IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

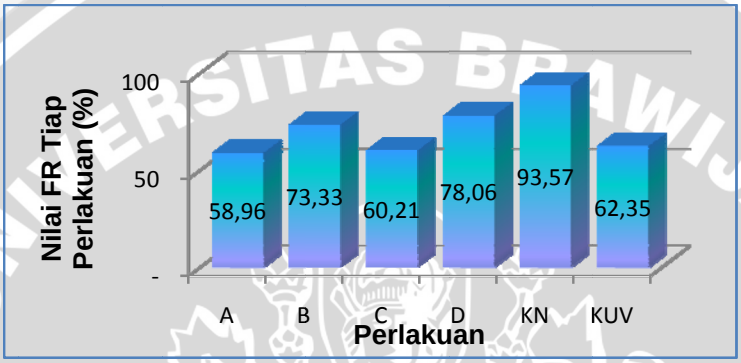
4.1 Analisa *Fertilization Rate* (FR)

FR merupakan derajat fertilisasi telur dimana nilai FR menunjukkan persentase banyaknya telur yang dapat terbuahi oleh sperma yang diberikan. FR telur tidak berhubungan langsung dengan pengaruh perbedaan suhu pada kejutan panas yang diberikan. Hal ini dikarenakan kejutan panas dilakukan dengan tujuan untuk menahan pembelahan sel pada akhir mitosis pertama sel telur. Artinya, pengaruh perlakuan kejutan panas hanya dapat diamati pada sel telur yang telah berhasil terfertilisasi dan melakukan serangkaian fase pembelahan sel. FR berhubungan erat dengan kondisi awal kualitas telur dan sperma yang akan memfertilisasi sehingga pada penelitian ini FR digunakan untuk membandingkan antara kemampuan sperma normal dalam perlakuan KN dan yang telah diradiasi UV (dengan daya, jarak, dan durasi yang sama atau homogen) dalam perlakuan A, B, C, D, dan KUV dalam membuahi sel telur. Dengan kata lain, perbandingan nilai FR digunakan untuk melihat pengaruh radiasi UV terhadap kemampuan sperma dalam membuahi dan mengaktifkan pembelahan sel pada telur.

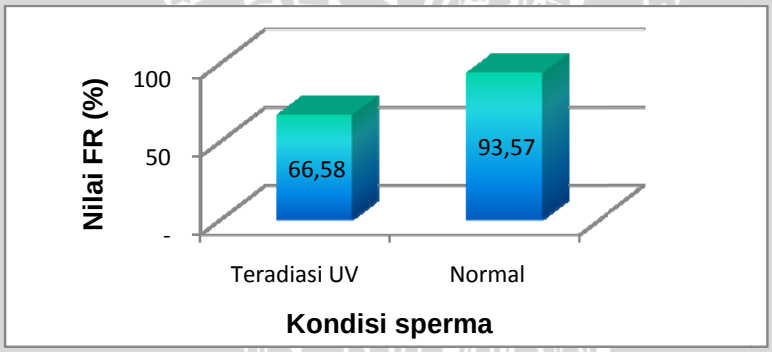
Berdasarkan hasil penelitian, didapatkan angka pembuahan telur atau FR untuk masing - masing ulangan perlakuan seperti yang tercantum pada Tabel 2. Data lengkap mengenai FR ditampilkan dalam Lampiran 2. Untuk lebih memperjelas pengamatan hasil, rata - rata nilai FR dari 4 ulangan disajikan dalam bentuk diagram batang (Gambar 6a), dan rata - rata umum nilai FR dari sperma normal (pada KN) dan sperma yang telah teradiasi UV (pada perlakuan A, B, C, D dan KUV) disajikan dalam Gambar 6b. dari kedua gambar tersebut dapat dibandingkan sepintas mengenai kemampuan sperma dalam membuahi sel telur.

Tabel 2. Nilai FR Ikan Lele Dumbo selama Penelitian (%)

Perlakuan	Ulangan				Rata - Rata
	1	2	3	4	
A	55,07	62,13	63,48	55,14	58,96
B	76,80	72,93	67,28	76,30	73,33
C	69,73	53,47	67,63	50,00	60,21
D	73,26	76,27	87,12	75,57	78,06
KN	92,25	95,14	93,75	93,15	93,57
KUV	70,65	69,78	47,95	61,03	62,35



(a)



(b)

Gambar 6. Diagram FR Ikan Lele Dumbo selama Penelitian
(a) Rata - Rata FR Tiap Perlakuan
(b) Rata - Rata FR Kondisi Sperma secara Umum

Berdasarkan diagram (Gambar 6a) di atas, dapat dilihat bahwa nilai derajat pembuahan atau FR tertinggi dimiliki oleh perlakuan KN sebesar 93,57% dilanjutkan berturut - turut oleh perlakuan D (78,06%), B (73,33%), KUV (62,35%), C (60,21%), dan terakhir A (58,96%). KN dengan sperma normal memiliki nilai FR yang sangat tinggi 93,57% (mendekati 100%). Tingginya nilai FR menunjukkan kualitas sperma dan telur pada kondisi tanpa perlakuan dalam

keadaan baik dan siap untuk difertilisasi. Dengan demikian, tidak terdapat masalah pada faktor kondisi awal telur dan sperma untuk perlakuan radiasi sperma dan kejutan panas yang diberikan. Lebih rendahnya nilai FR dari masing - masing perlakuan dibandingkan KN diduga disebabkan oleh pengaruh yang diberikan oleh radiasi UV terhadap sperma.

Sementara itu berdasarkan diagram pada Gambar 6b, rata - rata FR dari sperma normal bernilai 93,57% sedangkan untuk sperma yang telah diradiasi UV (rata - rata gabungan dari perlakuan A, B, C, D, dan KUV) adalah sekitar 66,58%. Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan sperma yang telah diradiasi UV pada fertilisasi menghasilkan nilai FR yang lebih rendah jika dibandingkan dengan fertilisasi menggunakan sperma normal. Akan tetapi, terjadinya fertilisasi pada perlakuan A, B, C, D, dan KUV juga membuktikan bahwa radiasi UV 15 watt dengan jarak 15 cm selama 2 menit tidak merusak kemampuan sperma untuk membuahi dan mengaktifkan pembelahan sel pada telur.

Tingginya nilai FR disebakan oleh beberapa faktor antara lain kualitas telur, sperma, lama penyimpanan, dan proporsi yang seimbang antara telur dan sperma. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Lin dan Dabrowski (1996) menyimpulkan bahwa FR optimal didapatkan pada lama penyimpanan gamet kurang dari 24 jam dalam suhu (6^0-10^0C) pada *Esox masquinongy.* Colihueque, Iturra, Diaz, Veloso, dan Estay (1992) juga menyatakan bahwa FR yang lebih tinggi dihasilkan dari penggunaan jumlah telur yang lebih sedikit untuk konsentrasi sperma yang sama. Dengan kata lain, hubungan antara volume sperma dan jumlah telur sangat penting untuk mendapatkan FR yang tinggi.

