

**KOMPARASI PENGGUNAAN METODE EKSPONENSIAL DAN SQUARE
WAVE TERHADAP MOTILITAS DAN VIABILITAS SPERMA IKAN MAS
(*Cyprinus carpio* L.)**

**SKRIPSI
PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERIKANAN**

**Oleh :
MUKHLIS KALKIANTO
NIM. 0610850050**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2010**

**KOMPARASI PENGGUNAAN METODE EKSPONENSIAL DAN SQUARE
WAVE TERHADAP MOTILITAS DAN VIABILITAS SPERMA IKAN MAS
(*Cyprinus carpio* L.)**

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

Oleh :

MUKHLIS KALKIANTO

0610850050

DOSEN PENGUJI I

(Ir. ARNING WILUJENG E., MS)

NIP. 19620805 198603 2 001

TANGGAL :

DOSEN PENGUJI II

(Ir. PURWOHADIJANTO)

NIP. 19480920 198103 1 001

TANGGAL :

MENYETUJUI,

DOSEN PEMBIMBING I

(Ir. ABDUL RAHEM FAQIH, MSi)

NIP. 19671010 199702 1 001

TANGGAL :

DOSEN PEMBIMBING II

(Ir. M. RASYID FADHOLI, MSi)

NIP. 19520713 198003 1 001

TANGGAL :

MENGETAHUI,

KETUA JURUSAN

(Dr. Ir. HAPPY NURSYAM, MS)

NIP. 19600322 198601 1 001

TANGGAL :

RINGKASAN

MUKHLIS KALKIANTO. Komparasi Penggunaan Metode *Eksponensial* dan *Square Wave* terhadap Motilitas dan Viabilitas Sperma Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.). (di bawah bimbingan Ir. **ABDUL RAHEM FAQIH, MSi.** dan Ir. **M. RASYID FADHOLI, MSi.**)

Elektroporasi adalah proses penerapan medan listrik (pulsa) untuk sel hidup dalam jangka waktu yang singkat dan memungkinkan pembentukan pori-pori pada molekul eksogen seperti DNA sehingga memungkinkan juga untuk masuk ke dalam sel. Elektroporasi memiliki dua metode, yaitu *Eksponensial Wave* dan *Square Wave*. Dua jenis kejutan listrik yang berbeda yaitu *Square Wave* dan *Exponential Wave* telah digunakan dalam mentransfer gen ke dalam sperma ikan. Tegangan dari *Square Wave* lebih diarahkan kepada amplitudo yang diperlukan untuk menjaga lamanya waktu kejutan, kemudian dikembalikan ke nol. Sedangkan *Exponential Wave*, tegangan ditujukan untuk suatu amplitudo yang diinginkan, kemudian memberikan kerusakan yang bersifat eksponen.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh perbedaan metode (*Square Wave* dan *Eksponensial*) terhadap pergerakan (motilitas) dan kemampuan hidup (viabilitas) sperma ikan mas (*Cyprinus carpio* L.), selain itu juga untuk mengetahui lebih baik mana penggunaan antara dua metode tersebut dalam elektroporasi. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi dan Reproduksi Ikan (Laboratorium Breeding) Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan serta di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Universitas Brawijaya Malang, Jawa Timur, mulai bulan Juni sampai dengan Agustus 2010.

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen, sedangkan rancangan percobaan yang digunakan adalah Uji t dengan 2 perlakuan 3 kali ulangan dan 2 kontrol. Sebagai perlakuan adalah metode *Square Wave*, *Eksponensial Wave* dan kontrol adalah sebelum dan sesudah perlakuan. Parameter dalam penelitian ini adalah motilitas dan viabilitas sperma ikan mas.

Parameter uji yang dilakukan dalam penelitian ini adalah motilitas dan viabilitas spermatozoa. Berdasarkan hasil penelitian didapatkan bahwa pemberian kejutan listrik dengan menggunakan metode *Square Wave* memiliki nilai persentase viabilitas dan motilitas yang lebih tinggi daripada penggunaan metode *Eksponensial Wave*. Persentase motilitas pada penggunaan metode *Square Wave* sebesar 31,67% dan persentase viabilitas sebesar 50%. Sedangkan pada penggunaan metode *Eksponensial Wave* memiliki persentase motilitas sebesar 15% dan viabilitas sebesar 30%. Berdasarkan penghitungan uji t persentase motilitas kedua metode tersebut berbeda nyata, dan viabilitas kedua metode tersebut berbeda sangat nyata.

Dari hasil penelitian ini dapat disarankan bahwa sebaiknya elektroporasi pada sperma ikan mas (*Cyprinus carpio* L.) menggunakan metode *Square Wave* agar diperoleh motilitas dan viabilitas yang tinggi dan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang elektroporasi dengan metode *Square Wave* pada sel telur ikan mas.

KATA PENGANTAR

Segala puji syukur setulus-tulusnya dan seikhlas-ikhlasnya penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat serta hidayahNya, sehingga penulisan skripsi ini dapat diselesaikan. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana perikanan dan ilmu kelautan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya. Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

- Seluruh keluarga terutama Ibu dan Bapak yang telah memberikan dukungannya baik moril maupun materiil.
- Bapak Ir. Abd. Rahem Faqih, MSi selaku dosen Pembimbing I, atas segala petunjuk dan bimbingannya dan telah meluangkan waktu memberikan koreksi serta saran.
- Bapak Ir. M. Rasyid Fadholi, MSi selaku dosen Pembimbing II, atas segala petunjuk dan bimbingannya dan telah meluangkan waktu memberikan koreksi serta saran.
- Ibu Ir. Arning Wilujeng E., MS selaku dosen Penguji I, atas segala saran yang diberikan.
- Bapak Ir. Purwohadijanto selaku dosen Penguji II, atas segala saran yang diberikan.
- Ketua Jurusan Manajemen Sumberdaya Perairan dan Ibu Ating Yuniarti S.Pi.,M.Aqua selaku Ketua Program Studi Budidaya Perairan.
- Teman-temanku, Transgenik team (Angga, Candra, Hedyat, Ipung, Leha, Desi & Septi) terima kasih atas kerjasama dan kebersamaannya.
- Teman - teman BP khususnya angkatan '06 (Begundal).
- Kawan - kawan penghuni kontrakan EE7 (Herman, Andi, Bhana, Didik, Umam, Heri, Bucu, Alan serta Irwan)
- Serta semua pihak yang telah memberi banyak dukungan baik moril maupun materiil sehingga dapat tersusunnya skripsi ini yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

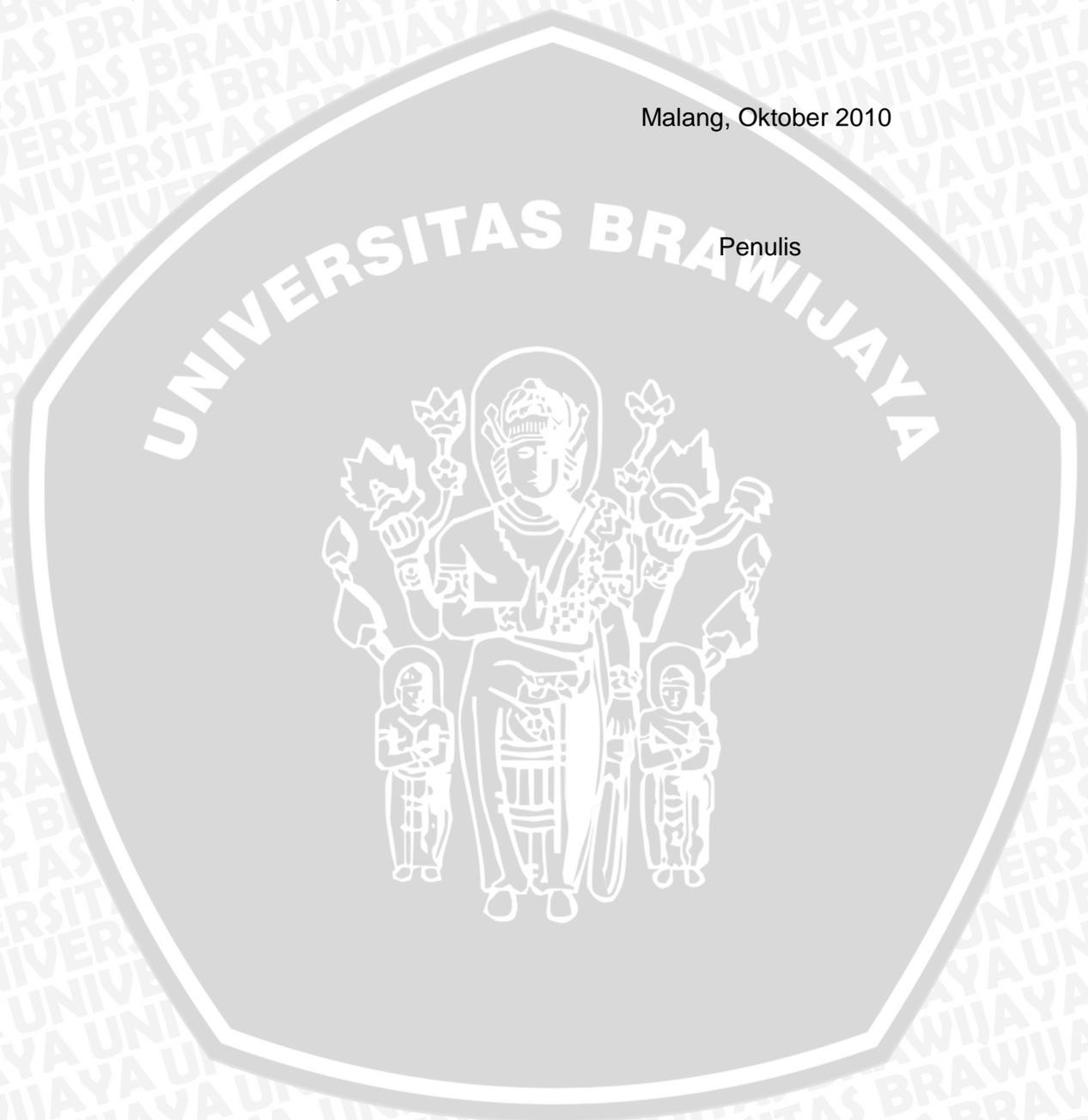
Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penulisan skripsi ini dan keterbatasan yang dimiliki oleh penulis. Walau telah dikerahkan segala kemampuan untuk lebih teliti, tetapi masih dirasakan banyak kekurangan,

oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun dari semua pihak agar tulisan ini bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Akhir kata, penulis berharap semoga skripsi ini dapat banyak berguna dan bermanfaat bagi pembaca pada umumnya serta bisa menjadi sumber informasi untuk penelitian berikutnya.

