

## 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Telur Ikan

Pada telur ikan yang sudah matang, sebagian besar merupakan substansi lemak, karbohidrat, dan protein. Sitoplasma hanya berfungsi sebagai penutup tipis kuning telur dan butiran minyak, sehingga sitoplasma akan berkumpul pada sebuah kutub. Proses pematangan sitoplasma bersamaan dengan terbentuknya lapisan pembungkus telur paling luar yang disebut khorion. Antara khorion dan kuning telur terbentuk ruang perivitelline yang berisi plasma. Ruang ini berfungsi agar sel telur atau embrio dapat dengan bebas berputar keliling dan selalu bermandi plasma yang berbentuk cairan. Pada khorion terdapat lubang sempit yang disebut mikropil dan merupakan pintu masuk spermatozoa ke dalam telur. Mikropil ini akan membuka secara optimal pada saat diovulasikan. Keadaan demikian merupakan waktu yang paling tepat untuk proses pembuahan (Murtidjo, 2001).

Telur ikan ovipar yang belum dibuahi, bagian luarnya dilapisi oleh selaput yang dinamakan selaput kapsul atau *chorion*. Pada *chorion* ini terdapat sebuah *mikropil* yaitu suatu lubang kecil tempat masuknya sperma ke dalam telur pada waktu terjadi pembuahan. Di bawah *chorion* terdapat selaput yang kedua dinamakan *selaput vitelline*. Selaput yang ketiga mengelilingi plasma telur dinamakan *selaput plasma*. Ketiga selaput ini semuanya menempel satu sama lain dan tidak ada ruang diantaranya. Bagian telur yang terdapat sitoplasma biasanya berkumpul di sebelah telur bagian atas yang dinamakan *kutub anima*, sedangkan bagian kutub yang berlawanan terdapat banyak kuning telur yang dinamakan *kutub vegetatif*. Kuning telur yang ada di bagian tengah keadaannya lebih pekat daripada kuning telur yang ada pada bagian pinggir karena adanya sitoplasma yang banyak terdapat di sekeliling inti telur. Telur yang baru saja

keluar dari tubuh induk dan bersentuhan dengan air akan terjadi perubahan yaitu selaput chorion akan terlepas dengan selaput vitelline dan membentuk ruang yang ini dinamakan *ruang perivitelline*. Adanya ruang perivitelline ini, maka telur dapat bergerak lebih bebas selama dalam perkembangannya, selain itu dapat juga mereduksi pengaruh gelombang terhadap posisi embrio yang sedang berkembang. Air masuk ke dalam telur yang disebabkan oleh adanya perbedaan tekanan osmose dan imbibisi protein yang terdapat pada permukaan kuning telur. Selaput vitelline merupakan penghalang masuknya air jangan sampai merembes ke dalam telur. Pengerasan selaput chorion. Waktu yang diperlukan untuk pengerasan selaput chorion tidak sama bergantung pada ion kalsium yang terdapat dalam air (Wahyuningsih dan Ternala, 2006).

## 2.2. Partenogenesis

Partenogenesis merupakan proses reproduksi aseksual dimana telur dari individu betina menjadi embrio yang berkembang tanpa adanya peranan sperma (Tobing, 2007). Individu muda yang dihasilkan selalu betina tanpa sedikitpun mempunyai sifat dari induk jantan. Ini berarti bahwa sifatnya sepenuhnya tergantung genotip induk betina (Sjafei *et al.*, 1991). Kejadian partenogenesis tidak bisa terjadi secara alami. Aktivasi buatan merupakan langkah penting dalam prosedur kloning, dimana kloning somatik dapat menjadi metode untuk menyelamatkan spesies hewan yang terancam punah.