Pada penelitian ini juga dapat disimpulkan bahwa kualitas sperma yang telah diradiasi UV 15 watt dengan jarak 15 cm selama 2 menit dalam membuahi sel telur lebih rendah dibandingkan dengan sperma normal, namun tetap dapat membuahi sel telur. Menurut (Dunham, 2004), radiasi akan memecah atau

merusak DNA pada sperma, sehingga tidak ada kontribusi paternal pada zigot, tetapi sperma masih bersifat motil dan dapat mempenetrasi telur serta mengaktifkan pembelahan sel. Menurut Chakraborty, Miah, Mirza, dan Habib (2006), keberhasilan radiasi sperma bergantung pada pengetahuan mengenai konsentrasi sperma optimum dimana semua sperma dalam larutan mendapat radiasi yang cukup untuk menghasilkan inaktivasi genetik total tanpa merusak kemampuannya untuk memfertilisasi telur secara optimal dan menghasilkan embrio viabel untuk menginduksi ginogen dengan hasil yang maksimal.

FR tinggi menandakan bahwa telur yang terbuahi dan berkembang berada dalam jumlah banyak, sehingga memungkinkan perolehan derajat penetasan (HR) larva yang tinggi karena telur yang terbuahi. Namun, menurut Colihueque *et al.* (1992) meskipun dengan FR 100 %, daya hidup (SR) embrio hasil diploidisasi ginogenesis tidak akan sama besar dengan embrio diploid dari fertilisasi normal karena adanya pengaruh kejutan suhu pada telur.

4.2 Analisa *Hatching Rate* (HR)

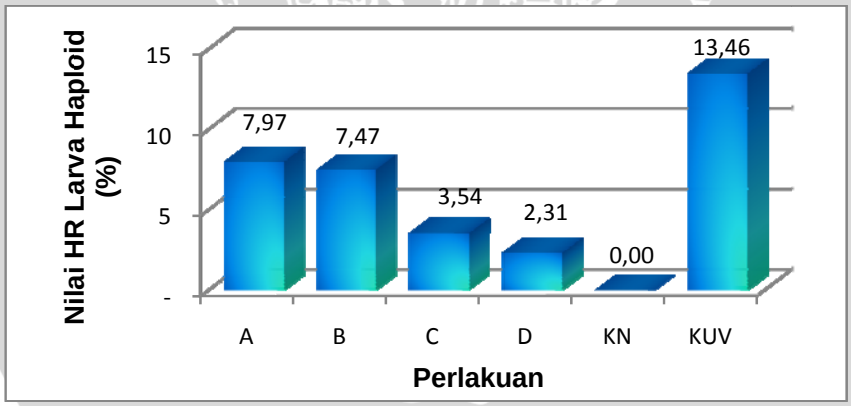
4.2.1 HR Larva Haploid (1n)

Inti dari perlakuan ginogensis adalah dengan membuat materi genetik sperma menjadi tidak aktif kemudian diteruskan dengan diploidisasi zigot. Materi genetik dibuat tidak aktif dimaksudkan agar tidak ada sifat genetik dari induk jantan yang diwariskan kepada keturunannya (*paternal inheritance*), akan tetapi sperma tersebut tetap bersifat motil dan viable sehingga mampu membuahi sel telur, Keberhasilan radiasi sperma dengan sinar UV dapat dilihat dari kondisi kontrol UV (KUV). Kontrol UV merupakan perlakuan dimana sperma diberikan radiasi UV untuk menonaktifkan materi genetiknya tanpa dilakukan kejutan suhu sebagai diploidisasi zigot sehingga diharapkan terbentuknya larva yang hanya memiliki 1 set kromosom dari induk betinanya (haploid).

Berdasarkan hasil penelitian, didapatkan derajat penetasan larva ditunjukkan dalam Lampiran 4. Derajat larva haploid atau HR larva haploid masing - masing perlakuan tercantum pada Tabel 3. Untuk mempermudah pengamatan hasil penelitian. Rata - rata nilai FR dari 4 ulangan disajikan dalam bentuk diagram batang (Gambar 7). Perhitungan analisa data secara lengkap dapat dilihat pada Lampiran 3.

Tabel 3. Nilai HR Larva Haploid Mitoginogenesis Ikan Lele Dumbo selama Penelitian (%)

Perlakuan	Ulangan				Rata - Rata
	1	2	3	4	
A	5,26	8,57	9,59	8,47	7,97
B	8,72	6,06	8,26	6,82	7,47
C	0,78	2,60	4,26	6,52	3,54
D	2,19	2,22	2,82	2,02	2,31
KN	-	-	-	-	-
KUV	4,23	11,02	18,10	20,48	13,46



Gambar 7. Diagram HR Larva Haploid Mitoginogenesis Ikan Lele Dumbo selama Penelitian

Nilai HR larva haploid tertinggi dimiliki oleh perlakuan KUV sebesar 13,46% dilanjutkan berturut - turut oleh perlakuan A (7,97%), B (7,47%), C (3,54%), D (2,31%), dan terakhir KN (0%) yang artinya tidak ditemukan larva haploid pada perlakuan KN. Tidak ditemukannya individu haploid pada hasil fertilisasi telur dengan sperma normal dalam KN disebabkan oleh tidak adanya materi genetik dari sperma yang inaktif.

Untuk mengetahui pengaruh pemberian besar suhu yang berbeda terhadap nilai HR larva haploid maka dilakukan Uji Sidik Ragam. Hasil Uji Sidik Ragam perlakuan terhadap nilai HR larva haploid dapat dilihat Pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Uji Sidik Ragam Pengaruh Besar Suhu Kejutan Panas terhadap HR Larva Haploid Mitoginogenesis Ikan Lele Dumbo

Sumber Keragaman	db	JK	KT	Fh	F5%	F1%
Perlakuan	3	95.49	31.83	11.41**	3.49	5.95
Acak	12	33.47	2.79			
Total	15	128.96				

Keterangan : ** = berbeda sangat nyata

Dari tabel di atas dapat dilihat bahwa nilai F hitung (11,41) bernilai lebih besar dari F5% (3,49) dan F1% (5,95) sehingga dapat diartikan perlakuan yang diberikan memberikan pengaruh yang sangat berbeda nyata terhadap HR larva haploid atau menolak H_0 dan menerima H_1. Dengan kata lain, radiasi UV terhadap sperma terbukti mampu menginaktifkan materi genetik pewarisan sifat dalam sperma dan menghasilkan individu yang haploid ketika difertilisasikan dengan telur yang normal. Hal ini sejalan dengan yang dinyatakan oleh Purdom (1983) *dalam* Sambara (1989), penonaktifan bahan genetik dalam spermatozoa dapat dilakukan dengan radiasi beberapa macam sinar seperti sinar gamma, sinar x, dan sinar ultra-violet (UV). Dunham (2004) menyatakan bahwa mutagen kimia, seperti dimetilsulfat, juga dapat menonaktifkan sperma.