Malang, Oktober 2010

Penulis

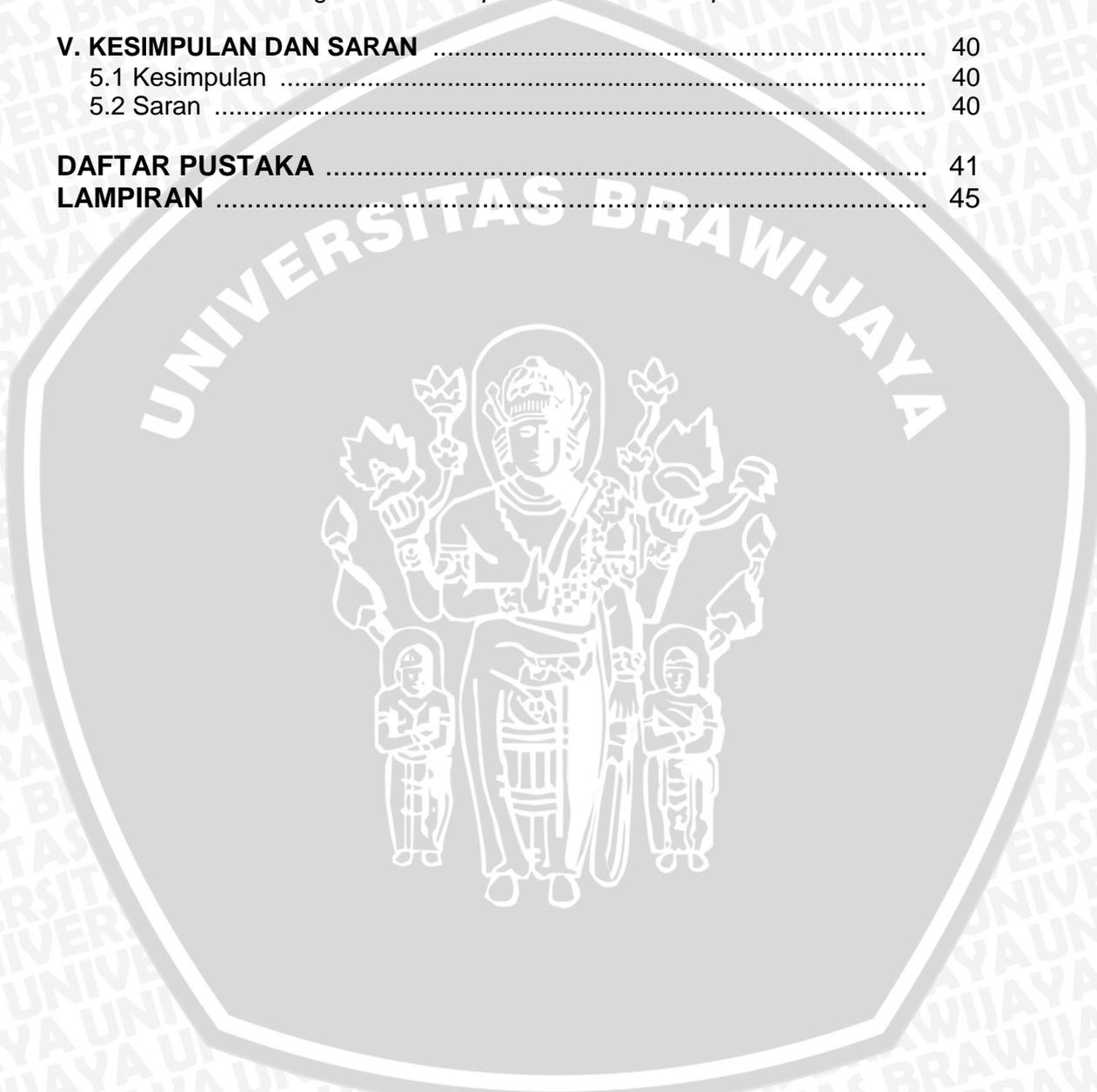


DAFTAR ISI

Halaman

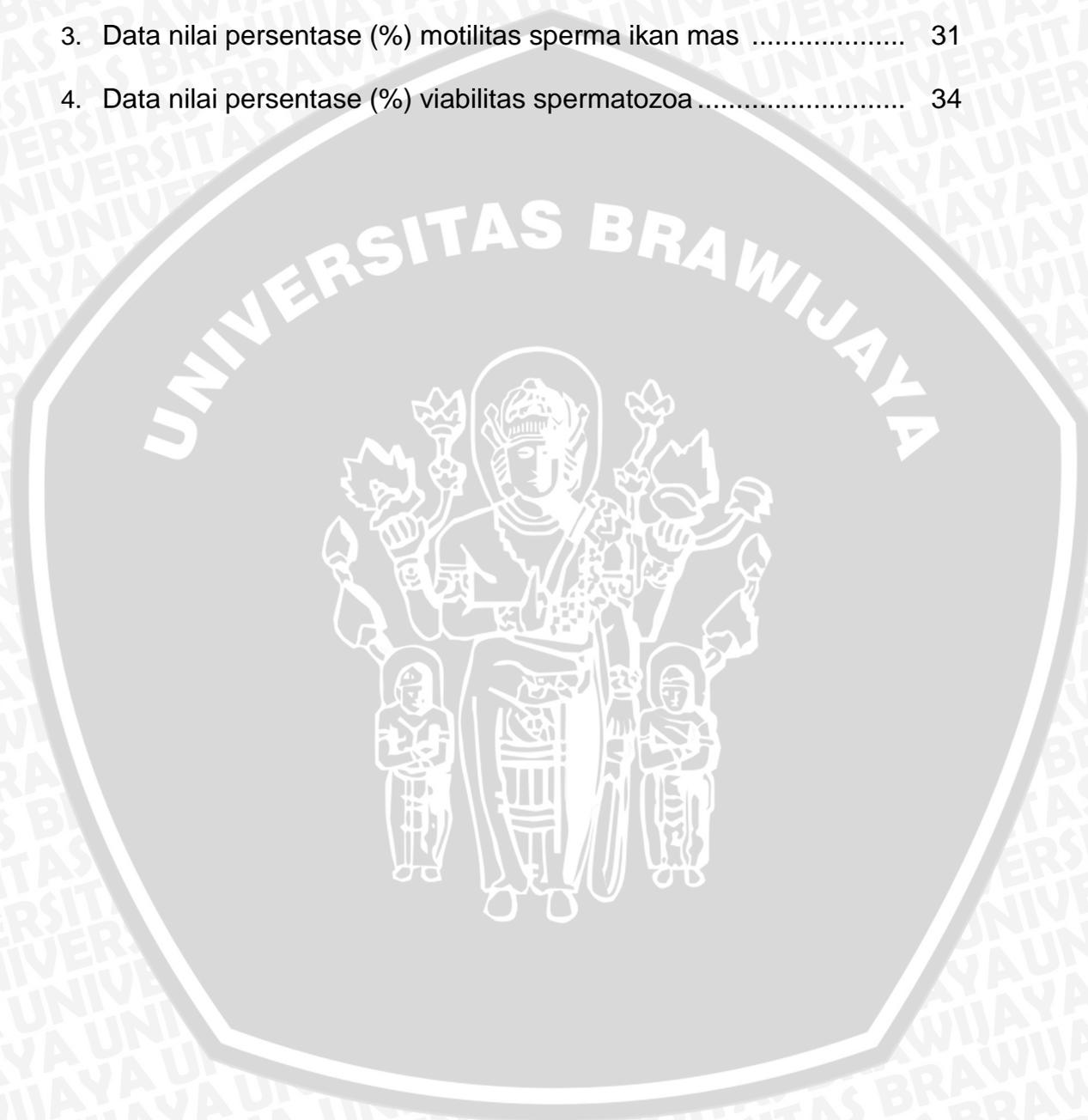
RINGKASAN	i
KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Kegunaan Penelitian	4
1.5 Hipotesis	4
1.6 Tempat dan Waktu	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Biologi Ikan Mas (<i>Cyprinus carpio</i> L.)	5
2.1.1 Klasifikasi	5
2.1.2 Morfologi	6
2.1.3 Syarat dan Kebiasaan Hidup	6
2.1.4 Siklus Reproduksi	7
2.2 Ciri-ciri Induk Ikan Mas yang Telah Matang Kelamin	8
2.2.1 Induk Jantan	8
2.2.2 Induk Betina	9
2.3 Spermatozoa dan Proses Spermatogenesis	10
2.3.1 Pengambilan Sperma Ikan Mas	11
2.3.2 Stabilisasi Kondisi Sperma	11
2.3.3 Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa	12
a. Pergerakan Sperma	12
b. Kemampuan Hidup Sperma	13
2.4 Pengaruh Kejutatan Listrik pada Sel Sperma	14
2.5 Hubungan Motilitas dan Viabilitas Sperma	15
2.6 Metode Elektroporasi	16
2.7 Elektroporasi Sperma	20
III. MATERI DAN METODE PENELITIAN	22
3.1 Materi Penelitian	22
3.1.1 Bahan	22
3.1.2 Alat	22
3.2 Metode Penelitian	23
3.3 Rancangan Penelitian	24
3.4 Prosedur Penelitian	25
3.5 Parameter Uji Penelitian	27
3.5.1 Motilitas Spermatozoa	27
3.5.2 Viabilitas Spermatozoa	28
3.6 Analisis Data	28

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	29
4.1 Kualitas Sperma Kontrol	29
4.1.1 Motilitas Spermatozoa	30
4.1.2 Viabilitas Spermatozoa	32
4.2 Kualitas Sperma Elektroporasi	34
4.2.1 Metode <i>Square Wave</i>	35
4.2.2 Metode <i>Eksponensial Wave</i>	36
4.2.3 Perbandingan Metode <i>Square Wave</i> dan <i>Eksponensial Wave</i> ...	37
V. KESIMPULAN DAN SARAN	40
5.1 Kesimpulan	40
5.2 Saran	40
DAFTAR PUSTAKA	41
LAMPIRAN	45



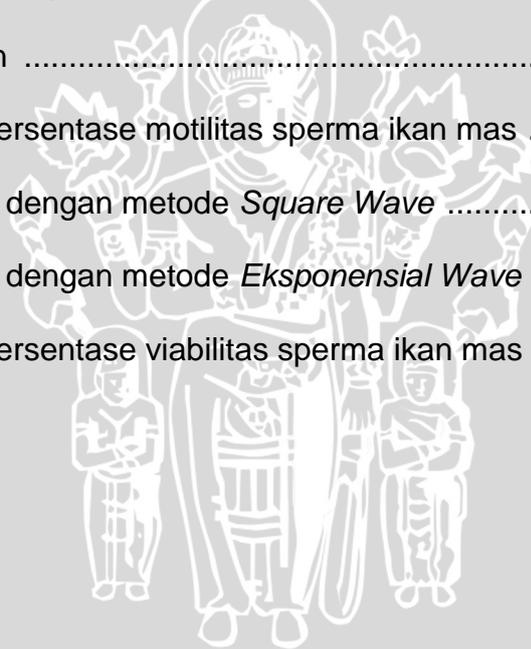
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Data Induk Jantan yang digunakan dalam penelitian	29
2. Waktu pemberian perlakuan kejutan listrik	31
3. Data nilai persentase (%) motilitas sperma ikan mas	31
4. Data nilai persentase (%) viabilitas spermatozoa	34



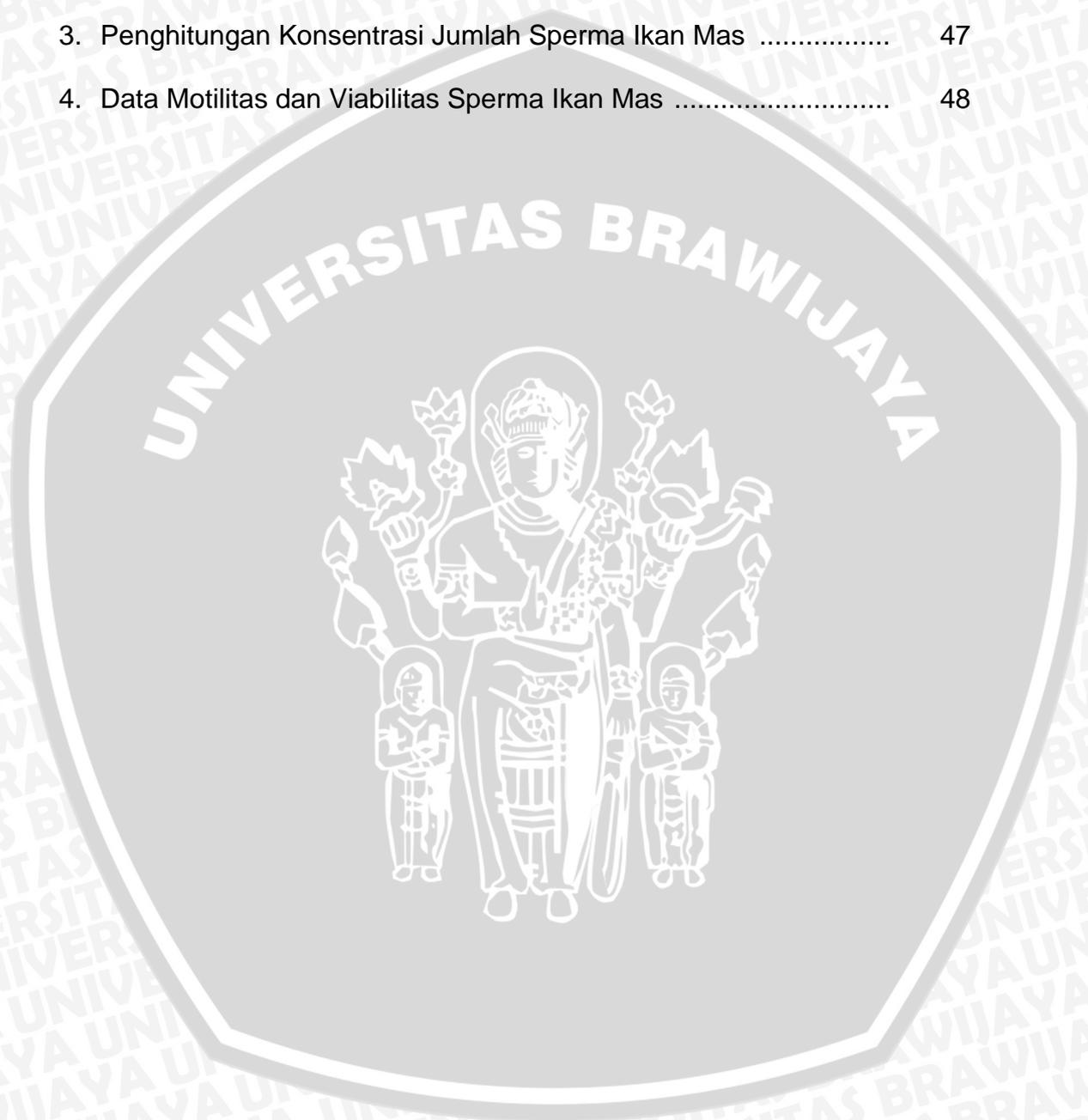
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Ikan mas	5
2. Ikan mas jantan matang kelamin	9
3. Ikan mas betina matang kelamin	9
4. Spermatozoa	11
5. <i>Gene Pulser</i> BIO-RAD	17
6. Gelombang <i>Eksponensial</i> dan <i>Square Wave</i>	18
7. a. <i>Eksponensial</i> ; b. <i>Square Wave</i>	19
8. Masuknya DNA asing ke dalam sel	21
9. Denah percobaan	25
10. Grafik rata-rata persentase motilitas sperma ikan mas	31
11. Viabilitas sperma dengan metode <i>Square Wave</i>	33
12. Viabilitas sperma dengan metode <i>Eksponensial Wave</i>	33
13. Grafik rata-rata persentase viabilitas sperma ikan mas	34



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Gambar bahan yang digunakan saat penelitian	45
2. Gambar alat yang digunakan saat penelitian	46
3. Penghitungan Konsentrasi Jumlah Sperma Ikan Mas	47
4. Data Motilitas dan Viabilitas Sperma Ikan Mas	48



I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Elektroporasi adalah proses penerapan medan listrik (pulsa) pada sel hidup dalam jangka waktu yang singkat. Elektroporasi memungkinkan pembentukan pori-pori sehingga molekul eksogen seperti DNA dapat masuk ke dalam sel. Elektroporasi merupakan teknik yang sangat efisien untuk memasukkan asam nukleat, protein, karbohidrat, RNA, pewarna, partikel virus dan molekul lain dalam berbagai macam sel seperti prokariotik dan eukariotik (Anonymous, 2010) Menurut Samarsik (2003), metode elektroporasi relatif sering digunakan dalam melakukan transfer gen karena lebih efisien, cepat dan sederhana.

Perubahan di dalam suatu sel permeabel akibat suatu medan elektrik disebut elektroporasi. Elektroporasi telah digunakan untuk mentransfer makromolekul seperti DNA dan protein ke dalam sel tumbuhan, sel hewan dan sel hasil bakteri (Weaver, 1993). Menurut Chent (1995) metode elektroporasi menggunakan serangkaian listrik arus pendek untuk melemahkan membran sel guna membantu DNA rekombinan masuk ke dalam sel tertentu. Pada umumnya metode elektroporasi digunakan untuk transfer gen pada bakteri *yeast*, tanaman-tanaman dan sel-sel hewan.

Transgenik pada ikan berdasar metode elektroporasi dengan sperma ikan sebagai media transfer gen masih belum dilakukan di Indonesia. Padahal Kang, Yoshizaki, Homma, Charlos, Strusmann dan

Takasima (1999) menyatakan bahwa sel sperma dapat digunakan sebagai media untuk memasukkan DNA asing ke dalam sel telur. Oleh karena itu sebagai dasar transgenik pada ikan dengan metode elektroporasi sperma, perlu dilakukan penelitian tentang pengaruh tegangan listrik yang berbeda terhadap motilitas dan viabilitas sperma ikan.

Metode elektroporasi yang umum digunakan untuk menghasilkan kondisi yang optimal terbukti membutuhkan waktu. Dengan diperkenalkannya *Gene Pulser* sistem elektroporasi” kondisi optimal dapat ditentukan dengan cepat. *Gene Pulser* adalah sistem elektroporasi modular, yang mencakup unit utama, memiliki dua modul aksesori modul CE (*Cell Eukariotic*) dan modul PC (*Prokariotic Cell*). Modul CE digunakan untuk media yang memiliki hambatan rendah (<1000 ohms) dan tegangan yang rendah. Pada tegangan *eksponensial*, modul CE berfungsi mengontrol kapasitan selama bertambahnya lama kejutan yang konstan atau stabil. Sedangkan pada metode *Square wave* memerlukan kapasitan yang besar (3275 μF) untuk mengirim kejutan *square wave* dalam media yang memiliki hambatan rendah.

Gene pulser PC modul dibutuhkan untuk elektroporasi tegangan tinggi. PC modul digunakan untuk hambatan 50 ohms – 1000 ohms dalam setiap kenaikan 50 ohm. Modul ini efektif untuk mengontrol konstantanya waktu ketika digunakan hambatan tinggi, akan tetapi memiliki efek yang sedikit pada pengontrolan konstantanya waktu ketika digunakan pada hambatan rendah. Modul CE digunakan untuk elektroporasi sel eukariotik, termasuk sel mamalia dan protoplas tanaman, sedangkan modul PC

digunakan untuk elektroporasi bakteri dan jamur serta aplikasi lain dimana kejutan tegangan tinggi diterapkan pada sampel volume kecil dan ketahanan tinggi. Sistem *Gene Pulser* dapat menghasilkan bentuk gelombang *eksponensial* dan persegi (square), memungkinkan untuk memilih gelombang yang terbaik untuk proses elektroporasi. Baik secara *eksponensial* maupun *square wave* telah digunakan dengan sangat efektif untuk elektroporasi. Bentuk gelombang elektroporasi dapat memiliki dampak yang signifikan terhadap efisiensi transformasi untuk tipe sel yang berbeda (Anonymous, 2010).

