

**PENGARUH SHOCK TERMAL ETANOL DENGAN LAMA PERENDAMAN
YANG BERBEDA TERHADAP PARTHENOGENETIS ARTIFISIAL OOSIT**

IKAN LELE DUMBO (*Clarias sp.*)

**SKRIPSI
MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN
(BUDIDAYA PERAIRAN)**

**OLEH :
AHMAD SYARIFUDIN HABIBI**

0310850001



UNIVERSITAS BRAWIJAYA

FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

MALANG

2009

**PENGARUH SHOCK TERMAL ETANOL DENGAN LAMA PERENDAMAN
YANG BERBEDA TERHADAP PARTHENOGENETIS ARTIFISIAL OOSIT
IKAN LELE DUMBO (*Clarias sp.*)**

**Skripsi sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar
Sarjana pada Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya**

**OLEH :
AHMAD SYARIFUDIN HABIBI**

0310850001

Dosen Penguji I

(Ir. Bambang Susilo Widodo)

Tanggal:

Dosen Penguji II

(Yunita Maimunah, Spi, MSc)

Tanggal:

Menyetujui,

Dosen Pembimbing I

(Ir. Agoes Soeprijanto, MS)

Tanggal:

Dosen Pembimbing II

(Ir. Soelistyowati)

Tanggal:

Mengetahui,

Ketua Jurusan MSP

(Dr. Ir. Happy Nursyam, MS.)

Tanggal:

DAFTAR ISI

| | Halaman |
|--|---------|
| RINGKASAN | iii |
| KATA PENGANTAR | v |
| DAFTAR ISI | vi |
| DAFTAR GAMBAR | viii |
| DAFTAR TABEL | ix |
| DAFTAR LAMPIRAN | x |
| 1. PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1 Latar Belakang | 1 |
| 1.2 Perumusan Masalah | 3 |
| 1.3 Tujuan Penelitian | 4 |
| 1.4 Kegunaan Penelitian | 4 |
| 1.5 Hipotesis | 4 |
| 1.6 Tempat dan Waktu | 5 |
| 2. TINJAUAN PUSTAKA | 6 |
| 2.1 Biologi ikan lele dumbo | 6 |
| 2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi | 6 |
| 2.1.2 Habitat | 8 |
| 2.2 Perkembangan telur ikan | 9 |
| 2.3 Embriogenesis | 13 |
| 2.3.1 Pembelahan sel Zigot (<i>cleavage</i>) | 14 |
| 2.3.2 Stadia morula | 15 |
| 2.3.3 Blastulasi | 16 |
| 2.3.4 Gastrulasi | 18 |
| 2.3.5 Organogenesis | 22 |
| 2.3.6 Penetasan | 23 |
| 2.4 Proses Aktivasi Telur | 25 |
| 2.4.1 Parthenogenesis Artifisial | 27 |
| 2.4.2 Kejutan suhu pada telur | 30 |
| 2.4.3 Pengaruh Aktivasi etanol | 35 |
| 2.5 Kualitas air | 37 |
| 2.5.1 Suhu | 37 |
| 2.5.2 Derajat keasaman (pH) | 38 |
| 2.5.3 Oksigen terlarut (DO) | 38 |

| | |
|---|----|
| 3. MATERI DAN METODE PENELITIAN | 40 |
| 3.1 Materi Penelitian | 40 |
| 3.1.1 Alat Penelitian..... | 40 |
| 3.1.2 Bahan Penelitian..... | 41 |
| 3.2 Metode dan Rancangan Penelitian | 41 |
| 3.2.1 Metode Penelitian..... | 41 |
| 3.2.2 Rancangan Penelitian | 41 |
| 3.3 Prosedur Penelitian | 44 |
| 3.3.1 Persiapan Penelitian | 44 |
| 3.3.2 Pembuatan Larutan Ethanol 7% | 44 |
| 3.3.3 Persiapan Induk..... | 45 |
| 3.3.4 penyuntikan hormone pada induk..... | 45 |
| 3.3.5 Stripping Induk | 45 |
| 3.3.6 Perlakuan kontrol normal..... | 46 |
| 3.3.7 Perlakuan <i>ethanol thermal shock</i> | 46 |
| 3.3.8 Pengamatan Perkembangan Telur..... | 46 |
| 3.6 Parameter Uji | 47 |
| 3.4.1 Parameter Uji Utama | 47 |
| 3.4.2 Parameter Uji Penunjang | 47 |
| 3.5 Analisa Data | 47 |
| 4. HASIL DAN PEMBAHASAN | 49 |
| 4.1 Perkembangan Oosit | 49 |
| 4.1.1 Fase Pembelahan 4 sel | 49 |
| 4.1.2 Fase Pembelahan 8 sel | 50 |
| 4.1.3 Fase Morula..... | 52 |
| 4.1.4 Fase Blastula | 55 |
| 4.1.5 Perkembangan oosit seluruh fase..... | 58 |
| 4.2 Pembahasan Perkembangan Oosit Ikan Lele Dumbo | 59 |
| 4.3 Kualitas Air | 64 |
| 4.3.1 Suhu | 64 |
| 4.3.2 pH..... | 65 |
| 4.3.3 Oksigen terlarut..... | 66 |
| 5. KESIMPULAN DAN SARAN | 67 |
| 5.1 Kesimpulan | 67 |
| 5.2 Saran | 68 |
| DAFTAR PUSTAKA | 69 |
| LAMPIRAN | 72 |

I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Di Indonesia dikenal banyak jenis ikan lele, diantaranya ikan lele lokal (*Clarias batracus*), lele dumbo (*Clarias gaerlepinus*), lele phiton (*Clarias sp*), dan lele babon (*Clarias sp*). Namun, yang banyak dibudidayakan hanya ikan lele lokal dan ikan lele dumbo. Jenis ikan lele dumbo yang lebih banyak dikembangkan karena pertumbuhan lebih cepat dan ukurannya lebih besar daripada ikan lele lokal

Pengelolaan budidaya ikan (khususnya ikan lele) perlu memperhatikan efisiensi dan produktifitas usaha serta kualitas ikan. Hal ini harus diimbangi dengan upaya perbaikan dan peningkatan kualitas induk maupun benih ikan lele. Saat ini disinyalir telah terjadi penurunan kualitas induk maupun benih ikan lele yang dipelihara oleh petani ikan. Beberapa usaha maupun penelitian telah dilakukan dalam upaya peningkatan produktivitas (produksi) dan perbaikan serta peningkatan kualitas genetik ikan lele seperti program seleksi, manipulasi jenis kelamin melalui perlakuan hormonal maupun manipulasi kromosom

Embrio dalam telur berkembang menjadi larva dan akan menetas melalui proses mekanis yang dibantu oleh produksi enzim dari dalam sel telur. Waktu perkembangan dan penetasan telur ini tidak dapat diperkirakan. Perkembangan dan penetasan telur dipengaruhi temperatur air dalam inkubator dan akan berlangsung lebih cepat pada kondisi air yang hangat, karena suhu air yang hangat dapat mempengaruhi proses metabolisme dan mempercepat produksi material pelarut

cangkang telur yang akan menyebabkan penetasan secara prematur sehingga larva-larva yang dihasilkan lemah

Parthenogenesis adalah terjadinya embrio tanpa adanya fertilisasi (pembuahan). Ini terjadi pada ikan-ikan tropis (*Peocilia formosa*). Dalam hal ini sperma hanya memacu perkembangan sel telur, tanpa menurunkan hereditas yang dimiliki. Embrio yang dihasilkan selain berkelamin betina yang tidak mempunyai sifat-sifat genotip jantan.

Parthenogenetik adalah salah satunya proses reproduksi yang sama sekali tidak memerlukan peran pejantan, organisme betina menghasilkan telur yang berkembang tanpa pembuahan oleh sperma dan menghasilkan individu baru yang identik dengan sifat induk betina

Penelitian tentang aktivasi artifisial parthenogenesis dapat meningkatkan homozygositas turunan yang hanya berasal dari turunan maternal, turunan ini dapat menjadi aspek dalam pemuliaan ikan lele.

1.2 Perumusan Masalah

Perkembangan budidaya yang pesat tanpa didukung oleh kontrol yang baik terhadap penggunaan induk telah mengakibatkan terjadinya perkawinan sekerabat (*inbreeding*) yang tinggi. Perkawinan sekerabat ini telah menyebabkan terjadinya ketidakstabilan pertumbuhan ikan yang ditandai oleh adanya penurunan pertumbuhan pada produksi pembenihan dan pembesaran

Untuk mendekatkan kembali mutu benih ikan lele dumbo saat ini kepada asalnya, perlu dilakukan perbaikan-perbaikan pada proses produksi induk lele dumbo.

Perbaikan mutu lele dumbo dapat dilakukan dengan beberapa strategi, antara lain dengan cara seleksi, hibridisasi, silang-balik, ginogenesis maupun transgenik

Banyaknya strain ikan lele yang berkembang di masyarakat merupakan salah satu masalah yang perlu kita hadapi sekarang ini, dengan banyaknya strain ini masyarakat kesulitan untuk mencari indukan murni dari setiap ikan lele tersebut, beberapa cara yang dapat dilakukan untuk mengatasi masalah ini adalah perlunya pemuliaan galur murni dan peningkatan homozygositas kemurnian, dimana peningkatan homozygositas kemurnian dapat dilakukan dengan aktivasi artifisial.

Parthenogenesis artifisial merupakan pemijahan buatan yang ditujukan untuk mendapatkan biakan yang memiliki sifat dan karakter murni dari induk betina saja. Metode ini dilakukan dengan memasukkan parameter kimia, seperti penambahan zat kimia serta parameter fisika yakni kejutan suhu. Hal ini dilakukan sebagai usaha untuk menggantikan peran sperma dalam proses aktivasi oosit ikan. Dengan ini diharapkan oosit yang teraktivasi akan berkembang tanpa menurunkan sifat dari induk jantan.

Fertilisasi merupakan proses yang sangat penting, sebagai titik awal perkembangan individu, namun sebagaimana kita ketahui, sperma bukanlah merupakan satu-satunya alat untuk merangsang telur supaya berkembang. Dalam perkembangan teknologi kultur in vitro, kejadian embrio partenogenetik dapat diupayakan melalui aktivitas oosit dengan menggunakan bahan kimia (etanol), aliran listrik ataupun proses maturasi. Telur mamalia dapat berkembang melalui parthenogenesis artifisial dengan menggunakan arus listrik dan pendinginan ataupun pemanasan (*thermal shock*) dan penelitian dengan menggunakan cara ini telah

dilakukan pada kelinci dan beberapa species lainnya. Telur mamalia dapat membelah (*cleavage*) dan membentuk blastodisk sebagai reaksi terhadap kejutan temperatur. Hal ini memperlihatkan bahwa sampai pada tingkat tertentu, fungsi spermatozoa sebagai pemacu perkembangan dapat digantikan oleh yang lain, walaupun tidak sempurna apabila difertilisasi oleh spermatozoa. Penelitian dengan *thermal shock* telah dilakukan pada oosit tikus dengan perlakuan *thermal shock* sebesar 44° hingga 45°C. Seluruh oosit pada fase pembelahan 8 sel, morula, hingga blastula dipastikan menjadi diploid. Oosit berkembang dengan baik pada perlakuan 44,5° C selama 5 menit dan perkembangan oosit pada parthenogenesis dengan perlakuan thermal shock berjalan lambat daripada kontrol normal. Aktivasi buatan pada telur dapat dilakukan dengan etanol. Penggunaan etanol dapat menginduksi peningkatan konsentrasi calcium (Ca^{2+}) sehingga memicu proses aktivasi telur

Perlakuan perendaman etanol dengan dosis 7% mencegah terjadinya peloncatan polar body 2 sehingga dapat mengubah fisiologi ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*). Adapun perlakuan ini didasarkan pada penelitian yang dilakukan oleh Ciptadi (2002) menjelaskan bahwa aktivasi embrio parthenogenesis oosit kambing dengan perendaman ethanol 7% selama 7 menit didapatkan persentasi jumlah oosit yang mengalami cleavage selama 48 jam adalah 26%, lebih besar dibandingkan kontrol yang hanya 4%.

Dengan menggunakan metode parthenogenesis artifisial diharapkan dapat memproduksi benih yang meningkat homozygotitasnya karena pada parthenogenesis dapat menghasilkan individu yang berasal dari keturunan genetik indukan betina (maternal).

Mengacu pada referensi dari beberapa penelitian diatas, maka dilakukan penelitian partenogenetik artifisial ini dengan menggunakan ethanol thermal shock dengan perbedaan lama perendaman Pada penelitian kali ini peran dan fungsi sperma digantikan oleh perlakuan ethanol thermal shock 7% dan suhu 40⁰C.

1.3 Tujuan penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ethanol thermal shock dengan penggunaan suhu yang berbeda sebagai aktivasi artifisial parthenogenesis telur ikan lele dumbo (*Clarias sp.*) yang diharapkan dapat memproduksi turunan maternal.

1.4 Kegunaan penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi salah satu dasar penelitian untuk mendapatkan turunan yang homozygot, dan untuk jangka panjangnya dapat dijadikan program pemuliaan ikan lele dumbo.

1.5 Hipotesis

Ho : Diduga pemberian etanol *thermal shock* dengan lama perendaman yang berbeda tidak berpengaruh terhadap partenogenetik artifisial oosit ikan lele dumbo (*Clarias Sp.*).

H1 : Diduga pemberian etanol *thermal shock* dengan lama perendaman yang berbeda berpengaruh terhadap partenogenetik artifisial oosit ikan lele dumbo (*Clarias Sp.*).

1.6 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi dan Reproduksi Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya pada bulan Mei 2009.



II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biologi Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*)

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*)

Menurut Khairuman (2002) ikan lele dumbo termasuk :

Phylum : Chordata

Subphylum : Vertebrata

Klass : Pisces

Sub kelas : Teleostei

Ordo : Ostariophysi

Subordo : Silaroidae

Famili : Clariidae

Genus : *Clarias*

Spesies : *Clarias gariepinus*



Gambar 1. *Clarias gariepinus*

Di Indonesia ada 6 (enam) jenis ikan lele yang dapat dikembangkan yaitu:

- *Clarias batrachus*, dikenal sebagai ikan lele (Jawa), ikan kalang (Sumatera Barat), ikan maut (Sumatera Utara) dan ikan pintet (Kalimantan Selatan).
- *Clarias teysmani*, dikenal sebagai lele Kembang (Jawa Barat), Kalang putih (Padang).
- *Clarias melanoderma*, yang dikenal sebagai ikan duri (Sumatera Selatan), wais (Jawa Tengah), wiru (Jawa Barat).

- *Clarias nieuhofi*, yang dikenal sebagai ikan lindi (Jawa), limbat (Sumatera Barat), kaleh (Kalimantan Selatan).
- *Clarias loiacanthus*, yang dikenal sebagai ikan keli (Sumatera Barat), ikan penang (Kalimantan Timur).
- *Clarias gariepinus*, yang dikenal sebagai lele Dumbo (Lele Domba), King cat fish, berasal dari Afrika.

Persebaran ikan ini melampaui batas benua, sehingga membuatnya dikenal dengan berbagai nama internasional seperti *mali* (Afrika), *plamond* (Thailand), ikan *keli* (Malaysia), *gura magura* (Srilangka), *ca tre trang* (Jepang). Istilah dalam bahasa Inggris-pun cukup beragam, mulai dari *catfish*, *siluroid*, *mudfish* dan *walking catfish*.

Beberapa keterangan menyatakan bahwa lele dumbo (*Clarias gariepinus*) merupakan hasil persilangan lele lokal yang berasal dari Afrika dengan lele lokal dari Taiwan.

Ciri-ciri morfologis ikan lele adalah ikan ini tidak bersisik dan licin, berwarna gelap pada bagian punggung dan sisi tubuh. Bila kena sinar, kulitnya berubah menjadi lebih terang. Bila dalam keadaan stres, kulitnya nampak seperti mosaik berwarna gelap dan totol-totol putih (terang).

Sistem Urogenital pada ikan jantan dan betina lubang urogenital terletak pada papilla tepat di belakang anus. Ikan jantan dewasa dapat dibedakan dari betina karena papillanya menjulur memanjang ke belakang. Papilla Catfish betina berbentuk oval pada tahap fingerling papillanya belum berkembang (Richter, C.J.J dan Rustidja, 1985).

2.1.2 Habitat (lingkungan hidup)

Semua perairan tawar dapat menjadi lingkungan hidup atau habitat lele dumbo, misalnya waduk, danau, rawa dan genangan air tawar lainnya. Di alam bebas, lele dumbo ini memang lebih menyukai air yang arusnya mengalir secara perlahan atau lambat. Terhadap aliran air/arus yang deras lele dumbo kurang menyukainya. Oleh karena itu, sungai yang arusnya lambat sering terdapat lele.

Walaupun lele dumbo jelas mendiami perairan tawar, namun sering terdapat pada perairan agak asin dan payau pada kisaran salinitas tertentu. Lele dumbo asal Afrika ternyata toleransi terhadap suhu air yang cukup tinggi yaitu 20⁰C -25⁰C. Di samping itu, ia dapat hidup pada kondisi lingkungan yang jelek. Dengan kata lain, kondisi air yang kandungan oksigennya sangat minim lele dumbo masih dapat bertahan hidup, karena lele dumbo dikaruniai alat pernafasan tambahan yang disebut organ arborescent. (Santoso, 1994).

Cat fish Afrika (*Clarias gariepinus*, Burch) tersebar luas di seluruh Afrika, terdapat di rawa-rawa tropis, danau-danau dan sungai-sungai yang dapat menjadi kering pada musim panas. Di Afrika Utara dan Tengah terdapat jenis Cat Fish *Clarias lazera*, di Afrika Barat *Clarias mossambicus* dan di Afrika Selatan terdapat *Clarias gariepinus* (Rustidja dan Richter C. J. J., 1985).

Siklus reproduksi ikan *Clarias gariepinus* di sebagian besar negara Afrika mulai terjadi pada awal musim hujan. Rupa-rupanya stimulus bagi ikan untuk berpijah ada hubungannya dengan naiknya permukaan air dan adanya banjir di daerah-daerah pinggiran. Peristiwa pemijahan ini terjadi di air antara kumpulan-kumpulan lele jantan dan betina. Kedalaman air sering kurang dari 10 cm dan

terletak di tepi danau atau kolam. *Clarias gariepinus* berpijah di tempat yang terlindung pada bermacam-macam substrat termasuk serat sisal, daun-daun palma dan batu-batu. Selama percumbuan yang dapat berlangsung beberapa jam, telur dikeluarkan dalam satu kelompok dan dibuahi dengan sperma. Dengan mengibaskan ekornya pada telur tadi ikan betina menyebarkan telur-telur ini meliputi daerah yang luas sampai akhirnya telur-telur menempel pada tumbuhan yang digenangi air. Telurnya tidak dijaga oleh induknya. Setelah bertelur, kumpulan ikan ini kembali ke air yang lebih dalam. Setelah beberapa minggu ikan ini telah siap untuk berpijah lagi dan kegiatan yang kedua dapat dimulai lagi tergantung pada curah hujan atau datangnya air dari sumbernya. Dengan jalan ini pemijahan dapat terjadi berkali-kali dalam satu tahun. Telur-telur ini akan menetas sekitar 24-28 jam, tergantung dari temperatur airnya (Effendie, 2002).

2.2 Perkembangan Telur Ikan

Menurut Wallace dan Selman (1981) dalam Fujaya (2004), perkembangan telur ikan secara umum meliputi empat tahap, yakni : awal pertumbuhan, tahap pembentukan kuning telur, tahap vitelogenesis, dan tahap pematangan. Pertumbuhan awal adalah terjadinya pelepasan hormon gonadotropin (GtH-independent) yang dicirikan dengan bertambahnya ukuran nukleus dan jumlah nukleolus. Sejumlah besar dari RNA disimpan dalam sitoplasma sel telur sebagai bekal bagi embrio untuk menghasilkan protein dari dirinya sendiri sebagai cadangan.

Tahap perkembangan kantung kuning telur, dicirikan dengan terbentuknya kantung atau vesikel. Pada perkembangan telur selanjutnya, kantung kuning telur ini

akan membentuk kortikal alveoli yang berisi butir-butir korteks. Tahap ini juga dicirikan dengan terbentuknya zona radiata, perkembangan ekstraselular dan bakal korion.

Vitelogenesis, dicirikan oleh bertambah banyaknya volume sitoplasma yang berasal dari luar sel, yakni kuning telur atau disebut juga vitelogenin. Vitelogenin disintesis oleh hati dalam bentuk lipophosphoprotein-calsium kompleks dan hasil mobilisasi lipid dari lemak viseral. Selanjutnya, kuning telur dibawa oleh darah dan ditransfer ke dalam sel telur secara endositosis (Fujaya,2004).

Menurut Zairin (2003) dalam Anonymous (2007)_b, Vitelogenesis dan diferensiasi oosit diawali dengan adanya sinyal lingkungan seperti hujan, perubahan suhu atau ketersediaan substrat untuk penempelan telur yang diterima oleh sistem syaraf pusat dan diteruskan ke hipotalamus. Hipotalamus akan merespon sinyal tersebut dengan melepaskan 2 GnRH (Gonadotropin Releasing Hormon) yang bekerja di kelenjar hipofisis. Selanjutnya kelenjar hipofisis akan melepaskan hormon gonadotropin I yang bekerja di lapisan teka pada oosit. Akibat kerja hormon gonadotropin I, lapisan teka akan mensintesis testosteron dan di lapisan granulosa, testosteron akan diubah menjadi estradiol-17 β oleh enzim aromatase. Estradiol-17 β akan merangsang hati untuk mensintesis vitelogenin yang merupakan bakal kuning telur. Melalui aliran darah, vitelogenin akan diserap secara selektif oleh lapisan folikel oosit.

Tahap akhir dari perkembangan telur adalah tahap pematangan, yakni tahap pergerakan germinal vesikel ke tepi dan akhirnya melebur (germinal vesicle break

down) selanjutnya membentuk pronuklei dan polar bodi II. Letak germinal vesicle dan butir-butir korteks telur yang belum terbuahi.