Menurut Bordignon dan Smith (1999), radiasi UV merupakan suatu cara yang dapat mengeliminasi komponen kromatin pada spermatozoa secara fungsional tanpa merusak kemampuan sperma untuk mengaktivasi perkembangan partenogenetik pada telur. Setelah diradiasi UV, fungsi kromatin akan menjadi abnormal. Abnormalitas fungsi kromatin terlihat pada fragmentasi kromatin, yang meliputi terbentuknya blastomer sel saudara dengan benang kromatin yang menyatu, kondensasi kromatin, dan degradasi kromatin.

Radiasi UV hanya efektif apabila sperma diencerkan dan disebar dalam lapisan yang tipis, (Dunham, 2004). Pada penelitian ini, lapisan sperma dibuat setipis dan semerata mungkin dalam cawan petri yang digunakan (diameter 7 cm) yakni ± 7 tetes atau 0,32 ml sperma dari pengenceran 1:300 dengan NaCl fisiologis. Namun hingga saat ini kajian literatur mengenai pengaruh pengenceran sperma terhadap efektivitas radiasi UV masih sulit ditemukan mengingat konsentrasi spermatozoa dalam testis memiliki kecenderungan nilai yang berbeda - beda untuk masing - masing individu.

Untuk mengetahui perbedaan pengaruh antar masing - masing perlakuan dan tata urutan perlakuan terbaik maka analisa dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) seperti dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil Uji BNT Pengaruh Besar Suhu Kejutan Panas terhadap HR Larva Haploid Mitoginogenesis Ikan Lele Dumbo

Perlakuan	D	C	B	A	Notasi
D	-				a
C	1.23	-			a
B	5.15**	3.93**	-		b
A	5.66**	4.44**	0.51	-	b

Keterangan: ** = berbeda sangat nyata
BNT 5% = 2,57
BNT 1% = 3,61

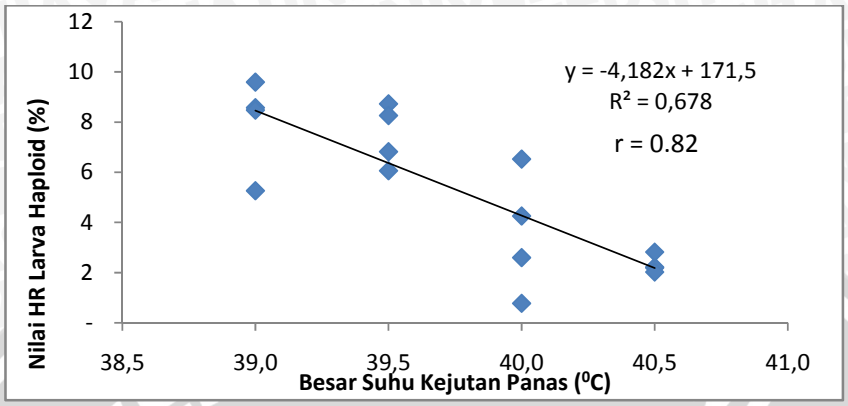
Perlakuan yang terbaik adalah perlakuan yang mampu memberikan hasil berbeda nyata terhadap perlakuan lainnya dalam menghasilkan nilai HR larva haploid terendah. Berdasarkan Uji BNT, perlakuan KN tidak berbeda nyata dengan D, selanjutnya C, kemudian B dan A, serta yang terakhir adalah KUV, KUV merupakan perlakuan yang menghasilkan HR larva haploid tertinggi (13,46%), sedangkan KN terendah bahkan tidak menghasilkan sama sekali (0%) Hal tersebut membuktikan bahwa radiasi UV sperma tanpa disertai kejutan suhu pada telur akan menghasilkan individu dengan hanya satu bagian kromosom (haploid atau 1n) yaitu dari induk betina saja.

Dari hasil Uji BNT didapatkan bahwa pengaruh perlakuan A tidak berbeda nyata terhadap perlakuan B dan pengaruh perlakuan C berbeda nyata terhadap perlakuan D. Tingginya larva haploid yang menetas merupakan penanda bahwa perlakuan kejutan suhu yang diberikan tidak tepat baik dari besarnya suhu maupun waktu inisiasinya. Akan tetapi, HR larva haploid tidak dapat dijadikan penentu mutlak keberhasilan kejutan suhu pada ginogenesis ikan, Hal ini disebabkan karena diduga banyak dari embrio haploid yang mati pada saat pembelahan sel dalam telur. Karena dalam penelitian ini tidak dilakukan perhitungan ploidi pada telur, oleh karena itu tidak didapatkan data mengenai jumlah embrio haploid yang dihasilkan namun mati sebelum sampai menetas. Dalam penelitiannya, Arti (2004), mendapatkan bahwa UV menunjukkan keberhasilan dalam meradiasi sperma sehingga mengakibatkan rendahnya embrio yang mampu berkembang, telur dan larva yang haploid serta abnormal yang mengakibatkan kematian.

Chourrout (1984) *dalam* Colihuque *et al.* (1992) menyatakan bahwa telur yang difertilisasi dengan sperma yang telah diradiasi menunjukkan angka haploidisitas yang tinggi (lebih dari 91%) ketika dilakukan analisa fragmen kromosom pada saat metafase embrio haploid. Dalam penelitiannya, Colihuque *et al.* (1992), menemukan fakta bahwa hanya terdapat sedikit larva yang menetas pada grup haploid yakni ±4,2%. Akan tetapi, mereka berasumsi bahwa tidak ada embrio haploid ikan *rainbow trout* (*Oncorhyncus mykiss*, Walbaum) yang dapat sampai menetas sehingga keberadaan larva tersebut justru diasumsikan berhubungan dengan kondisi diploid akibat penahanan polar body II (mioginogenesis) yang terjadi secara spontan.

Untuk mengetahui hubungan antara besar perlakuan kejutan suhu mitoginogenesis terhadap nilai HR larva haploid (1n) lele dumbo maka digunakan

analisa regresi. Bentuk regresi yang digunakan adalah bentuk linier dan didapatkan persamaan y = 171,5 - 4,182x (Gambar 9).