Bahan yang telah digunakan untuk aktivasi partenogenesis adalah etanol pada telur ikan mas (Kurniawan, 2010), Ca-ionopore dan 6-dimethylaminopurine pada telur ikan mas (Marhendra, 2010), protein kinase pada telur ikan mas (Jing *et al.*, 1999), enzim protease pada telur ikan lele dumbo (Tobing, 2007), sitokalsin B pada telur ikan mas (Novaliza, 2007 *dalam* Tobing, 2007).

Berdasarkan penelitian Tobing (2007) tentang penggunaan enzim protease dengan konsentrasi etanol 7% dapat mengaktivasi telur ikan lele dumbo dengan jumlah larva pada hari pertama sebesar 0,89 % atau lebih kurang 3 ekor dari 300 butir telur dan bertahan hidup hingga hari ke-3 sebesar 0,22%.

### 2.3. Aktivasi Oosit oleh Sperma (Fertilisasi)

Ikan teleostei berbeda dalam satu hal besar dari golongan polychaeta, echinodermata, dan ampibi, yaitu memiliki sebuah mikrofil pada membran telur paling luar (zona radiata) (Alderdice, 1988). Fertilisasi (pembuahan telur oleh sperma) terjadi apabila sel-sel telur segera terbuahi oleh sperma. Di dalam air, sel sperma bergerak aktif dan masuk membuahi sel telur melalui lubang kecil pada lapisan *chorion*. Telur yang telah dibuahi oleh spermatozoa (*fertil*) akan menghasilkan embrio yang tumbuh di dalamnya (Bachtiar, 2002).

Pembuahan pada ikan air tawar berlangsung ketika terjadi penggabungan antara sel telur dan spermatozoa sehingga terbentuk zigot. Pembuahan pada ikan terjadi di luar tubuh, yakni setelah telur dikeluarkan oleh ikan betina dan disusul ikan jantan yang mengeluarkan spermatozoa. Jika telur yang dikeluarkan oleh ikan betina tidak memperoleh proses penggabungan dengan spermatozoa, maka telur akan mati. Telur ikan yang mati dengan mudah dapat diketahui karena kecerahannya hilang, warnanya pucat atau memutih dan keruh. Pembuahan telur ikan didukung oleh adanya substansi yang disebut fertilizing yang merangsang spermatozoa untuk mengejar telur yang dikeluarkan oleh ikan betina. Fertilizin tersebut dikeluarkan oleh telur pada saat terakhir ketika telur dilepas dan siap untuk dibuahi. Pembuahan pada telur dapat dikatakan terjadi jika spermatozoa memasuki telur lewat mikropil. Satu spermatozoa sudah cukup untuk membuahi telur. Pembuahan telur ikan berupa masuknya kepala spermatozoa ke dalam sel telur dan ekor spermatozoa tertinggal di luar. Jika sudah demikian, sitoplasma dan khorion meregang dan semacam sumbat segera

menutup mikropile untuk menghalangi masuknya spermatozoa yang lain. Ketika telur sudah bergabung dengan spermatozoa, inti spermatozoa mulai membesar dan kromosomnya mengalami perubahan, sehingga memungkinkan untuk berhimpun dengan kromosom dari sel telur sebagai fase awal pembelahan. Untuk melindungi embrio, khorion akan mengeras yang disebabkan enzim pengeras yang terdapat pada bagian dalam lapisan khorion. Pengerasan khorion sangat berguna untuk melindungi embrio yang masih sangat sensitif pada saat-saat awal atau disebut saat gastrulasi. Setelah proses pembelahan, selanjutnya diikuti oleh perkembangan berupa proses blastulasi, gastrulasi, organogenesis sampai proses penetasan (Murtidjo, 2001).