Menurut Graff dan Jansen (1996) dalam Anonymous (2007)_b terdapat delapan fase perkembangan oosit, adapun perkembangan – perkembangan dari sel telur tersebut adalah sebagai berikut :

Fase I: oogonia, Sel-selnya berbentuk oval dan berukuran kecil (7.5-10 μm). Pada saat ini terlihat adanya nucleolus kromatin (cn) dan tahap awal perinukleolus (ep).

Fase II: oosit nucleolus kromatin. Pada fase ini terdapat sedikit sitoplasma, dan posisi inti sudah mulai nampak. Oosit sudah berukuran 20-30 μm .

Fase III: tahap awal oosit perinukleolus. Pada fase ini, ukurannya sudah bertambah menjadi 38-48 μm dan sudah mempunyai sitoplasma basofil dan membrane sel yang disebut karioteka.

Fase IV: tahap akhir oosit perinukleolus. Oosit berukuran 69-85 μm .

Fase V: vesikel kuning telur. Oosit berukuran 195-210 μm , bentuk nucleus tidak beraturan dan posisi nukleoli berada di zona peripheral. Zona radiata atau korion, berada antara oosit dan sel folikel.

Fase VI: vitelogenesis Oosit. berukuran antara 570-750 μm dan menunjukkan adanya deposisi ekstra-vesikular kuning telur didalam zona radiate. Nukleus mempunyai garis tepi yang tidak beraturan dan mengandung beberapa nucleolus periferikal.

Fase VII: oosit vitellogenik (matang). Ukuran sel ovarii menjadi (850-1020 μm) dan mempunyai granula protein kuning telur (protein vitellus) dan vesikel kortikal

(lipid vitellus). Ukuran vesikel kuning telur bertambah, demikian juga dengan granula kuning telur.

Fase VIII: folikel post-ovulatory. Setelah matang, folikel pecah dan oosit dilepaskan. Tahap ini juga biasa disebut dengan istilah GVBD (germinal vesicle break down).

2.3 Fertilisasi

Fertilisasi pada hewan air khususnya ikan ada dua cara yaitu fertilisasi internal dan eksternal (alami). Kalau untuk ikan secara umum melalui pembuahan eksternal, sedangkan untuk hewan air lainnya misalnya ikan paus dengan cara pembuahan internal. Adapun dalam penelitian ini cara fertilisasi yang digunakan adalah fertilisasi buatan, yaitu dengan cara mencampur telur ikan dari ikan resipien dengan sperma ikan yang telah disediakan. Sperma ikan diteteskan ke dalam telur kemudian digoyang-goyangkan selama kurang lebih satu menit supaya telur dan sperma tercampur merata dan telur dapat terbuahi seluruhnya (Subowo, 1995).

Tahap penting dari fertilisasi, yaitu awal persatuan antara sel mani dan sel telur. Yang menjadi masalah utama, mengapa persatuan tersebut hanya berlangsung antara sel telur dan sel mani tertentu saja, mengapa tidak terjadi persatuan antara sel telur dengan sel telur, mengapa tidak terjadi persatuan antara sel mani yang berbeda spesiesnya, proses yang harus dilewati sel mani untuk bertemu dengan sel telur yaitu dinamakan dengan kapasitasasi. Diduga pada saat kapasitasasi terjadi perubahan susunan kimia membran sel mani sehingga pada saat bersatu dengan sel telur, membran plasma mani terikat dengan molekul glikoprotein dari zona pellucida sel telur (Subowo, 1995).

Apabila membran plasma pada ujung sel mani telah dapat kontak dengan membran plasma sel telur maka bersatulah kedua membran tersebut yang diikuti oleh masuknya bahan inti sel mani ke dalam sel telur. Persatuan membran plasma sel mani dan sel telur juga akan memacu aktivasi sel telur yang dimulai dengan peningkatan aktivasi sintesis DNA sehingga terjadilah pembelahan sel telur (Subowo, 1995).

2.4 Embriogenesis

Menurut Tang dan Ridwan (2000), embriogenesis merupakan masa perkembangan sejak pembuahan sampai ikan mendapat makanan dari luar. Sedangkan embrio adalah makhluk yang sedang berkembang sebelum makhluk tersebut mencapai bentuk definitif seperti bentuk makhluk dewasa.

Tipe pembelahan pada embrio ikan adalah disoidal cleavage, sama halnya dengan unggas dan reptil, setelah fertilisasi sitoplasma mengalir ke daerah kutub animal membentuk gundukan yang disebut *Blastodise*. Pembelahan tidak berlanjut menembus kuning telurnya. Akibatnya setiap sel yang terbentuk pada belahan yang awal akan terikat pada puncak dan pada sisinya dengan membran sel, tetapi dasar selnya berhubungan langsung dengan kuning telur, pembelahan ini disebut juga pembelahan parsial (Kimball, 1994).

2.4.1 Pembelahan Sel Zigot (*Cleavage*)

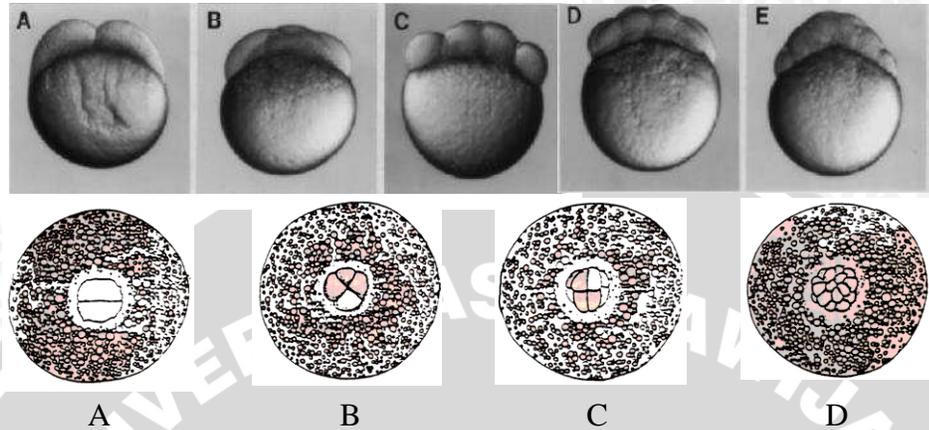
Pembelahan zygot (*cleavage stage*) merupakan rangkaian mitosis yang berlangsung berturut-turut segera setelah terjadi pembuahan. Pembelahan zygot berlangsung cepat sehingga sel anak tidak sempat tumbuh sehingga besar sel anak makin lama makin kecil sesuai tingkat pembelahan. Akibat pembelahan

menghasilkan kelompok sel anak yang disebut morula dan sel anak disebut blastomer. Blastomer melekat satu sama lain oleh kekuatan saling melekat yang disebut tigmotaksis (Tang dan Ridwan, 2000).

Menurut Woynarovich (1980), pada saat *swelling* atau perkembangan telur telah lengkap, telur mengalami dua fase yaitu inti menjadi bentuk yang lebih dibedakan, baik dari bentuk maupun warna. Kutub animal berkembang berbentuk bukit kecil dan kuning telur berkembang menjadi warna kuning gelap dimana proses tersebut tergantung dari temperatur air. Pembelahan kutub animal dimulai dari satu sel berturut-turut menjadi 2, 4, 8, 16 dan 32 sel. Stadia ini terlihat seperti buah *mulberry* dan hal ini merupakan akhir dari fase banyak sel atau blastoderm yang dimulai dari satu selaput sel yang kemudian secara berangsur-angsur berkembang menjadi beberapa selaput sel.

Pembelahan pertama berlangsung melalui bidang vertikal telur atau sejajar dengan sumbu yang menghubungkan kutub-kutub animal dan vegetal. Dari cara pembelahan ini akan diperoleh sel yang terletak simetris. Pembelahan berikutnya juga berlangsung melalui bidang vertikal sehingga sampai sekarang telah dihasilkan empat buah sel yang berukuran yang sama besar. Pembelahan ketiga melalui bidang horizontal yang letaknya sedikit di atas garis tengahnya dari empat sel tadi, sehingga dari pembelahan tersebut akan diperoleh 2 kelompok sel. Empat buah sel yang berukuran lebih besar terdapat di bawah empat buah sel yang berukuran lebih kecil. Selanjutnya, sampai pembelahan yang ke-12 pertama, sel-sel membelah masing-masing dalam waktu yang sama, tetapi pembagiannya asimetri sehingga bagian sel

sebelah bawah (sel vegetal) berukuran lebih besar dan jumlahnya lebih sedikit daripada bagian atasnya (Subowo, 1995).



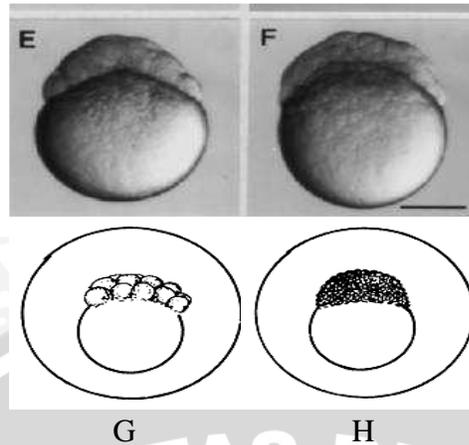
Gambar 2. Pembelahan cleavage (Anonymous, 2006)

Keterangan : A. 2 sel; B. 4 sel; C. 8 sel; D. 16 sel; E. 32 sel

2.4.2 Stadia Morula

Stadia morula dimulai saat pembelahan mencapai 32 sel. Pada saat ini ukuran sel mulai beragam. Sel membelah secara melintang dan mulai terbentuk formasi lapisan kedua secara samar pada kutub animal. Stadia morula berakhir apabila pembelahan sel sudah menghasilkan blastomer yang ukurannya sama tetapi ukurannya lebih kecil. Sel tersebut memadat untuk menjadi blastodisk kecil membentuk dua lapisan sel (Tang dan Ridwan, 2000).

Pada stadia morula, perkembangan embrio sangat sensitif terhadap guncangan dan sel tersebut mudah terlepas dari permukaan sehingga menyebabkan kematian dari embrio dalam sel terbentuk ruang yang berukuran kecil antara kuning telur dan masa sel yang disebut *segmentation cavity*.



Gambar 3. Pembelahan morula (Anonymous, 2006)
Keterangan : E, G. 32 sel (morula awal); F, H. 64 sel (morula akhir)

2.4.3 Blastulasi

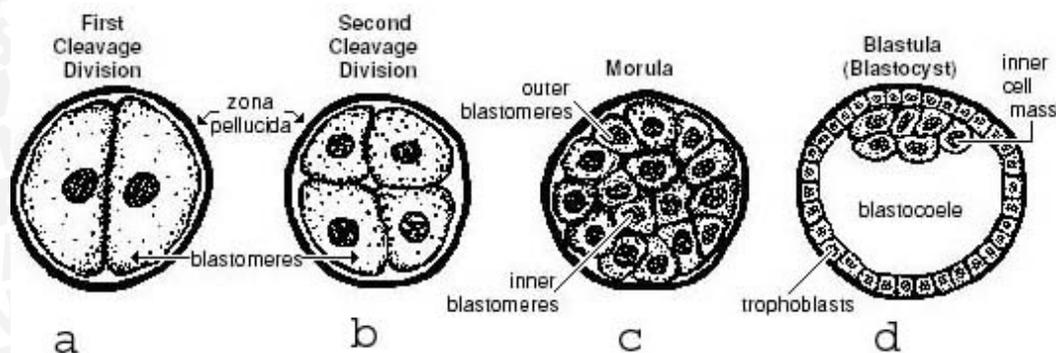
Menurut Nelsen (1954) dalam Effendie (2002) sel yang menempel kuning telur membuat penjuruan plasma ke bagian dalam sehingga seperti lapisan di bawah mangkuk terbalik. Lapisan itu dinamakan periblast atau tropoblast yang erat hubungannya dengan substansi kuning telur. Rongga yang ada didalamnya dinamakan blastocoel. Stadium demikian dinamakan stadium blastula awal.

Sebagai kelanjutan stadium Blastula awal ialah stadia blastula dimana sel-selnya terus mengadakan pembelahan dengan aktif sehingga ukuran sel-selnya semakin menjadi kecil. Pada stadia blastula ini terdapat dua macam sel yaitu sel formatif dan non formatif. Sel formatif masuk ke dalam komposisi tubuh embrionik, sedangkan sel non formatif sebagai tropoblast yang ada hubungannya dengan nutrisi embrio. Sel blastoderm yang kelak akan menjadi bagian depan embrio, lapisannya menjadi tebal. Sel-sel bagian pinggir blastoderm yang dekat kuning telur juga lapisannya menjadi tebal yang dinamakan cincin kecambah. Pada saat stadium blastula ini terdapat daerah sel yang dapat diperkirakan atau dipetakan menjadi

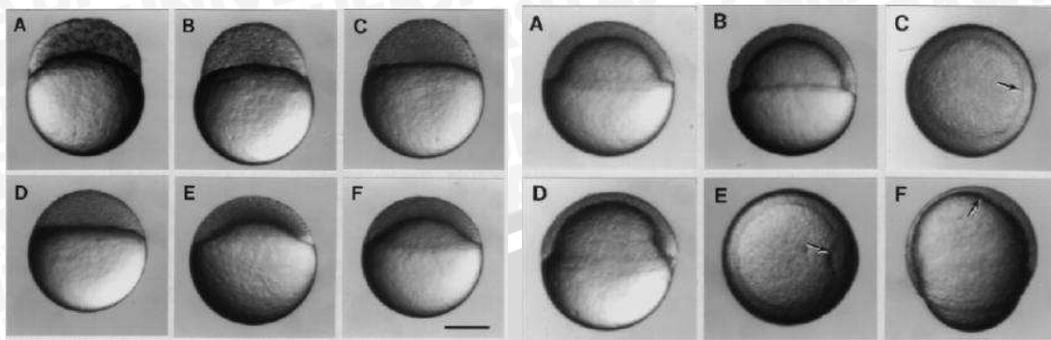
lapisan ectoderm (epiblast), entoderm (hypoblast), dan mesoderm (mesoblast) (Effendie, 2002).

Blastulasi merupakan proses pembentukan blastula, dimana kelompok sel-sel anak hasil pembelahan berbentuk benda yang relatif bulat dan ditengahnya terdapat rongga. Thropoblast terletak diantara kuning telur dan sel-sel blastoderm dan membungkus semua kuning telur tersebut. Pada blastula ini sudah terdapat daerah yang akan berdiferensiasi membentuk organ-organ tertentu seperti sel-sel saluran pencernaan, notochorda, syaraf dan epiderm, eksoderm, mesoderm dan endoderm. Bentuk dan fungsi beberapa bagian blastula terjadi melalui diferensiasi yakni sebuah atau sekelompok sel mengalami perubahan secara kimia, bentuk dan fungsi. Diferensiasi kimia merupakan langkah awal untuk diferensiasi-diferensiasi berikutnya dan sifatnya menentukan atau membatasi kegiatan sel ke arah fungsi tertentu (Fujaya, 1999).

Pada akhir proses blastulasi, sel-sel blastoderm akan terdiri atas neural, epidermal, notokhordal, mesodermal dan endodermal yang merupakan bekal pembentukan organ-organ (Murtidjo, 2001).



Gambar 4. a) pembelahan 2 sel; b) pembelahan 4 sel; c) Morula; d) Blastula



I.

II.

Gambar 5 : Pembelahan blastula

Keterangan : A-E I : morula akhir, FI :Blastula awal,

A-DII : Blastula; E-F II : Blastula Akhir

(Anonymous, 2006)

2.4.4 Gastrulasi

Gastrulasi adalah proses pembentukan tiga daun kecambah yaitu ektoderm, mesoderm dan endoderm. Proses ini umumnya sama bagi ikan yang pembelahan telurnya meroblastik. Gastrulasi ini erat kaitannya dengan pembentukan sistem syaraf (neurolasi) sehingga merupakan periode kritis. Pada proses ini terjadi perpindahan daerah ektoderm, mesoderm dan endoderm serat notokorda menuju tempat yang definitif. Ektoderm adalah lapisan luar dari gastrula, disebut juga ektoblas atau epiblas. Endoderm adalah lapisan sel-sel terdalam pada gastrula, sedangkan mesoderm atau mesoblast adalah lapisan sel lembaga yang terletak di tengah antara ektoderm dan endoderm (Fujaya, 1999).

Gastrula sebagai kelanjutan dari stadium blastula lapisannya berkembang dari satu menjadi dua lapis sel. Awal dari gastrulasi ini terjadi begitu stadium blastula

selesai. Proses pembelahan sel dengan pergerakannya berjalan lebih cepat daripada dalam stadium blastula. Dalam garis besarnya proses pergerakan sel dalam stadium gastrula ada dua macam yaitu epiboly dan emboly. Epiboly ialah suatu gerakan sel-sel yang kelak dianggap akan menjadi epidermis dan daerah persyarafan, dimana pergerakannya itu ke depan, ke belakang dan juga ke sampingnya dari sumbu yang akan menjadi embrio. Jadi dengan epiboly akan terjadi penutupan kuning telur kecuali di tempat yang dinamakan blastopore. Sedangkan emboly ialah pergerakan sel yang arahnya menuju ke bagian dalam terutama di ujung sumbu bakal embrio.

Dalam proses emboly ini ada beberapa pergerakan yang satu sama lain dapat dibedakan dan diantaranya ialah : involusi, invaginasi dan delaminasi. Involusi ialah pergerakan sel dengan rotasi menuju ke bagian dalam di daerah pinggir blastopore. Di dalam proses ini sel-sel pinggir blastopore akan masuk menjadi lapisan di bawahnya. Invaginasi ialah proses mendalamnya lapisan sel yang akan membentuk suatu lekukan dimana di pinggirnya terdapat penonjolan. Delaminasi ialah pemisahan beberapa kelompok sel, terutama dari lapisan ectoderm, kemudian membuat lapisan baru yaitu lapisan mesoderm (Effendie, 2002).

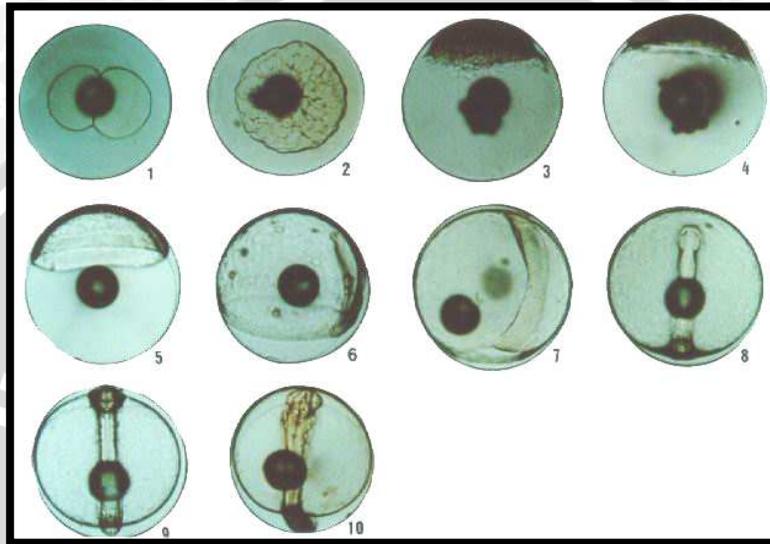
Pada proses gastrulasi terjadi pergerakan massa sel yakni epiboli dan emboli. Epiboli meliputi pergerakan sepanjang sumbu antero-posterior dan meluas ke tepi (divergensi). Pergerakan ini mencakup pergerakan bakal epidermis dan daun syaraf serta erat kaitannya dengan pengaturan daerah daun syaraf dan epidermis. Gerakan epiboli di sebelah luar, diikuti oleh gerakan di sebelah dalam embrio (gerakan eksistensi). Pergerakan emboli mencakup pergerakan involusi (bergerak ke dalam), invaginasi (melekuk dan melipat ke arah dalam), evaginasi (kebalikan dari

invaginasi), divergensi (memisahkan diri dari kelompok sel asalnya). Selain itu mencakup juga gerakan pemanjangan, pengluasan, penyempitan blastopore (Fujaya, 1999).

Gastrulasi mengubah embrio dalam bangunan yang berlapis tiga, yaitu: epitel sebelah dalam *endoderm*, epitel sebelah luar *eksoerm* dan lapisan di antaranya sebagai sel-sel *mesoderm* yang kemudian sel-selnya melepaskan diri dari ikatan epitel. Lapisan endoderm akan membentuk lapisan dalam dari usus dan jaringan turunnya seperti kelenjar pencernaan: lapisan ektoderm terutama akan membentuk epidermis dan susunan syaraf, sedangkan lapisan mesoderm akan membentuk sebagian besar jaringan otot, jaringan pengikat, susunan pembuluh peredaran dan saluran kencing dan kelamin (Subowo,1995).

Akhir dari proses gastrulasi apabila kuning telur sudah tertutup oleh lapisan sel. Bersamaan dengan selesainya proses gastrulasi, sebenarnya sudah dimulai awal pembentukan organ-organ (*organogenese*) yang didahului oleh semacam pembuatan bumbung oleh jaringan-jaringan epidermis, neural, mesoderm dan endoderm. Bumbung neural dibentuk dengan tenggelamnya lekukan neural yang berasal dari lapisan ectoderm. Organ yang dibentuk dari jaringan neural antara lain otak, ganglion dan mata. Organ yang berasal dari endoderm ialah lapisan bagian dalam alat pencernaan makanan dengan kelanjarnya dan juga sebagian dari kelenjar endocrine. Lapisan mesoderm dibagi menjadi tiga bagian yaitu bagian dorsal, intermediate dan lateral. Dari mesoderm bagian dorsal akan terbentuk menjadi somite yaitu semacam ruas yang terdapat pada embrio. Dari mesoderm intermediate diantaranya akan terbentuk ginjal dan gonad. Sedangkan dari mesoderm lateral akan terbentuk

pembungkus jantung dan pembungkus pembuluh darah. Di dalam somite terdapat sclerotom, myotome dan dermatome. Sclerotom kelak akan menjadi rangka axial, myotom menjadi urat daging dan dermatome akan menjadi dermis dengan derivatnya (Effendie, 2002).