Gambar 8. Hubungan antara Besar Suhu Kejutan Panas terhadap HR Larva Haploid Mitoginogenesis Ikan Lele Dumbo

Pada penelitian ini, koefisien determinasi yang didapatkan yaitu (R^2) = 0,678 yang artinya 67,8% nilai HR larva haploid dipengaruhi oleh perbedaan besar suhu kejutan panas antara 39^0, $39,5^0$, 40^0, dan $40,5^0$ yang diberikan. Pada penelitian ini, didapatkan koefisien korelasi sebesar 0,82 yang artinya besar suhu kejutan panas dan HR larva haploid memiliki korelasi tinggi. Artinya, pemberian perbedaan kejutan panas pada ginogenesis telur memiliki pengaruh yang tinggi terhadap penekanan jumlah HR larva haploid. Berdasarkan grafik di atas, semakin mendekati 39^0 maka nilai HR haploid semakin tinggi yang artinya diduga tingkat diploidisasi lebih rendah seiring lebih rendahnya suhu kejutan panas yang diberikan.

Penentuan jumlah ploidi dapat dilakukan dengan menghitung langsung banyaknya ploidi pada inti sel. Akan tetapi, larva ikan haploid (1n kromosom) juga mampu ditandai secara visual karena memiliki sejumlah ciri yang mencolok. Menurut Onozato dan Yamaha *dalam* Sambara (1989) menyatakan bahwa embrio yang menunjukkan gejala haploid atau *haploid syndrome* adalah embrio haploid yang hidup pada saat 33 - 40 jam setelah pembuahan dengan ciri-ciri memiliki pigmentasi mata yang tidak merata atau kurang hitam, badan pendek

dan embrio bergerak lemah. Menurut Taniguchi *et al*, (1988) *dalam* Yulintine (1995) larva yang abnormal ditandai dengan tulang punggung yang tidak berkembang dan ekor pendek, pigmen bintik mata tidak terjadi, tidak berenang, tinggal di dasar saja.

Pada penelitian ini ditemukan larva haploid yang bertahan hidup hingga hari kedua (Gambar 9), dengan ciri - ciri tubuh pendek, dan ekor membulat (seperti terpotong dan tidak berkembang). Larva haploid bergerak lambat di dasar, miring, dan larva tidak aktif mendekati pakan. Dalam penelitian ini, tidak ditemukan lagi larva yag haploid yang hidup pada waktu 42 jam setelah penetasan. Haploiditas larva pada dasarnya dipastikan melalui uji perhitungan kromosom, namun pada penelitian ini digunakan perbandingan keberadaan larva haploid dan diploid pada KUV, KN, dan masing – masing perlakuan untuk memastikan haploiditas larva – lava tersebut.

(a) **(b)**

Gambar 9. (a) dan (b) Larva Haploid Mitoginogenesis pada Hari Kedua

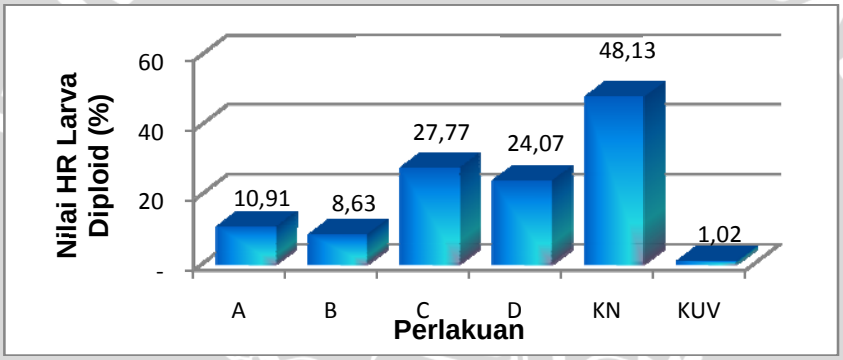
4.2.2 HR Larva Diploid (2n)

Berdasarkan hasil penelitian, didapatkan angka penetasan atau HR larva diploid untuk masing - masing ulangan perlakuan seperti yang tercantum pada Tabel 6. Untuk lebih memperjelas pengamatan hasil, rata - rata nilai HR dari 4 ulangan tiap perlakuan disajikan dalam bentuk diagram batang yang dapat dilihat

pada Gambar 10, Perhitungan data HR diploid selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 4.

Tabel 6. Nilai HR Larva Diploid Mitoginogenesis Ikan Lele Dumbo selama Penelitian (%)

Perlakuan	Ulangan				Rata - Rata
	1	2	3	4	
A	14,47	8,57	9,59	11,02	10,91
B	8,05	6,06	12,84	7,58	8,63
C	26,36	23,38	28,72	32,61	27,77
D	25,55	18,89	22,54	29,29	24,07
KN	40,34	43,80	56,19	52,21	48,13
KUV	0,70	-	0,95	2,41	1,02



Gambar 10. Diagram HR Larva Diploid Mitoginogenesis Ikan Lele Dumbo selama Penelitian

Hasil perolehan HR larva diploid (2n) sebagaimana dapat dilihat pada gambar di atas dimana nilai tertinggi diperoleh oleh perlakuan KN (48,13%), kemudian berturut - turut C (27,77%), D (24,07 %), A (10,91%), B (8,63%) dan KUV dengan nilai ternedah (1,02%). HR fertilisasi normal dalam penelitian ini (48,13%) tergolong rendah meskipun FR (93,57%) cukup tinggi, Umumnya persentase penetasan ikan berkisar antara 50-80% (Ritcher dan Rustidja, 1985). Rendahnya laju penetasan telur ikan dapat disebabkan oleh beberapa faktor antara lain kualitas telur dan kualitas air media inkubasi (Mukti, Rustidja, Sumitro, dan Djati, 2001) yang tidak baik, dan ketidaktepatan penempatannya.

Tipe telur ikan lele yang cenderung berlendir dan lengket (adhesif) memungkinkannya menjadi salah satu faktor yang menyebabkan kematian telur

pada saat pembelahan sel berlangsung. Menurut Mukti (2001), sifat telur ikan yang melekat, membutuhkan tempat pelekatan atau substrat yang baik seperti rerumputan, akar tanaman air, ataupun substrat buatan seperti kakaban (ijuk). Perbedaan substrat sebagai media inkubasi dapat berpengaruh terhadap pembelahan pertama dan fisiologis keturunan. Pada penelitian ini, rendahnya HR (48,13%) pada perlakuan normal (KN) tanpa radiasi UV dan perlakuan panas kemungkinan disebabkan oleh masih terdapatnya telur yang saling menempel satu sama lain pada substrat kaca yang digunakan. Menurut Soeprijanto, Fajar, Dalimunthe, Wilujeng, dan Widodo (2005), penyebaran telur yang kurang baik juga dapat mengganggu proses perkembangan embrio. Menempelnya telur yang satu dengan telur yang lainnya mudah menyebabkan kerusakan pada telur. Hal ini dikarenakan kemampuan telur untuk menyerap oksigen terlarut berkurang, sehingga proses terbentuknya embrio dalam telur otomatis akan terhambat.