Perpindahan molekul DNA ke dalam sel, suatu transfer gen dari sel yang berisi DNA asing melalui kejutan listrik. Dua jenis kejutan listrik yang berbeda yaitu *Square wave* dan *Exponential wave* telah digunakan dalam mentransfer gen ke dalam sperma ikan. Tegangan dari *Square wave* lebih diarahkan kepada amplitudo yang diperlukan untuk menjaga lamanya waktu kejutan, kemudian dikembalikan ke nol. Sedangkan *Exponential wave*, tegangan ditujukan untuk suatu amplitudo yang diinginkan, kemudian memberikan kerusakan yang bersifat eksponen (berkelanjutan) (Muller, Ivich, Erdelyi, Papp, Varadi, Horvart dan Maclean, 1992).

Sperma memiliki kelebihan dalam bertindak sebagai media transfer gen, karena dalam mentransfer materi genetik, sperma menggunakan vektor yang relatif alami (Lavitrano, Marcho, Maria, Roberto, Stefano dan Alessia, 2006). Sel sperma telah digunakan sebagai vektor transfer gen pada ikan. Masuknya konstruksi gen ke dalam sperma dapat dipermudah dengan penggunaan elektroporator dan efektifitas transfer gen dengan

elektroporasi sperma sangat dipengaruhi kondisi listrik dan parameter biologi (Muller *et al.*, 1992).

Dalam penelitian ini digunakan sperma ikan mas karena ikan mas adalah salah satu ikan konsumsi yang digemari masyarakat, karena ikan mas (*Cyprinus carpio* L.) memiliki rasa daging yang gurih dan mengandung protein tinggi yaitu 16%. Ikan mas cukup mudah dalam pemeliharannya, karena pertumbuhannya yang relatif cepat yaitu setelah 6 bulan ikan jantan dapat mencapai bobot kira-kira 0,5 kg, sedangkan seekor ikan mas betina yang telah mencapai umur 15 bulan dapat memiliki bobot 1,5 kg. Ikan mas tahan terhadap penyakit dan parasit serta adaptif terhadap lingkungan yang terbatas. Oleh karena itu perlu dilakukan upaya agar produktifitas usaha budidaya ikan mas meningkat.

1.2 Perumusan Masalah

Bagaimana pengaruh pemberian kejutan listrik dengan metode yang berbeda (*Square wave dan Eksponensial*) terhadap motilitas (pergerakan) dan viabilitas (kemampuan hidup) sperma ikan mas (*Cyprinus carpio* L.).

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh beda metode (*Square wave dan Eksponensial*) terhadap motilitas dan viabilitas sperma ikan mas (*Cyprinus carpio* L.).

1.4 Kegunaan Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan pengetahuan dan dapat dijadikan informasi dasar dalam transfer gen berdasar metode elektroporasi.

1.5 Hipotesis

H_0 : Diduga pemberian kejutan listrik dengan metode yang berbeda tidak memberikan pengaruh terhadap motilitas dan viabilitas sperma ikan mas (*Cyprinus carpio* L.).

H_1 : Diduga pemberian kejutan listrik dengan metode yang berbeda berpengaruh terhadap motilitas dan viabilitas sperma ikan mas (*Cyprinus carpio* L.).

1.6 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi dan Reproduksi Ikan (Laboratorium *Breeding*) Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan serta di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Universitas Brawijaya Malang, Jawa Timur, mulai bulan Juni sampai dengan Agustus 2010.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biologi Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.)

2.1.1 Klasifikasi

Klasifikasi ikan mas secara sistematis (Gambar 1) menurut

Anonymous (2009) adalah sebagai berikut :

Phylum	: Chordata
Subphylum	: Vertebrata
Superclass	: Pisces
Class	: Osteichthyes
Subclass	: Actinopterygii
Ordo	: Cypriniformes
Subordo	: Cyprinoidea
Family	: Cyprinidae
Subfamily	: Cyprininae
Genus	: <i>Cyprinus</i>
Species	: <i>Cyprinus carpio</i> L.



Gambar 1. Ikan mas (Anonymous, 2009)

2.1.2 Morfologi

Bentuk tubuh ikan mas agak memanjang dan memipih tegak (*compressed*). Mulutnya terletak di ujung tengah (*terminal*) dan dapat disembulkan (*protoaktif*). Di bagian anterior mulut terdapat dua pasang sungut. Di ujung dalam mulut terdapat gigi kerongkongan (*pharyngeal teeth*) yang tersusun dari tiga baris gigi geraham. Sisik ikan mas berukuran relatif besar dan digolongkan ke dalam sisik tipe lingkaran (*sikloid*). Sirip punggung (*dorsal*) berukuran memanjang dan bagian belakangnya berjari keras (Khairuman, 2008).

Ikan mas berasal dari daerah beriklim sedang di Asia dan Eropa. Ciri-ciri fisik ikan mas adalah sebagai berikut : pada sudut mulut terdapat dua pasang sungut peraba, sirip punggung memiliki 4 jari-jari keras dan 16-18 jari-jari lunak, sirip dubur memiliki 3 jari-jari keras dan 5 jari-jari lunak, sirip perut memiliki 2 jari-jari keras dan 8 jari-jari lunak, sirip dada memiliki 1 jari-jari keras dan 13-16 jari-jari lunak, dan sisik-sisik gurat sisi jumlahnya ada 33-37 keping.

Fekunditas ikan mas sangat tinggi, berkisar antara 100.000 sampai 300.000 butir telur per kilogram berat badan dalam setiap siklus oogenesis. Diameter telur berkisar antara 1,24-1,42 milimeter dengan berat 0,86-1,41 mg (Winarsih, 1996).

2.1.3 Syarat dan Kebiasaan Hidup

Menurut Santoso (1993) Ikan mas yang dibudidayakan di areal perkolaman dapat dikawinkan sepanjang tahun (tidak mengenal musim). Tetapi di alam, misalnya sungai, danau ataupun genangan air lainnya,

ikan mas memijah pada awal / sepanjang musim penghujan. Biasanya memijah pada perairan dangkal, setelah mengalami kekeringan musim kemarau, dan menempelkan seluruh telurnya pada tanaman atau rerumputan di tepian perairan. Ikan mas dapat tumbuh normal, jika lokasi pemeliharaan berada pada ketinggian antara 150-1000 meter di atas permukaan laut, suhu air 20-25⁰C, pH air antara 7-8. Berbeda dengan ikan lele lokal, terutama pejantannya yang mempunyai sifat mengasuh anak-anaknya. Ikan mas justru sebaliknya, ikan mas tidak mau merawat keturunannya. Setelah melakukan tugasnya (kawin), ikan mas tidak menghiraukan lagi kelangsungan hidup anak-anaknya. Kebiasaan lain ikan mas di alam adalah selalu mencari tempat yang aman (terutama di tempat yang ditumbuhi rumput) karena sifat telur ikan menempel (*adhesif*), sehingga para petani mempergunakan ijuk sebagai alat penempel telur yang lazim disebut kakaban. Selain ijuk dapat pula menggunakan bahan lain misalnya tali rafia atau tumbuhan air eceng gondok (*Echornia crasipes*).

Pemijahan ikan mas biasanya terjadi antara pukul 23.00 WIB sampai pukul 04.00 WIB. Saat pemijahan biasanya terjadi kejar-mengejar di antara induk. Pemijahan ini biasanya dilakukan ikan mas pada malam hari yang sepi, dan induk betina biasanya meloncat-loncat karena dikejar oleh induk jantan. Perbandingan berat antara induk jantan dan betina adalah 1:1, artinya jika induk jantan seberat 4 kg, maka betinanya pun harus 4 kg juga (Santoso, 1993).

2.1.4 Siklus Reproduksi

Pemijahan ikan mas dapat terjadi sepanjang tahun dan tidak tergantung pada musim. Namun, di alam ikan mas biasanya memijah pada awal musim hujan, saat muncul rangsangan dari aroma tanah kering yang kemudian tergenang air. Secara alami, proses pemijahan terjadi pada tengah malam sampai menjelang pagi hari. Menjelang memijah, induk-induk ikan mas menjadi aktif mencari tempat yang rimbun dengan tanaman air atau rerumputan yang akan dijadikan lokasi memijah dan menempelkan telur yang dihasilkan. Telur ikan mas berbentuk bulat dan berwarna bening. Ukurannya bervariasi, tergantung umur serta ukuran dan berat induk. Namun secara umum diameter telurnya mencapai 1,5-1,8 mm dengan berat 0,17-0,20 mg. Dalam waktu 2-3 hari, telur-telur ikan mas akan menetas dan tumbuh menjadi larva berukuran 0,5-0,6 mm dengan berat 18-20 mg. Larva-larva ini memiliki kantong kuning telur sebagai cadangan makanan, yang akan habis dalam 2-4 hari. Larva ikan mas bersifat menempel di substrat dan bergerak vertikal. Setelah 4-5 hari, larva-larva tersebut akan berubah menjadi kebul. Stadia kebul ini, ikan mas memerlukan pasokan pakan dari luar untuk menunjang kehidupannya. Pakan tambahan yang dapat diberikan terutama zooplankton seperti rotifera, moina dan daphnia. Dosis per harinya 60-70% dari total beratnya. Setelah 2-3 minggu, kebul akan tumbuh menjadi burayak dengan panjang 1-3 cm dan berat 0,1-0,5 gram. 2-3 minggu kemudian, burayak tumbuh menjadi putihan dengan panjang 3-5 cm dan berat 0,5-2,5 gram. Tiga bulan kemudian, putihan berkembang menjadi

gelondongan yang memiliki berat 100 gram per ekor. Gelondongan ini akan terus tumbuh dan menjadi induk. Induk jantan berukuran 0,5 kg dapat dicapai setelah 6 bulan pemeliharaan, sedangkan induk betina berukuran 1,5 kg dapat dicapai setelah pemeliharaan minimum selama 15 bulan (Khairuman, 2008).

2.2 Ciri-ciri Induk Ikan mas yang Telah Matang kelamin

2.2.1 Induk Jantan

Menurut Djarijah (2001) ciri – ciri ikan mas jantan yang matang kelamin (Gambar 2) adalah sebagai berikut :

- Permukaan punggung dan sirip dada (pectoralis) agak kasar
- Apabila permukaan perut dekat lubang kelamin ditekan (diurut) akan mengeluarkan cairan kental berwarna putih
- Badan langsing
- Alat kelamin relatif kecil dan seolah – olah menyatu dengan lubang anus



Gambar 2. Ikan mas jantan matang kelamin (Sucandra, 2009)

2.2.2 Induk Betina

Menurut Djarijah (2001), ciri – ciri induk ikan mas betina yang matang kelamin (Gambar 3) adalah sebagai berikut :

- Badan (tubuh) sirtal dan bulat
- Perut lembek dan tampak berisi dari ujung posterial sampai lubang kelamin
- Alat kelamin bulat, membengkak dan menonjol, berwarna kemerahan (*reddish*) dan bagian tepinya berkerut mirip punggung ulat
- Lubang anus membesar dan memerah
- Beberapa induk ikan mas yang hidup di perairan alami memiliki perut berwarna kemerahan



Gambar 3. Ikan mas betina matang kelamin (Sucandra, 2009)

2.3 Spermatozoa dan Proses Spermatogenesis

Sperma adalah sel-sel spermatozoa yang berada dalam larutan seminal dan dihasilkan oleh hidrasi testes, atau salah satu bagian dari alat reproduksi ikan jantan (Arie, 2008).

Proses pembentukan spermatozoa terjadi di dalam testes. Testes ikan berbentuk memanjang dalam rongga badan dibawah gelembung renang di atas usus. Jaringan pengikat yang disebut *mesentrium* menempelkan testes ini pada rongga badan di bagian depan gelembung renang (Rustidja, 2000).

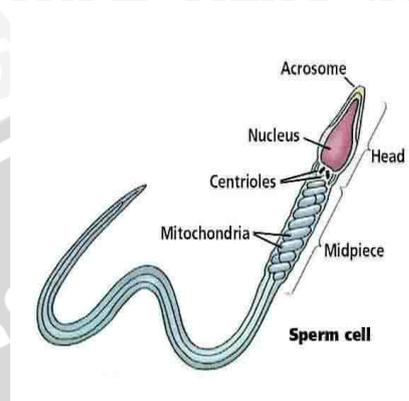
Sel yang hidup dan bergerak di dalam semen disebut spermatozoa. Spermatozoa yang normal terdiri dari kepala dan ekor. Bagian ekor terbagi

atas leher (tengah), bagian utama dan bagian ujung (Partodihardjo, 1992). Menurut Rachman (2003) spermatozoa adalah spermatosit sekunder yang membelah menjadi spermatid yang mengadakan *metamorphose* menjadi gamet *motile* (dapat bergerak) dan mempunyai potensi fungsional.

Menurut Fujaya (2004) perkembangan gamet jantan dan spermatogonium menjadi spermatozoa melalui dua tahap, yakni spermatogenesis dan spermiogenesis. Spermatogenesis adalah tahap perkembangan spermatogonium menjadi spermatid, sedangkan spermiogenesis adalah metamorfosa spermatid menjadi spermatozoa. Awal spermatogenesis ditandai dengan berkembang biaknya spermatogonia beberapa kali melalui pembelahan mitosis, untuk memasuki spermatosit primer dibutuhkan beberapa kali pembelahan mitosis, selanjutnya terjadi pembelahan meiosis, dimulai dengan kromosom berpasangan, yang diikuti dengan duplikasi membentuk tetraploid ($4n$). satu spermatosit primer tetraploid membentuk dua spermatosit sekunder yang diploid ($2n$). Satu spermatosit sekunder diploid membelah diri menjadi dua spermatid haploid (n).

Spermatozoa merupakan sel padat dan sangat khas, tidak tumbuh atau membagi diri serta tidak mempunyai peranan fisiologis apapun pada hewan yang menghasilkannya, semata-mata hanya untuk membuahi telur pada jenis yang sama (Anonymous, 2010). Spermatozoa terdiri dari dua bagian, yaitu kepala dan ekor, tetapi adapula spermatozoa yang memiliki tiga bagian, yaitu kepala, ekor dan tengah. Menurut Toelihere (1981),

walaupun ukuran dan bentuk spermatozoa berbeda pada berbagai jenis hewan namun struktur morfologinya sama, yaitu terdiri dari kepala, bagian tengah dan ekor, seperti tampak pada Gambar 4 di bawah ini :



Gambar 4. Spermatozoa (Anonymous, 2010)

2.3.1 Pengambilan Sperma Ikan mas

Pada induk jantan dilakukan striping pada daerah perut sampai cairan sperma keluar. Kemudian sperma tersebut diberikan bahan pengencer yaitu NaCl fisiologis yang berfungsi untuk pengencer serta penambah nutrisi bagi sperma ikan (Anonymous, 2009).