Gambar 6. Pembelahan cleavage-organogenesis

Keterangan : G-L : Gastrula 1) 2 sel; 2) morula awal, 3) morula akhir, 4) Blastula, 5-7) gastrula 8-10) organogenesis (Anonymous, 2006)

2.4.5 Organogenesis

Organogenesis adalah proses pembentukan alat-alat tubuh makhluk yang sedang berkembang. Sistem organ tubuh berasal dari tiga daun kecambah yakni ektoderm, mesoderm dan endoderm. Dari ektoderm akan terbentuk saluran pencernaan beserta kelenjar-kelenjar pencernaan dan pernafasan. Sedangkan dari mesoderm akan terbentuk rangka, otot, sistem peredaran darah, ekskresi, alat reproduksi dan korium kulit. Derivat-derivat ektoderm selanjutnya adalah lapisan luar gigi, epitelium olfaktorius, syaraf, lensa mata. Bulu neutral muncul dari rigi neural yang terbenam

berasal dari ektoderm dan dari bulu neural tersebut terbentuk otak dan sumsum tulang belakang serta bagian dari mata yaitu retina, syaraf dan lainnya (Fujaya, 1999).

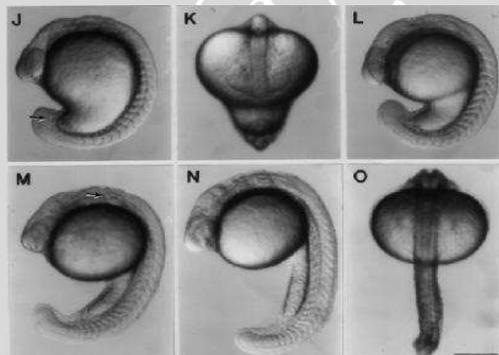
Mesodermal badan segera setelah terbagi menjadi dorsal, intermediate dan lateral. Mesoderm dorsal terbagi menjadi kelompok-kelompok somit. Tiap somit terbagi menjadi tiga bagian yaitu skelerotom, myotom dan dermatom. Skelerotom membentuk rangka axial, myotom berkembang menjadi otot tubuh, rangka apendicular, sirip dan otot-ototnya, dermatom berkembang menjadi jaringan-jaringan ikat dermis dan derivat-derivat kulit termasuk sisik dan lainnya (Fujaya, 1999).

Pembentukan semua organ tubuh hampir sempurna ketika telur akan menetas. Selama pembentukan organ tersebut, yaitu semenjak telur dibuahi, chorion menjadi semakin keras. Hal ini menunjukkan bahwa telur itu mengadakan perlindungan untuk menjaga gangguan dari luar selama proses pembentukan organ-organ sedang berjalan. Pada waktu akan menetas kekerasan chorion akan menurun kembali (Nikolsky, 1963. dalam Effendie, 2002).

2.4.6 Penetasan

Menetas merupakan saat terakhir masa pengeraman sebagai hasil beberapa proses sehingga embrio keluar dari cangkangnya. Pada saat akan terjadi penetasan seperti yang telah dikemukakan, kekerasan chorion semakin menurun. Hal ini disebabkan oleh substansi enzim dan unsur kimia lainnya yang dikeluarkan oleh kelenjar endodermal di daerah pharynx. Enzim ini dinamakan chorionase yang terdiri dari pseudokeratine yang kerjanya bersifat mereduksi chorion menjadi lembik (Effendie, 2002).

Menurut Murtidjo (2001), peristiwa penetasan terjadi jika embrio telah menjadi lebih panjang lingkaran kuning telur dan telah terbentuk perut. Selain itu, penetasan telur juga disebabkan oleh gerakan larva akibat peningkatan temperatur, intensitas cahaya dan pengurangan tekanan oksigen. Setelah telur menetas, embrio memasuki fase larva atau fase embrio yang masih berbentuk primitif dan sedang dalam proses perubahan untuk menjadi bentuk definitif dengan cara metamorfose. Pada ikan air tawar, fase akhir larva ditentukan oleh habisnya isi kantong kuning telur. Saat itu merupakan akhir dari bentuk. Dengan bentuk definitif, larva sudah ada lipatan sirip dan bintik pigmen (Murtidjo, 2001).



Gambar 7. J-L : Organogenesis dan M-O : Penetasan (perkembangan larva)

(Anonymous, 2006)

Semakin aktif embrio bergerak, maka akan semakin cepat terjadinya penetasan. Aktifitas embrio dan chorionase dipengaruhi oleh faktor dalam dan faktor luar. Faktor dalam antara lain antara lain hormon dan volume kuning telur. Pengaruh hormon misalnya adalah hormon yang dihasilkan oleh kelenjar hipofisa dan tyroid yang berperan dalam proses metamorfosa, sedangkan volume kuning telur berhubungan dengan perkembangan embrio. Faktor luar yang berpengaruh antara lain suhu, oksigen terlarut, pH, salinitas dan intensitas cahaya. Proses penetasan umumnya

berlangsung lebih cepat pada suhu yang lebih tinggi karena pada suhu yang tinggi proses metabolisme berjalan lebih cepat sehingga perkembangan embrio juga akan lebih cepat dan berakibat lanjut pada pergerakan embrio dalam cangkang yang lebih intensif. Namun demikian, suhu yang terlalu tinggi atau terlalu rendah dapat menghambat proses penetasan, bahkan suhu yang terlalu ekstrim atau berubah secara mendadak dapat menyebabkan kematian embrio dan kegagalan penetasan (Tang dan Ridwan, 2000).

Pada waktu akan terjadi penetasan, embrio sering mengubah posisinya karena kekurangan ruang di dalam cangkang. Dalam pergerakan-pergerakan tersebut bagian cangkang telur yang telah lembik akan pecah. Dengan dua atau tiga kali pembetulan posisi embrio mengatur dirinya lagi. Biasanya pada bagian cangkang yang pecah ujung ekor embrio dikeluarkan terlebih dahulu sambil digerakkan. Kepalanya dikeluarkan terakhir karena ukurannya lebih besar dibandingkan dengan bagian tubuh yang lainnya. tetapi banyak juga didapatkan kepala yang keluar lebih dahulu (Effendie, 2002).

Embrio akan tumbuh dalam telur yang telah dibuahi spermatozoa. Antara 2-3 hari kemudian, telur-telur tersebut akan menetas dan tumbuh menjadi larva. Larva ikan mempunyai kantong kuning telur yang berukuran relatif besar dan berfungsi sebagai makanan. Kantong kuning telur pada larva tersebut akan habis 2-4 hari kemudian. Larva ikan biasanya menempel dan bergerak vertikal. Ciri morfologinya adalah berukuran panjang antara 0,5-0,6 mm dan bobotnya antara 0,18-20 mg (Suseno, 2004).

2.5 Proses aktivasi telur

Mekanisme pelepasan kalsium melalui induksi sperma telah menjadi bahasan utama pada sebagian besar penelitian sejak dikembangkannya sistem kultur secara in vitro pada akhir 1950-an yang telah mampu mendukung fertilisasi mamalia. Rangsangan aktivasi utamanya adalah merupakan peningkatan konsentrasi kalsium intraselular bebas yang cukup besar dan berbagai macam perlakuan fisika serta kimia telah diketahui dapat menginduksi perubahan kalsium sehingga memulai peristiwa aktivasi oosit. Peningkatan kalsium intraseluler yang terjadi setelah fertilisasi merupakan sinyal utama yang bertanggung jawab atas dimulainya perkembangan.

Pada fertilisasi oosit mamalia, pertama-tama sperma mengikat pada membran plasma oosit dan kemudian menyatu dengannya. Interaksi diantara membran gamet akan mengaktifasi jalur biokimia tertentu di dalam oosit, dimana hal ini akan memicu pelepasan kalsium. Masih terdapat suatu perdebatan tentang apakah penggabungan membran plasma gamet adalah merupakan sebuah prasyarat untuk aktivasi oosit, atau apakah pengikatan sperma pada reseptor permukaan sel akan dapat memulai aktivasi oosit. Akibatnya, kedua hipotesis yang telah diajukan untuk menjelaskan bagaimana sinyal pengaktifasi dipancarkan dari sperma menuju ke oosit didasarkan pada jalur pensinyalan dengan mediasi reseptor permukaan sel dan jalur pensinyalan yang dimediasi oleh faktor sperma cytosolic.

Meskipun bukti yang mendukung jalur pensinyalan dengan mediasi reseptor sangat meyakinkan, namun sejumlah temuan menyatakan bahwa mekanisme pengubahan sinyal yang memicu pelepasan kalsium sebagai respon atas pengikatan sperma bekerja melalui jalur pensinyalan dengan mediasi faktor sperma. Mekanisme

ini mengharuskan terjadinya penyatuan antara oosit dan membran plasma sperma, dan terbentuknya pori-pori diantara sitoplasma gamet sehingga memungkinkan faktor cytosolic untuk dapat menyatu dari sperma ke oosit. Ketika memasuki oosit, faktor sperma ini dihipotesiskan memediasi pelepasan kalsium secara langsung atau tidak langsung.

Penelitian parthenogenetis telah menunjukkan bahwa kemampuan berkembang oosit bisa ditingkatkan dengan cara menerapkan stimulasi kalsium berganda yang dapat menginduksi perubahan kalsium yang mirip dengan yang terdapat pada fertilisasi.

Jika tidak ada sperma, maka konsentrasi kalsium intraseluler bebas pada oosit mamalia bisa ditingkatkan melalui beragam perlakuan yang berbeda. Meskipun amplitudo, durasi, dan dinamika spasiotemporer peningkatan kalsium yang diinduksi secara artifisial tidak sama dengan yang terjadi pada saat fertilisasi, namun cara ini masih mampu untuk memulai peristiwa aktivasi oosit awal maupun akhir. Bahkan, sebagian besar perlakuan aktivasi secara artifisial hanya memunculkan sebuah kenaikan kalsium tunggal saja, berlawanan dengan serangkaian osilasi kalsium yang diinduksi dengan cara membuahi sperma. Namun teori juga menyatakan bahwa kalsium yang berlebihan justru dapat merusak fungsi sel-sel (Gruppen C, 2002).

Pada kenyataannya pemicu dari aktivasi alami dipengaruhi oleh sperma yang membawa serangkaian dari Ca^{2+} yang berlangsung pada waktu yang singkat dalam telur (Miyazaki, 1993; Kline, 1992). Dalam waktu yang singkat ion-ion Ca^{2+} disebarkan keseluruh telur dibuahi dalam bentuk gelombang dan mengawali eksositosis kedua lapisan granula dan keluar dari proses metafase II akhir (Whitaker,

1990). Selanjutnya jelas bahwa tidak ada metode penelitian aktivasi telur, yang dapat menirukan pola respon dari pengaruh sperma (Hoyland *et al.*, 1991). Meskipun hal yang terpenting dari aktivasi penuh tidak bisa ditunjukkan dari amplitudo dan frekuensi Ca^{2+} yang dipengaruhi oleh elektrik stimulan mempengaruhi aktivasi MPV (*Maturation Promoting Factor*), pada waktu pembentukan inti dan tingkat kepadatan pembentukan *blastocyt* dalam proses parthenogenesis dapat mengaktifkan telur (Loi *et al.*, 1998).

2.5.1 Parthenogenesis Artifisial

Parthenogenesis merupakan suatu proses dari pembelahan sel telur yang tidak terfertilisasi secara normal, yang mungkin akibat dari pembentukan jaringan embrio dan pada kondisi yang ekstrim secara sempurna akan berkembang menjadi individu, dan jaringan parthenogenetik yang berkembang pada telur infertil adalah bersifat infertil (Anonymous, 2005).

Parthenogenesis dalam biologi adalah bentuk reproduksi dimana ovum berkembang menjadi individu baru tanpa fertilisasi. Sebenarnya aktivitas sel telur tidak harus oleh sel mani. Kadang-kadang aktivasi sel telur, dapat diaktivasi oleh rangsangan mekanik atau kimiawi. Perkembangan sel telur tanpa adanya sel mani dinamakan parthenogenesis (Subowo. 1995)

Parthenogenesis adalah terjadinya embrio tanpa adanya fertilitas (pembuahan). Ini terjadi pada ikan-ikan tropis (*Peocilia formosa*). Dalam hal ini sel sperma hanya memacu perkembangan sel telur, tanpa menurunkan hereditas yang dimiliki. Embrio yang dihasilkan selalu berkelamin betina yang tidak mempunyai sifat-sifat genotip jantan (Arfiati, 2005).

Parthenogenesis artifisial merupakan pemijahan buatan yang ditujukan untuk mendapatkan biakan yang memiliki sifat dan karakter murni dari induk betina saja. Metode ini dilakukan dengan memasukkan parameter kimia, seperti penambahan zat kimia serta parameter fisika yakni kejutan suhu. Hal ini dilakukan sebagai usaha untuk menggantikan peran sperma dalam proses aktivasi oosit ikan. Dengan ini diharapkan oosit yang teraktivasi akan berkembang tanpa menurunkan sifat dari induk jantan.

Pada kenyataannya pemicu dari aktivasi alami dipengaruhi oleh sperma yang membawa serangkaian dari Ca^{2+} yang berlangsung pada waktu yang singkat dalam telur (Miyazaki, 1993; Kline, 1992). Dalam waktu yang singkat ion-ion Ca^{2+} disebarkan ke seluruh telur dibuahi dalam bentuk gelombang dan mengawali eksositosis kedua lapisan granula dan keluar dari proses metafase II akhir (Whitaker, 1990). Selanjutnya jelas bahwa tidak ada metode penelitian aktivasi telur, yang dapat menirukan pola respon dari pengaruh sperma (Hoyland *et al.*, 1991). Meskipun hal yang terpenting dari aktivasi penuh tidak bisa ditunjukkan dari amplitudo dan frekuensi Ca^{2+} yang dipengaruhi oleh elektrik stimulan mempengaruhi aktivasi MPV (*Maturation Promoting Factor*), pada waktu pembentukan inti dan tingkat kepadatan pembentukan *blastocyt* dalam proses parthenogenesis dapat mengaktifkan telur (Loi *et al.*, 1998).

Dalam proses parthenogenesis, kajian yang pertama kali menetapkan bahwa aktivator kimia menyebabkan inti sel berkembang sedikit lebih tinggi kecepatannya dibanding dengan aktivator fisik, bahan-bahan itu adalah etanol 95 %, ionomycin

96% dan elektro aktivator 80 %. Bahan-bahan tersebut dapat menghambat polar body II dan inti dapat teramati pada telur(Loi *et al.*, 1998).

Dalam perkembangan teknologi kultur in vitro, kejadian embrio partenogenetik dapat diupayakan melalui aktivitas oosit dengan menggunakan bahan kimia (etanol), aliran listrik ataupun proses maturasi diperpanjang (Fuadiyah S. 2007). Telur mamalia dapat berkembang melalui parthenogenesis artifisial dengan menggunakan arus listrik dan pendinginan ataupun pemanasan (*thermal shock*) dan penelitian dengan menggunakan cara ini telah dilakukan pada kelinci dan beberapa species lainnya (Komar, 1972)

Pada oosit babi, kombinasi antara aktivasi elektrik dan perlakuan 6-DMAP telah diketahui dapat mempercepat penekanan aktivitas MPF dibandingkan hanya dengan menggunakan aktivasi elektrik saja. Lebih lanjut, reaktivasi MPF dapat ditunda dengan menerapkan perlakuan 6-DMAP sedemikian rupa sehingga daya kinetik aktivitas MPF menjadi sama dengan yang terdapat pada oosit yang telah diinseminasi, dimana hal ini berkorelasi dengan terjadinya peningkatan pembentukan blastosis parthenogenetik. Pendekatan ini berusaha untuk menduplikasi siklus sel utama, bukan untuk meniru osilasi kalsium yang diinduksi oleh pembuahan sperma. (Gruppen, 2002).

Oosit tikus telah berhasil diaktivasi dengan menerapkan perlakuan dengan menggunakan inhibitor sintesis protein, yaitu cycloheximide. Didapatkan hasil yang sama dengan hasil yang didapat dari oosit manusia dengan cara menginkubasinya dengan menggunakan puromycin, yaitu jenis inhibitor sintesis protein lainnya.

Senyawa ini kemungkinan mampu menghambat proses sintesis cytotatis (CSF), oleh karena itu ia dapat menurunkan tingkat aktivitas MPF pada oosit, dimana hal ini dapat memicu keberlangsungan proses meiosis. Pada oosit babi dan lembu, perlakuan dengan cycloheximide saja tidak mampu menginduksi aktivasi sebagai perangsang yang efektif yang mampu membangkitkan peningkatan kalsium intraseluler. Namun demikian, jika digabungkan dengan ethanol atau denyutan listrik, perlakuan cycloheximide ini bisa meningkatkan prosentase oosit yang mampu membentuk protisel dan membelah (Grupen,2002) Telur mamalia dapat membelah (*cleavage*) dan membentuk blastodisk sebagai reaksi terhadap kejutan temperatur. Hal ini memperlihatkan bahwa sampai pada tingkat tertentu, fungsi spermatozoa sebagai pemacu perkembangan dapat digantikan oleh yang lain, walaupun tidak sempurna apabila difertilisasi oleh spermatozoa. (Suhana dan Ratu, 1982).

2.5.2 Kejutan Suhu Pada Telur

Manipulasi kromosom biasanya dilakukan dengan pemberian kejutan suhu panas pada telur yang telah terfertilisasi. Metode perlakuan fisik kejutan panas merupakan metode yang sederhana, mudah murah dan efisien. Menurut Pandian dan Varadaraj (1988), dalam perlakuan pemberian kejutan suhu pada telur harus diperhatikan waktu awal kejutan, suhu kejutan dan lama kejutan dimana nilai setiap parameter tersebut beda untuk setiap spesies dimana perlakuan kejutan suhu panas, ini juga dapat berpengaruh pada *hatching rate*, *survival rate* dan pertumbuhan ikan.

Androgenesis pada ikan relatif mudah dilakukan dengan menggunakan kejutan suhu sesaat setelah terjadinya fertilisasi. Perlakuan ini dimaksudkan untuk

mencegah pembelahan sel, sehingga di dalam sel akan terdapat 2N kromosom. Seperti yang dikemukakan oleh Stanley dan Sneed (1974) dalam Gustiano dan Dharma (1987) bahwa mempertahankan telur bersifat diploid dapat dilakukan dengan memberi kejutan, baik kejutan panas, dingin, tekanan atau zat kimia.

Disamping itu kejutan suhu memiliki kelebihan jika dibanding perlakuan lain. Refstie *et al.* (1982), bahwa pada prakteknya kejutan suhu paling banyak dilakukan, karena lebih mudah diterapkan, terutama kejutan panas yang dapat memberikan hasil lebih baik dan dapat menggunakan telur lebih banyak. Kejutan panas (40°) memberikan hasil yang lebih baik pada gynogenesis mitosis I ikan mas dengan waktu kejutan panas antara 30-40 menit (Komen *et al.*, 1990). Pada ikan mas (*Cyprinus carpio* linn.) mitosis terjadi pada 26-30 menit setelah pembuahan.

Panas atau dingin pada dasarnya merupakan pemberian stress fisik pada ikan. Menurut Kabakov dan Vladimir (1997), menyatakan bahwa stress temperatur, radiasi ultraviolet, perubahan pH lingkungan sel dan perlakuan dengan oksidan, deterjen, etanol, transisi ion logam, asam amino analog dan lain-lain akan mendorong sel untuk mensintesis protein sel baru yaitu *heat shock protein* (HSP). HSP berfungsi dalam pertahanan sel terhadap bahaya yang disebabkan oleh faktor tersebut.

Poliploidi pada ikan dapat dilakukan melalui perlakuan secara fisik seperti melakukan kejutan (shocking) suhu, baik panas maupun dingin, pressure (hydrostatic pressure) yang secara kimiawi untuk mencegah peloncatan polar bodi II atau pembelahan sel pertama pada telur terfertilisasi. Pada perlakuan poliploidi ikan menunjukkan adanya tingkat mortalitas yang tinggi. Hal ini disebabkan oleh beberapa macam efek merugikan dari perlakuan kejutan pada sitoplasma telur. Perlakuan

kejutan suhu dapat mengakibatkan kerusakan pada benang-benang spindel yang terbentuk setelah proses pembelahan sel dalam telur. Kejutan suhu dan tekanan mengakibatkan rusaknya mikrotubulus yang membentuk spindel selama pembelahan.

Carman (1990) *dalam* Risnandar (2001) mengatakan bahwa di antara perlakuan fisika, kejutan suhu telah digunakan secara luas. Hal ini disebabkan karena kejutan suhu mempunyai kelebihan jika dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Kejutan suhu ini bisa berupa kejutan yang lebih dingin dari suhu normal. Kejutan panas mempunyai kepraktisan yaitu dapat dilakukan untuk telur dalam jumlah yang besar, untuk usaha komersil. Di samping itu kejutan panas mudah dilakukan dan tidak membutuhkan keahlian khusus. Kejutan panas juga memerlukan waktu yang lebih singkat daripada kejutan dingin.

Pendekatan praktis untuk induksi poliploidi melalui kejutan panas merupakan perlakuan aplikatif sesaat setelah fertilisasi (untuk induksi triploidi) atau sesaat setelah pembelahan pertama (untuk induksi tetraploidi) pada suhu lethal. Kejutan suhu selain murah dan mudah juga efisien dapat dilakukan dalam jumlah banyak Thorgard (1983) *dalam* Mukti (2001).