Berdasarkan hasil penelitian, HR larva diploid cukup rendah yaitu hanya berkisar antara 8,63% - 27,77%. Hal ini sejalan dengan yang dinyatakan dalam Anonymous (2009) bahwa secara umum angka penetasan ikan ginogenetik biasanya rendah. Pada penelitaian yang dilakukan oleh Olufeagba dan Moses (2011), didapatkan HR sebesar 50,7% pada ginogenesis ikan *African catfish* spesies *H. longifiis* dengan kejutan dingin 5^0C pada 40 menit setelah fertilisasi selama 15 menit. Hammed, Bombata, dan Osinaike (2010) memperoleh HR sebesar 55% pada triploidisasi ikan *African mud catfish Clarias* sp. dengan kejutan suhu 0^0C, 3 menit setelah fertlisasi yang dilakukan selama 25 menit.

Pada penelitian ini ditemukan pula larva diploid pada perlakuan KUV dimana seharusnya didapatkan individu haploid secara keseluruhan karena sperma diradiasi UV namun telur yang terbuahi tidak diberi kejutan panas. Kejadian ini kemungkinan disebabkan karena terdapat beberapa sel spermatozoa yang memiliki daya tahan terhadap radiasi UV yang lebih kuat

dibandingkan dengan sel lainnya. Artrinya, pada beberapa sel spermozoa, materi genetik dalam rantai DNA masih tetap aktif. Selain itu, kemungkinan lainnya adalah, yaitu dengan terjadinya diploidisasi spontan atau alami pada telur terbuahi tanpa materi genetik sperma seperti yang ditemukan pada beberapa penelitian terdahulu. Pada kasus ini, radiasi UV efektif menonaktifkan materi genetik sperma akan tetapi terjadi diploidisasi alami pada telur.

Penelitian yang dilakukan oleh Kucharczyk, Luczynski, Woznicki, Kujawa, Szczerbowski, Targonska, dan Mamcarz (2008) menemukan fakta bahwa telah terjadi ginogenesis alami (sp*ontaneous gynogenesis*) pada ikan *ide* (*Leuciscus idus* L.) dengan persentase rata - rata kejadian 0,4%. Penelitian tersebut berangkat dari adanya kejadian bahwa dalam beberapa penelitian mengenai rekayasa genetika (*genetik engineering*) beberapa jenis ikan sering ditemukan adanya ginogenesis atau androgenesis yang terjadi secara spontan atau alami. Ginogenesis alami terjadi terutama ketika kualitas biologi dari telur sangat rendah. Pada ikan ide kejadian ini diduga berhubungan dengan kualitas oosit, akan tetapi diperlukan penelitian lebih lanjut lagi mengenai hal tersebut. Hasil Uji Sidik Ragam perhitungan data HR larva diploid ditampilkan pada Tabel 7 di bawah ini.

Tabel 7. Hasil Uji Sidik Ragam Pengaruh Besar Suhu Kejutan Panas terhadap HR Larva Diploid Mitoginogenesis Ikan Lele Dumbo

Sumber Keragaman	db	JK	KT	Fh	F5%	F1%
Perlakuan	3	1,080.17	360.06	28.80**	3.49	5.95
Acak	12	150.01	12.50			
Total	15	1,230.18				

Keterangan: ** = berbeda sangat nyata

Dari tabel di atas dapat dilihat bahwa nilai F hitung (28,80) lebih besar dari nilai F5% (3,49) dan F1% (5,95) sehingga diartikan perlakuan memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap daya penetasan HR larva diploid atau

menolak H_0 dan menerima H_1. Untuk mengetahui perbedaan pengaruh antar masing - masing perlakuan dan tata urutan perlakuan terbaik maka dilakukan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) seperti dapat dilihat di bawah ini (Tabel 8).

Tabel 8. Hasil Uji BNT Pengaruh Besar Suhu Kejutan Panas terhadap HR Larva Diploid Mitoginogenesis Ikan Lele Dumbo selama Penelitian

Perlakuan	B	A	D	C	Notasi
B	-				a
A	2.28	-			a
D	15.43**	13.15**	-		b
C	19.13**	16.85**	3.70	-	b

Keterangan: ** = berbeda sangat nyata
BNT 5% = 5,45
BNT 1% = 7,64

Berdasarkan Uji BNT didapatkan bahwa pengaruh perlakuan C tidak berbeda nyata terhadap perlakuan D, sedangkan perlakuan A juga memiliki pengaruh yang tidak berbeda nyata terhadap perlakuan B. Tingginya larva diploid yang menetas merupakan penanda bahwa perlakuan kejutan suhu yang diberikan tepat. Berdasarkan analisa BNT diperoleh hasil suhu perlakuan kejutan panas yang mampu menghasilkan larva diploid tertinggi adalah perlakuan C (40^0C) dengan nilai rata–rata HR 27,77% yang tidak berbeda nyata terhadap perlakuan D ($40,5^0$C) dengan nilai rata - rata HR 24,07%. Nilai HR pada kisaran tersebut pada spesies ikan lele dapat dikatakan sangat kecil apabila dibandingkan dengan HR larva hasil fertilisasikan secara normal, seperti pada KN yaitu 48.13%. Namun kendala umum dalam kasus mitoginogenesis memang terdapat pada masalah rendahnya HR larva diploid yang dihasilkan. Anonymous (2009) menyatakan bahwa pada ikan *sea bass*, HR mioginogen umumnya bervariasi antara 17 - 35 %, sedangkan untuk HR mitoginogen tidak lebih dari 27%. Hal ini diduga disebabkan oleh banyaknya tahapan teknis dalam rangkaian proses mitoginogenesis yang mampu menyebabkan kerusakan pada sperma maupun zigot.

Setelah penonaktifan materi genetik sperma melalui radiasi UV, tahap kedua dari ginogenesis adalah diploidisasi zigot. Meskipun sperma yang telah teradiasi UV dapat membuahi telur, akan tetapi jika tanpa perlakuan lanjutan telur tersebut akan bersifat 1n (haploid) karena hanya mendapatkan warisan genetik dari induk betina (*maternal inheritance*). Oleh karenanya, dilakukan proses diploidisasi. Diploidisasi dimaksudkan untuk membuat zigot yang dihasilkan memiliki sepasang kromosom 2n (diploid), seperti yang dihasilkan oleh pembuahan alami. Perbedaan larva diploid normal dan ginogen yaitu, diploid normal mendapatkan warisan kromosom lengkap dari induk jantan dan betinanya sedangkan diploid ginogen memiliki sepasang kromosom yang hanya berasal dari induk betinanya.