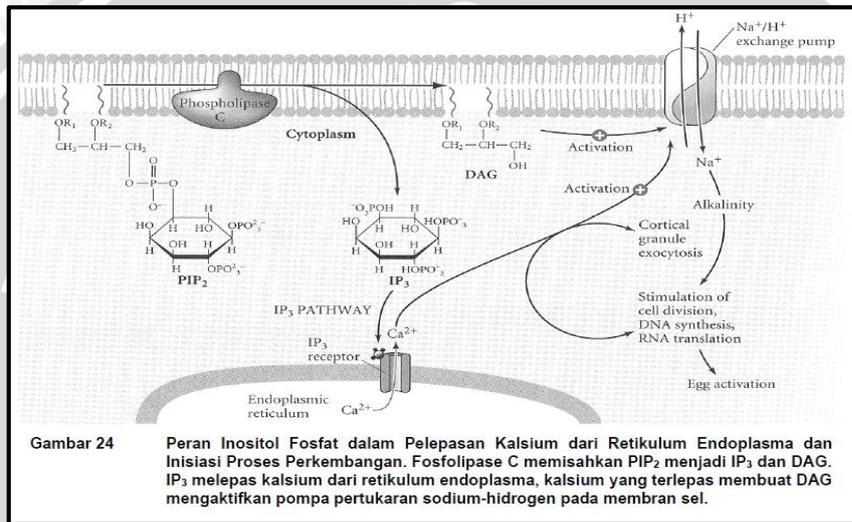
#### **2.4. Etanol sebagai Aktivator**

Etanol dapat digunakan sebagai agen pengaktivasi telur ikan karena kemampuannya memfasilitasi peningkatan ion  $\text{Ca}^+$  di dalam ooplasma yang merupakan tanda bahwa oosit telah teraktivasi (Susko-Parrish *et al.* (1994). Ditambahkan oleh Meo (2004), bahwa penggunaan etanol dalam partenogenesis diketahui dapat menyebabkan terjadinya aktivasi sel telur dengan melakukan inisiasi pelepasan ion kalsium ( $\text{Ca}^{2+}$ ).

Etanol dapat menyebabkan peningkatan ion kalsium yang terjadi karena masuknya ion kalsium ekstraseluler dan mobilisasi ion kalsium intraseluler. Etanol dapat melakukan interaksi dengan membran sel dan secara langsung akan menyebabkan polaritas membran dan memindahkan ion kalsium dan membran fosfolipid (Meo, 2004). Pelepasan kalsium ke dalam ooplasma penting untuk mengaktifkan reaksi sistemik pada oosit yang bermuara pada penerusan pembelahan meiosis (Sun *et al.*, 1992).

Terjadinya pelepasan  $\text{Ca}^{2+}$  berpengaruh terhadap reaksi granula korteks, selanjutnya reaksi ini juga berpengaruh terhadap dimulainya siklus sel dan reaktivasi sintesis protein. Pelepasan kalsium mengaktifkan seluruh rangkaian

reaksi metabolisme yang mengawali perkembangan embrio. Salah satunya adalah aktivasi enzim NAD<sup>+</sup> kinase yang berperan mengubah NAD<sup>+</sup> menjadi NADP<sup>+</sup> (Epel *et al.*, 1981). Perubahan ini menghasilkan konsekuensi yang penting untuk metabolisme lipid. Hal ini disebabkan NADP<sup>+</sup> (bukan NAD<sup>+</sup>) yang dapat berperan sebagai koenzim biosintesis lipid. Oleh karena itu konversi NAD<sup>+</sup> menjadi NADP<sup>+</sup> berperan dalam konstruksi membran sel baru selama tahap pembelahan.



Gambar 24 Peran Inositol Fosfat dalam Pelepasan Kalsium dari Retikulum Endoplasma dan Inisiasi Proses Perkembangan. Fosfolipase C memisahkan PIP<sub>2</sub> menjadi IP<sub>3</sub> dan DAG. IP<sub>3</sub> melepas kalsium dari retikulum endoplasma, kalsium yang terlepas membuat DAG mengaktifkan pompa pertukaran sodium-hidrogen pada membran sel.