Tiga parameter yang berhubungan dengan perlakuan kejutan panas adalah umur zigot waktu pelaksanaan kejutan, suhu kejutan dan lama perlakuan kejutan. Pemilihan umur zigot waktu pelaksanaan, suhu dan lama waktu kejutan yang tepat adalah spesifik untuk masing-masing spesies. Prinsip pemberian kejutan suhu pada telur yang telah dibuahi adalah mencegahnya keluarnya badan kutub II pada saat pembelahan meiosis II. Dengan demikian kromosom telur yang telah diploid

ditambah seperangkat sehingga menjadi tiga perangkat Purdom (1983) dalam Risnandar (2001).

Thermal Shock pada oosit dan embrio dapat mengubah perkembangan dari oosit ataupun merusaknya. Namun semua itu dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti toleransi telur terhadap peningkatan suhu serta regulasi dari *Heat Shock Protein (HSP)*. (Ju, 2005).

Penelitian dengan *thermal shock* telah dilakukan pada oosit tikus dengan perlakuan *thermal shock* sebesar 44° hingga 45°C. Seluruh oosit pada fase pembelahan 8 sel, morula, hingga blastula dipastikan menjadi diploid. Oosit berkembang dengan baik pada perlakuan 44,5° C selama 5 menit dan perkembangan oosit pada parthenogenesis dengan perlakuan *thermal shock* berjalan lambat daripada kontrol normal. Aktivasi buatan pada telur dapat dilakukan dengan etanol. Penggunaan etanol dapat menginduksi peningkatan konsentrasi calsium (Ca^{2+}) sehingga memicu proses aktivasi telur (Komar 1972)

2.5.3 Pengaruh aktivasi etanol

Ethanol adalah molekul kecil yang larut dalam air yang dapat diabsorpsi dengan cepat oleh membran. Belum ditemukan adanya reseptor khusus, namun sebaliknya etanol telah dibutuhkan mempengaruhi sejumlah besar protein membran yang berperan dalam induksi sinyal, termasuk reseptor neurotransmitter berbagi amine, asam amino, opioid, enzim-enzim seperti Na^+/K^+ , ATP ase, *adenlyil cyclose*, *phosphornositide-specific phospoliphase C* dan beberapa kanal untuk ion Ca^{2+} (Diamon, 1997 dalam Bertram, 2001)

Ethanol diperkirakan bisa berinteraksi dengan membran sel secara langsung, yaitu dengan mempolarisasi membran dan menggantikan Ca^{2+} dari fosfolipid membrane (Loi *et al*, 1998).

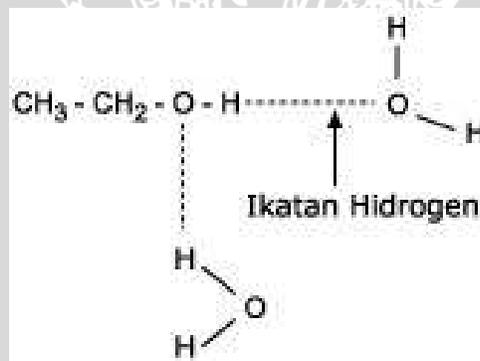
Menurut Loi (1998), Selama bertahun-tahun efek utama dari etanol adalah menyebabkan kerusakan pada membran biologis akibat dari penurunan viskositas lipid. Efek fluidisasi etanol ini dianggap suatu hipotesis yang bertanggung jawab atas beraneka ragam perubahan yang diamati dalam membran. Dalam parthenogenesis, kajian yang pertama kali menetapkan bahwa aktivator kimia menyebabkan inti sel berkembang sedikit lebih tinggi kecepatannya dibanding aktivator fisik. Bahan-bahan kimia itu adalah etanol 95 %, ionomycin 96 % dan elektro aktivator 80 %. Bahan – bahan tersebut dapat menghambat *Polar Body* II dan inti dapat teramati pada telur. Etanol menyebabkan Ca tunggal meningkat yang akan menginaktifkan CSF (Cytostatic factor) dan mensistesis protein di dalam telur. Aktivasi tidak akan terjadi pada telur apabila tidak ada ekstraseluler kalsium. Etanol menyebabkan Ca tunggal meningkat yang mengakibatkan masuk secara ekstraseluler dan beberapa termobilisasi secara intraseluler. Etanol pada perkembangan telur digunakan sebagai pemicu awal dari aktivasi.

Ethanol merupakan salah satu dari bahan kimia yang mempunyai molekul dari golongan hydroxyl (-OH) dan diikat oleh atom karbon. Beberapa sifat ethanol antara lain tidak mempunyai warna (jernih) dan dapat larut dalam air. Dalam bidang bioteknologi, ethanol diketahui dapat menstimulasi mitosis dan meningkatkan pembentukan blastosis, dan ethanol dalam konsentrasi tertentu diketahui dapat

digunakan sebagai aktivator pelepasan ion *calcium* (Ca^{2+}) sehingga dapat menyebabkan terjadinya aktivasi telur secara partenogenesis (Novalisa,2007).

Dalam sistem binatang menyusui, etanol yang dicerna dioksidasi terutama di dalam hati (liver) dengan pertolongan enzim yang disebut alcohol-dehidrogenase. Produk dehidrogenasi ini adalah asetaldehida, CH_3CHO (oksidasi biologis methanol menghasilkan formaldehida, HCHO), yang bersifat racun. Asetaldehid dari etanol ini dioksidasi lebih lanjut secara enzimatik menjadi ion asetat, CH_3CO_2^- , yang bereterifikasi dengan koenzim A tiol. Produk esterifikasi ini ialah asetilkoenzim A. Gugus asetil ($\text{CH}_3\text{CO}-$) dalam setil koenzim A ini dapat diubah menjadi CO_2 , H_2O dan energi atau diubah menjadi senyawa lain, seperti lemak (Fessenden, 1986).

Oksidasi biologis etanol menurut Fessenden (1986) adalah sebagai berikut:



Gambar 4. Oksidasi Biologis Etanol

Menurut Grupen (2002) penggunaan ethanol untuk aktivasi telur berkaitan dengan perannya dalam menginduksi pelepasan ion *calcium* (Ca^{2+}). Ethanol akan berinteraksi dengan membran sel dan secara langsung dapat menyebabkan terjadinya

polarisasi membran dan dapat memindahkan ion *calcium* (Ca^{2+}) dari membran phospholipid.

Ethanol akan mengaktifkan inositol 1,4,5-triphosphate (InSP_3), yang berfungsi untuk terjadinya osilasi kalsium intraseluler (Ilyin dan parker, 1991)

Ciptadi (2002), menjelaskan bahwa aktivasi embrio parthenogenesis oosit kambing dengan perendaman ethanol 7% selama 7 menit didapatkan persentasi jumlah oosit yang mengalami cleavage selama 48 jam adalah 26%, lebih besar dibandingkan kontrol yang hanya 4%. Hal ini dapat membuktikan bahwa aktivasi embrio parthenogenesis oosit kambing dapat dilakukan secara buatan, tanpa adanya peran sperma.

2.6 Kualitas Air

Kualitas air adalah variabel-variabel yang dapat mempengaruhi kehidupan lele. Variabel tersebut dapat berupa sifat fisika, kimia dan biologi air. Sifat fisika air meliputi suhu, kekeruhan dan warna air. Sifat kimia air adalah kandungan oksigen (O_2), karbon dioksida (CO_2), pH (derajat keasaman), amoniak (NH_3) dan alkalinitas. Sifat biologi meliputi jenis dan jumlah binatang air (binatang renik), seperti plankton yang hidup di perairan.

2.6.1 Suhu

Suhu adalah kapasitas panas. Penyebaran suhu dalam perairan dapat terjadi karena adanya penyerapan, angin dan aliran tegak. Ditinjau dari segi fisiologis, perubahan suhu air dapat mempengaruhi kecepatan metabolisme pada ikan. Di daerah subtropis dan dingin, suhu air berkaitan erat dengan lama penyinaran matahari sehingga kedua faktor abiotik tersebut mempengaruhi proses biologis seperti

pematangan gonad, pemijahan dan penetasan telur pada pembenihan ikan. Kisaran suhu yang diperlukan dalam pembenihan ikan adalah antara 25° – 30° (Sutisna dan Ratno, 1995).

Dalam penetasan telur ikan koi perlu diperhatikan suhu air dan kandungan oksigen dalam air. Pada suhu yang relatif rendah, masa tetas telur menjadi makin lama sedangkan pada suhu relatif tinggi (dalam batas tertentu) masa tetas telur menjadi lebih cepat (Effendie, 1993).

2.6.2 Derajat Keasaman (pH)

Nilai pH menyatakan nilai konsentrasi ion hidrogen dalam suatu larutan. Nilai pH yang ideal bagi kehidupan organisme air pada umumnya terdapat antara 7 sampai 8,5. kondisi perairan yang bersifat sangat asam maupun sangat basa akan membahayakan kelangsungan hidup organisme karena akan menyebabkan terjadinya gangguan metabolisme dan respirasi. Disamping itu nilai pH yang sangat rendah akan menyebabkan mobilitas berbagai senyawa logam berat terutama ion Aluminium yang bersifat toksik sedangkan pH yang tinggi akan menyebabkan keseimbangan amoniak dalam air akan terganggu dimana konsentrasi amoniak yang berlebih akan bersifat sangat toksik bagi organisme (Barus, 2002).

2.6.3 DO (Oksigen terlarut)

Oksigen merupakan gas yang terpenting untuk respirasi dan metabolisme dalam tubuh ikan. Dalam usaha pembenihan ikan, konsentrasi oksigen yang terlarut dalam kolam akan berkurang karena konsumsi oksigen digunakan untuk pernafasan ikan dan organisme lainnya serta reaksi kimia bahan organik yang berasal dari kotoran

ikan, sisa pakan, pembusukan tumbuhan dan hewan yang mati dan sebagainya. Akan tetapi penurunan konsentrasi oksigen ini diimbangi dengan penambahan oksigen dari hasil fotosintesis yang berlangsung pada siang hari dan dari proses pencampuran udara dengan air yang disebabkan oleh air permukaan. Konsentrasi oksigen yang optimal dalam usaha pembenihan ikan adalah 5 ppm. Pada kolam pembenihan ikan dengan konsentrasi oksigen sebesar kurang dari 3 ppm akan berbahaya bagi benih ikan dimana konsentrasi oksigen yang rendah dapat ditingkatkan dengan menggunakan aerator ataupun dengan pemasangan kincir (Sutisna dan Ratno, 1995).

Tabel 1. Persyaratan kualitas air untuk budidaya lele dumbbo

| Parameter | Telur, larva dan benih | Dewasa |
|-----------------|------------------------|----------------------|
| Oksigen | Mendekati jenuh | 3 ppm |
| Temperatur | 20-30 ⁰ C | 20-30 ⁰ C |
| pH | 6,5-8 | 6,5-8 |
| N ₂ | 102 % | 102 % |
| CO ₂ | 15 ppm | 15 ppm |
| NH ₃ | 0,05 ppm | 0,05 ppm |
| Kadar garam | 15.000 ppm | 15.000 ppm |

Sumber : Infis Manual Seri No.57, 1987 dalam Khairuman, 2006.

III MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat Untuk Penelitian

Alat yang dipergunakan untuk penelitian adalah :

- Akuarium
- Heater
- Thermometer
- pH meter
- DO meter
- Mikroskop
- Timbangan analitik
- Kotak mika
- Bola hisap
- Beaker glass
- Spet injeksi
- Gelas ukur
- Obyek glass
- Pipet tetes
- Pipet volume
- Stop watch
- Aerator
- Handtally counter
- Mangkuk
- Seperangkat alat bedah

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah

- ❖ Induk ikan lele dumbo jantan dan betina
- ❖ NaCL fisiologi 0,9 %
- ❖ Aquadest
- ❖ Etanol p.a 98 %
- ❖ Enzim Protease (Trypsin)
- ❖ Hormon Ovaprim
- ❖ Tissue
- ❖ Bulu ayam
- ❖ Kertas label

3.2 Metode dan Rancangan Penelitian

3.2.1 Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen. Nazir (1983) menyatakan metode penelitian yang melakukan manipulasi obyek penelitian untuk mengetahui ada atau tidak hubungan sebab akibat dapat perlakuan yang diberikan dengan memakai kontrol sebagai pembanding dengan teknik pengambilan data secara langsung yang dilakukan dengan cara observasi langsung.

3.2.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dimana RAL ini digunakan untuk penelitian yang mempunyai media atau tempat percobaan yang bersifat homogen atau seragam sehingga tidak berpengaruh pada respon yang diamati (Sastrosupadi, 2000).

Rumus dari RAL menurut Sastrosupadi (1973) adalah sebagai berikut :

$$Y = \mu + \tau + \varepsilon$$

Dimana Y = Nilai pengamatan

μ = nilai rata-rata harapan

τ = pengaruh faktor perlakuan

ε = gallat

Dalam penelitian ini, perlakuan yang dikenakan adalah perlakuan dengan ethanol dan kejutan panas dengan lama perendaman yang berbeda. Adapun perlakuan ini didasarkan pada penelitian yang dilakukan oleh Ciptadi (2002) menjelaskan

bahwa aktivasi embrio parthenogenesis oosit kambing dengan perendaman ethanol 7% selama 7 menit didapatkan persentasi jumlah oosit yang mengalami cleavage selama 48 jam adalah 26%, lebih besar dibandingkan kontrol yang hanya 4%. Perlakuan perendaman etanol dengan dosis 7% mencegah terjadinya peloncatan polar body 2 sehingga dapat mengubah fisiologi ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*). Pada penelitian ini juga ditambahkan perlakuan *heat shock* pada oosit dan didapatkan perlakuan terbaik yaitu pada suhu 40°C selama 2 menit serta suhu letal sebesar 42°C. Perlakuan *heat shock* didapatkan hasil yang signifikan dibanding dengan penelitian tanpa perlakuan *heat shock* (normal). Acuan ini dipilih karena sebelumnya telah dilakukan penelitian pendahuluan untuk menentukan batas suhu yang sesuai bagi oosit ikan. Pada suhu 42°C oosit ikan banyak yang mengalami kematian. Menurut Bhise dan Tariq (2002), hasil terbaik perendaman pada perlakuan *Thermal Shock* oosit ikan yakni selama 2 menit dan didapatkan suhu lethal sebesar 42°C. Penelitian tersebut dijadikan dasar pada penelitian parthenogenesis kali ini karena pada tahap awal penelitian tersebut juga dilakukan perlakuan *heat shock* pada oosit ikan.

Penelitian ini menggunakan 4 perlakuan yang masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Perlakuan dilakukan dengan menempatkan telur yang telah diberikan perlakuan dengan lama perendaman yang berbeda sebelumnya dan tanpa perlakuan sebagai kontrol serta perlakuan dengan pemberian sperma sebagai kontrol normal. Perlakuan ditempatkan pada toples dan ditempatkan pada bak inkubator sebagai tempat untuk proses perkembangan telur.

Rincian perlakuan yang digunakan adalah sebagai berikut :

- Perlakuan A = Ethanol 7% suhu 40°C dan lama perendaman 1 menit

- Perlakuan B = Ethanol 7% suhu 40°C dan lama perendaman 1,5 menit
- Perlakuan C = Ethanol 7% suhu 40°C dan lama perendaman 2 menit
- Perlakuan D = Ethanol 7% suhu 40°C dan lama perendaman 2,5 menit
- Perlakuan K = Tanpa ethanol dan tanpa kejutan suhu sebagai kontrol
- Perlakuan N = Menggunakan sperma dan tanpa kejutan suhu sebagai kontrol normal

Toples yang telah disiapkan, disusun di atas bak inkubator yang sudah dirancang agar dapat membuat lingkungan yang homogen. Pada proses selanjutnya, telur ikan diamati setiap waktu untuk mengetahui perkembangan telur dari setiap fase dan dilakukan penghitungan telur yang mampu bertahan. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop. Untuk pengamatan, telur yang diambil menggunakan sampel dari setiap perlakuan.

| | | | | | |
|----|----|----|----|----|----|
| A1 | B2 | C1 | D3 | K1 | N1 |
| B3 | D2 | A2 | C2 | K2 | N2 |
| C3 | D1 | B1 | A3 | K3 | N3 |

Gambar 9. Denah Penelitian

Keterangan : A-D : perlakuan lama perendaman,

K : kontrol tanpa sperma,

N : kontrol sperma

1-3 : ulangan

3.3 Prosedur penelitian

3.3.1 Persiapan Penelitian

a. Persiapan wadah dan peralatan

Persiapan peralatan yang akan digunakan untuk penelitian meliputi pembersihan bak inkubator dan penyediaan kotak mika, dimana pada bak inkubator dilakukan sterilisasi dan pemasangan sarana pendukung, misalnya selang, lampu dan sirkulasi air. Sedangkan pada kotak mika dilakukan perendaman selama 3 hari.

b. Penyediaan dan Pemeliharaan Induk

Sebelum penelitian dilakukan, disediakan indukan ikan lele dumbo yang siap memijah, Pemeliharaan secara intensif dilakukan kurang lebih selama 2 minggu, dalam pemeliharaan ini ikan lele dumbo diberi pakan berupa pellet dan cacing sutra.

3.3.2 Pembuatan larutan ethanol 7%

Rumus

$$V_1 N_1 = V_2 N_2$$

Keterangan : V_1 = Volume air

V_2 = volume total ethanol + air

N_1 = Konsentrasi ethanol akhir

N_2 = konsentrasi ethanol absolut

- $V_1 N_1 = V_2 N_2$
- $500 \cdot 7 = V_2 \cdot 98$
- $V_2 = 3500 / 98$
- $V_2 = 35,7 \text{ ml}$
- Volume ethanol absolut yang di ambil sebanyak 35,7 ml
- Volume aquades yang ditambahkan sebanyak 464,3 ml

- Larutan ethanol 7% ditaruh pada botol air mineral dan ditutup rapat agar konsentrasi didalamnya tidak berubah (menguap).

3.3.3 Persiapan induk

Disiapkan ember bak sebagai tempat penampungan sementara induk lele sebelum perlakuan. Lele betina dan lele jantan ditempatkan terpisah.

3.3.4 Penyuntikan hormon pada induk

- Induk betina diukur panjang dan berat badannya.
- Induk betina disuntik dengan larutan ovaprim dan Na-fis pada bagian dorsal dengan dosis 0,25 ml/ kg bobot ikan.
- Induk betina ditempatkan pada aquarium yang telah disediakan dan dikondisikan pada suhu normal (25°C).
- Induk ditunggu hingga proses stripping (latency time), kurang lebih 10 jam.

3.3.5 Stripping induk

- Setelah melewati masa latency time (kurang lebih 10 jam), induk betina distripping.
- Telur ditempatkan pada mangkuk dan ditutup dengan lap basah.
- Telur diambil dengan menggunakan sendok besi kecil sebagai sampel untuk dihitung berat dan jumlahnya.
- Setelah proses stripping dilakukan, induk betina diberi tanda (tagging) pada bagian ekor dan dikembalikan kembali ke dalam kolam.

3.3.6 Perlakuan kontrol normal

- Induk jantan dibedah dengan alat sectio dan diambil gonadnya.

- Gonad dicacah dan dicampur dengan Na-fis dengan perbandingan 1:3 dan dihomogenkan pada gelas ukur.
- Campuran gonad dicampurkan pada telur dan ditambahkan Na-fis lalu ditempatkan pada mangkuk dan diaduk dengan bulu ayam dan dibilas dengan aquadest.
- Telur+sperma+air ditempatkan pada kotak mika dan terpisah dari perlakuan.

3.3.7 Perlakuan *ethanol thermal shock*

- Masukan etanol 7% ke dalam bak yang berisi air
- Air di bak dipanaskan dengan heater
- Suhu air diatur agar mencapai mencapai suhu yang diinginkan.
- Telur ditempatkan pada masing-masing toples.
- Telur diberi larutan Na-fis+tripsin selama 1 ½ menit.
- Telur dibilas dengan air yang telah diaerasi.
- Untuk telur kontrol tanpa perlakuan langsung ditempatkan pada inkubator.
- Untuk telur perlakuan, telur direndam *etanol* yang dipanaskan 40⁰C, dengan lama perendaman 1; 1,5; 2; dan 2,5 menit.
- Telur diberi air perlakuan dengan menggunakan gelas corong dan direndam selama 2 menit.
- Telur dalam toples ditempatkan pada inkubator dan diaerasi.

3.3.8 Pengamatan perkembangan telur

- Telur diambil dengan menggunakan pipet tetes dan diletakkan di atas object glass.

- Telur diamati di bawah mikroskop, dicatat waktunya dan difoto.
- Telur yang telah diamati ditempatkan kembali pada kotak mika
- Pengamatan dilakukan setiap jam.
- Jumlah telur dihitung disetiap fasenya.

3.4 Parameter Uji

3.6.1 Parameter Utama

- **Perhitungan persentase embrio**

Sebagai parameter uji utama dalam penelitian ini adalah tingkat perkembangan embrio, dimana dilakukan pengamatan perkembangan bentuk morfologi, sejauh mana embrio teraktivasi serta penghitungan persentase embrio di setiap fasenya.

Pengamatan bentuk morfologi dilakukan dengan mengambil sampel. Setelah embrio memasuki fase tertentu, maka dilakukan penghitungan persentase embrio. Persentase embrio disetiap fase tertentu dapat dihitung dengan menggunakan rumus yaitu;

$$\text{Survival Rate} = \frac{N_t}{N_0} \times 100\%$$

N_t : Jumlah oosit akhir pengamatan pada setiap fase (butir)

N_0 : Jumlah oosit awal pengamatan pada setiap (butir)

- **Kecepatan perkembangan embrio**

Perhitungan kecepatan perkembangan embrio, dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$V_E = T_t - T_0$$

V_E : Kecepatan perkembangan embrio (menit)

T_1 : Waktu akhir oosit berkembang (menit)

T_0 : Waktu pertama kali oosit berkembang (menit)

3.6.2 Parameter Penunjang

Parameter uji penunjang dalam penelitian ini antara lain pengukuran kualitas air media yang meliputi suhu menggunakan termometer, pH menggunakan pH meter, oksigen terlarut menggunakan DO meter.