Diploidisasi dilakukan dengan menahan keluarnya polar bodi kedua pada pembelahan meiosis pertama (mioginogenesis), atau dengan mencegah pembelahan sel pada akhir mitosis pertama dimana kromosom di dalamnya telah terduplikasi (mitoginogenesis). Menurut Dunham (2004), produksi ginogen dengan menahan cleavage pertama (mitoginogen) lebih sulit daripada dengan menahan polar bodi kedua (mioginogen) sama halnya dengan menghasilkan ikan triploid lebih mudah daripada tetraploid. Hal ini mengindikasikan bahwa polar bodi kedua lebih mudah dimanipulasi daripada pembelahan mitosis pertama pada telur, atau bahwa embrio lebih sensitif terhadap kejutan lingkungan pada saat mendekatai pembelahan sel pertama dibandingkan dengan beberapa saat setelah fertilisasi. Mitoginogen mudah mati selama perkembangan embrionik.

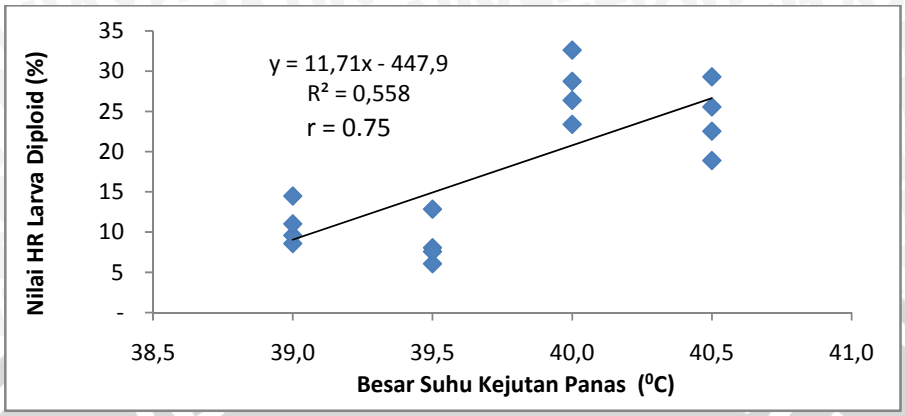
Diploidisasi dapat dilakukan dengan berbagai cara antara lain pemberian kejutan panas, dingin, tekanan hidrostatik, maupun larutan kimia tertentu. Pada penelitian ini, kejutan panas dilakukan pada saat menjelang fase terakhir dari akhir mitosis pertama. Penentuan waktu perlakuan kejutan panas yang efektif

dalam mitoginogenesis sama dengan waktu efektif untuk dilakukannya tetraploidisasi karena kedua teknik tersebut bergantung pada penahanan pembelahan mitosis sel pertama. Pada mitoginogenesis, duplikasi kromosom dibiarkan sehingga menghasilkan kromosom ganda (berjumlah satu pasang atau berjumlah 2n) dari kondisi yang semula haploid (kromosom hanya berjumlah 1n yang berasal dari induk betina) menjadi kondisi diploid, kemudian apabila pembelahan sel pertama diblok, dihasilkan sebuah sel diploid. Mitoginogen adalah homozigot karena berasal dari sebuah set kromosom tunggal yang digandakan, (Dunham, 2004).

Pada penelitian ini, parameter yang menentukan perlakuan besar suhu kejutan panas mana yang dianggap terbaik untuk diploidisasi mitoginogenesis adalah dengan melihat tingginya larva diploid yang dihasilkan. Berdasarkan hasil Uji BNT diperoleh kesimpulan bahwa perlakuan D memiliki pengaruh yang tidak berbeda nyata dengan perlakuan C. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Varadi *et al*. (1999) dimana kejutan panas diberikan dengan suhu $40{,}5^0$ C selama 2 menit pada induksi diploid ginogenseis dan tetraploidisasi *Clarias* sp.. Sementara Galbusera *et al*, (2000) memperoleh fakta bahwa kejutan panas optimal untuk mitoginogenesis *Clarias* sp. adalah dengan dengan suhu sebesar 40^0 C selama 1 menit dan 39^0C selama 1,5 - 2 menit pada 20 - 37 menit setelah fertilisasi.

Untuk mengetahui hubungan antara besar perlakuan kejutan suhu perlakuan mitoginogenesis terhadap nilai HR larva haploid (1n) lele dumbo maka digunakan analisa regresi. Bentuk regresi yang digunakan adalah bentuk linier dan didapatkan persamaan $y = 11{,}71x - 447{,}9$ (Gambar 11). Pada penelitian ini, koefisien determinasi yang didapatkan yaitu (R^2) = 0,558 yang artinya 55,8% nilai HR larva haploid dipengaruhi oleh perbedaan besar suhu kejutan panas antara 39^0C, $39{,}5^0$C, 40^0C, dan $40{,}5^0$C yang diberikan. Pada penelitian ini, didapatkan

koefisien korelasi sebesar 0,75 yang artinya perlakuan memiliki korelasi yang tinggi atau hubungan yang erat.



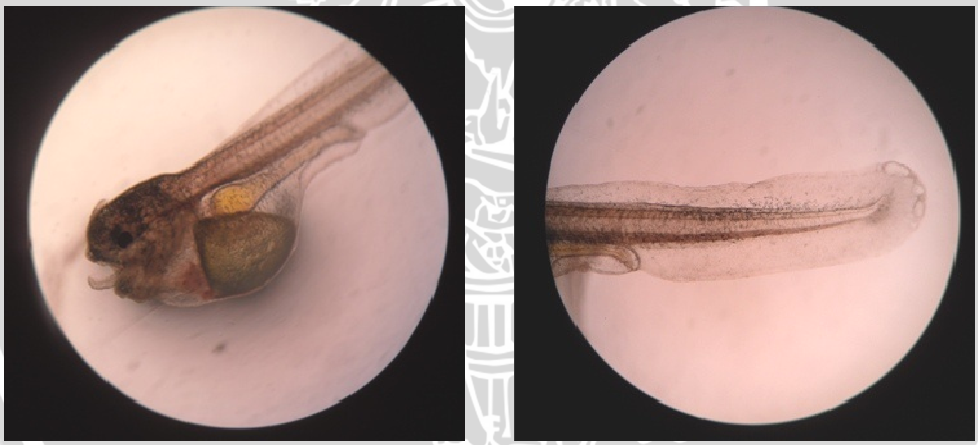
Gambar 11. Hubungan antara Besar Suhu Kejutan Panas terhadap HR Larva Diploid Mitoginogenesis Ikan Lele Dumbo

. Berdasarkan grafik linear di atas, dapat ditarik kesimpulan bahwa perlakuan terbaik untuk menunjang keberhasilan teknik ginogenesis melalui pemberian kejutan panas dalam proses diploidisasi zigot yaitu perlakuan D (40,5^{0}C). Hal ini diduga disebabkan karena kejutan panas pada suhu 40,5^{0}C selama 2 menit mampu mempengaruhi sejumlah reaksi biologis dalam proses pembelahan sel telur yang menyebabkan akhir fase mitosis pertama terhenti sejenak dan separasi 2 calon inti sel tertahan. Pada grafik hubungan antara besar suhu kejutan panas dan nilai HR larva diploid pada mitoginogesis ikan lele dumbo di atas, belum ditemukan pola kuadratik dengan titik puncak yang menandakan besar suhu yang paling optimal. Oleh karena itu, dalam penelitan selanjutnya, sebaiknya dilakukan penelitian lanjutan dengan besar suhu yang lebih tinggi dari 40,5^{0}C agar didapatkan titik puncak grafik regresi.