2.3.2 Stabilisasi Kondisi Sperma

Sperma yang keluar dari tubuh ikan tidak akan bertahan lama karena kondisinya berubah. Spermatozoa yang telah ditampung diusahakan mempunyai kondisi yang dapat mendukung kehidupannya. Salah satu cara yang digunakan adalah diberikannya bahan pengencer berupa NaCl fisiologis (Rustidja, 1999). Tujuan penambahan larutan Na-Fis adalah sebagai pengencer serta sebagai penambah nutrisi bagi sperma ikan (Anonymous, 2008).

Salisbury dan Vandemark (1985), mengatakan bahwa bahan pengencer yang baik harus memenuhi kriteria sebagai berikut: 1). Memberikan unsur mineral yang dibutuhkan untuk kehidupan spermatozoa; 2). Menyediakan bahan makanan sel spermatozoa untuk proses metabolisme *aerob* dan *anaerob*; 3). Memiliki lipoprotein atau lecithin untuk melindungi spermatozoa dari kejutan suhu dingin (*cold shock*); 4). Menyediakan penyangga terhadap produk akhir metabolisme yang bersifat racun terhadap spermatozoa; 5). Bebas dari substansi produk kuman-kuman atau organisme penyakit menular yang berbahaya terhadap spermatozoa.

2.3.3 Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa

a. Pergerakan Sperma

Aktifitas spermatozoa dimulai ketika sperma bersentuhan dengan air, dengan demikian motilitas spermatozoa yang tinggi sangat berpengaruh terhadap terjadinya fertilisasi (Woynarovich dan Horvart, 1980 *dalam* Rustidja, 2000). Menurut Fujaya (2004) spermatozoa bersifat *immotil* dalam cairan plasmanya, dan akan bergerak apabila bercampur dengan air. Gerak progresif secara berkesinambungan hanya terjadi satu menit setelah bersentuhan dengan air dan hanya 50% yang masih dapat berenang setelah 3 menit. Sebagian besar spermatozoa ikan air tawar dapat motil tidak lebih dari 2-3 menit setelah bersentuhan dengan air. Menurut Stoss dan Donaldson (1982) *dalam* Rustidja (2000) di dalam testes dan dalam seminal plasma, spermatozoa dapat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan selama musim pemijahan. Untuk ikan air tawar aktifasi spermatozoa terjadi jika perairan di sekitarnya bersifat hipotonik.

Motilitas merupakan nilai pergerakan dan juga merupakan salah satu tolak ukur keadaan spermatozoa jantan (Sujana, 2007). Hermawanto dan Hadiwidjaja (2008) menjelaskan bahwa biasanya empat sampai enam lapangan pandang yang diperiksa untuk memperoleh pergerakan sperma secara berurutan yang kemudian diklasifikasi sehingga menghasilkan persentase setiap kategori motilitas. Dianjurkan untuk melakukan pemeriksaan ulang dengan tetesan sperma kedua yang diperlakukan dengan tatacara sama.

Pengamatan untuk waktu motilitas spermatozoa dilakukan dengan mencatat waktu dalam satuan detik pada dua jenis motilitas: *fast progresive* (pergerakan spermatozoa yang bergerak sangat cepat dengan arah maju kedepan) dan motilitas *slow proggesive* (pergerakan spermatozoa yang bergerak cepat dengan arah maju kedepan) (Hidayaturrahmah, 2007).

b. Kemampuan Hidup Sperma

Menurut Rachman (2003) jangka waktu hidup spermatozoa bergantung pada spesies dan substrat tempat spermatozoa diletakkan. Sperma yang diletakkan pada air maka jangka waktu hidupnya lebih pendek. Kemungkinan hidup sel sperma dipengaruhi juga oleh suhu, pada suhu yang rendah hidup sel sperma lebih lama dari pada suhu yang tinggi.

Permukaan spermatozoa dibungkus oleh suatu membran lipoprotein. Apabila spermatozoa tersebut mati maka permeabilitas membrannya meninggi, terutama di daerah pangkal kepala dan hal ini merupakan dasar pewarnaan sperma yang membedakan spermatozoa

yang hidup dengan spermatozoa yang mati (Tang dan Affandi, 2001 dalam Yulham, 2007).

Kemampuan hidup spermatozoa sangat dipengaruhi oleh suhu, oleh karena itu penurunan suhu dari suhu kamar ke suhu dingin perlu dilakukan secara bertahap untuk menghindari terjadinya *cold shock* (Toelihere, 1981 dalam Rustidja, 2000). Untuk memastikan apakah sperma yang tidak motil tersebut hidup atau mati, perlu dilakukan uji viabilitas sperma. Partodihardjo (1992) menyatakan bahwa setelah sperma mati, sedikitnya 100-2.000 sel atau yang terbaik 500 sel dihitung untuk menentukan persentase spermatozoa yang hidup.

Penentuan kelangsungan hidup spermatozoa berdasarkan atas prinsip-prinsip sebagai berikut : (1) sperma yang hidup adalah sperma yang bergerak cepat, lambat atau sedikit pergerakannya pada kepala atau ekor. (2) sperma yang mati adalah sperma yang tidak memperlihatkan pergerakan pergerakan sama sekali pada bagian kepala maupun ekor (Partodihardjo, 1992).

2.4 Pengaruh Kejut Listrik pada Sel Sperma

Jenis kejut yang dapat digunakan antara lain kejut suhu, kejut tekanan, kejut dengan menggunakan bahan kimia dan kejut listrik (Carman, 1990). Menurut Evariny (2005) kejut listrik dengan tegangan yang tinggi akan berpengaruh terhadap produksi spermatozoa, sperma yang dikeluarkan dari testes bisa menjadi cacat dan dapat menurunkan tingkat motilitas spermatozoa serta dapat meningkatkan nilai mortalitas dan abnormalitas pada spermatozoa.

Tegangan listrik berperan besar dalam kegiatan transfer gen. Menurut Andre, Gehl, Sersa, Preat, Hojman, Eriksen, Gotzio, Cemazar, Pavsels, Rols, Miklavcic, Neumann, Teissie dan Mir. (2008) kejutan listrik pada jaringan otot memainkan dua peran, yaitu: merubah struktur permeabilitas serabut otot dan membantu perpindahan DNA melewati permeabilitas membran. Parameter elektrik yang paling penting dalam percobaan elektroporasi adalah kekuatan bidang, karena tegangan dan lamanya kejutan yang diberikan dapat digunakan sebagai indikator berhasil atau tidaknya kejutan listrik yang telah diberikan pada media ($E = V/cm$), kekuatan bidang diperoleh dari hasil tegangan antara elektroda yang dibagi dengan jarak antar elektroda) dan lama kejutan. Lama kejutan adalah tergantung dari hambatan (*resistance, ohm*) dan ketahanan (*capacitance, farad*) pada sirkuit. Ketahanan ditentukan dari kekuatan ion dari sampel dan jarak antar elektroda. Kekuatan ion bersifat berbanding terbalik dengan hambatan sehingga semakin tinggi kekuatan ion dari media maka hambatannya akan semakin kecil. Apabila jarak antar elektroda semakin jauh maka hambatan yang dihasilkan akan semakin besar. Ketahanan yang terjadi tergantung dari kapasitor pada sirkuit, jika pada kondisi hambatan rendah dan ketahanan tidak ditentukan maka dihasilkan kejutan yang pendek.

Menurut Weaver (1995), apabila tegangan yang diberikan terhadap sperma terlalu berlebihan maka dapat menyebabkan pembukaan pori-pori yang terlalu lebar dan gagal untuk menutup seperti semula, sehingga dapat mengakibatkan sel rusak atau pecah, oleh sebab itu maka perlu

diketahui tegangan yang sesuai supaya tidak sampai terjadi kerusakan pada sel sperma.

2.5 Hubungan Motilitas dan Viabilitas Sperma

Kerusakan dapat terjadi pada sperma akibat gangguan proses spermatogenesis antara lain, kerusakan mitokondria sehingga motilitas spermatozoa terganggu serta gangguan siklus spermatogenesis sehingga konsentrasi spermatozoa juga menurun. Untuk memastikan apakah spermatozoa yang tidak motil tersebut hidup atau mati, maka perlu dilakukan uji viabilitas spermatozoa. Sperma yang immotile/ motilitas < 5%, dianjurkan untuk dilakukan pemeriksaan *viability assay* (Ningrum, 2006). Waktu motilitas dan viabilitas spermatozoa akan berbanding terbalik yaitu semakin meningkatnya waktu motilitas spermatozoa maka akan semakin menurun waktu viabilitasnya (Hidayaturrahmah, 2007).

2.6 Metode Elektroporasi

Elektroporasi adalah proses penerapan medan listrik (pulsa) untuk sel hidup dalam jangka waktu yang singkat. Elektroporasi memungkinkan pembentukan pori-pori yang memungkinkan juga molekul eksogen seperti DNA untuk masuk ke dalam sel. Elektroporasi merupakan teknik yang sangat efisien untuk memperkenalkan asam nukleat, protein, karbohidrat, RNA, pewarna, partikel virus dan molekul lain dalam berbagai macam sel seperti prokariotik dan eukariotik (Anonymous, 2010).

Keuntungan metode elektroporasi ini adalah sebagai metode yang paling efisien. Elektroporasi dengan tegangan tinggi merupakan salah satu

metode yang paling efisien dalam mentransformasikan plasmid DNA ke dalam sel kompeten. Metode ini juga sering digunakan, terutama untuk plasmid. Metode elektroporasi ini juga dapat digunakan untuk mentransformasikan DNA ke dalam bakteri gram negatif dan positif lainnya (tidak hanya *E. coli*). Sedangkan kekurangan dari metode ini adalah alat elektroporasi ini membutuhkan *micropulser* (elektroporasi untuk bakteri dan ragi). Elektroporasi dapat menurunkan fertilitas dari sperma yang disebabkan oleh kerusakan dini dari akrosom. Umumnya penurunan fertilitas sperma ini terlihat setelah elektroporasi (Squires, 1998).

Pembuahan buatan untuk menghasilkan ikan transgenik yang efisien dan mudah dengan menggunakan metode elektroporasi. Bahkan dengan metode elektroporasi ini memungkinkan untuk memproduksi ikan transgenik secara massal (Tsai *et al.*, 1997). Metode elektroporasi menggunakan serangkaian listrik arus pendek untuk melemahkan membran sel guna membantu DNA rekombinan masuk dalam sel tertentu (Chent, 1995).

Metode elektroporasi yang umum digunakan untuk menghasilkan kondisi yang optimal terbukti memakan waktu. Dengan diperkenalkannya “*Gene Pulser* sistem elektroporasi” (Gambar 5) kondisi optimal dapat ditentukan dengan cepat. *Gene Pulser* adalah sistem elektroporasi modular, yang mencakup unit utama, memiliki dua modul aksesori modul CE (*Cell Eukarotic*) dan modul PC (*Prokariotic Cell*). Modul CE digunakan untuk elektroporasi sel eukariotik, termasuk sel mamalia dan protoplas

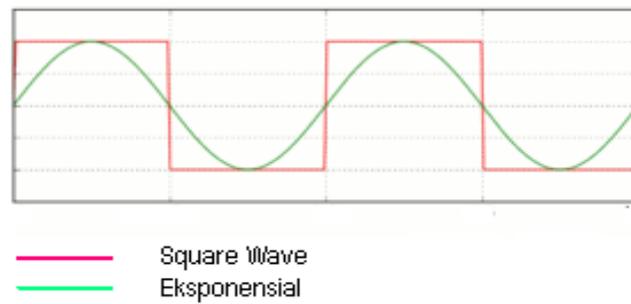
tanaman, sedangkan modul PC digunakan untuk elektroporasi bakteri dan jamur serta aplikasi lain dimana pulsa tegangan tinggi diterapkan pada sampel volume kecil dan ketahanan tinggi. Sistem *Gene Pulser* (Gambar 6) menghasilkan bentuk gelombang *eksponensial* dan persegi (square), memungkinkan untuk memilih gelombang yang terbaik untuk proses elektroporasi. *Gene pulser* pada tegangan rendah dapat dicapai pada 10-500 V, sedangkan pada tegangan tinggi dapat dicapai antara 200-3000 V (Anonymous, 2010).



Gambar 5. *Gene Pulser* BIO-RAD (Anonymous, 2010)

Sel eukariotik memiliki membran nukleus dan sistem endomembran sedangkan sel prokariotik mempunyai membran plasma, sitoplasma yang mengandung ribosom, mesosom, kromator (pigmen) dan materi inti (DNA dan RNA) dan sel prokariotik tidak mempunyai membran inti dan system.

Perbedaan bentuk dasar gelombang *Eksponensial* dan *Square Wave* dapat dilihat pada gambar 6 berikut ini :



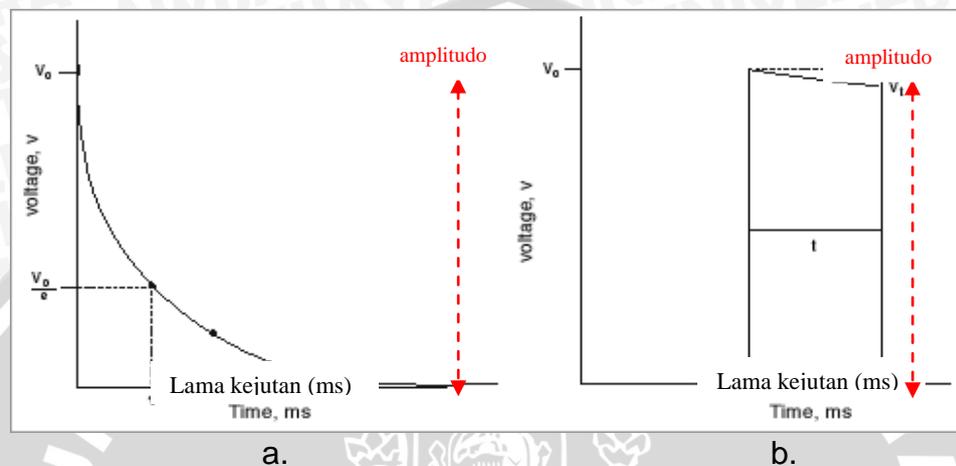
Gambar 6. Gelombang *Eksponensial* dan *Square Wave* (Anonymous, 2010)

Parameter elektrik yang paling penting dalam percobaan elektroporasi adalah kekuatan bidang ($E = V/cm$, tegangan antara elektroda yang dibagi dengan jarak antar elektroda) dan lama kejutan. Lama kejutan adalah tergantung dari hambatan (*resistance, ohm*) dan ketahanan (*capacitance, farad*) pada sirkuit. Ketahanan ditentukan dari kekuatan ion dari sampel dan jarak antar elektroda. Kekuatan ion bersifat berbanding terbalik dengan hambatan sehingga semakin tinggi kekuatan ion dari media maka hambatannya akan semakin kecil. Apabila jarak antar elektroda semakin jauh maka hambatan yang dihasilkan akan semakin besar. Ketahanan yang terjadi tergantung dari kapasitor pada sirkuit. Jika pada kondisi hambatan rendah dan ketahanan tidak ditentukan maka dihasilkan kejutan yang pendek (Shigekawa dan Dower, 1988).