3.7 Analisa Data

Penelitian ini menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap) dengan 3 kali ulangan untuk masing-masing perlakuan. Untuk mengetahui pengaruh perlakuan digunakan analisis keragaman atau uji F. Apabila nilai F berbeda nyata atau sangat nyata maka dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) untuk menentukan perlakuan yang memberi respon terbaik. Respon terbaik pada taraf atau derajat kepercayaan 5% dan 1%. Untuk mengetahui hubungan antara perlakuan dengan hasil yang dipengaruhi digunakan analisa regresi yang bertujuan untuk menentukan sifat dari fungsi regresi yang memberikan keterangan mengenai pengaruh perlakuan yang terbaik pada respon. Selanjutnya untuk mengetahui bentuk kerja antara perlakuan dengan penentuan penelitian dilakukan uji polinomial orthogonal (Sastrosupadi, 1973).

4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Perkembangan oosit

4.1.1 Fase pembelahan 4 sel

Data hasil penelitian perlakuan lama perendaman dalam etanol yang dipanaskan 40°C terhadap aktivasi parthenogenetik artifisial oosit ikan lele dumbo (*Clarias sp.*) pada fase pembelahan 4 sel disajikan pada Tabel 1 dan gambar 10.

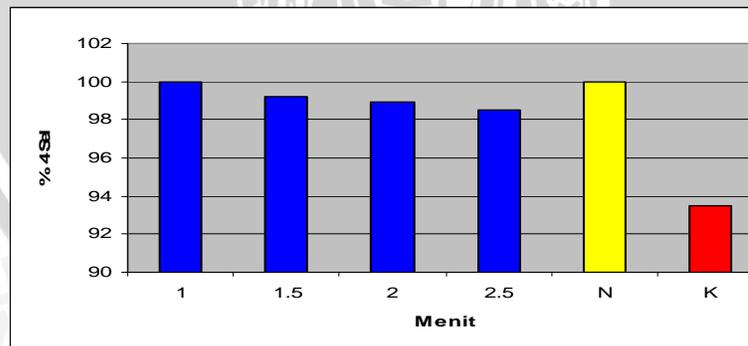
Tabel 1. Data pengamatan tingkat perkembangan oosit ikan lele dumbo pada fase pembelahan 4 sel (%)

| perlakuan | Ulangan | | | total | rata2 |
|-----------|---------|-------|-------|---------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | | |
| 1,0 menit | 100 | 100 | 100 | 300 | 100 |
| 1,5 menit | 100 | 98,92 | 98,85 | 297,67 | 99,22 |
| 2,0 menit | 100 | 98,85 | 97,93 | 297,78 | 98,92 |
| 2,5 menit | 99 | 95,83 | 97,75 | 295,58 | 98,52 |
| Total | - | - | - | 1191,03 | - |
| N | 100 | 100 | 100 | 300 | 100 |
| K | 93,81 | 93,88 | 92,78 | 280,47 | 93,49 |

Keterangan :

N = Kontrol normal (dengan sperma)

K = Kontrol tanpa sperma dan tanpa perlakuan



Gambar 10. Gambar pengaruh lama perendaman etanol yang dipanaskan 40°C terhadap jumlah telur (%) pada fase pembelahan 4 sel.

Setelah dilakukan penghitungan, diperoleh daftar sidik ragam seperti terdapat dalam Tabel 2 berikut ini.

Tabel 2. Daftar sidik ragam tingkat perkembangan oosit ikan lele dumbo pada pembelahan 4 sel di setiap perlakuan

| S.KERAGAM | DB | JK | KT | F.HIT | F5% | F1% |
|-----------|----|--------|-------|--------------------|------|------|
| PERL. | 3 | 114,94 | 38,31 | 3,84 ^{ns} | 4,07 | 7,59 |
| ACAK | 8 | 79,8 | 9,975 | | | |
| TOTAL | 11 | 194,72 | | | | |

Keterangan, ns = tidak berbeda nyata

Pada Tabel 1, terlihat bahwa perlakuan lama perendaman memberikan jumlah pembelahan 4 sel yang berbeda yaitu Jumlah pembelahan 4 sel terbanyak mencapai 100% yakni pada perlakuan 1 menit, sedangkan jumlah terendah sebesar 98,52%, didapat pada perlakuan 2,5 menit dan pada perlakuan 1,5 menit serta 2 menit didapatkan sebesar 99,22% dan 98,92%. Akan tetapi apabila dibandingkan dengan kontrol normal didapatkan jumlah pembelahan 4 sel yang lebih banyak yaitu 100%, sedangkan untuk kontrol tanpa sperma dan tanpa perlakuan didapatkan jumlah paling rendah yaitu 93,49%.

Hasil sidik ragam pada Tabel 2 ternyata jumlah lama perendaman tidak berpengaruh nyata terhadap perkembangan oosit ikan lele dumbo pada fase perkembangan 4 sel atau hasil pembelahan 4 sel relatif sama (homogen), yang berarti menerima H₀ dan menolak H₁

4.1.2 Fase pembelahan 8 sel

Data hasil penelitian lama perendaman etanol yang dipanaskan 40°C terhadap aktivasi parthenogenetik artifisial oosit ikan lele dumbo (*Clarias sp.*) pada fase pembelahan 8 sel disajikan pada Tabel 3 dan gambar 11.

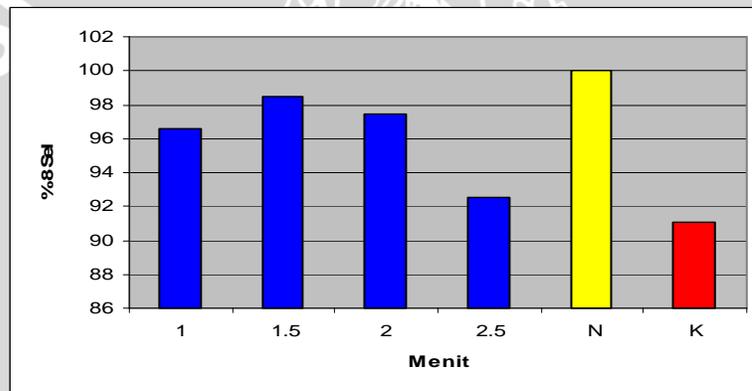
Tabel 3. Data pengamatan tingkat perkembangan oosit ikan lele dumbo pada fase pembelahan 8 sel di setiap suhu perlakuan (%)

| perlakuan | Ulangan | | | total | rata2 |
|-----------|---------|-------|-------|--------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | | |
| 1,0 menit | 97,64 | 95,60 | 96,51 | 289,75 | 96,58 |
| 1,5 menit | 97,75 | 98,92 | 98,85 | 295,52 | 98,5 |
| 2,0 menit | 100 | 96,55 | 95,87 | 292,42 | 97,47 |
| 2,5 menit | 95 | 91,66 | 91,01 | 277,67 | 92,55 |
| Total | - | - | - | 115,36 | - |
| N | 100 | 100 | 100 | 300 | 100 |
| K | 91,75 | 90,82 | 90,72 | 273,29 | 91,09 |

Keterangan Tabel 3:

N = Kontrol normal (dengan sperma)

K = Kontrol tanpa sperma dan tanpa perlakuan



Gambar 11. Gambar pengaruh perlakuan lama perendaman etanol yang dipanaskan 40°C terhadap jumlah telur (%) pada fase pembelahan 8 sel.

Setelah dilakukan penghitungan, diperoleh daftar sidik ragam seperti terdapat dalam Tabel 4 berikut ini.

Tabel 4. Daftar sidik ragam tingkat perkembangan oosit ikan lele dumbo pada pembelahan 8 sel di setiap perlakuan

| S.KERAGAM | DB | JK | KT | F.HIT | F5% | F1% |
|-----------|----|--------|-------|--------------------|------|------|
| PERL. | 3 | 146,29 | 48,76 | 3,67 ^{ns} | 4,07 | 7,59 |
| ACAK | 8 | 106,21 | 13,27 | | | |
| TOTAL | 11 | 252,5 | - | | | |

Keterangan; ns = tidak berbeda nyata

Pada Tabel 3, terlihat bahwa perlakuan lama perendaman memberikan jumlah pembelahan 8 sel yang berbeda yaitu Jumlah pembelahan 8 sel terbanyak mencapai 98,5% yakni pada perlakuan 1,5 menit , sedangkan jumlah terendah sebesar 92,55%, didapat pada perlakuan 2,5 menit dan pada perlakuan 1menit serta 2 menit didapatkan sebesar 96,58% dan 97,47%. Akan tetapi apabila dibandingkan dengan kontrol normal didapatkan jumlah pembelahan 8 sel yang lebih banyak yaitu 100%, sedangkan untuk kontrol tanpa sperma dan tanpa perlakuan didapatkan jumlah paling rendah yaitu 91,09%.

Hasil sidik ragam pada Tabel 4 ternyata jumlah lama perendaman tidak berpengaruh nyata terhadap perkembangan oosit ikan lele dumbo pada fase perkembangan 8 sel atau hasil pembelahan 8 sel relatif sama(homogen), yang berarti menerima H_0 dan menolak H_1

4.1.3 Fase morula

Data hasil penelitian pada perlakuan lama perendaman etanol yang dipanaskan 40°C terhadap aktivasi parthenogenetik artifisial oosit ikan lele dumbo (*Clarias sp.*) pada fase morula disajikan pada Tabel 5 dan gambar 12.

Tabel 5. Data pengamatan tingkat perkembangan oosit ikan lele dumbo pada fase morula di setiap suhu perlakuan

| perlakuan | Ulangan | | | total | rata2 |
|-----------|---------|-------|-------|---------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | | |
| 1,0 menit | 94,11 | 91,30 | 93,02 | 278,43 | 92,81 |
| 1,5 menit | 93,25 | 97,84 | 93,55 | 284,64 | 94,88 |
| 2,0 menit | 92,30 | 87,35 | 91,75 | 271,4 | 90,46 |
| 2,5 menit | 90 | 81,25 | 85,39 | 256,64 | 85,54 |
| Total | - | - | - | 1091,11 | - |
| N | 98,94 | 100 | 100 | 298,84 | 99,61 |
| K | 67,01 | 67,35 | 67,01 | 201,37 | 67,09 |

Keterangan :

N = Kontrol normal (dengan sperma)

K = Kontrol tanpa sperma dan tanpa perlakuan



Gambar 12. Gambar pengaruh perlakuan lama perendaman etanol yang dipanaskan 40°C terhadap jumlah telur (%) pada fase pembelahan morula

Setelah dilakukan penghitungan, diperoleh daftar sidik ragam seperti terdapat dalam Tabel 6 berikut ini.

Tabel 6. Daftar sidik ragam tingkat perkembangan oosit ikan lele dumbo pada pembelahan morula di setiap perlakuan

| S.KERAGAM | DB | JK | KT | F.HIT | F5% | F1% |
|-----------|----|--------|-------|--------|------|------|
| PERL. | 3 | 182,81 | 83,26 | 9,95** | 4,07 | 7,59 |
| ACAK | 8 | 66,99 | 8,37 | | | |
| TOTAL | 11 | 249,8 | - | | | |

Keterangan ** = berbeda sangat nyata

Pada Tabel 5, terlihat bahwa perlakuan lama perendaman memberikan jumlah morulla yang berbeda yaitu Jumlah morulla terbanyak mencapai 94,88% yakni pada perlakuan 1,5 menit , sedangkan jumlah terendah sebesar 85,54%, didapat pada perlakuan 2,5 menit dan pada perlakuan 1 menit serta 2 menit didapatkan sebesar 92,81% dan 90,46%. Akan tetapi apabila dibandingkan dengan kontrol normal

didapatkan jumlah morulla yang lebih banyak yaitu 99,61%, sedangkan untuk kontrol tanpa sperma dan tanpa perlakuan didapatkan jumlah paling rendah yaitu 67,09%.

Hasil sidik ragam Tabel 6 ternyata jumlah lama perendaman berpengaruh sangat nyata terhadap perkembangan oosit ikan lele dumbo pada fase morulla, yang berarti menolak H_0 dan menerima H_1

Untuk mengetahui perbedaan pengaruh dari tiap perlakuan maka dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT), dengan perhitungan berdasarkan uji BNT disajikan pada Tabel 7 berikut ini.

Tabel 7. Uji BNT lama perendaman terhadap perkembangan oosit pada fase morula

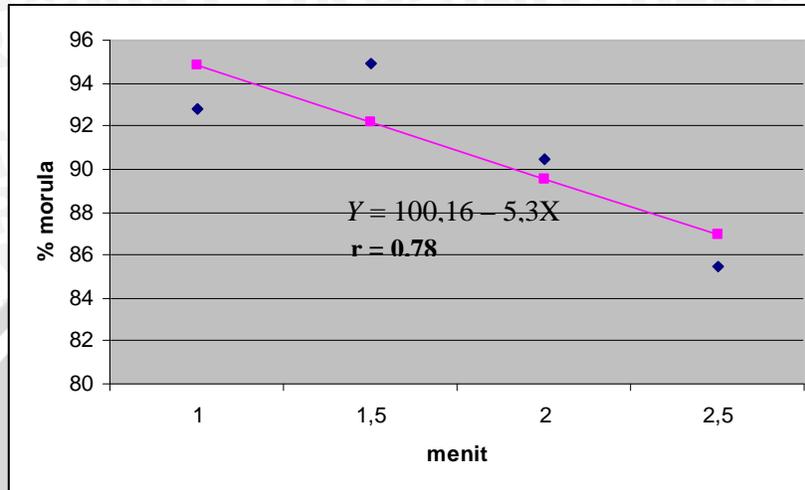
| Perlakuan | Rata-rata | NOTASI |
|---------------|-----------|--------|
| B = 1,5 menit | 94,88 | a |
| A = 1,0 menit | 92,81 | a |
| C = 2,0 menit | 90,46 | ab |
| D = 2,5 menit | 85,54 | b |

Ket : notasi sama berarti tidak berbeda

Berdasarkan Tabel 7, dapat diketahui bahwa perlakuan B (1,5 menit) dan perlakuan A (1 menit) memberikan hasil terbaik yang diikuti oleh C (2 menit), sedangkan perlakuan D (2,5 menit) memberikan hasil yang terendah dalam perkembangan fase morulla. Perbedaan ini bukan berarti semua telur teraktivasi, karena dibandingkan dengan kontrol normal yang mengalami perkembangan embrio dengan jumlah 99,61%

Hasil analisis polynomial orthogonal diperoleh hubungan yang linier antara lama perendaman terhadap perkembangan oosit ikan lele dumbo dengan persamaan $Y = 100,16 - 5,3X$ sedangkan nilai $r = 0,78$ Hal ini dapat dilihat pada grafik

persamaan linier, disajikan pada Gambar 11 berikut ini, dimana X = lama perendaman dan Y = jumlah telur perkembangan oosit pada fase morula(%).



Gambar 13. Grafik hubungan antara lama perendaman etanol yang dipanaskan 40°C terhadap jumlah telur (%) perkembangan oosit tertinggi pada fase morulla

Pada Gambar 11 menunjukkan bahwa perlakuan lama perendaman etanol yang dipanaskan 40°C terhadap aktivasi parthenogenetik artifisial oosit ikan lele dumbo (*Clarias sp.*) mempunyai respon yang berbeda dalam perkembangan oosit sebagai akibat perlakuan lama rendaman yang berbeda. Perlakuan D (2,5 menit) memiliki jumlah morula yang terendah dengan jumlah 85,54% dan perlakuan lama perendaman 1,5 menit memiliki jumlah morula tertinggi dengan besar persentase 94,48%.

4.1.4 Fase blastula

Data hasil penelitian dengan perlakuan lama perendaman etanol yang dipanaskan 40°C terhadap aktivasi parthenogenetik artifisial oosit ikan lele dumbo (*Clarias sp.*) pada fase blastula disajikan pada Tabel 8 dan Gambar 14.

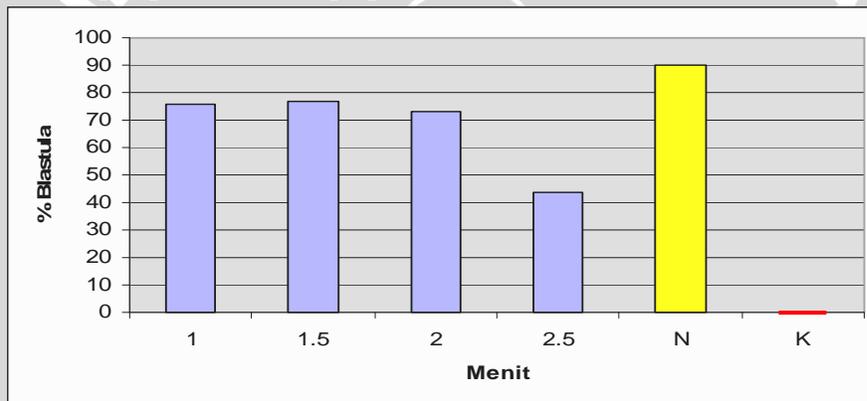
Tabel 8. Data pengamatan tingkat perkembangan oosit ikan lele dumbo pada fase blastula

| Perlakuan | Ulangan | | | Total | Rata2 |
|-----------|---------|-------|-------|--------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | | |
| 1 | 78,82 | 72,52 | 73,25 | 227,59 | 75,86 |
| 1,5 | 71,91 | 81,72 | 77,01 | 230,64 | 76,88 |
| 2 | 78,16 | 65,51 | 75,25 | 218,92 | 72,97 |
| 2,5 | 51 | 38,54 | 41,57 | 131,11 | 43,70 |
| Total | - | - | - | 808,26 | - |
| N | 92,63 | 94 | 82,65 | 269,28 | 89,76 |
| K | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Keterangan :

N = Kontrol normal (dengan sperma)

K = Kontrol tanpa sperma dan tanpa perlakuan



Gambar 14. Gambar pengaruh lama rendaman terhadap jumlah telur (%) pada fase pembelahan blastula

Setelah dilakukan penghitungan, diperoleh daftar sidik ragam seperti terdapat dalam Tabel 9 berikut ini.

Tabel 9. Daftar sidik ragam tingkat perkembangan oosit ikan lele dumbo pada pembelahan blastula di setiap perlakuan

| S.KERAGAM | DB | JK | KT | F.HIT | F5% | F1% |
|-----------|----|--------|--------|---------|------|------|
| Perlakuan | 3 | 792,27 | 264,09 | 21,81** | 4,07 | 7,59 |
| Acak | 8 | 96,86 | 12,11 | | | |
| Total | 11 | 889,13 | | | | |

Keterangan ** = berbeda sangat nyata

Berdasarkan Tabel 9, dapat diketahui bahwa penelitian dengan perlakuan lama rendaman yang berbeda berpengaruh sangat nyata terhadap perkembangan oosit ikan lele dumbo pada fase perkembangan blastula yang berarti menerima H1 dan menolak H0. Jumlah blastula tertinggi terdapat pada perlakuan lama rendaman 1,5 menit yang memiliki prosentase sebesar 76,88% dan jumlah blastula terendah pada perlakuan lama rendaman 2,5 menit sebesar 43,7%. Namun dari keseluruhan percobaan, nilai terendah terdapat pada kontrol tanpa sperma dan tanpa perlakuan yakni sebesar 0% karena tidak terjadi perkembangan telur.

Untuk mengetahui perbedaan pengaruh dari tiap perlakuan maka dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT), dengan perhitungan berdasarkan uji BNT disajikan pada Tabel 10 berikut ini.

Tabel 10. Daftar uji BNT pengaruh lama rendaman terhadap perkembangan oosit pada fase blastula

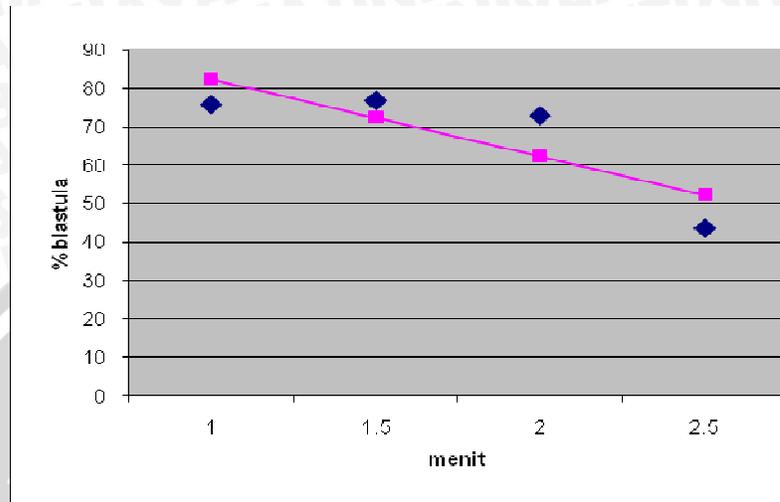
| RATA2 PERL | RATA-RATA | NOTASI |
|---------------|-----------|--------|
| B = 1,5 menit | 76,18 | a |
| A = 1,0 menit | 75,86 | a |
| C = 2,0 menit | 72,97 | a |
| D = 2,5 menit | 43,70 | b |

Ket : notasi sama berarti tidak berbeda

Berdasarkan Tabel 10, dapat diketahui bahwa perlakuan D (2,5 menit) berbeda dengan perlakuan A,B,C. Dari table 10 juga terlihat bahwa perlakuan A (1 menit), B (1,5 menit), C (2 menit) memberikan hasil yang relatif sama.

Berdasarkan analisis polynomial orthogonal diperoleh hubungan linier antara lama rendaman terhadap perkembangan oosit ikan lele dumbo dengan persamaan $Y = 102,49 - 20,08X$ dengan nilai $r = 0,91$ Hal ini dapat dilihat pada grafik persamaan

kuadrat ini disajikan pada Gambar 15 berikut ini, dimana x = lama perendaman dan Y = jumlah telur perkembangan oosit pada fase morula.