Menurut Cherfas (1981) dan Aray (2001); *dalam* Mardiana (2007) Embrio yang terbentuk dari pembuahan sel telur oleh sperma yang diradiasi adalah haploid dimana pada umumnya tidak normal (abnormal) dikenal dengan *haploid syndrome* dan akan mati selama perkembangan embrio, atau beberapa saat setelah menetas, atau selama stadia awal larva sebelum mulai makan. Larva

diploid pada hari kedua (Gambar 12) memiliki ciri - ciri tubuh panjang (normal), ekor meruncing, bergerak aktif vertikal maupun horizontal dalam air, larva dengan gesit mendekat ketika diberi pakan.

Menurut Rustidja (1997) larva diploid (normal) akan nampak seperti jarum-jarum kecil dengan bulatan hijau, yaitu kantung kuning (*yolk sack*). Selama 4-5 hari larva akan memanfaatkan kuning telur tersebut sebagai makanan, Setelah kuning telur habis maka larva akan mencari makan. Menurut Rustidja (2004), larva-larva yang baru menetas berenang secara vertikal menuju ke arah permukaan. Tingkah laku larva terus berubah sesuai proses perkembangannya, beberapa larva yang berenang secara vertikal kadang-kadang menetap di dasar tanpa bergerak, kemudian akan bergerak secara aktif dengan cara melompat dan berenang aktif.



(a) **(b)**

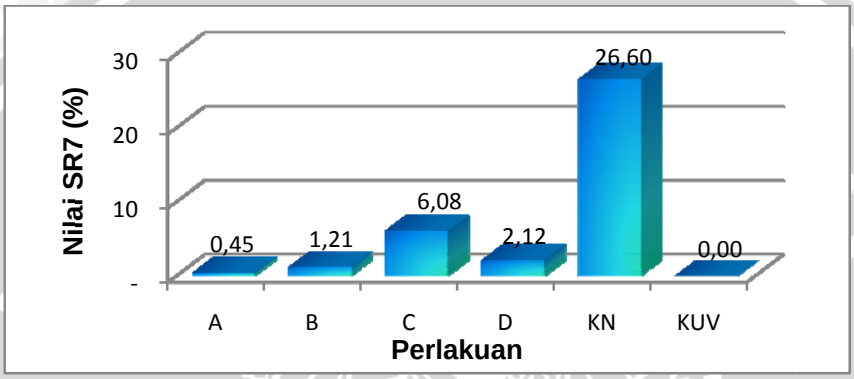
Gambar 12. Larva Diploid Mitoginogenesis pada Hari Kedua, (a)Bagian Kepala (b)Bagian Ekor

4.3 Analisa *Survival Rate* Hari Ketujuh (SR7)

Berdasarkan hasil penelitian, didapatkan daya hidup larva diploid pada hari ketujuh (SR7) disajikan pada Tabel 9. rata - rata nilai SR7 disajikan dalam bentuk diagram (Gambar 13). Perhitungan data dapat dilihat pada Lampiran 5.

Tabel 9. Nilai SR7 Larva Diploid Mitoginogenesis Ikan Lele Dumbo selama Penelitian (%)

Perlakuan	Ulangan				Rata - Rata
	1	2	3	4	
A	-	0,95	-	0,85	0,45
B	1,34	-	2,75	0,76	1,21
C	3,10	10,39	2,13	8,70	6,08
D	3,65	-	2,82	2,02	2,12
KN	27,73	28,47	26,67	23,53	26,60
KUV	-	-	-	-	-



Gambar 13. Diagram SR7 Larva Diploid Mitoginogenesis Ikan Lele Dumbo selama Penelitian

Nilai daya tahan hidup (SR) larva diploid hingga hari ketujuh tertinggi dimiliki oleh perlakuan KN sebesar 26,6% dilanjutkan berturut - turut oleh perlakuan C (6,08%), D (2,12%), B (1,21%), A (0,45%), dan terakhir KUV (0%). Untuk mengetahui pengaruh pemberian besar suhu yang berbeda terhadap nilai HR larva diploid maka dilakukan Uji Sidik ragam, Hasil analisa Uji Sidik Ragam ditampilkan pada Tabel 12.

Tabel 12. Hasil Uji Sidik Ragam Pengaruh Besar Suhu Kejutan Panas terhadap SR7 Larva Diploid Mitoginogenesis Ikan Lele Dumbo

Sumber Keragaman	db	JK	KT	Fh	F5%	F1%
Perlakuan	3	75.21	25.07	4.84*	3.49	5.95
Acak	12	62.12	5.18			
Total	15	137.33				

Keterangan: * = berbeda nyata

Dari tabel di atas dapat dilihat bahwa nilai F hitung (4,84) bernilai lebih besar daripada nilai F5% (3,49) sehingga dapat diartikan perlakuan - perlakuan

yang diberikan memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap SR7 larva diploid atau menolak H_0 dan menerima H_1. Untuk mengetahui perbedaan pengaruh antar masing - masing perlakuan dan tata urutan perlakuan terbaik maka dilakukan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) seperti dapat dilihat di bawah ini (Tabel 11).

Tabel 11. Hasil Uji BNT Pengaruh Besar Suhu Kejutan Panas terhadap SR7 Larva Diploid Mitoginogenesis Ikan Lele Dumbo

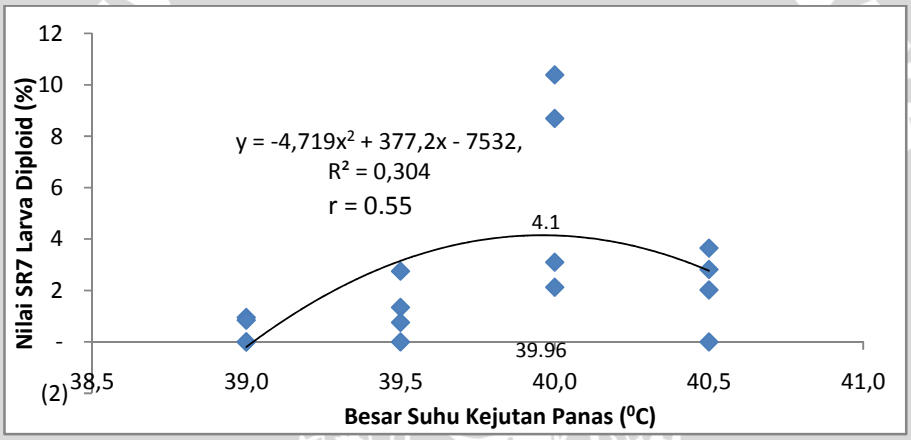
Perlakuan	A	B	D	C	Notasi
A	-				a
B	0.76	-			a
D	1.67	0.91	-		a
C	5.63**	4.87*	3.96*	-	b

Keterangan: * = berbeda nyata
** = berbeda sangat nyata
BNT 5% = 3,51
BNT 1% = 4,92

Perlakuan yang memiliki pengaruh terbesar adalah perlakuan yang mampu memberikan hasil berbeda nyata terhadap perlakuan lainnya dan memiliki nilai rata - rata SR7 tertinggi. Tingginya SR menunjukkan daya tahan hidup larva diploid yang baik. Berdasarkan Uji BNT, perlakuan terbaik adalah KN selanjutnya yaitu C dan kemudian perlakuan sisanya D , B, A, dan KUV yang saling tidak berbeda nyata.