Metode *Eksponensial*, tegangan yang dilepaskan dari kapasitor yang dipilih meluruh dengan cepat dari waktu ke waktu. Kejutan yang diberikan dicirikan oleh kekuatan bidang (kV/cm) dan lama kejutan yang konstan (ms). Penyesuaian tegangan pada *Gene Pulser* untuk jarak elektroda dikenal dengan kontrol kekuatan bidang. Kekuatan medan,

hambatan dan nilai-nilai kapasitansi ditetapkan oleh waktu yang konstan dan tegangan yang diberikan.

Hubungan kedua parameter (*Voltage* dan lama kejutan) dapat dilihat pada Gambar 7 berikut ini :



Gambar 7. a. Eksponensial; b. Square Wave (Anonymous, 2010)

Tegangan *eksponensial*, ketika sebuah kapasitor dibebankan ke tegangan V_0 dan kemudian dikejutkan ke dalam sel, maka tegangan yang diberikan untuk sel akan semakin berkurang seiring bertambahnya waktu yang terlihat pada kurva *eksponensial*, sehingga tegangan (V) pada setiap waktu (t) yang diberikan $V_0 V = e^{- (t / RC)}$, dimana R= *Resistance*, C = *Capacitance*, dan $t = CR$, maka $V = V_0 / e$. Nilai CR (lama kejutan) sebagai waktu yang konstan dari tegangan *eksponensial* yang terjadi dan e merupakan besarnya kejutan awal yang diberikan. Berarti dalam hal ini faktor yang berpengaruh terhadap tegangan *eksponensial* adalah tegangan, waktu dan kekuatan bidang.

Tegangan *Square wave* lebih diarahkan kepada amplitudo yang diperlukan untuk menjaga lamanya waktu kejutan, kemudian dikembalikan ke nol. Pada metode *Square Wave*, dicirikan juga oleh tegangan yang

diberikan, panjang kejutan, jumlah kejutan dan panjang jarak diantara kejutan. Gelombang *square wave* dapat meningkatkan efisiensi dan kelangsungan hidup. *Eksponensial wave*, tegangan ditujukan untuk suatu amplitudo yang diinginkan, kemudian memberikan kerusakan yang bersifat eksponen. Pada metode ini panjang kejutan memiliki nilai yang sama dengan lama kejutan. Jika terjadi penurunan tegangan oleh peluruhan *eksponensial* pada akhir kejutan kejadian ini disebut kejutan layu dan diukur sebagai persentase dari tegangan awal (Anonymous, 2010).

Tegangan dari metode *square wave* yaitu dinaikkan sampai pada amplitudo yang diinginkan kemudian dijaga tetap konstan sampai pada waktu yang telah ditentukan kemudian kembali ke nol, sedangkan pada metode *exponential wave*, voltase dinaikkan sampai pada amplitudo yang diinginkan kemudian menurun secara *eksponensial* (Sin, 2001).

2.7 Elektroporasi Sperma

Sperma dapat menjadi vektor yang efisien dalam transfer gen. Efektifitas transfer gen dengan elektroporasi sperma sangat dipengaruhi kondisi listrik dan parameter biologi (Andre, Gehl, Sersa, Preat, Hojman, Eriksen, Gotzio, Cemazar, Pavsels, Rols, Miklavcic, Neumann, Teissie dan Mir, 2008). Menurut Symonds *et al.* (1994a) bahwa pengambilan DNA oleh sperma yang akan ditransfer tergantung pada tegangan listrik (kV/cm atau V/cm), jumlah kejutan yang dikenakan dan konsentrasi DNA. Efisiensi transfer DNA ke embrio dengan sperma yang dielektroporasi sangat dipengaruhi oleh tegangan dan lama kejutan.

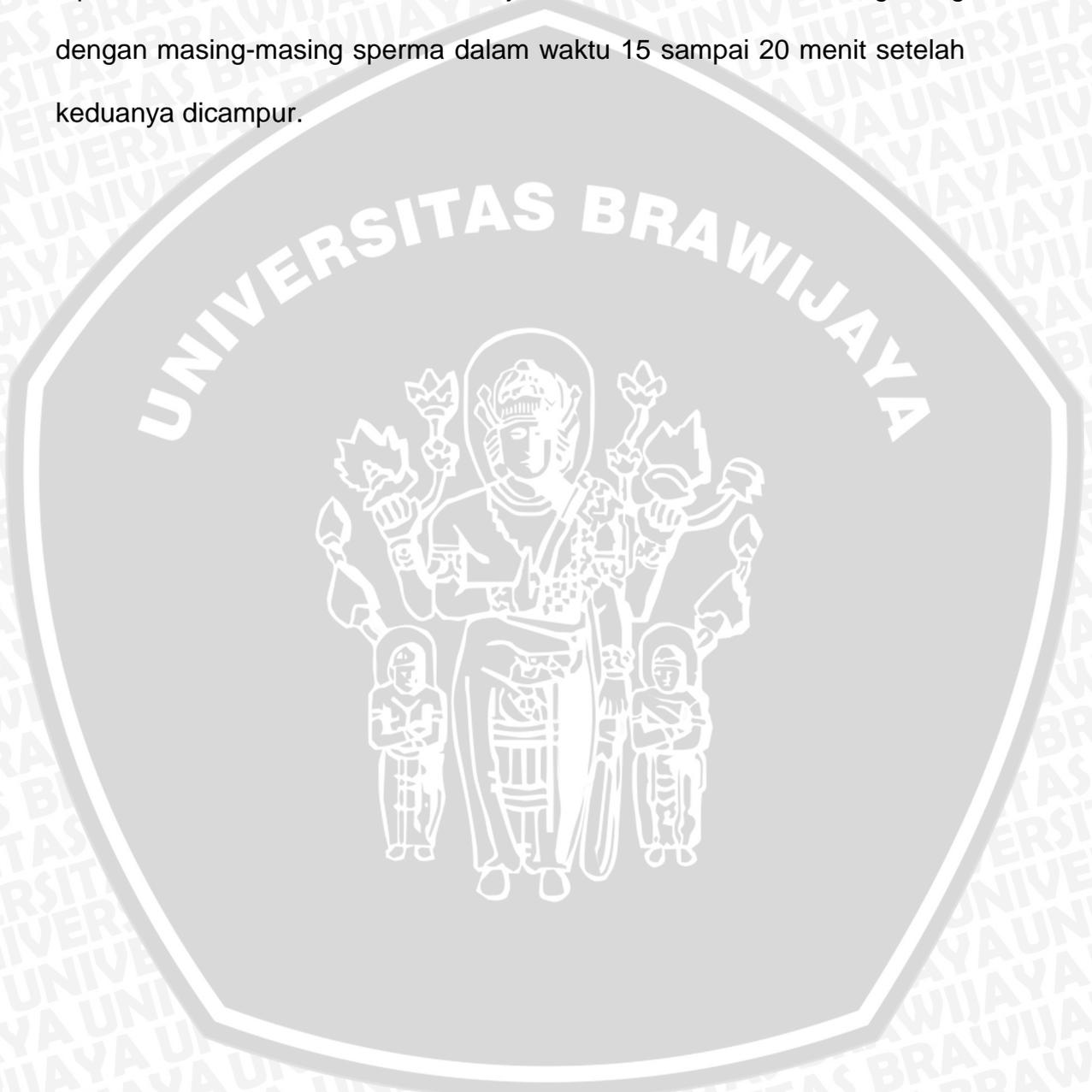
Ketika sel diberi kejutan listrik, molekul yang menyusun membran sel akan saling bertentangan dan suatu potensi tegangan dialirkan kedalam sel (gambar 8). Ketika beda-potensial melebihi suatu keseimbangan antara di dalam dan bagian luar selaput sel, maka area selaput yang dilokalisir untuk sementara membuka dan di dalam akan terbentuk pori-pori, kemudian membiarkan difusi DNA asing ke dalam sel (Sin, 2001). Proses tersebut mungkin menimbulkan kerusakan pada membran atau selaput sperma karena Jeyendran (1986) menyatakan, bahwa permeabilitas membran spermatozoa erat kaitannya dengan motilitas dan viabilitas spermatozoa karena seperti diketahui permeabilitas membran sangat berkaitan dengan transportasi nutrisi yang penting peranannya dalam metabolisme sel.



Gambar 8. Masuknya DNA asing ke dalam sel (www.maxcyte.com)

Motilitas sperma ikan merupakan parameter kelangsungan hidup sperma, yang akan menurun dengan semakin meningkatnya tegangan dan lama kejutan. Kelulushidupan dari embrio yang dibuahi dengan sperma yang dielektroporasi dan dengan sperma tanpa perlakuan tidak tampak perbedaan (Sin, 2001).

Menurut Sin (2001), interaksi antara spermatozoa dengan DNA asing telah mendapat perhatian, seperti ikan salmon dan abalon telah menunjukkan mampu untuk mengikat DNA secara *in vitro*. Hal ini diperkirakan molekul DNA dalam jumlah 3.8×10^2 telah bergabung dengan masing-masing sperma dalam waktu 15 sampai 20 menit setelah keduanya dicampur.



III. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah antara lain :

1. Induk jantan ikan mas (*Cyprinus carpio* L.) yang akan diambil cairan spermanya.
2. Larutan Na Fis yang digunakan untuk memudahkan dalam mengambil sperma ikan mas yang sudah di elektroporasi (Lampiran 1).
3. Eosin-negrosin untuk pewarnaan sperma yang akan diamati viabilitasnya.
4. Sperma ikan mas yang akan diamati motilitas (pergerakan spermatozoa) dan viabilitasnya.
5. Akuadest yang digunakan untuk mengaktifkan sperma.
6. HCl 0,2 M untuk membersihkan cuvet.
7. *Tissue* yang digunakan untuk membersihkan alat-alat (Lampiran 1).
8. Etanol 70% yang digunakan untuk merendam cuvet yang telah dibersihkan dengan HCl.
9. Air yang digunakan sebagai media hidup indukan ikan mas.
10. Es batu yang digunakan untuk mendinginkan cuvet sebelum digunakan untuk proses elektroporasi sperma.

3.1.2 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah antara lain :

1. Satu set alat elektroporator (BIO-RAD) yang digunakan untuk memberi kejutan listrik pada sperma ikan mas (Lampiran 2).
2. Cuvet sebagai tempat sperma yang akan diberi kejutan listrik (Lampiran 2).

3. Kolam pemeliharaan induk ikan mas yang digunakan untuk media hidup induk ikan mas (di Laboratorium Biologi dan Reproduksi Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya).
4. Bak plastik yang akan digunakan untuk memindah induk dari kolam ke dalam laboratorium.
5. Obyek glass yang digunakan sebagai tempat pembuatan preparat sperma untuk diamati motilitas dan viabilitasnya di bawah mikroskop.
6. Cover glass yang digunakan untuk penutup obyek glass.
7. *Haemocytometer* yang digunakan untuk menghitung jumlah sel sperma.
8. Pipet volume untuk mengetahui jumlah volume sperma yang dihasilkan.
9. Mikro pipet yang digunakan untuk mengambil sperma yang ada di mangkok dan mengambil Na Fisiologis (Lampiran 2).
10. *Yellow tip* dan *white tip* yang akan dipasangkan ke mikro pipet untuk mengambil cairan sperma dan Na Fisiologis (Lampiran 2).
11. Timbangan Digital yang digunakan untuk menimbang berat induk dan sperma ikan mas.
12. Spuit 5 cc/mL yang digunakan untuk mengambil sperma ikan mas.
13. Blower yang digunakan sebagai sumber aerasi.
14. *Handtally counter* yang digunakan untuk menghitung jumlah sel sperma.

3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen, dimana metode eksperimen adalah suatu metode yang dilakukan dengan mengadakan kegiatan percobaan untuk melihat suatu hasil atau hubungan kausal antara variable-variabel yang diselidiki (Sahri, 1992). Menurut Sugiyono (2008) metode eksperimen adalah metode penelitian yang digunakan untuk mencari pengaruh perlakuan tertentu terhadap yang lain.

Tujuan dari penelitian eksperimental adalah untuk menyelidiki ada tidaknya hubungan sebab akibat tersebut dengan cara memberikan perlakuan-perlakuan tertentu pada kelompok eksperimental dan menyediakan kontrol sebagai perbandingan (Nazir, 2003).

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan dua perlakuan yang masing-masing perlakuannya diulang sebanyak tiga kali (Gambar 9) dan kontrol diberikan pada semua perlakuan yang fungsinya untuk membandingkan dengan perlakuan.

Dalam penelitian ini, perlakuan yang digunakan adalah sebagai berikut :

Kejutatan Listrik dengan tegangan 40 volt dan lama tegangan 0,5 ms.

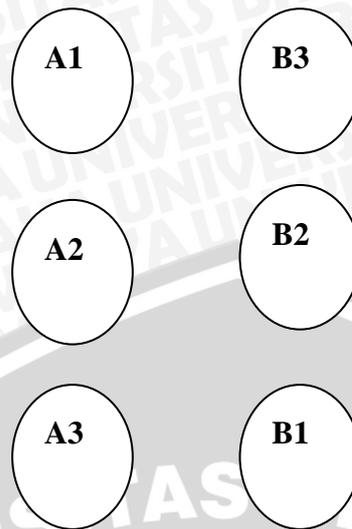
Perlakuan A = pemberian kejutan listrik dengan metode *Square Wave* menggunakan parameter ukur tegangan (40 v).

Perlakuan B = pemberian kejutan listrik dengan metode *Eksponensial* menggunakan parameter ukur tegangan (40 v).

Untuk membedakan atau membandingkan dua macam perlakuan dilakukan dengan 'uji t' (*t test*). Pada prinsipnya berbeda atau tidaknya dua macam perlakuan tersebut dapat diketahui dari perbandingan t hitung (*calculated*) dan t daftar (Gaspersz, 1994).

Soelistyowati (2003), menyatakan bahwa model umum uji t adalah sebagai berikut :

$$t \text{ hitung} = \frac{|\bar{A} - \bar{B}|}{\sqrt{\frac{n(n-1)}{JK_A + JK_B}}}$$



Gambar 9. Denah Percobaan

Keterangan :

- A = pemberian kejutan listrik dengan metode *Square Wave*
B = pemberian kejutan listrik dengan metode *Ekspensial*
1, 2, 3 = Ulangan perlakuan.

3.4 Prosedur Penelitian

Pertama menyiapkan alat elektroporasi sebagai alat kejutan listrik dengan langkah-langkah sebagai berikut :

- Menyambungkan steker alat ke sumber listrik yang sesuai.
- Menekan tombol "POWER" di samping kanan alat untuk menyalakan alat.
- Muncul tampilan awal yaitu "*HOME SCREEN*"
- Pada tampilan "*HOME SCREEN*" dipilih no 3 atau menggunakan panah keatas atau kebawah untuk memilih "*Square wave protocol / Ekspensial protocol*".