Gambar 15. Grafik hubungan antara perlakuan lama perendaman yang berbeda dengan jumlah telur (%) perkembangan oosit tertinggi pada fase blastula

4.1.5 Perkembangan oosit seluruh fase

Data hasil penelitian dengan perlakuan lama perendaman etanol yang dipanaskan 40°C terhadap aktivasi parthenogenetik artifisial oosit ikan lele dumbo (*Clarias sp.*) pada seluruh fase disajikan pada Tabel 11 dan gambar 16.

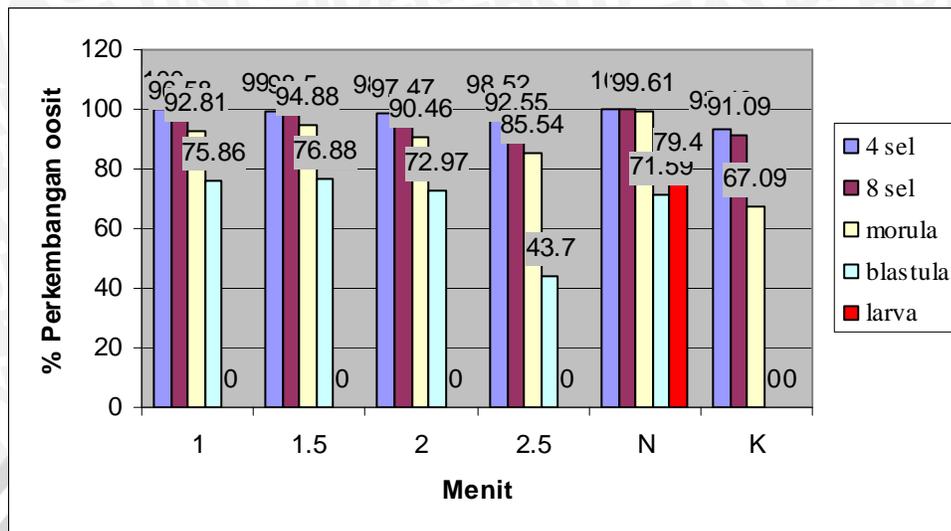
Tabel 10. Data pengamatan tingkat perkembangan oosit ikan lele dumbo pada seluruh fase di setiap suhu perlakuan

| PERLAKUAN | RATA-RATA TINGKAT PERKEMBANGAN OOSIT | | | | |
|-----------|--------------------------------------|-------|--------|----------|-----------|
| | 4 SEL | 8 SEL | MORULA | BLASTULA | PENETASAN |
| 1 | 100 | 96,58 | 92,81 | 75,86 | 0 |
| 1.5 | 99,22 | 98,5 | 94,88 | 76,88 | 0 |
| 2 | 98,92 | 97,47 | 90,46 | 72,97 | 0 |
| 2.5 | 98,52 | 92,55 | 85,54 | 43,70 | 0 |
| N | 100 | 100 | 99,61 | 89,76 | 71,59 |
| K | 93,49 | 91,09 | 67,09 | 0 | 0 |

Keterangan :

N = Kontrol normal (dengan sperma)

K = Kontrol tanpa sperma dan tanpa perlakuan



Gambar 16. Gambar perlakuan lama perendaman etanol yang dipanaskan 40°C terhadap jumlah telur (%) pada seluruh fase.

4.2 Pembahasan Perkembangan Oosit Ikan Lele Dumbo

Berdasarkan Gambar di atas, dapat diketahui bahwa penelitian dengan perlakuan lama perendaman etanol yang dipanaskan 40°C yang berbeda tidak berpengaruh nyata terhadap perkembangan oosit ikan lele dumbo pada fase perkembangan 4 sel. Pada perkembangan 4 sel hasil perendaman 1 menit sampai dengan 2,5 menit berkisar antara 98,85-100%. sedangkan aktivasi menggunakan etanol 7%, pada oosit tikus didapatkan persentase hasil telur yang teraktivasi mencapai fase 4 sel sebesar 49,1%, (Uranga, Pedersen, dan Arechaga, 1996). Dengan demikian tingkat keberhasilan pada ikan lele dumbo lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan pada oosit tikus. Dimana pada fase 4 sel ini pembelahan sel berlangsung melalui bidang vertikal sehingga sampai tahapan ini telah dihasilkan empat buah sel yang berukuran sama besar (Subowo, 1995)

Berdasarkan Gambar 16, tentang perkembangan jumlah telur(%) pada seluruh fase dapat diketahui bahwa penelitian dengan perlakuan lama perendaman etanol yang dipanaskan 40°C yang berbeda tidak berpengaruh nyata terhadap perkembangan oosit ikan lele dumbo pada fase perkembangan 8 sel. Pada perkembangan 8 sel hasil perendaman 1 menit sampai dengan 2,5 menit berkisar antara 92,55 – 98,52%. Pada aktivasi oosit Marmoset dengan menggunakan etanol 7% selama 6 – 8 jam, oosit yang teraktivasi mencapai fase 8 sel yaitu sebesar 20% (8 dari 40) (Marshall, Wilton dan More, 1998). Hal ini membuktikan bahwa aktivasi oosit ikan lele dumbo dengan menggunakan etanol tingkat kelulushidupannya lebih tinggi daripada aktivasi oosit marmoset.

Pada fase morulla jumlah telur tertinggi terdapat pada perlakuan B (1,5 menit) dengan jumlah 94,88% dan jumlah terkecil terdapat pada perlakuan D (2,5 menit) dengan angka prosentase 85,54%. Hasil perlakuan ini menerima H1 dan menolak H0. Tetapi bila dibandingkan dengan kontrol (K) masih lebih tinggi karena kontrol tanpa sperma atau tanpa perlakuan hanya sebesar 67,09% tetapi bila dibandingkan dengan kontrol normal masih lebih rendah dengan nilai 99,61%. Aktivasi dengan menggunakan etanol 7%, pada oosit tikus didapatkan persentase hasil telur yang teraktivasi sampai pada fase morula yaitu sebesar sebesar 37% (Uranga, Pedersen, dan Arechaga, 1996). Hal ini menunjukkan presentase tingkat kelulushidupan oosit ikan lele dumbo yang teraktivasi pada fase morula, lebih tinggi dibandingkan dengan presentase oosit tikus yang teraktivasi pada fase morula.

Pada fase Blastula jumlah telur tertinggi terdapat pada perlakuan B dengan lama perendaman 1,5 menit dengan jumlah 76,88% dan jumlah terkecil terdapat pada

perlakuan D yaitu lama perendaman 2,5 menit dengan angka prosentase 43,70%. Hasil perlakuan pada fase blastula menerima H1 dan menolak H0 karena pada fase ini kontrol (K) tidak berkembang sampai fase blastula sedangkan pada kontrol normal 79,4%. Hasil ini sesuai dengan hasil penelitian yang pernah dilakukan pada oosit tikus. Menurut Komar (1972), penelitian parthenogenesis dengan perlakuan *thermal shock* pada tikus yang telah dilakukan, menunjukkan bahwa sekitar 50% telur mengalami aktivasi pada perlakuan suhu tertinggi, sedangkan perlakuan dengan suhu di bawah kondisi optimal, embrio hanya mampu berkembang hingga fase 8 sel dan sebagian kecil lagi hanya mampu bertahan pada fase morula. Telur yang teraktivasi pada parthenogenetik artifisial yang dilakukan pada oosit tikus dengan *Thermal Shock* hanya mencapai fase blastula.

Pada fase berikutnya, seluruh perlakuan telah mati semua kecuali pada kontrol normal dengan sperma. Hanya selang sekitar satu jam setelah dilakukan penghitungan pada perkembangan fase blastula, seluruh telur dari semua perlakuan dan kontrol tanpa perlakuan dan tanpa sperma mati. Untuk perkembangan oosit kontrol dengan sperma mampu terus melanjutkan hingga fase penetasan dan menghasilkan larva dengan jumlah telur sebesar 71,59%.

Dari sini dapat disimpulkan bahwa perkembangan oosit pada ikan lele dumbo dengan perlakuan lama perendaman etanol yang dipanaskan 40°C hanya mampu bertahan hidup hingga fase blastula. *Thermal Shock* pada oosit dan embrio dapat mengubah perkembangan dari oosit ataupun merusaknya. Namun semua itu dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti toleransi telur terhadap peningkatan suhu serta regulasi dari *Heat Shock Protein (HSP)*. (Ju, 2005). Hal ini sesuai dengan

penelitian yang dicapai oleh Grupen (2002) Pada oosit babi, kombinasi antara aktivasi elektrik dan perlakuan 6-DMAP telah diketahui dapat mempercepat penekanan aktivitas MPF dibandingkan hanya dengan menggunakan aktivasi elektrik saja. Lebih lanjut, reaktivasi MPF dapat ditunda dengan menerapkan perlakuan 6-DMAP sedemikian rupa sehingga daya kinetik aktivitas MPF menjadi sama dengan yang terdapat pada oosit yang telah diinseminasi, dimana hal ini berkorelasi dengan terjadinya peningkatan pembentukan blastosis parthenogenetis.

Dari perkembangan oosit ikan lele dumbo seluruh perlakuan lama rendaman, perlakuan B dengan lama rendaman 1,5 menit dinilai yang terbaik karena mampu bertahan hidup hingga fase terakhir dengan jumlah telur yang mampu bertahan hidup terbanyak dengan prosentase sebesar 76,88%.

Poliploidi pada ikan dapat dilakukan melalui perlakuan secara fisik seperti melakukan kejutan (*shocking*) suhu baik panas maupun dingin, *pressure (hydrostatic pressure)* yang secara kimia untuk mencegah peloncatan *Polar Body II* atau pembelahan sel pertama pada telur terfertilisasi. Pada perlakuan poliploidi ikan menunjukkan adanya tingkat mortalitas yang tinggi. Hal ini disebabkan oleh beberapa macam efek merugikan dari perlakuan kejutan pada sitoplasma telur. Perlakuan kejutan suhu dapat mengakibatkan kerusakan pada benang-benang spindle yang terbentuk setelah proses pembelahan sel dalam telur. Kejutan suhu dan tekanan mengakibatkan rusaknya mikrotubulus yang membentuk spindle selama pembelahan. (Kabakov dan Vladimir, 1997).

Menurut Novalisa (2007), dari hasil penelitian yang telah dilakukan bahwa kombinasi perlakuan ethanol 7% dengan sitokalasin B 0,9 µg/ml memberikan

persentase perkembangan telur lebih tinggi daripada perlakuan kombinasi yang lain. Perkembangan telur secara normal pada tahap 2 sel terdapat pada perlakuan kombinasi ethanol 7 % dengan sitokalasin B dan tahap 4 sel abnormal ditemukan pada kombinasi ethanol dengan sitokalasin B 0,7 µg/ml. *Abnormal cleavage* terjadi pada tahap 2 sel dengan perlakuan ethanol 6 % dengan variasi konsentrasi sitokalasin B 0,7 µg/ml dan 0,9 µg/ml kombinasi ethanol 8 % dengan sitokalasin 0,5 µg/ml. tahap akhir dari perkembangan telur adalah sampai pada tahap blastula abnormal sebelum telur mengalami kematian.

Sedangkan hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Fuadiyah (2007) dijelaskan bahwa hasil perlakuan dengan perendaman ethanol 7 % dan 6 DMAP menunjukkan bahwa rata-rata persentase oosit yang berkembang lebih tinggi dibandingkan tanpa perendaman dengan 6 DMAP, persentase tertinggi oosit yang berkembang pada perendaman ethanol dilanjutkan dengan perendaman dengan 6 DMAP yaitu 98,90 % yaitu pada perlakuan perendaman dengan menggunakan ethanol konsentrasi 7% 7 menit dilanjutkan dengan perendaman dengan 6 DMAP 200 µg/ml 10 menit, sedangkan yang terendah adalah pada perendaman dengan menggunakan ethanol konsentrasi 7% 7 menit diikuti dengan perendaman DMAP 100 µg/ml 5 menit yaitu sebesar 79,42 %. Nilai ini lebih tinggi bila dibandingkan dengan perlakuan pada perendaman ethanol 7% saja tanpa 6 DMAP yaitu sebesar 70,75 %. Sedangkan jumlah terendah yaitu pada perendaman ethanol 7 % selama 9 menit sebesar 52,09 % dan ini merupakan hasil terendah dari semua perlakuan yang telah dilakukan dalam penelitian ini.

Ciptadi (2002), dalam penelitian yang telah dilakukan pada embrio cloning kambing menjelaskan bahwa aktivasi embrio parthenogenesis oosit kambing dengan perendaman ethanol 7% selama 7 menit didapatkan persentasi jumlah oosit yang mengalami cleavage selama 48 jam adalah 26%, lebih besar dibandingkan kontrol yang hanya 4%.

4.3 Kualitas air

Dalam penelitian tentang pola perlakuan kejutan suhu pada parthenogenetik artifisial ini menggunakan parameter penunjang kualitas air. Kualitas air yang diukur meliputi suhu, derajat keasaman (pH) dan oksigen terlarut (DO). Faktor-faktor tersebut turut diperhatikan selama penelitian berlangsung karena air dapat mempengaruhi kelangsungan hidup ikan itu sendiri. Air merupakan media bagi ikan merupakan salah satu faktor penunjang dalam penelitian ini adalah kualitas air. Air sebagai tempat hidup organisme perairan harus mampu mendukung kehidupan ikan selain secara kuantitas harus tersedia. Pada penelitian ini digunakan parameter penunjang antara lain :

4.3.1 Suhu

Perlakuan yang dilakukan pada telur ikan lele ini tidak memberikan perubahan yang besar terhadap suhu media (air inkubator). Suhu pada media dalam kisaran budidaya ikan lele dumbo yaitu sekitar 25°C – 26°C (lampiran 2). Suhu sangat berpengaruh pada proses kimia dan biologis (Arifin, 2003)

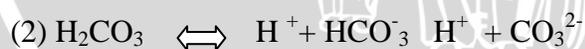
Fluktuasi suhu sangat berpengaruh terhadap kehidupan organisme karena setiap organisme mempunyai daya adaptasi yang berbeda-beda terhadap suhu lingkungannya. Menurut Alabaster dan Lyod dalam Handayani (2001), toleransi ikan

terhadap suhu yang berbeda-beda tergantung pada jenis species, stadium pertumbuhan, derajat aklimatisasi, oksigen terlarut, jenis dan tingkat pencemaran serta lamanya lingkungan terkena panas dan musim.

4.3.2 PH

pH adalah suatu ukuran dari konsentrasi ion hidrogen, yang menunjukkan suasana air tersebut apakah bersifat asam atau basa. Skala pH mempunyai deret 0-14 dan pH adalah netral, tidak bersifat asam atau basa. Skala pH akan menurun (bersifat asam) apabila konsentrasi karbondioksida (CO₂) meningkat. Derajat keasaman (pH) air dapat diukur dengan menggunakan kertas lakmus dan pH meter. Hasil pengukuran pH pada saat penelitian adalah berkisar antara 6,95 sampai 7,41 dengan menggunakan pH meter (lampiran 2). Kondisi ini sesuai dengan kisaran pH untuk lele dumbo menurut Khairuman (2002) yaitu 6,5 - 8.

Menurut Stickney dalam Handayani (2001), pH di perairan dipengaruhi oleh jumlah CO₂ yang dihasilkan dari proses respirasi sesuai dengan reaksi sebagai berikut.



Dari reaksi di atas dapat dilihat bahwa CO₂ akan bereaksi dengan H₂O membentuk H₂CO₃ yang pada reaksi selanjutnya akan terionisasi menjadi ion H⁺ dan HCO₃⁻ yang akan terionisasi lagi menjadi ion H⁺ dan CO₃²⁻. Penambahan ion H⁺ pada air akan berakibat meningkatkan keasaman air yang diindikasikan dengan turunnya pH.

4.3.3 Oksigen terlarut

Berdasarkan hasil pengamatan pada saat penelitian berlangsung didapatkan kisaran oksigen terlarut yaitu 4,73 sampai 4,93 ppm (lampiran 2). Kondisi ini sesuai dengan kandungan oksigen terlarut yang baik untuk kehidupan lele dumbo adalah di atas 3 mg/l, namun ikan lele mempunyai organ pernafasan tambahan (arborescent organ), maka ikan lele mampu hidup pada air dengan DO 0-3 mg/l (Viveen *et al*, 1989 dalam Handayani 2001).

Kondisi kadar oksigen terlarut merupakan terpenting dalam kehidupan akuatik. Oksigen terlarut dalam air dapat berkurang karena digunakan untuk respirasi baik fitoplankton maupun organisme lain dalam perairan, selain itu oksigen juga bisa berkurang karena pada proses dekomposisi bahan organik. Penyebab lain berkurangnya kandungan oksigen dalam air lepasnya oksigen ke udara yang diakibatkan oleh meningkatnya suhu air.

5 KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian tentang “Pengaruh Ethanol Thermal Shock Dengan Lama Perendaman Yang Berbeda Terhadap Parthenogenetik Artifisial Oosit Ikan Lele Dumbo (*Clarias Sp.*)” dapat disimpulkan bahwa:

- Penggunaan etanol yang dipanaskan 40°C dengan lama perendaman yang berbeda tidak berpengaruh nyata terhadap fase pembelahan 4 sel dan pembelahan 8 sel.
- Penggunaan etanol yang dipanaskan 40°C dengan lama perendaman yang berbeda berpengaruh sangat nyata terhadap fase morula, hubungan antara lama perendaman pada fase morula berupa regresi linier dengan persamaan $Y = 100,16 - 5,3X$, $r = 0,78$ dengan nilai tertinggi sebesar 94,86% didapat pada lama rendaman 1 menit.
- Penggunaan etanol yang dipanaskan 40°C dengan lama perendaman yang berbeda berpengaruh nyata terhadap fase blastula, hubungan antara lama perendaman dengan fase blastula berupa regresi linier dengan persamaan $Y=102,49 - 20,08X$, $r= 0,91$. dengan nilai tertinggi sebesar 82,41% didapat pada lama rendaman 1 menit.
- Penggunaan etanol yang dipanaskan 40°C dengan lama perendaman yang berbeda telah menyebabkan telur membelah mencapai fase blastula. Pada kontrol normal (kontrol dengan sperma) menghasilkan penetasan sebesar 71,5%.

5.2 Saran

Dari penelitian yang telah dilakukan, dapat disarankan :

- Untuk mengaktivasi telur lele dumbo hingga fase blastula sebaiknya digunakan etanol yang dipanaskan 40°C dengan lama perendaman menit.
- Perlu penelitian lanjutan pada penggunaan konsentrasi etanol serta kombinasi dengan bahan lain yang digunakan sehingga diharapkan embrio dapat telur berkembang.
- Perlu Penelitian dengan penambahan bahan kimia lain untuk menyempurnakan aktivasi oosit dalam parthenogenetik artifisial, seperti Ca Ionophore dan 6 DMAP.



DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous, 2005. **Effect of the incubation temperature on the embryonic development and hatching time of eggs of the red porgy *Pagrus pagrus* (Linne, 1758) (Pisces: Sparidae).** scielo.php.htm
- _____, 2006. **<http://Stress In Fish Part I : What Is Stress In Fish>**. <http://www.advancedaquarist/issues/july2004/short.htm>.
- _____, 2007 **Pembentukan Diferensiasi Kuning Telur** <http://aquamina.files.wordpress.com/2007/12/vitellogenesis.pdf> (17 Juni 2009).
- Arfiati, D. 2005. **Anatomi Ikan**. Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang. 103 Hal.
- Barus, T.A. 2002. **Pengantar Limnologi**. Jurusan Biologi FMIPA, USU. Medan. 112 Hal
- Bhise, M.P. and Tariq A.K, 2002. **Androgenesis: The Best Manipulation of Fish Genomes. Fish Genetic and Biotechnology Division**. Central Institute of Fisheries Education, Versova. Mumbai. India. 232 Hal.
- Ciptadi, G. 2002. **Pengembangan Metode Aktivasi Oosit Rekonstruksi Hasil Transfer Nukleus Intra Sitoplasma Untuk Produksi Embrio Kloning Kambing**. Universitas Brawijaya Program Pasca Sarjana. Malang.
- Effendie, M. I. 1979. **Metode Biologi Perikanan**. Institut Pertanian Bogor. Bogor 69 Hal
- _____, M. I. 1993. **Mengenal Beberapa Jenis Koi**. Kanisius. Yogyakarta. 65 Hal
- _____, M. I. 2002. **Biologi Perikanan**. Yayasan Pustaka Utama. Yogyakarta. 163 Hal.
- Fessenden, 1982. **Kimia Organik (Edisi Ketiga)**. Penerbit Erlangga. Jakarta. 590 Hal.
- Fuadiyah, S. 2007. **Pengaruh Variasi Waktu Perendaman Telur Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) Dalam Etanol 7% dan Perendaman Dalam 6-Dimethylaminopurine (6DMAP) Terhadap Aktivasi dan Perkembangan Embrio Parthenogenetik**. Universitas Brawijaya. Malang. 125 Hal.
- Fujaya, Y. 1999. **Fisiologi Ikan**. Jurusan Perikanan Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanudin. Ujung Pandang. 177 Hal

- _____. 2004. **Fisiologi Ikan Dasar Pengembangan Teknologi Perikanan**. Rineka Cipta. Jakarta.
- Gruppen, Christopher and Mark B. Nottle. 2002. **Calcium Release at Fertilization. Artificially Mimicking The Oocytes Response to Sperm**. Hiroshima.
- Handayani, S. 2001. **Peran Hormon 3,5,3-Tridotironin (T3) Dalam Pakan Terhadap Peningkatan Laju Pertumbuhan dan Efisiensi Pakan Ikan Gurami (*Osphronemus gouramy*)**. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 216 hal
- Ilyin V and Parker I. 1992, **Effect Of Alcohol On Responses Evoked By Inositol triphosphahate in Xenovus Oocytes**, departemen of psychobiologi, University of California.
- Ju, J.C 2005 Cellular responses of oocytes and embryos under thermal stress: hints to molecular signaling. <http://www.jcju@dragon.nchu.edu.tw>
- Kabakov, A.E. and Vladimir L.G. 1997. **Heat Shock and Cytoprotection: Atp Deprived Mammalian Cells**. R.G. Landes Company. Austin. 237 Hal.
- Khairuman dan Khairul. 2002. **Budidaya Lele Dumbo Secara Intensif**. Agromedia Pustaka. Jakarta. 79 Hal
- Khairuman dan Amri, K.. 2006. **Budidaya Lele Dumbo Secara Intensif**. AgroMedia. Jakarta.
- Kimbal J.W, 1994. **BIOLOGI** Edisi ke-2 alih bahasa siti Soetarmi dan N. Sugiri Erlangga, Jakarta.
- Komar, A. 1972. **Parthenogenetic Development Of Mouse Eggs Activated By Heat-Shock**. <http://www.springerlink.com>. Diakses tanggal 5 Maret 2008.
- Loi, 1998. **Development Of Parthenogenetic Clones Ovine Embryo: Effect Of Activation Protocols**. Biology Reproduktion. 58 Hal.
- Mukti A.T, 2001. **Poliploidisasi Ikan Mas (*Cyprinus carpio L.*)**. Biosain, Volume. 1 No. 1
- Murtidjo, B.A. 2001. **Beberapa Metode Pembenihan Ikan Air Tawar**. Kanisius. Yogyakarta. 107 Hal.
- Nazir M, 1983. **Metode Penelitian**. Ghalia Indonesia. Jakarta. 62 Hal.