Untuk mengetahui hubungan antara besar perlakuan kejutan suhu mitoginogenesis terhadap nilai HR larva haploid (1n) lele dumbo maka digunakan analisa regresi. Bentuk regresi yang digunakan adalah bentuk kuadratik dan didapatkan persamaan $y = -4.719x^2-377.2x^3-7532$ (Gambar 14). koefisien determinasi yang didapatkan yaitu $R^2 = 0,547$ yang artinya 54,7% nilai SR larva diploid pada hari ketujuh dipengaruhi oleh perbedaan besar suhu kejutan panas antara 39^0C, $39,5^0$C, 40^0C, dan $40,5^0$C yang diberikan. Pada penelitian ini, didapatkan koefisien korelasi sebesar 0,55 yang artinya antar perlakuan memiliki korelasi tinggi. Titik puncak menandakan besarnya besar suhu kejutan panas

optimal terhadap SR7 larva diploid. Pada kurva kuadratik yang didapatkan, titik puncak berada pada suhu 39,96^{0}C yang mampu menghasilkan SR7 sebesar 4,1%. Akan tetapi SR7 tidak dapat dijadikan parameter utama penentu keberhasilan teknik mitoginogenesis, karena terdapat faktor selain kejutan suhu yang mempengaruhi daya hidup larva hingga hari ke-7, seperti faktor lingkungan. Hal tersebut juga terlihat dari besar koefisien korelasi grafik regresi yang ada, pada HR larva diploid besar koefisien korelasinya adalah 0,75 sedangkan SR7 hanya 0,55. Artinya, hubungan antara kejutan suhu dan HR larva diploid jauh lebih erat dibandingkan hubungan antara kejutan panas dan SR7.



Gambar 14. Hubungan antara Besar Suhu Kejutan Panas terhadap SR7 Larva Diploid Mitoginogenesis Ikan Lele Dumbo

Dalam analisa SR7 ini diperoleh hasil bahwa suhu kejutan panas terbaik adalah perlakuan C (39.96^{0}C). Hal ini disebabkan karena jumlah larva diploid yang menetas tertinggi ada pada perlakuan ini, serta diduga larva - larva tersebut memiliki kestabilan kondisi tubuh yang lebih tinggi untuk dapat bertahan hidup hingga hari ketujuh. Kestabilan kondisi tubuh larva tersebut diduga disebabkan oleh proses diploidisasi yang baik dan besar suhu kejutan panas yang tepat.

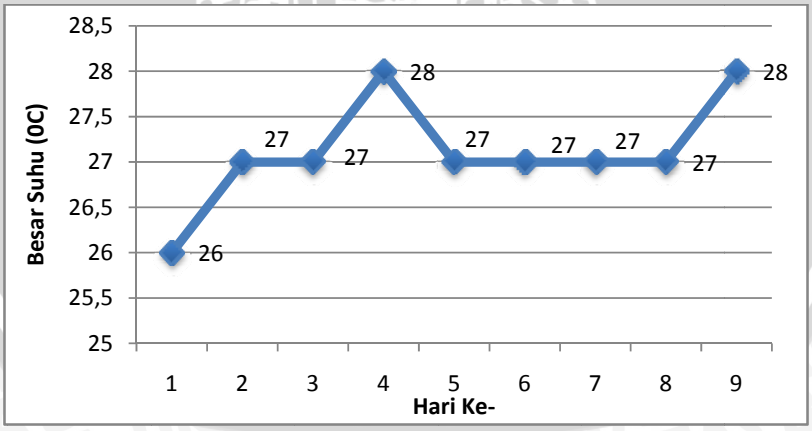
4.4 Analisa Suhu Air media Pemeliharaan

Nilai suhu air media pemeliharaan telur dan larva ikan lele dumbo (*Clarias* sp.) selama penelitian ini berfluktuatif namun masih dalam kisaran yang sempit.

Nilai suhu harian air media pemeliharaan ditampilkan pada Tabel 12. Untuk lebih mempermudah pengamatam terhadap fluktuasi suhu harian, maka data suhu ditampilkan dalam bentuk grafik (Gambar 15).

Tabel 12. Suhu Harian Air Media Pemeliharaan Telur dan Larva selama Penelitian

Hari ke-	Suhu (^{0}C)
1 (Inkubasi telur)	26
2 (Penetasan telur)	27
3 (Larva umur 1 hari atau D-1)	27
4 (D-2)	28
5 (D-3)	27
6 (D-4)	27
7 (D-5)	27
8 (D-6)	27
9 (D-7)	28



Gambar 15. Grafik Suhu Air Media Pemeliharaan Telur dan Larva Ikan Lele Dumbo selama Penelitian

Suhu harian air media pemeliharaan dalam penelitian ini berada pada kisaran 26^{0}C - 28^{0}C. Interval suhu tersebut berada pada kadar toleransi hidup

ikan lele. Menurut Amri dan Khairuman (2008), suhu yang cocok untuk memelihara lele dumbo adalah 20^0C - 30^0C dengan suhu optimum yaitu 27^0C. Suhu termasuk salah satu faktor penting yang harus diperhatikan dalam pemeliharaan ikan, karena suhu dapat mempengaruhi lama penetasan telur dan laju pertumbuhan larva ikan.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Morgan (2005), ditemukan bahwa ikan *North Carolina southern flounder* (*Paralichtys lengostigma*) yang dipelihara pada suhu 28^0C dan 29^0C memiliki laju pertumbuhan yang lebih tinggi dibandingkan dengan yang dipelihara pada 23^0C. Namun selain dapat meningkatkan laju petumbuhan dan perkembangan, suhu juga dapat berpengaruh terhadap perubahan kelamin ikan. Seperti yang dijelaskan dalam Anonymous (2009), pengaruh faktor lingkungan, terutama suhu, atau keberadaan gen resesif dapat menyebabkan terjadinya perubahan kelamin pada ikan betina ginogen menjadi jantan walaupun memiliki genetik XX-XY.