- Kemudian muncul tampilan detail metode *Square wave/ Eksponensial protocol*, selanjutnya memasukkan beberapa parameter yang akan ditentukan seperti:
 - Lama kejutan + besar tegangan
 - Lama kejutan + besar tegangan + jumlah kejutan + interval tegangan
- Menyiapkan *cuvette* dan yang akan dipakai yaitu *cuvette* ukuran 0,2 cm
- Setelah parameter yang dimasukkan sesuai maka simpan dan berikan tanda dengan abjad, agar saat memberikan *pulse* dapat dilakukan dengan cepat.
- Persiapkan sampel dengan langkah sebagai berikut:
 1. Memasukkan 25 μ l sperma ke dalam *cuvette* menggunakan mikropipet setelah itu tutup *cuvette* dengan rapat.
 2. Membuka tutup "*shock pod*"
 3. Memasang *cuvette* berisi sampel pada "*shock pod*"
 4. Menutup kembali "*shock pod*"
 5. Setelah itu sperma siap untuk diberi kejutan
- Setelah itu pilih besar tegangan yang akan diberikan dengan memilih tanda, kemudian tekan "enter" sehingga tampilan tegangan akan terbuka.
- Menekan tombol "*PULSE*" untuk memulai memberikan kejutan pada sampel.
- Setelah itu akan muncul tampilan yaitu hasil perlakuan yang diberikan pada sampel.
- Dicatat hasil dari penurunan tegangan yang muncul di layar alat elektroporator.

Sperma yang diberi kejutan listrik kemudian 25 μ l sperma yang ada di dalam *cuvette* ditambahkan larutan Na Fisiologis sebanyak 275 μ l, fungsi penambahan larutan Na Fisiologis ini sendiri adalah agar memudahkan dalam

mengambil sperma yang ada di dalam *cuvette* serta untuk menjaga kondisi sperma tetap stabil.

3.5 Parameter Uji Penelitian

3.5.1 Motilitas Spermatozoa

Motilitas sperma sangat bergantung terhadap lingkungan dan proses preservasi, pembekuan yang cepat dapat melindungi sperma dari kerusakan akibat efek larutan tetapi dapat mengakibatkan cool shock dan pembentukan kristal s yang akan merusak sperma, pembekuan yang lambat akan mencegah munculnya kristal s tetapi akan menyebabkan naiknya konsentrasi garam dan tekanan osmotik yang akan merusak protein yang dikandung oleh sel (Wira, 2007). Menurut Rustidja (2000) pergerakan sperma dipengaruhi oleh salinitas air. Umumnya pergerakan sperma ikan yang memijah dalam air laut lebih lama dari pada air tawar, hal ini disebabkan air laut lebih banyak mengandung zat-zat yang terdapat dalam sperma.

Lama penyimpanan sperma berpengaruh terhadap motilitas spermatozoa setelah pembekuan, fertilitas dan daya tetas telur ikan. Semakin lama sperma disimpan akan terjadi penurunan terhadap motilitas, fertilitas dan daya tetas telurnya (Rustidja 2000). Menurut Paisal (2008) motilitas sperma bisa dikatakan normal apabila 40% atau lebih sperma dapat bergerak dan dapat membuahi telur, tetapi beberapa pusat laboratorium mengatakan bahwa nilai normal untuk motilitas sperma adalah 60% atau lebih, baru sperma dapat dikatakan normal dan mampu untuk membuahi telur.

Sperma yang telah dikeluarkan dari gonad ikan mas, kemudian diberi perlakuan tegangan yang berbeda-beda, setelah itu dilakukan pengamatan motilitas untuk mengetahui persentase nilai motilitasnya.

Penghitungan persentase motilitas sperma dilakukan dengan melihat pergerakan sperma di bawah mikroskop dalam satu bidang pandang. Dari pergerakan sel spermatozoa tersebut dapat dilihat pergerakannya sebagai dasar perkiraan penghitungan persentase motilitas sperma. Pengamatan pergerakan sperma ini dilakukan oleh lebih dari 3 orang untuk mendapatkan nilai yang valid.

3.5.2 Viabilitas Spermatozoa

Kemampuan hidup (viabilitas) spermatozoa sangat dipengaruhi oleh suhu dan secara umum akan hidup lebih lama dalam suhu rendah. Penurunan suhu dari suhu kamar ke suhu dingin dan perlu dilakukan secara bertahap untuk menghindari terjadinya *cold shock* (Toelihere, 1981 dalam Rustidja, 2000). Pembekuan dan pencairan sperma kembali menyebabkan terjadinya perubahan intrastruktural pada membran plasma, hilangnya beberapa matrik mitokondria dan penurunan densitas elektron dari matrik mitokondria menyebabkan hilangnya viabilitas spermatozoa (Jones dan Stewart, 1979 dalam Rustidja, 2000).

Penghitungan persentase viabilitas sperma dilakukan dengan menghitung jumlah sperma yang hidup kemudian dibagi dengan jumlah sperma awal dan dikali 100 %. Pada saat pengamatan viabilitas, sperma awal dihitung sebanyak 200 sel sperma, kemudian dihitung sperma yang terwarnai dan tidak terwarnai dalam 200 sel tersebut untuk mendapatkan prosentase sperma yang hidup Partodiharjo (1992) menyatakan bahwa sedikitnya 100-2.000 sel sperma dihitung untuk menentukan prosentase sperma yang hidup

3.6 Analisis Data

Untuk membedakan atau membandingkan dua macam perlakuan yaitu metode *Eksponensial* dan *Square Wave*, dilakukan dengan uji t (t test). Pada prinsipnya berbeda atau tidaknya dua macam perlakuan tersebut dapat diketahui dari perbandingan t hitung (*calculated*) dan t daftar (Gaspersz, 1994).

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Kualitas Sperma Kontrol

Dari hasil pengamatan di dapat nilai persentase motilitas sperma kontrol sebelum dilakukan perlakuan sebesar 65% dan nilai viabilitas sperma sebesar 73,33%. Selama penelitian induk jantan yang digunakan sebanyak 2 ekor ikan mas setelah itu ditimbang berat tubuhnya. Induk jantan di stripping untuk memperoleh cairan spermanya, sebagaimana terlihat pada Tabel 1 berikut ini:

Tabel 1. Data Induk Jantan yang digunakan dalam penelitian

Nomor Ikan	Berat Tubuh	Volume Sperma
Ikan 1	0.872 Kg	2,57 ml
Ikan 2	0.755 Kg	2,84 ml
Rata-rata	0,813 Kg	2,7 ml

Konsentrasi sperma merupakan salah satu parameter utama di dalam evaluasi kualitas sperma ikan. Semakin tinggi konsentasi sperma maka kemungkinan terjadinya fertilisasi akan semakin besar pula. Ikan yang mampu menghasilkan telur sampai ratusan ribu butir, maka selain konsentrasi sperma yang tinggi, juga membutuhkan volume sperma yang lebih banyak pula (Rustidja, 2000). Kepadatan sel sperma dalam 1 ml diperoleh sebesar $\pm 24 \times 10^9$ sel/ ml. Perhitungan tersebut dapat dilihat pada Lampiran 3. Menurut Anonymous (2010) konsentrasi sperma ikan mas berkisar antara $\pm 23,8 - 25,6 \times 10^9$ sel/ ml, dengan rata-rata $\pm 24,7 \times 10^9$ sel/ ml. Penilaian konsentrasi sperma sangat penting, karena faktor ini yang menggambarkan sifat-sifat semen dan dipakai sebagai salah satu kriteria penentuan kualitas sperma (Toelihere, 1981 dalam Rustidja, 2000).

4.1.1 Motilitas Spermatozoa

Motilitas sperma kontrol sebelum elektroporasi lebih besar dibandingkan dengan motilitas sperma kontrol sesudah elektroporasi, hal ini disebabkan karena sperma kontrol sebelum elektroporasi masih segar dan baik. Sperma kontrol sesudah elektroporasi dilakukan setelah perlakuan elektroporasi, sehingga kualitas sperma sudah dipengaruhi oleh jeda waktu perlakuan. Pengamatan sperma kontrol sebelum elektroporasi dan sesudah elektroporasi ini adalah sperma murni tanpa perlakuan kejutan listrik.

Sebagaimana dikatakan Chent *et al.* (1995) bahwa proses pengaktifan sperma dipengaruhi oleh kejutan konsentrasi yaitu perbedaan konsentrasi cairan di dalam spermatozoa dengan lingkungan di luar spermatozoa sehingga menimbulkan pergerakan spermatozoa (*osmotic shock*). Setelah itu sperma dikeluarkan dengan cara gonad diperas agar jaringan gonad tidak tercampur dengan cairan sperma sehingga tidak mengganggu waktu pengambilan sperma dengan mikropipet. Sperma yang sudah dikeluarkan tidak dicampurkan dengan pengencer apapun namun untuk menjaga agar kondisinya tidak berubah, sperma diletakkan dalam tempat tertutup dan dengan kondisi yang dingin (diberi es). Menurut Sin (2001), sperma yang keluar dari tubuh ikan tidak akan bertahan lama, karena kondisinya berubah. Sperma yang telah ditampung diusahakan mempunyai kondisi yang dapat mendukung kehidupannya dan kemampuan hidup (*viabilitas*) spermatozoa sangat dipengaruhi oleh suhu dan secara umum akan hidup lebih lama dalam suhu rendah (Toelihere, 1981 *dalam* Rustidja, 2000).

Untuk lebih jelasnya waktu atau jeda saat pemberian perlakuan dapat dilihat pada Tabel 2 berikut ini:

Tabel 2. Waktu pemberian perlakuan kejutan listrik

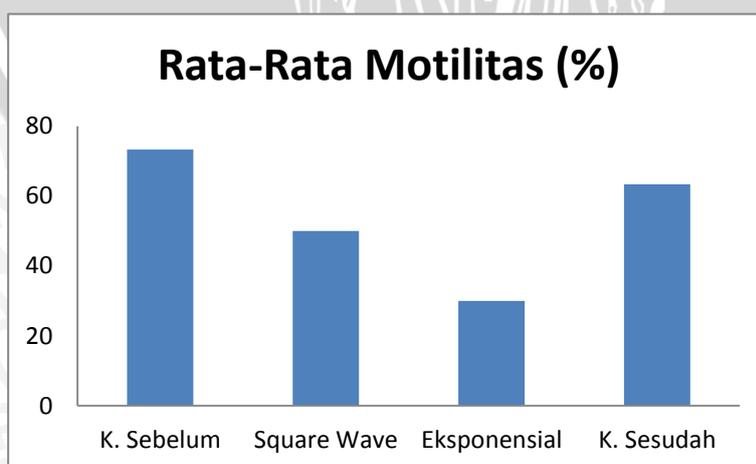
Perlakuan	Waktu Perlakuan (WIB)			Rata-Rata (menit)
	1	2	3	
Kontrol Sebelum	10:50	11:03	11:08	6
Perlakuan A	11:30	11:36	11:41	3,67
Perlakuan B	11:46	11:51	12:14	9,33
Kontrol Sesudah	13:00	13:15	13:30	10

Dari tabel di atas diketahui jeda saat pemberian perlakuan antara sperma kontrol sebelum elektroporasi dengan sperma kontrol sesudah elektroporasi adalah 90 menit, sehingga kualitas sperma kontrol sesudah menjadi menurun karena dibiarkan sampai 90 menit. Hasil persentase motilitas sperma ikan mas dapat dilihat pada Tabel 3 berikut ini :

Tabel 3. Data nilai persentase (%) motilitas sperma ikan mas

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-rata
	1	2	3		
Square Wave	30	35	30	95	31,67
	10	20	15	45	15
K. Sebelum	65	70	60	195	65
	45	40	45	130	43,33

Berikut ini grafik rata-rata motilitas sperma ikan mas

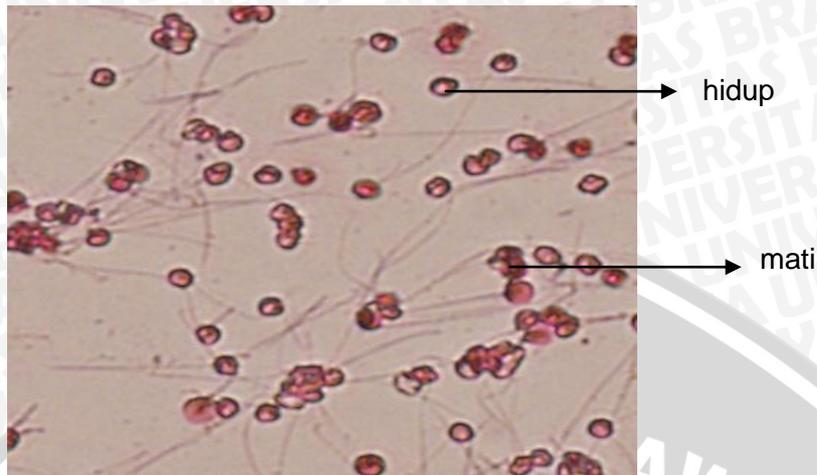


Gambar 10. Grafik rata-rata persentase motilitas sperma ikan mas

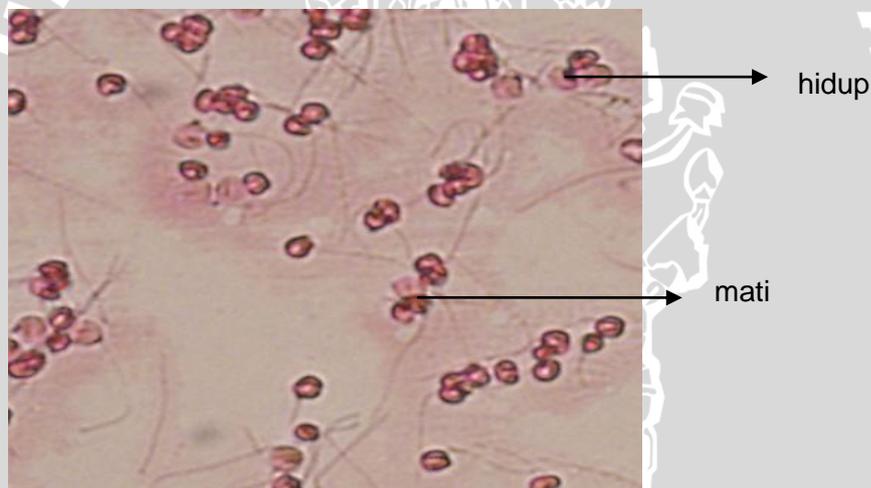
Hasil pengamatan didapatkan nilai persentase motilitas sperma kontrol sebelum elektroporasi adalah sebesar 65% didapat dari rata-rata persentase 65%, 70% dan 60%, sedangkan sperma kontrol sesudah elektroporasi mempunyai nilai motilitas sebesar 43,33% didapat dari rata-rata persentase 45%, 40% dan 45%. Nilai motilitas spermatozoa kontrol sebelum elektroporasi ini sudah cukup bagus untuk membuahi sel telur. Hal ini sesuai dengan pendapat Toelihere (1981) dalam Rustidja (2000) yang menyebutkan bahwa persentase motilitas spermatozoa yang menunjukkan dibawah 40%, adalah nilai motilitas spermatozoa yang kurang baik dalam proses pembuahan telur atau sering berhubungan dengan *infertilitas*, sehingga nilai motilitas spermatozoa kontrol sesudah elektroporasi juga cukup bagus untuk membuahi sel telur.