- Novalisa, T. 2007. **Tingkat Aktivasi dan Perkembangan Telur Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) Secara Parthenogenesis Menggunakan Variasi Konsentrasi Etanol dan Sitokalasin B.** Universitas Brawijaya. Malang.
- Richter, C. J. J dan Rustidja, 1985. **Pengantar Ilmu Reproduksi Ikan.** NUFFIC/UNIBRAW/LUW/FISH. Malang. 86 Hal.
- Risnandar, D. 2001. **Pengaruh Umur Zigot Pada Saat Kejutan Panas Terhadap Tingkat Keberhasilan Triploidisasi, Serta Kelangsungan Hidup Embrio Dan Larva Ikan Jambal Siam (*Pangasius hypophthalmus*).** Skripsi. Program studi Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.
- Santoso, B. 1994. **Petunjuk Praktis Budidaya Lele Dumbo dan Lokal.** Kanisius. Yogyakarta. 42 Hal.
- Sastrosupadi, A. 2000. **Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian Edisi Revisi.** Kanisius. Yogyakarta. 276 Hal.
- Subowo, 1995. **Biologi Sel.** Penerbit Angkasa. Bandung. 286 Hal.
- Suhana dan Ratu, 1982. **Diferensiasi – Embriologi Dalam tingkat: Seluler, Subseluler, Molekuler.** Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. 111 hal
- Suseno, D. 2004. **Pengelolaan Usaha Pembenihan Ikan Mas.** Penebar Swadaya. Jakarta.
- Sutisna, D.H., Ratno S. 1995. **Pembenihan Ikan Air Tawar.** Kanisius. Yogyakarta. 135 hal.
- Tang, U.M. dan Ridwan A. 2000. **Biologi Reproduksi Ikan.** IPB. Bogor. 110 Hal.
- Uranga, Jose A., Roger A. Pedersen, and Juan Arechaga, 1996. **Parthenogenetic Activation of Mouse Oocytes Using Calcium Ionophore and Protein and Protein Kinase C Stimulators.** Departemen of cell biology, University of the Basque Country, Leioa, Spain.
- Woyanovich, E and Horvarth, L. 1980. **The Artificial Propagation of Warm-Water Fin Fishes- A Manual For Extension.** Food and Agriculture Organization of United Nations. Rome.

LAMPIRAN 1, Data pengamatan perkembangan oosit pada masing-masing perlakuan

**Data pengamatan perlakuan : Durasi perendaman etanol thermal
Shock 1 menit**
Pengamat : Ahmad Syarifudin Habibi
Tgl : 17 Mei – 18 Mei 2009
Telur masuk inkubator : 11:33

| Perlakuan | Stadia Perkembangan | waktu (pukul) | KELULUS HIDUPAN | | | | arcsin |
|-----------|---------------------|---------------|-----------------|-------|-------|------------|--------|
| | | | mati | hidup | total | persentase | |
| A1 | 2 sel | 11:37 | 0 | 85 | 85 | 100 | 90 |
| A2 | 2 sel | 11:38 | 0 | 91 | 91 | 100 | 90 |
| A3 | 2 sel | 11:39 | 0 | 86 | 86 | 100 | 90 |
| A1 | 4 sel | 12:07 | 1 | 85 | 85 | 100 | 90 |
| A2 | 4 sel | 12:08 | 2 | 91 | 91 | 100 | 90 |
| A3 | 4 sel | 12:09 | 1 | 86 | 86 | 100 | 90 |
| A1 | 8 Sel | 12:43 | 2 | 83 | 85 | 97,64 | 81,16 |
| A2 | 8 Sel | 12:45 | 4 | 87 | 91 | 95,60 | 77,89 |
| A3 | 8 Sel | 12:45 | 3 | 83 | 86 | 96,51 | 79,23 |
| A1 | Morula | 13:36 | 5 | 80 | 85 | 94,11 | 75,95 |
| A2 | Morula | 13:38 | 7 | 84 | 91 | 91,30 | 72,84 |
| A3 | Morula | 13:42 | 6 | 80 | 86 | 93,02 | 74,68 |
| A1 | Morula | 15:16 | 6 | 79 | 85 | 92,94 | 74,59 |
| A2 | Morula | 15:18 | 10 | 81 | 91 | 89,01 | 70,64 |
| A3 | Morula | 15:20 | 8 | 78 | 86 | 90,69 | 72,23 |
| A1 | Blastula | 17:24 | 18 | 67 | 85 | 78,82 | 62,59 |
| A2 | Blastula | 17:26 | 25 | 66 | 91 | 72,52 | 58,38 |
| A3 | Blastula | 17:28 | 23 | 63 | 86 | 73,25 | 58,85 |
| A1 | Blastula | 19:12 | 63 | 22 | 85 | 25,88 | 30,57 |
| A2 | Blastula | 19:14 | 42 | 49 | 91 | 53,84 | 47,20 |
| A3 | Blastula | 19:15 | 65 | 21 | 86 | 24,41 | 29,60 |
| A1 | Blastula | 20:27 | 85 | 0 | 85 | 0 | 0 |
| A2 | Blastula | 20:28 | 90 | 1 | 91 | 1,09 | 5,99 |
| A3 | Blastula | 20:30 | 86 | 0 | 86 | 0 | 0 |

LAMPIRAN 1,(Lanjutan)

Data pengamatan perlakuan : Durasi perendaman etanol thermal
Shock 1,5 menit
Pengamat : Ahmad Syarifudin Habibi
Tgl : 17 Mei – 18 Mei 2009
Telur masuk inkubator : 11:35

| Perlakuan | Stadia Perkembangan | waktu (pukul) | KELULUS HIDUPAN | | | | arcsin |
|-----------|---------------------|---------------|-----------------|-------|-------|------------|--------|
| | | | mati | hidup | total | persentase | |
| B1 | 2 sel | 11:46 | 0 | 89 | 89 | 100 | 90 |
| B2 | 2 sel | 11:47 | 0 | 93 | 93 | 100 | 90 |
| B3 | 2 sel | 11:47 | 0 | 87 | 87 | 100 | 90 |
| B1 | 4 sel | 12:13 | 0 | 89 | 89 | 100 | 90 |
| B2 | 4 sel | 12:14 | 1 | 92 | 93 | 98,92 | 84,03 |
| B3 | 4 sel | 12:15 | 1 | 86 | 87 | 98,85 | 83,84 |
| B1 | 8 Sel | 12:46 | 2 | 87 | 89 | 97,75 | 81,37 |
| B2 | 8 Sel | 12:48 | 1 | 92 | 93 | 98,92 | 84,03 |
| B3 | 8 Sel | 12:50 | 1 | 87 | 87 | 98,85 | 83,84 |
| B1 | Morula | 13:46 | 6 | 83 | 89 | 93,25 | 74,94 |
| B2 | Morula | 13:51 | 2 | 91 | 93 | 97,84 | 81,55 |
| B3 | Morula | 13:54 | 3 | 84 | 87 | 96,55 | 79,29 |
| B1 | Morula | 15:21 | 10 | 79 | 89 | 88,76 | 70,41 |
| B2 | Morula | 15:22 | 4 | 89 | 93 | 95,69 | 78,02 |
| B3 | Morula | 15:23 | 5 | 82 | 87 | 94,25 | 76,12 |
| B1 | Blastula | 17:31 | 25 | 64 | 89 | 71,91 | 57,99 |
| B2 | Blastula | 17:36 | 17 | 76 | 93 | 81,72 | 64,68 |
| B3 | Blastula | 17:37 | 20 | 67 | 87 | 77,01 | 61,34 |
| B1 | Blastula | 19:17 | 76 | 13 | 89 | 14,60 | 22,46 |
| B2 | Blastula | 19:19 | 64 | 29 | 93 | 31,18 | 33,94 |
| B3 | Blastula | 19:20 | 71 | 16 | 87 | 18,39 | 25,39 |
| B1 | Blastula | 20:31 | 89 | 0 | 89 | 0 | 0 |
| B2 | Blastula | 20:32 | 92 | 1 | 93 | 1,07 | 5,93 |
| B3 | Blastula | 20:34 | 87 | 0 | 87 | 0 | 0 |

LAMPIRAN 1,(Lanjutan)

**Data pengamatan perlakuan : Durasi perendaman etanol thermal
Shock 2 menit**
Pengamat : Ahmad Syarifudin Habibi
Tgl : 17 Mei – 18 Mei 2009
Telur masuk inkubator : 11:37

| Perlakuan | Stadia Perkembangan | waktu (pukul) | KELULUS HIDUPAN | | | | arcsin |
|-----------|---------------------|---------------|-----------------|-------|-------|------------|--------|
| | | | mati | hidup | total | persentase | |
| C1 | 2 sel | 11:49 | 0 | 91 | 91 | 100 | 90 |
| C2 | 2 sel | 11:50 | 0 | 87 | 87 | 100 | 90 |
| C3 | 2 sel | 11:51 | 0 | 97 | 97 | 100 | 90 |
| C1 | 4 sel | 12:16 | 0 | 91 | 91 | 100 | 90 |
| C2 | 4 sel | 12:18 | 1 | 86 | 87 | 98,85 | 83,84 |
| C3 | 4 sel | 12:18 | 2 | 95 | 97 | 97,93 | 81,73 |
| C1 | 8 Sel | 12:51 | 0 | 91 | 91 | 100 | 90 |
| C2 | 8 Sel | 12:52 | 3 | 84 | 87 | 96,55 | 79,29 |
| C3 | 8 Sel | 13:53 | 4 | 93 | 97 | 95,87 | 78,27 |
| C1 | Morula | 13:57 | 7 | 84 | 91 | 92,30 | 73,89 |
| C2 | Morula | 14:01 | 11 | 76 | 87 | 87,35 | 69,16 |
| C3 | Morula | 14:02 | 8 | 89 | 97 | 91,75 | 73,34 |
| C1 | Morula | 15:24 | 14 | 77 | 91 | 84,61 | 66,90 |
| C2 | Morula | 15:26 | 23 | 64 | 87 | 73,56 | 59,02 |
| C3 | Morula | 15:27 | 19 | 78 | 97 | 80,41 | 63,73 |
| C1 | Blastula | 17:38 | 23 | 68 | 91 | 78,16 | 62,14 |
| C2 | Blastula | 17:40 | 30 | 57 | 87 | 65,51 | 54,03 |
| C3 | Blastula | 17:43 | 24 | 73 | 97 | 75,25 | 60,16 |
| C1 | Blastula | 19:21 | 68 | 23 | 91 | 25,27 | 30,18 |
| C2 | Blastula | 19:21 | 65 | 22 | 87 | 25,28 | 30,18 |
| C3 | Blastula | 19:22 | 72 | 25 | 97 | 25,77 | 30,51 |
| C1 | Blastula | 20:35 | 90 | 1 | 91 | 1,09 | 5,99 |
| C2 | Blastula | 20:36 | 85 | 2 | 87 | 2,29 | 8,70 |
| C3 | Blastula | 20:37 | 97 | 2 | 97 | 2,06 | 8,29 |

LAMPIRAN 1,(Lanjutan)

Data pengamatan perlakuan : Durasi perendaman etanol thermal
Shock 2,5 menit
Pengamat : Ahmad Syarifudin Habibi
Tgl : 17 Mei – 18 Mei 2009
Telur masuk inkubator : 11:39

| Perlakuan | Stadia Perkembangan | waktu (pukul) | KELULUS HIDUPAN | | | | arcsin |
|-----------|---------------------|---------------|-----------------|-------|-------|------------|--------|
| | | | mati | hidup | total | persentase | |
| D1 | 2 sel | 11:55 | 0 | 100 | 100 | 100 | 90 |
| D2 | 2 sel | 11:58 | 0 | 96 | 96 | 100 | 90 |
| D3 | 2 sel | 11:59 | 0 | 89 | 89 | 100 | 90 |
| D1 | 4 sel | 12:19 | 1 | 99 | 100 | 99 | 84,26 |
| D2 | 4 sel | 12:21 | 4 | 92 | 96 | 95,83 | 78,21 |
| D3 | 4 sel | 12:21 | 2 | 87 | 89 | 97,75 | 81,37 |
| D1 | 8 Sel | 12:54 | 5 | 95 | 100 | 95 | 77,08 |
| D2 | 8 Sel | 12:55 | 8 | 88 | 96 | 91,66 | 73,21 |
| D3 | 8 Sel | 12:56 | 8 | 81 | 89 | 91,01 | 72,55 |
| D1 | Morula | 14:043 | 10 | 90 | 100 | 90 | 71,56 |
| D2 | Morula | 14:04 | 18 | 78 | 96 | 81,25 | 64,34 |
| D3 | Morula | 14:06 | 13 | 76 | 89 | 85,39 | 67,53 |
| D1 | Morula | 15:29 | 24 | 76 | 100 | 76 | 60,66 |
| D2 | Morula | 15:30 | 28 | 68 | 96 | 70,83 | 57,03 |
| D3 | Morula | 15:31 | 23 | 66 | 89 | 74,15 | 59,44 |
| D1 | Blastula | 17:44 | 49 | 51 | 100 | 51 | 45,57 |
| D2 | Blastula | 17:49 | 59 | 37 | 96 | 38,54 | 38,37 |
| D3 | Blastula | 17:50 | 52 | 37 | 89 | 41,57 | 40,17 |
| D1 | Blastula | 19:23 | 79 | 21 | 100 | 21 | 27,27 |
| D2 | Blastula | 19:24 | 74 | 22 | 96 | 22,91 | 28,59 |
| D3 | Blastula | 19:25 | 72 | 17 | 89 | 19,10 | 25,91 |
| D1 | Blastula | 20:38 | 100 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| D2 | Blastula | 20:39 | 96 | 0 | 96 | 0 | 0 |
| D3 | Blastula | 20:40 | 89 | 0 | 89 | 0 | 0 |

LAMPIRAN 1,(Lanjutan)**Data pengamatan perlakuan****: Kontrol tanpa perlakuan****Pengamat****: Ahmad Syarifudin Habibi****Tgl****: 17 Mei – 18 Mei 2009****Telur masuk inkubator****: 11:40 WIB**

| Perlakuan | Stadia Perkembangan | waktu (pukul) | KELULUS HIDUPAN | | | | arcsin |
|-----------|---------------------|---------------|-----------------|-------|-------|------------|--------|
| | | | mati | hidup | total | persentase | |
| K1 | 2 sel | 12:02 | 2 | 95 | 97 | 97,94 | 81,75 |
| K2 | 2 sel | 12:02 | 2 | 96 | 98 | 97,96 | 81,78 |
| K3 | 2 sel | 12:03 | 1 | 96 | 97 | 98,97 | 84,17 |
| K1 | 4 sel | 12:22 | 6 | 91 | 97 | 93,81 | 75,59 |
| K2 | 4 sel | 12:22 | 6 | 92 | 98 | 93,88 | 75,67 |
| K3 | 4 sel | 12:24 | 7 | 90 | 97 | 92,78 | 74,41 |
| K1 | 8 sel | 12:57 | 8 | 89 | 97 | 91,75 | 73,31 |
| K2 | 8 sel | 12:58 | 9 | 89 | 98 | 90,82 | 72,36 |
| K3 | 8 sel | 12:58 | 9 | 88 | 97 | 90,72 | 72,26 |
| K1 | 16 sel | 14:09 | 11 | 86 | 97 | 88,66 | 70,32 |
| K2 | 16 sel | 14:13 | 11 | 87 | 98 | 88,78 | 70,43 |
| K3 | 16 sel | 14:15 | 10 | 87 | 97 | 89,69 | 71,27 |
| K1 | 16 sel | 15:33 | 23 | 74 | 97 | 76,29 | 62,93 |
| K2 | 16 sel | 15:34 | 23 | 75 | 98 | 76,53 | 61,02 |
| K3 | 16 sel | 15:35 | 25 | 72 | 97 | 74,23 | 59,49 |
| K1 | Morula | 17:52 | 32 | 65 | 97 | 67,01 | 54,94 |
| K2 | Morula | 17:54 | 32 | 66 | 98 | 67,35 | 55,15 |
| K3 | Morula | 17:55 | 32 | 65 | 97 | 67,01 | 59,49 |
| K1 | Morula | 20:55 | 45 | 52 | 97 | 53,61 | 47,07 |
| K2 | Morula | 20:58 | 45 | 53 | 98 | 54,08 | 47,37 |
| K3 | Morula | 20:58 | 44 | 53 | 97 | 54,64 | 47,66 |
| K1 | Morula | 21:51 | 66 | 31 | 97 | 31,96 | 34,42 |
| K2 | Morula | 21:51 | 67 | 31 | 98 | 31,63 | 34,22 |
| K3 | Morula | 21:52 | 67 | 30 | 97 | 30,93 | 33,79 |
| K1 | Morula | 22:07 | 97 | 0 | 97 | 0 | 0 |
| K2 | Morula | 22:08 | 98 | 0 | 98 | 0 | 0 |
| K3 | Morula | 22:08 | 97 | 0 | 97 | 0 | 0 |

LAMPIRAN 1,(Lanjutan)

Data pengamatan perlakuan : Kontrol Normal (Sperma)
Pengamat : Ahmad Syarifudin Habibi
Tgl : 17 Mei – 18 Mei 2009
Telur masuk inkubator : 11:41 WIB

| Perlakuan | Stadia Perkembangan | waktu (pukul) | KELULUS HIDUPAN | | | | arcsin |
|-----------|---------------------|---------------|-----------------|-------|-------|------------|--------|
| | | | mati | hidup | total | persentase | |
| N1 | 4 sel | 12:35 | 0 | 95 | 95 | 100 | 90 |
| N2 | 4 sel | 13:28 | 0 | 100 | 100 | 100 | 90 |
| N3 | 4 sel | 13:29 | 0 | 98 | 98 | 100 | 90 |
| N1 | 8 sel | 14:29 | 0 | 95 | 95 | 100 | 90 |
| N2 | 8 sel | 14:28 | 0 | 100 | 100 | 100 | 90 |
| N3 | 8 sel | 14:34 | 0 | 98 | 98 | 100 | 90 |
| N1 | Morula | 15:30 | 1 | 94 | 95 | 98,94 | 84,09 |
| N2 | Morula | 15:36 | 0 | 100 | 100 | 100 | 90 |
| N3 | Morula | 15:59 | 0 | 98 | 98 | 100 | 90 |
| N1 | Morula | 16:19 | 1 | 94 | 95 | 98,94 | 84,09 |
| N2 | Morula | 16:29 | 0 | 100 | 100 | 100 | 90 |
| N3 | Morula | 16:30 | 1 | 97 | 98 | 98,97 | 84,17 |
| N1 | Blastula | 17:19 | 7 | 88 | 95 | 92,63 | 74,25 |
| N2 | Blastula | 17:22 | 6 | 94 | 100 | 94 | 75,82 |
| N3 | Blastula | 17:23 | 17 | 81 | 98 | 82,65 | 65,38 |
| N1 | Blastula | 19:29 | 12 | 83 | 95 | 87,36 | 69,17 |
| N2 | Blastula | 19:33 | 18 | 82 | 100 | 82 | 64,89 |
| N3 | Blastula | 19:35 | 19 | 79 | 98 | 80,61 | 63,87 |
| N1 | Blastula | 20:55 | 21 | 74 | 95 | 77,89 | 61,95 |
| N2 | Blastula | 20:58 | 23 | 77 | 100 | 77 | 61,34 |
| N3 | Blastula | 20:58 | 27 | 71 | 98 | 72,44 | 58,33 |
| N1 | Blastula | 21:51 | 27 | 68 | 95 | 71,57 | 57,78 |
| N2 | Blastula | 21:51 | 23 | 77 | 100 | 77 | 61,34 |
| N3 | Blastula | 21:52 | 27 | 71 | 98 | 72,44 | 58,33 |
| N1 | Blastula | 21:52 | 27 | 68 | 95 | 71,57 | 57,78 |
| N2 | Blastula | 21:53 | 23 | 77 | 100 | 77 | 61,34 |
| N3 | Blastula | 21:54 | 27 | 71 | 98 | 72,44 | 58,33 |
| N1 | Organogenesis | 22:04 | 27 | 68 | 95 | 71,57 | 57,78 |
| N2 | Organogenesis | 22:05 | 23 | 77 | 100 | 77 | 61,34 |
| N3 | Organogenesis | 22:06 | 27 | 71 | 98 | 72,44 | 58,33 |
| N1 | Larva | 00:12 | 28 | 67 | 95 | 70,52 | 57,11 |
| N2 | Larva | 00:13 | 25 | 75 | 100 | 75 | 60 |
| N3 | Larva | 00:15 | 27 | 71 | 98 | 72,44 | 58,33 |

LAMPIRAN 2, Data kualitas air**Data pengamatan kualitas air pada saat penelitian**

| Pengamatan kualitas air | Hasil pengamatan |
|-------------------------|------------------|
| Suhu | 25°C – 26°C |
| PH | 6,95 - 7,41 |
| Oksigen terlarut | 4,73 - 4,93 ppm |



LAMPIRAN 3, Penghitungan data pengamatan tingkat perkembangan oosit pada fase pembelahan 4 sel

Data hasil pengamatan pada fase pembelahan 4 sel (dalam arcsin)

| Perlakuan (menit) | ulangan | | | total | rata2 |
|-------------------|---------|-------|-------|---------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | | |
| A = 1,0 | 90 | 90 | 90 | 270 | 90 |
| B = 1,5 | 90 | 84,03 | 83,84 | 257,87 | 85,96 |
| C = 2,0 | 90 | 83,84 | 81,73 | 255,57 | 85,19 |
| D = 2,5 | 84,26 | 78,21 | 81,37 | 243,84 | 81,28 |
| Total | | | | 1027,28 | |

Perhitungan =

- Faktor Koreksi (FK) $= \frac{G^2}{n} = \frac{1027,28^2}{12} = \frac{1055304,19}{12} = 87942,02$
- JK Total $= (90^2 + 90^2 + 90^2 + \dots + 81,73^2) - 87942,02 = 194,72$
- JK Perlakuan $= \left[\frac{270^2 + 257,87^2 + 255,57^2 + 243,84^2}{3} - 87942,02 \right] = 114,94$
- JK Acak $= \text{JK Total} - \text{JK Perlakuan} = 194,72 - 114,92 = 79,8$

Tabel analisa keragaman

| S,KERAGAM | DB | JK | KT | F,HIT | F5% | F1% |
|-----------|----|--------|-------|--------------------|------|------|
| PERL, | 3 | 114,94 | 38,31 | 3,84 ^{ns} | 4,07 | 7,59 |
| ACAK | 8 | 79,8 | 9,975 | | | |
| TOTAL | 11 | 194,72 | - | | | |

F, Hit < F tabel 5% = tidak berbeda nyata (ns)

LAMPIRAN 4, Penghitungan data pengamatan tingkat perkembangan oosit pada fase pembelahan 8 sel

Data hasil pengamatan pada fase pembelahan 8 sel (arcsin)

| Perlakuan (menit) | ulangan | | | total | rata2 |
|-------------------|---------|-------|-------|--------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | | |
| A = 1,0 | 81,16 | 77,89 | 79,23 | 238,28 | 79,23 |
| B = 1,5 | 81,37 | 84,03 | 83,84 | 249,24 | 83,08 |
| C = 2,0 | 90 | 79,29 | 78,27 | 247,56 | 82,52 |
| D = 2,5 | 77,08 | 73,21 | 72,55 | 222,84 | 74,28 |
| Total | | | | 957,92 | |

Perhitungan =

- Faktor Koreksi (FK) = $\frac{G^2}{n} = \frac{957,92^2}{12} = \frac{917610,73}{12}$
 $= 76467,56$
- JK Total = $(81,16^2 + 77,89^2 + 81,37^2 + \dots + 72,55^2) - 76467,56$
 $= 252,5$
- JK Perlakuan = $\left[\frac{238,28^2 + 249,24^2 + 247,56^2 + 222,84^2}{3} - 76467,56 \right]$
 $= 146,24$
- JK Acak = JK Total - JK Perlakuan
 $= 252,5 - 146,24$
 $= 106,21$

Tabel analisa keragaman

| S,KERAGAM | DB | JK | KT | F,HIT | F5% | F1% |
|-----------|----|--------|-------|--------------------|------|------|
| PERL, | 3 | 146,29 | 48,76 | 3,67 ^{ns} | 4,07 | 7,59 |
| ACAK | 8 | 106,21 | 13,27 | | | |
| TOTAL | 11 | 252,5 | - | | | |

F, Hit < F tabel 5% = tidak berbeda nyata (ns)

LAMPIRAN 5, Penghitungan data pengamatan tingkat perkembangan oosit pada fase morula

Data hasil pengamatan pada fase morula (arcsin)

| Perlakuan (menit) | ulangan | | | total | rata2 |
|-------------------|---------|-------|-------|--------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | | |
| A = 1,0 | 75,95 | 72,84 | 74,68 | 223,47 | 74,49 |
| B = 1,5 | 74,94 | 81,55 | 79,29 | 235,78 | 78,59 |
| C = 2,0 | 73,89 | 69,16 | 73,34 | 216,39 | 72,13 |
| D = 2,5 | 71,56 | 64,34 | 67,53 | 203,43 | 67,81 |
| Total | | | | 879,07 | |

Perhitungan =

- Faktor Koreksi (FK) = $\frac{G^2}{n} = \frac{879,07^2}{12} = \frac{772764,06}{12}$
 $= 64397$
- JK Total = $(75,95^2 + 72,84^2 + 74,68^2 + \dots + 67,53^2) - 64397$
 $= 249,8$
- JK Perlakuan = $\frac{223,47^2 + 235,78^2 + 216,39^2 + 203,43^2}{3} - 64397$
 $= 182,81$
- JK Acak = JK Total - JK Perlakuan
 $= 249,8 - 182,81$
 $= 66,99$

Tabel analisa keragaman

| S,KERAGAM | DB | JK | KT | F,HIT | F5% | F1% |
|-----------|----|-------|--------|--------|------|------|
| PERL, | 3 | 182,8 | 83,266 | 9,95** | 4,07 | 7,59 |
| ACAK | 8 | 66,99 | 8,37 | | | |
| TOTAL | 11 | 249,8 | - | | | |

F, Hit > F tabel 1% = berbeda sangat nyata (**)

LAMPIRAN 5 (lanjutan)

Menghitung nilai BNT

$$SED = \sqrt{\frac{2KT_{acak}}{3}} = \sqrt{\frac{2 \times 8,37}{3}} = \sqrt{5,58} = 2,36$$

$$BNT 5\% = 2,306 \times 2,36 = 5,44$$

$$BNT 1\% = 3,355 \times 2,36 = 7,91$$

Tabel BNT perlakuan

| RATA2 PERL | 78,59 | 74,49 | 72,13 | 67,81 | NOTASI |
|------------|---------------------|--------------------|--------------------|-------|--------|
| B = 78,59 | - | - | - | - | a |
| A = 74,49 | 4,1 ^{ns} | - | - | - | a |
| C = 72,13 | 6,42 ^{ns} | 2,36 ^{ns} | - | - | ab |
| D = 67,81 | 10,78 ^{**} | 6,68 [*] | 4,32 ^{ns} | - | b |

Keterangan :

Selisih < BNT 5% = ns (tidak berbeda nyata)

BNT 5% < selisih < BNT 1% = * (berbeda nyata)

Selisih > BNT 1% = ** (berbeda sangat nyata)

Untuk menentukan hubungan fungsional antara tanggapan (respon) dan perlakuan yang terlibat dalam kisaran taraf faktor penelitian dilakukan pengujian menurut metode *orthogonal polinomial*

LAMPIRAN 5 (lanjutan)

Tabel polynomial orthogonal

| PERLAKUAN | DATA | LIN | KUA | KUB |
|------------|--------|--------|--------|-------|
| A = 1,0 | 223,47 | -3 | 1 | -1 |
| B = 1,5 | 235,78 | -1 | -1 | 3 |
| C = 2,0 | 216,39 | 1 | -1 | -3 |
| D = 2,5 | 203,43 | 3 | 1 | 1 |
| Q | | -79,51 | -25,27 | 38,13 |
| KR | | 60 | 12 | 60 |
| JK | | 105,36 | 53,21 | 24,23 |
| JK REGRESI | 182,8 | | | |

Ragam regresi

| S,KERAGAM | DB | JK | KT | F,HIT | F5% | F1% |
|-----------|----|--------|--------|--------------------|------|------|
| PERLAK | 3 | 182,8 | 83,26 | 9,95** | 4,07 | 7,54 |
| LIN | 1 | 105,36 | 105,36 | 12,58** | | |
| KUA | 1 | 53,21 | 53,21 | 6,35* | | |
| KUB | 1 | 24,23 | 24,23 | 2,89 ^{ns} | | |
| ACAK | 8 | 66,99 | 8,37 | | | |
| TOPTAL | 11 | 249,8 | | | | |

- Ns = tidak berbeda nyata
- * = berbeda nyata
- ** = berbeda sangat nyata

$$R^2 \text{ linier} = \frac{105,36}{105,36 + 66,99} = 0,61$$

$$r = \sqrt{0,61}$$

$$r = 0,78$$

$$R^2 \text{ Kuadrat} = \frac{53,21}{53,21 + 66,99} = 0,44$$

$$r = \sqrt{0,44}$$

$$r = 0,66$$

Karena R^2 linier > R^2 kuadrat maka regresi linier yang sesuai,

LAMPIRAN 5 (lanjutan)

| X | Y | XY | X ² |
|-------------|---------------|--------------|------------------------|
| 1 | 92,81 | 92,81 | 1 |
| 1,5 | 94,88 | 142,32 | 2,25 |
| 2 | 90,46 | 180,92 | 4 |
| 2,5 | 85,44 | 213,6 | 6,25 |
| Σx = 7 | Σy = 363,59 | Σ XY =629,65 | Σ X ² =13,5 |
| Rata2 =1,75 | Rata2 = 90,89 | | |

$$b_1 = \frac{\sum XY - \frac{\sum X \cdot \sum Y}{n}}{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}}$$

$$b_1 = \frac{629,65 - \frac{2545,13}{4}}{13,5 - \frac{49}{4}}$$

$$b_1 = -5,30$$

$$b_0 = \bar{Y} - b_1 \bar{X}$$

$$b_0 = 90,89 - ((-5,30), 1,75)$$

$$b_0 = 100,16$$

Persamaan linier

$$Y = 100,16 - 5,3X$$

$$X = 1 \quad \rightarrow \quad y = 94,86$$

$$X = 1,5 \quad \rightarrow \quad y = 92,21$$

$$X = 2 \quad \rightarrow \quad y = 89,56$$

$$X = 2,5 \quad \rightarrow \quad y = 86,91$$



LAMPIRAN 6, Penghitungan data pengamatan tingkat perkembangan oosit pada fase blastula

Data hasil pengamatan pada fase blastula (arcsin)

| perlakuan | ulangan | | | total | rata2 |
|-----------|---------|-------|-------|--------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | | |
| A = 1,0 | 62,59 | 58,38 | 58,85 | 179,82 | 59,94 |
| B = 1,5 | 57,99 | 64,68 | 61,34 | 184,01 | 61,33 |
| C = 2,0 | 62,14 | 54,03 | 60,16 | 176,33 | 58,77 |
| D = 2,5 | 45,57 | 38,37 | 40,17 | 124,11 | 41,37 |
| Total | | | | 663,27 | |

Perhitungan =

- Faktor Koreksi (FK) = $\frac{G^2}{n} = \frac{664.27^2}{12} = \frac{441254.63}{12}$
 $= 36771,22$
- JK Total = $(62,59^2 + 58,38^2 + 58,85^2 + \dots + 40,17^2) - 36771,22$
 $= 889,13$
- JK Perlakuan = $\left[\frac{179,82^2 + 184,01^2 + 176,33^2 + 124,11^2}{3} - 36771,22 \right]$
 $= 792,27$
- JK Acak = JK Total - JK Perlakuan
 $= 889,13 - 792,27$
 $= 96,86$

Tabel analisa keragaman

| S,KERAGAM | DB | JK | KT | F,HIT | F5% | F1% |
|-----------|----|--------|--------|---------|------|------|
| PERL, | 3 | 792,27 | 264,09 | 21,81** | 4,07 | 7,59 |
| ACAK | 8 | 96,86 | 12,11 | | | |
| TOTAL | 11 | 889,13 | - | | | |

F, Hit < F tabel 5% = berbeda sangat nyata(**)

LAMPIRAN 6 (lanjutan)

Menghitung nilai BNT

$$SED = \sqrt{\frac{2KT_{\text{acak}}}{3}} = \sqrt{\frac{2.12,11}{3}} = \sqrt{8,07} = 2,84$$

$$BNT 5\% = 2,306 \times 2,84 = 6,55$$

$$BNT 1\% = 3,355 \times 2,84 = 9,53$$

Tabel BNT perlakuan

| RATA2 PERL | 61,33 | 59,94 | 58,77 | 41,37 | NOTASI |
|------------|---------------------|---------------------|---------------------|-------|--------|
| B = 61,33 | - | - | - | - | a |
| A = 59,94 | 1,39 ^{ns} | - | - | - | a |
| C = 58,77 | 2,25 ^{ns} | 1,17 ^{ns} | - | - | a |
| D = 41,37 | 19,96 ^{**} | 18,57 ^{**} | 17,54 ^{**} | - | b |

Keterangan :

Selisih < BNT 5% = ns (tidak berbeda nyata)

BNT 5% < selisih < BNT 1% = * (berbeda nyata)

Selisih > BNT 1% = ** (berbeda sangat nyata)

Untuk menentukan hubungan fungsional antara tanggapan (respon) dan perlakuan yang terlibat dalam kisaran taraf faktor penelitian dilakukan pengujian menurut metode *orthogonal polinomial*

LAMPIRAN 6 (lanjutan)

Tabel polynomial orthogonal

| PERLAKUAN | DATA | LIN | KUA | KUB |
|------------|--------|---------|--------|--------|
| A = 1,0 | 179,82 | -3 | 1 | -1 |
| B = 1,5 | 184,01 | -1 | -1 | 3 |
| C = 2,0 | 176,33 | 1 | -1 | -3 |
| D = 2,5 | 124,11 | 3 | 1 | 1 |
| Q | | -174,81 | -56,41 | -32,62 |
| KR | | 60 | 12 | 60 |
| JK | | 509,30 | 265,17 | 17,73 |
| JK regresi | 792,2 | | | |

Ragam regresi

| S,KERAGAM | DB | JK | KT | F,HIT | F5% | F1% |
|-----------|----|--------|--------|--------------------|------|------|
| PERLAK | 3 | 792,2 | 264,09 | 21,81** | 4,07 | 7,54 |
| LIN | 1 | 509,30 | 509,30 | 42,5** | | |
| KUA | 1 | 265,17 | 265,17 | 21,89** | | |
| KUB | 1 | 17,73 | 17,73 | 1,46 ^{ns} | | |
| ACAK | 8 | 96,86 | 12,11 | | | |
| TOTAL | 11 | 889,13 | | | | |

- Ns = tidak berbeda nyata
- * = berbeda nyata
- ** = berbeda sangat nyata

$$R^2 \text{ linier} = \frac{509,3}{509,3 + 98,86} = 0,837$$

$$r = \sqrt{0,837}$$

$$r = 0,915$$

$$R^2 \text{ Kuadrat} = \frac{265,17}{265,17 + 98,86} = 0,72$$

$$r = \sqrt{0,72}$$

$$r = 0,85$$

Karena R² linier > R² kuadrat maka regresi linier yang sesuai,

LAMPIRAN 6 (lanjutan)

| X | Y | XY | X ² |
|-------------|---------------|--------------|------------------------|
| 1 | 75,86 | 75,86 | 1 |
| 1,5 | 76,88 | 115,32 | 2,25 |
| 2 | 72,97 | 145,94 | 4 |
| 2,5 | 43,7 | 109,25 | 6,25 |
| Σx = 7 | Σy = 269,41 | Σ XY =446,37 | Σ X ² =13,5 |
| Rata2 =1,75 | Rata2 = 67,35 | | |

$$b1 = \frac{\sum XY - \frac{\sum X \cdot \sum Y}{n}}{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}}$$

$$b1 = \frac{446,37 - \frac{1885,87}{4}}{13,5 - \frac{49}{4}}$$

$$b1 = -20,08$$

$$b0 = \bar{Y} - b1 \bar{X}$$

$$b0 = 67,35 - ((-20,08) \cdot 1,75)$$

$$b0 = 102,49$$

Persamaan linier

$$Y = 102,49 - 20,08X$$

$$X = 1 \quad \rightarrow \quad y = 82,41$$

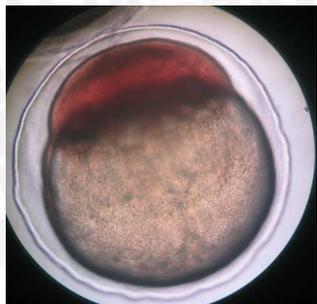
$$X = 1,5 \quad \rightarrow \quad y = 72,37$$

$$X = 2 \quad \rightarrow \quad y = 62,33$$

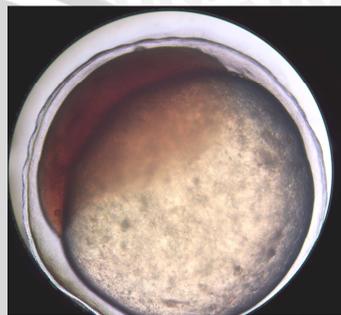
$$X = 2,5 \quad \rightarrow \quad y = 52,29$$



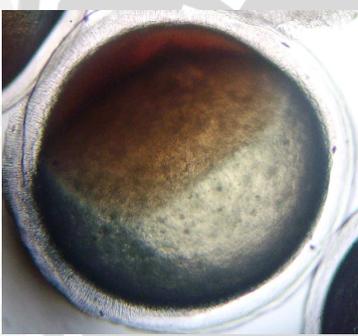
LAMPIRAN 7, Gambar pengamatan perkembangan oosit dari semua perlakuan kejutan suhu,



a. Pembelahan 4 sel



b. Pembelahan 8 sel



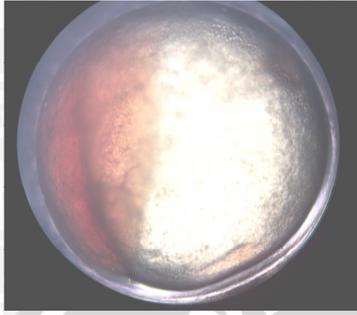
c. Perkembangan morula



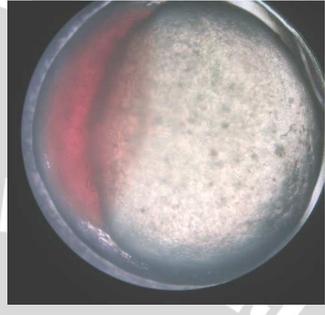
d. Perkembangan blastula



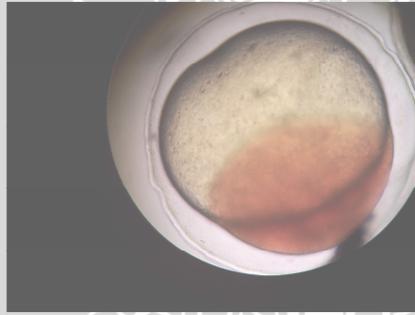
LAMPIRAN 8, Gambar pengamatan perkembangan oosit dari kontrol tanpa perlakuan dan tanpa sperma



a. Pembelahan 4 sel



b. Pembelahan 8 sel



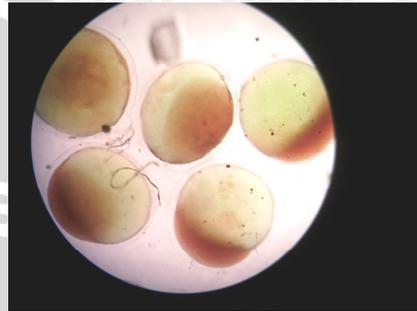
c. Perkembangan morula



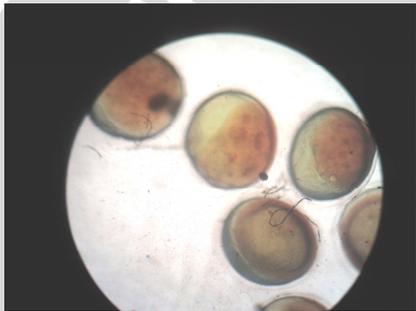
LAMPIRAN 9, Gambar pengamatan perkembangan oosit dari kontrol dengan sperma



a. Pembelahan 4 sel



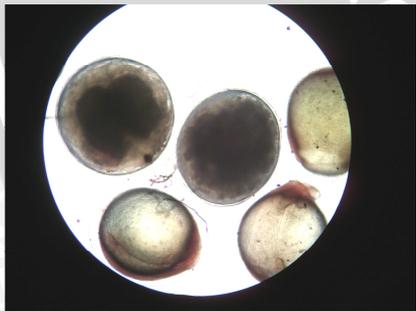
a. Pembelahan 8 sel



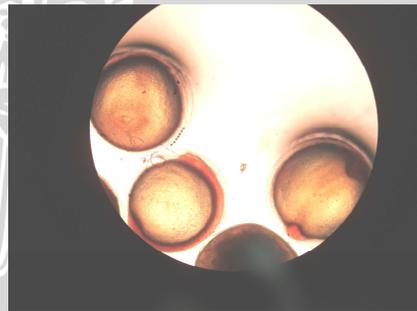
c. Morula



d. Blastula



e. Gastrula



f. Organogenesis



g. Larva

LAMPIRAN 10, Gambar bahan penelitian



a. lele



b. ovaprim



c. ethanol



d. Air aerasi



e. antiseptik



f. Tripsin



g. NaFis

LAMPIRAN 11, Gambar Peralatan Penelitian



a. Kolam induk



b. Akuarium



c. DO Meter



d. Mikroskop



e. pH Meter



f. Inkubator



g. Tepak



h. Cawan petri



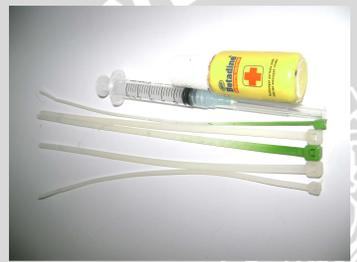
LAMPIRAN 11, (lanjutan)



i. Timbangan analitik



j. Timbangan gross



k. Tag



l. Ember, termometer



m. Corong



n. Penggaris



o. Kamera



p. Peralatan pendukung