4.1.2 Viabilitas Spermatozoa

Pengamatan viabilitas spermatozoa sangat penting dilakukan sebelum elektroporasi, karena nantinya akan dibandingkan dengan spermatozoa yang di elektroporasi. Penilaian viabilitas spermatozoa dilakukan dengan menggunakan bahan pewarna *eosin-negrosin*, kemudian diamati viabilitasnya di bawah mikroskop. Zat pewarna ini akan diserap oleh sel spermatozoa yang mati, sedangkan spermatozoa yang hidup tidak terwarnai atau sedikit sekali menyerap zat warna tersebut. Hal ini sesuai dengan pendapat Toelihere (1981) dalam Rustidja (2000) yang menyebutkan bahwa pada saat spermatozoa dicampur dengan zat warna, spermatozoa yang hidup tidak menyerap zat warna atau sedikit sekali menyerap zat warna, sedangkan spermatozoa yang mati akan menyerap zat warna dalam jumlah yang sangat banyak (Gambar 11 dan 12), karena setelah mati permeabilitas dinding sel spermatozoa akan meningkat.



Gambar. 11 Viabilitas sperma dengan metode *Square Wave*



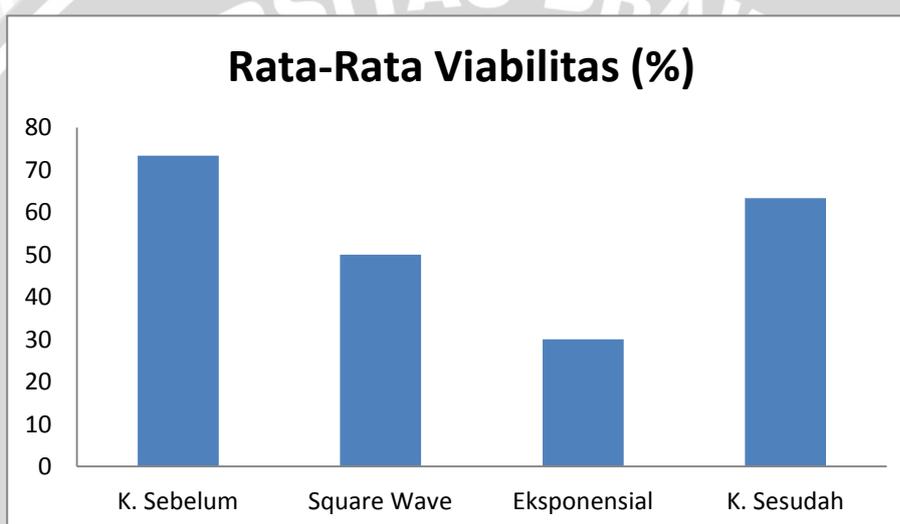
Gambar. 12 Viabilitas sperma dengan metode *Ekspensial Wave*

Pada saat pengamatan viabilitas sperma dihitung sebanyak 200 sel sperma, kemudian dihitung sperma yang terwarnai dan tidak terwarnai dalam 200 sel tersebut untuk mendapatkan persentase sperma yang hidup. Karena menurut Partodiharjo (1992) sedikitnya 100-2.000 sel sperma dihitung untuk menentukan persentase sperma yang hidup. Untuk lebih jelasnya persentase sperma yang hidup dapat dilihat pada Tabel 4 berikut ini:

Tabel 4. Data nilai persentase (%) viabilitas spermatozoa

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-rata
	1	2	3		
Square Wave	50	55	45	150	50
Eksponensial Wave	35	25	30	90	30
K. Sebelum	75	70	75	220	73,33
K. Sesudah	70	60	60	190	63,33

Berikut ini grafik rata-rata viabilitas sperma ikan mas



Gambar 13. Grafik rata-rata persentase viabilitas sperma ikan mas

Nilai viabilitas sperma kontrol sebelum elektroporasi didapatkan sebesar 73,33% sedangkan nilai viabilitas sperma kontrol sesudah elektroporasi didapatkan sebesar 63,33%. Nilai ini tergolong baik, karena menurut Anonymous (2010) persentase hidup sel spermatozoa dalam sperma yang baik adalah minimal 70%.

4.2 Kualitas Sperma Elektroporasi

Sperma yang keluar dari tubuh ikan tidak akan bertahan lama, karena kondisinya berubah. Sperma yang telah ditampung diusahakan mempunyai

kondisi yang dapat mendukung kehidupannya. Salah satu cara untuk tetap menjaga kualitas sperma adalah dengan melakukan penambahan pengencer Na Fis. Karena menurut Rustidja (1985) dalam Hidayaturrahmah (2007) penggunaan larutan fisiologis yang mengandung NaCl dan urea dapat mempertahankan daya hidup spermatozoa antara 20-25 menit.

Menurut Anonymous (2009), penambahan larutan dengan kandungan ion dapat meningkatkan resisten (ohm) sampel sehingga lama kejutan bertambah dan menimbulkan peningkatan suhu pada sampel, sehingga sampel sperma mati. Sebaiknya sel yang akan dielektroporasi dalam keadaan dingin supaya viabilitasnya tetap terjaga, karena pada saat kejutan listrik diberikan pada sel dapat menimbulkan panas yang nantinya dapat mengurangi viabilitas sel.

4.2.1 Metode *Square Wave*

Elektroporasi sperma dengan menggunakan metode *Square Wave* merupakan salah satu metode elektroporasi yang tegangannya lebih diarahkan kepada amplitudo yang diperlukan untuk menjaga lamanya waktu kejutan, kemudian dikembalikan ke nol (Sin, 2001). Beberapa faktor yang berpengaruh terhadap tegangan *Square wave* adalah tegangan, panjang kejutan, jumlah kejutan, dan panjang interval diantara kejutan (Anonymous, 2010).

Dari penelitian diperoleh hasil rata-rata nilai motilitas sperma ikan mas setelah diberi perlakuan kejutan listrik dengan tegangan 40 volt dan lama tegangan 0,5 ms menggunakan metode *Square Wave* adalah sebesar 31,67%. Nilai persentase motilitas ini lebih kecil bila dibandingkan dengan persentase sperma kontrol sebelum diberi perlakuan kejutan listrik sebesar 65%. Penurunan motilitas ini dapat diakibatkan karena terjadinya adaptasi antara spermatozoa dengan tegangan sehingga mengakibatkan terjadinya gangguan terhadap permeabilitas membran atau selaput sperma, menurunkan aktivitas metabolisme,

kerusakan sel dan penurunan motilitas. Hal ini sesuai dengan pendapat Chent *et al.* (1995) yang menyatakan bahwa permeabilitas membran spermatozoa erat kaitannya dengan motilitas dan viabilitas spermatozoa karena seperti yang diketahui permeabilitas membran sangat berkaitan dengan transportasi nutrisi yang penting peranannya dalam metabolisme sel. Ditambahkan oleh Tsai (1997) yang menyatakan bahwa motilitas sperma yang diperoleh sangat tergantung pada level tegangan selama elektroporasi.

Nilai persentase viabilitas sperma ikan mas setelah diberi kejutan yang sama diperoleh rata-rata sebesar 50% (Lampiran 4). Nilai persentase ini juga lebih kecil bila dibandingkan dengan rata-rata persentase viabilitas sperma kontrol sebelum diberi perlakuan yaitu sebesar 73,33%. Adanya penurunan nilai viabilitas sperma disebabkan karena pemberian kejutan listrik dengan tegangan tinggi dapat menyebabkan rusaknya membran plasma dan penurunan motilitas sperma. Kerusakan membran spermatozoa akan berdampak pada membran yang pada awalnya mempunyai sifat semi-permeabel tidak lagi mampu menyeleksi keluar masuknya zat, yang akhirnya pada saat dilakukan uji warna eosin-negrosin zat tersebut bisa masuk ke dalam plasma. Permukaan spermatozoa dibungkus oleh suatu membran lipoprotein. Apabila spermatozoa tersebut mati maka permeabilitas dinding sel akan meningkat dan menyebabkan terserapnya zat warna, terutama di daerah pangkal kepala dan hal ini merupakan dasar pewarnaan sperma yang membedakan spermatozoa yang hidup dengan spermatozoa yang mati (Tang dan Affandi. 2001).

4.2.2 Metode *Eksponensial Wave*

Elektroporasi sperma dengan metode *Eksponensial Wave* merupakan salah satu metode elektroporasi dengan menaikkan tegangan sampai pada amplitudo yang diinginkan kemudian menurun secara *eksponensial* (Sin, 2001).

Berarti dalam hal ini faktor yang berpengaruh terhadap tegangan *Eksponensial* adalah tegangan, waktu dan kekuatan bidang. *Eksponensial wave*, tegangan ditujukan untuk suatu amplitudo yang diinginkan, kemudian memberikan kerusakan yang bersifat eksponen (berkelanjutan). Pada metode ini panjang kejutan memiliki nilai yang sama dengan lama kejutan (Anonymous, 2010).

Dari penelitian diperoleh hasil rata-rata nilai motilitas sperma ikan mas setelah diberi perlakuan kejutan listrik dengan tegangan 40 volt dan lama tegangan 0,5 ms menggunakan metode *Eksponensial Wave* adalah sebesar 15%. Nilai persentase motilitas ini jauh lebih kecil bila dibandingkan dengan persentase sperma kontrol sebelum diberi perlakuan kejutan listrik sebesar 65%. Begitu juga dengan nilai rata-rata persentase viabilitasnya juga jauh lebih rendah dibandingkan dengan rata-rata persentase sperma kontrol sebelum diberi kejutan listrik dengan metode *eksponensial*. Menurut Weaver (1995) penggunaan tegangan listrik tinggi yang diberikan pada sampel dapat menyebabkan panas yang bisa membunuh sebagian besar sampel yang dielektroporasi.

4.2.3 Perbandingan Metode *Square Wave* dan *Eksponensial Wave*

Berdasarkan hasil yang didapat dari perlakuan pemberian kejutan menggunakan dua metode elektroporasi yang berbeda diperoleh rata-rata persentase motilitas dan viabilitas dari penggunaan metode *Square Wave* ternyata lebih besar daripada persentase motilitas dan viabilitas dari penggunaan metode *Eksponensial Wave*. Kemungkinan kerusakan sel spermatozoa pada metode *Square Wave* lebih kecil dibanding dengan metode *Eksponensial*. Chent *et al.* (1995) menyatakan bahwa metode *Square* dapat menghasilkan tegangan yang besar sehingga efisiensi pemasukan DNA asing lebih besar karena pembukaan pori relatif lebih besar, namun gelombangnya sangat pendek (*pulse length*) sehingga mencegah sel rusak dan dapat kembali seperti semula karena

panas yang ditimbulkan relatif kecil. Sehingga dapat dikatakan metode *square wave* dapat menghantarkan tegangan tinggi dalam gelombang yang pendek sehingga menimbulkan sedikit panas, sehingga transfer DNA dapat terjadi tanpa membunuh sel atau embrio. Hal ini juga sesuai dengan pendapat Samarsik *et al.* (2003) bahwa penggunaan dua metode dalam elektroporasi (*Square/Ekspensial Wave*) akan menimbulkan efek pada suatu sel, akan tetapi pada penggunaan metode *Square Wave* memiliki persentase bertahan hidup yang lebih besar pada sel yang dielektroporasi.

Metode *Square Wave* dicirikan dengan tegangan (*voltage*), panjang kejutan (*pulse length*), jumlah kejutan (*number of pulse*) dan jarak antara kejutan (*pulse interval*). Sedangkan pada metode *Ekspensial Wave* dicirikan dengan tegangan (*voltage*), ketahanan (*capacitance*) dan hambatan (*resistence*). Dari perlakuan elektroporasi dengan menggunakan tegangan 40 volt pada metode *Square Wave* menghasilkan tegangan akhir 37 volt, panjang gelombang 0,5 ms, jumlah kejutan 1 dan persentase penurunan tegangan (*Droop*) 0,075%. Selanjutnya pada metode *Ekspensial* menghasilkan tegangan akhir 37 volt dan waktu konstan (TC) 10,4 ms. Berdasarkan hasil diatas diketahui bahwa lama kejutan atau panjang kejutan (*pulse lenght*) metode *Ekspensial Wave* lebih besar daripada Metode *Square Wave*, sehingga metode *Ekspensial* menghasilkan panas yang lebih besar yang mengakibatkan rusaknya sel spermatozoa.

Untuk membedakan atau membandingkan dua macam perlakuan umumnya dilakukan dengan 'uji t' (*t test*). Pada prinsipnya berbeda atau tidaknya dua macam perlakuan tersebut dapat diketahui dari perbandingan t hitung (*calculated*) dan t daftar (Gaspersz, 1994). Dari data motilitas sperma ikan mas yang diperoleh maka didapatkan hasil $t_{\text{tabel } 5\% (2(n-i))} < t_{\text{hitung}} < t_{\text{tabel } 1\% (2(n-i))}$

i) artinya perlakuan dengan menggunakan metode *Ekspensial dan Square Wave* berbeda nyata, sedangkan dari data viabilitas sperma ikan mas yang diperoleh maka didapatkan hasil $t_{hitung} > t_{tabel\ 1\% (2(n-i))}$ yang artinya perlakuan dengan menggunakan metode *Ekspensial dan Square Wave* berbeda sangat nyata.

Dari kedua metode tersebut tampak bahwa penggunaan metode *Square Wave* lebih baik dari pada Metode *Ekspensial Wave*. Hasil ini diperkuat dengan nilai persentase motilitas dan viabilitas sperma ikan mas yang lebih tinggi dibandingkan dengan metode *Ekspensial* (Lampiran 4).



V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil perhitungan dan analisis data pada penelitian ini dapat diambil beberapa kesimpulan sebagai berikut :

- Pemberian kejutan listrik dengan metode yang berbeda berpengaruh terhadap motilitas dan viabilitas sperma ikan mas (*Cyprinus carpio* L.).
- Metode *Square Wave* dapat menghantarkan tegangan tinggi dalam gelombang yang pendek sehingga menimbulkan sedikit panas, sehingga tanpa membunuh sel atau embrio.
- Lama kejutan atau panjang kejutan (*pulse lenght*) metode *Eksponensial Wave* lebih besar daripada Metode *Square Wave*, sehingga metode *Eksponensial Wave* menghasilkan panas yang lebih besar yang mengakibatkan rusaknya sel spermatozoa.
- Penggunaan metode *Square Wave* lebih baik dilihat dari persentase motilitas sperma sebesar 31,67% dan persentase viabilitas sperma sebesar 50% dari pada Metode *Eksponensial Wave* yang memiliki persentase motilitas sperma sebesar 15% dan persentase viabilitas sperma sebesar 30%.

5.2 Saran

- Elektroporasi pada sperma ikan mas (*Cyprinus carpio* L.) sebagai media transfer gen sebaiknya dilakukan dengan *Square Wave*.
- Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang elektroporasi dengan metode *Square Wave* pada sel telur ikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous. 2008. **Sperma Ikan**. www.google.com. Diakses pada tanggal 18 Mei 2010 pukul 16.45 WIB.
- _____. 2009. **Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.)**. www.google.com. Diakses pada tanggal 10 Mei 2010 pukul 20.55 WIB.
- _____. 2010. **Gene Pulser Xcell Electroporation System**. Instruction Manual. BIO-RAD. Diakses pada tanggal 15 Mei 2010 pukul 17.15 WIB.
- _____. 2010. **Sperm cell**. www.google.com/gambar. Diakses pada tanggal 10 Mei 2010 pukul 20.55 WIB.
- _____. 2010. **Konsentrasi sperma**. Fish.com/konsentrasi sperma ikan mas. Diakses pada tanggal 29 September 2010 pukul 23.55 WIB.
- Andre, F.M, J. Gehl, G. Sersa, V. Preat, P. Hojman, J. Eriksen, M. Gotzio, M. Cemazar, N. Pavscl, M. P. Rols, D. Miklavcic, E. Neumann, J. Teissie and L. M. Mir. 2008. **Efficiency of High- and Low-Voltage Pulse Combinations for Gene Electrotransfer in Muscle, Liver, Tumor and Skin**. Diakses dari <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/hum.2008.060> pada tanggal 12 April 2010 pukul 16:15 WIB.
- Arie, Usni. 2008. **Budidaya Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.)**. <http://solusiikanmas.blogspot.com/2008/04/sperma-ikan-mas.html>. Diakses tanggal 12 Mei 2010 pukul 18.45 WIB.
- Carman, O. 1990. **Ploidy manipulation in some warm water fish**. Thesis, Sumited in Partial Fulfillment of Requirements for Degree of Master in Fisheries Science at The Tokyo University of Fisheries, 87 pp.
- Chent, T. T., Marsh, A., Shablott, M., Gonzalez-Villasenor, L. I., Powers, D. A. and Wood. 1995. **Structure and Evolution of Fish Growth Hormone and Insulin – Like Growth Factor Genes in Fish Fisiology**. National Taiwan University. p. 179 – 209.
- Djarajah, A.S. 2001. **Pembenihan dan pembesaran Ikan Mas secara Intensif**. Kanisius. Yogyakarta. 85 hal.
- Evariny, A. 2005. **Gali Soal Sperma Lebih Dalam**. astaga.com selasa, 15 November. <http://www.hypno-birthing.web.id/?p=160>.
- Fujaya, Yushinta. 2004. **Fisiologi Ikan Dasar Pengembangan Teknologi Perikanan**. Rineka Cipta. Jakarta. 179 hal.
- Garner, D. L. and Hafez, E. S. E. 2000. **Spermatozoa and Seminal Plasma In Reproduction in Farm Animal**. Hafez, B and Hafez, E.S.E. 7th eds. Lippincott Williams and Wilkins. Allowers Kluwer Company. Philadelphia. p. 274 – 293.

Gaspersz, V. 1994. **Metode Perancangan Percobaan**. CV. Armico. Bandung. 472 hal.

Hermawanto, H. H dan Hadiwidjaja, D. B. 2008. **Analisis Sperma pada Infertilitas Pria**. RSUD Dr. Syaiful Anwar Malang. 26 Juli. 10.36 pm. <http://kamuseliz.wordpress.com/>. Diakses pada tanggal 07 Maret 2010 pukul 21.43 WIB.

Hidayaturrahmah. 2007. **Waktu Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.) pada Beberapa Konsentrasi Larutan Fruktosa**. Program Studi Biologi Fakultas MIPA Universitas Lambung Mangkurat. Kalsel. Hal 9 – 18. <http://www.unlam.ac.id/bioscientiae>. Diakses pada tanggal 01 Januari 2010 pukul 07:56 WIB.

Kang, H.J., Goro Yoshizaki, Osamu Homma, Charlos, A., Strusmann and Fumio Takasima. 1999. **Effect of Osmotic Differential on the Efficiency of Gene Transfer by Elektroporation of Fis Spermatozoa**. Aquaculture, 173: 297 – 307.

Khairuman, 2008. **Buku Pintar Budidaya 15 Ikan Konsumsi**. Agromedia. Jakarta. 358 hal.

Lavitrano, M., Marcho, B., Maria, G. C., Roberto, G., Stefano, M. and Alessia. 2006. **Sperm Mediated Gene Transfer, Reprod. Fertility and Development 18**. CSIRO Co. Inc.p. 19 – 23.

Maftuch. 2002. **Diktat Kuliah Rancangan Percobaan**. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang. 84 hal.

Muller, F., Ivich, Z., Erdelyi, F., Papp, T., Varadi, L., Horvart, L and Maclean, N. 1992. **Introducing Foreign Gene into Fish Eggs with Electroporated Sperm as Carrier**. Mol. Biol. Biotechnol. I: 276 – 281.

Nazir, M. 2003. **Metode Penelitian Cetakan III**. Ghalia Indonesia. Jakarta. 83 hal.

Ningrum, D. R. 2006. **Pengaruh Fase Air Daun Gendarusa (*Vulgaris nees*) terhadap Motilitas, Viabilitas dan Konsentrasi Spermatozoa**. Thesis Airlangga University. Surabaya. Diterbitkan pada tanggal 08 November. <http://www.adln.lib.unair.ac.id>.

Paisal. 2008. **Pemeriksaan Sperma**. 07 September 2008. <http://www.wartamedika.com/2008/09/pemeriksaan-sperma.html>. Diakses pada tanggal 09 Juni 2010 pukul 07:55 WIB.

Partodihardjo. 1992. **Ilmu Reproduksi Hewan**. Mutiara Jakarta. 158 hal.

Prihartono, R. E., Rasidik, J dan Arie, U. 2008. **Mengatasi Permasalahan Budidaya Lele Dumbo**. Penebar Swadaya. Jakarta. 86 hal.

Rachman, A. 2003 **Sistem Organ Pernafasan, Peredaran Darah, Ekskresi, Reproduksi, Syaraf dan Hormon**. Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang. 247 hal.

- Rustidja. 1999. **Pemisahan Spermatozoa X dan Y Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.)**. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang. 76 hal.
- _____. 2000. **Prospek Pembekuan Sperma**. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang. 68 hal.
- Salisbury, G. W. dan Van Denmark, N. L. 1985. **Fisiologi dan Inseminasi Buatan pada Sapi**. Djanuar R. (Terjemahan). Universitas Gajah Mada. Yogyakarta. 283 hal.
- Sahri, M. 1992. **Diktat Kuliah Dasar – Dasar Metodologi Penelitian dan Rancangan Percobaan. LUW/UNIBRAW FISH**. Fisheries Project. Malang. 73 hal.
- Samarsik, A., Warr, G and Chen, T. T. 2003. **Production Gene Transfer Fish with Elevated Levels of Defense Activity to Bacterial Pathogen**. Mar. Biotech. 4: 310 – 322.
- Santoso, budi. 1993. **Seri budidaya ikan mas**. Penerbit kanisius. Yogyakarta. 74 hal.
- Sin, F.Y.T. 2001. **Gene Transfer Technology for Salmon In Recent Advances in Marine Biotechnology Vol 10, Molecular Genetics of Marine Organism**. Milton, F., Rachakonda, N., (eds). Science Publisher. USA p. 327-347.
- Sin, F.Y.T, Walker S.P, Symonds J.E, Sin I.L. 2008. **Sperm Mediated Gene Transfer in Chinook Salmon**. Diakses dari <http://www.heb.pac.dfo-mpo.gc.ca>. Diakses pada tanggal 11 Mei 2010 pukul 19:25 WIB.
- Squires, E.J. 1998. **Status of Sperm-mediated Delivery Methods for Gene Transfer**. A.B.I. University. Cambridge New York p. 276-284.
- Sucandra, Hadi. 2009. **Teknik Pembenihan Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.) di Balai Benih Ikan Sidorejo Kabupaten Ngawi Jawa Timur**. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang. 67 hal.
- Sugiyono. 2008. **Metode Penelitian Pendidikan**. Alfabeta. Bandung. 456 hal.
- Sulistiyowati. 2003. **Diktat Kuliah Rancangan Percobaan Penelitian**. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang. 78 hal.
- Symond, J. E., Walker S. P. and Sin, F. Y. T. 1994a. **Development of Mass Gene Transfer ; Optimazation of Gene Transfer by Elektroporated Sperm**. Mol. Mar. Biol. Biotech. 3: 104–111.
- Tang, M. U. dan R. Affandi. 2001. **Biologi reproduksi Ikan**. P2KP2 UNRI. Riau.165 hal.
- Toelihere, Mozes R. 1981. **Fisiologi Reproduksi Pada Ternak**. Angkasa. Bandung. 147 hal.

Tsai, H. J., Lai, C., and Yang, H. S. 1997. **Sperm as Carrier to Introduce an Exogenous DNA Fragment Into Oocyte of Japanese Abalone Transgenics.** Res. 8: 313 – 315.

Weaver, J. C. 1995. **Electroporation: A General Phenomenon For Manipulating Cells and Tissues.** J. Cell Biochem. 51: 426-435.

Winarsih, W.H. 1996. **Pengaruh Pembekuan Spermatozoa dengan Nitrogen Cair terhadap Kualitas dan daya Tetasetelur Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.).** Thesis. Universitas Airlangga. Surabaya. 120 halaman.

Wira, 2007. **Tingkah Laku Pemijahan Biota Akuatik (bagian 2).** 12 Juli 2007. <http://maswira.blogspot.com>. Diakses pada tanggal 21 Maret 2010 pukul 14:59 WIB.



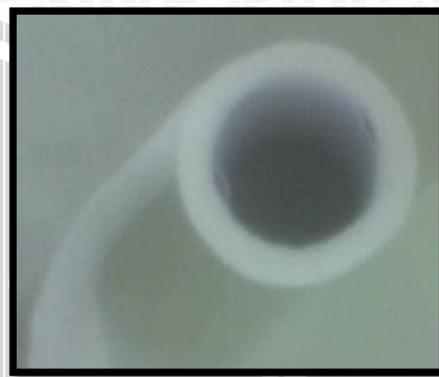
LAMPIRAN

Lampiran 1.

Gambar bahan yang digunakan saat penelitian



Na Fisiologis



Tissue

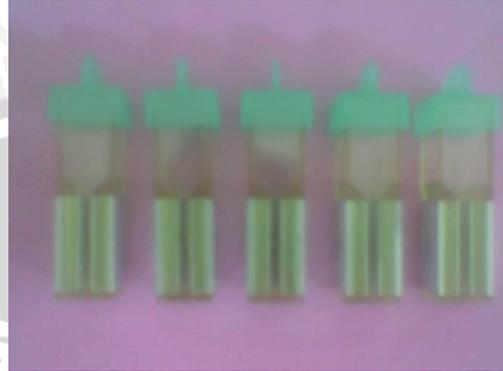


Lampiran 2.

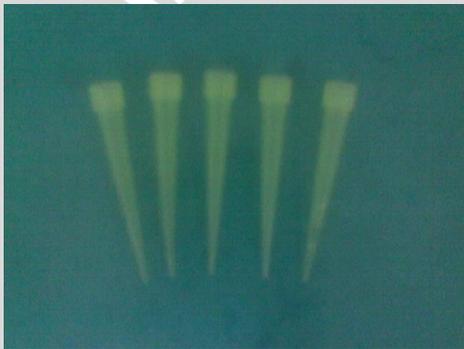
Gambar alat yang digunakan saat penelitian



Elektroporator *Gene Pulser*



Cuvet dengan ukuran 2 mm



Yellow Tip



Mikroskop "Olympus BX 51" Tipe DIC



Mikropipet

Lampiran 3.

Perhitungan Konsentrasi Jumlah Sperma Ikan Mas

Sperma diencerkan 1000 x, caranya dengan menambah atau mencampur volume sperma sebanyak 10 µl dengan Na fis sebanyak 10 ml. Dari pengamatan 5 bidang pandang pada hemocytometer didapatkan jumlah sperma:

Bidang Pandang	Jumlah Sel Sperma
I	172
II	132
III	167
IV	154
V	128
Total	753

Setelah didapatkan data jumlah sel sperma pada setiap bidang pandang, kemudian dapat dihitung jumlah sel sperma dengan cara jumlah sel sperma pada 5 bidang pandang tersebut dijumlah dan dikalikan 16 lalu dikalikan pengenceran, diketahui pengenceran yang digunakan adalah 1000x (10^3), kemudian dikalikan 10^4 kemudian dibagi 5 bidang pandang. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat perhitungan di bawah ini:

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi sperma} &= \frac{753 \times 16 \times 10^3 \times 10^4}{5} \\ &= \frac{12048 \times 10^7}{5} \\ &= 24 \times 10^9 \text{ sel/ml}\end{aligned}$$

Lampiran 4.

Data Motilitas Sperma Ikan Mas

Ulangan	Metode A (<i>Eksponensial</i>) %	Metode B (<i>Square Wave</i>) %
1	10	30
2	20	35
3	15	30
Total	45	95
Rata - Rata	15	31,67

- $JK_A = 10^2 + 20^2 + 15^2 - \frac{(45)^2}{3} = 725 - 675 = 50$
- $JK_B = 30^2 + 35^2 + 30^2 - \frac{(95)^2}{3} = 3025 - 3008,33 = 16,67$
- $t_{hitung} = |15 - 31,67| \sqrt{\frac{3(3-1)}{50+16,67}} = 16,67 \times 0,21 = 3,5$

$$t_{tabel\ 5\% (2(n-i))} = t_{tabel\ 5\% (4)} = 2,776$$

$$t_{tabel\ 1\% (2(n-i))} = t_{tabel\ 1\% (4)} = 4,604$$

$$t_{hitung} > t_{tabel\ 1\% (2(n-i))}$$

→ Perlakuan A dan B berbeda sangat nyata

$$t_{tabel\ 5\% (2(n-i))} < t_{hitung} < t_{tabel\ 1\% (2(n-i))}$$

→ Perlakuan A dan B berbeda nyata

$$t_{hitung} < t_{tabel\ 5\% (2(n-i))}$$

→ Tidak ada perbedaan antara perlakuan A dan B

Dapat disimpulkan berdasarkan nilai persentase motilitas bahwa perlakuan Metode *Eksponensial* dan *Square Wave* berbeda nyata ($2,776 < 3,5 < 4,024$).

Data Viabilitas Sperma Ikan Mas

Ulangan	Metode A (<i>Eksponensial</i>) %	Metode B (<i>Square Wave</i>) %
1	35	50
2	25	55
3	30	45
Total	90	150
Rata - Rata	30	50

- $JK_A = 35^2 + 25^2 + 30^2 - \frac{(90)^2}{3} = 2750 - 2700 = 50$
- $JK_B = 50^2 + 55^2 + 45^2 - \frac{(150)^2}{3} = 7550 - 7500 = 50$
- $t_{hitung} = |30 - 50| \sqrt{\frac{3(3-1)}{50+50}} = 20 \times 0,24 = 4,8$

$t_{tabel\ 5\% (2(n-i))} = t_{table\ 5\% (4)} = 2,776$

$t_{tabel\ 1\% (2(n-i))} = t_{table\ 1\% (4)} = 4,604$

$t_{hitung} > t_{tabel\ 1\% (2(n-i))}$

→ Perlakuan A dan B berbeda sangat nyata

$t_{tabel\ 5\% (2(n-i))} < t_{hitung} < t_{tabel\ 1\% (2(n-i))}$

→ Perlakuan A dan B berbeda nyata

$t_{hitung} < t_{tabel\ 5\% (2(n-i))}$

→ Tidak ada perbedaan antara perlakuan A dan B

Dapat disimpulkan berdasarkan nilai persentase viabilitas bahwa Perlakuan Metode *Eksponensial* dan *Square Wave* berbeda sangat nyata ($4,8 > 4,604$).