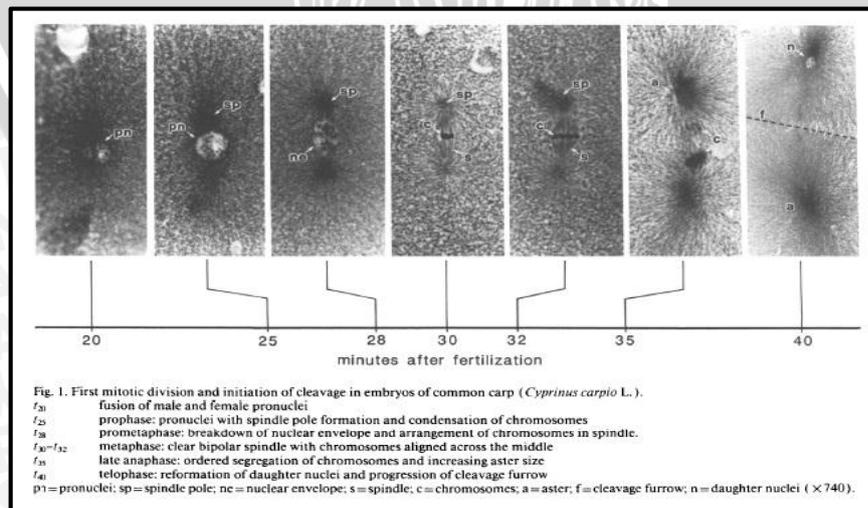
Gambar 1. Peran Inositol Fosfat dalam Pelepasan Kalsium dari Retikulum Endoplasma dan Inisiasi Proses Perkembangan (Gilbert, 2009).

## 2.5. Diploidisasi Embrio

Haploid pada ikan secara morfologi menyebabkan ketidaknormalan (*haploid syndrome*) dan mati sebelum atau segera setelah menetas. Untuk mendapatkan ikan bergenetik diploid yang mampu bertahan hidup, kromosom betina haploid harus digandakan. Penggandaan kromosom betina dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu dengan penahanan pembelahan meiosis kedua pada sel telur atau penahanan pembelahan mitosis pertama pada embrio haploid. Untuk penahan (*suppression*) pembelahan meiosis atau mitosis, perlakuan fisik yang keras diberikan pada embrio. Kebanyakan perlakuan yang digunakan yaitu temperatur rendah atau tinggi. Untuk penahanan, kejutan biasanya diberikan

pada anafase dari pembelahan. Akibat pengaruh dari perlakuan ini, benang-benang spindel dihancurkan, sehingga pembelahan berhenti dan material hasil pembelahan digabungkan kembali dengan sel induk. Ketika pembelahan meiosis kedua ditahan, polar body kedua tidak dikeluarkan dan dileburkan dengan pronukleus betina haploid. Saat penahanan pembelahan mitosis pertama pada embrio haploid, dua nukleus haploid disatukan untuk membentuk nukleus diploid. Sesudah siklus mitosis berikutnya, dua blastomer diploid terbentuk (Gomelsky, 2003).

Diploidisasi merupakan rangkaian kegiatan ginogenesis untuk menghasilkan individu diploid ginogenesis. Diploidisasi tersebut dapat dilakukan dengan cara menahan pembentukan polar body II pada saat meiosis II. Pelepasan polar body II dicegah dengan cara diberi kejutan panas, sehingga terbentuk nukleus yang diploid. Kejutan panas dilakukan dengan cara merendam telur-telur yang telah dibuahi ke dalam air panas dengan temperatur tertentu. Setiap spesies ikan yang berbeda memerlukan waktu dan saat yang tepat dilakukan kejutan yang berbeda-beda. Beberapa laporan penelitian telah dilakukan yang meliputi lama dan saat dimulai kejutan panas agar diperoleh hasil yang optimal (Murtidjo, 2001).



Gambar 2. Pembelahan Mitosis I dan Inisiasi Pembelahan pada Embrio Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.) (Komen *et al.*, 1991)



## 2.6. Embriogenesis

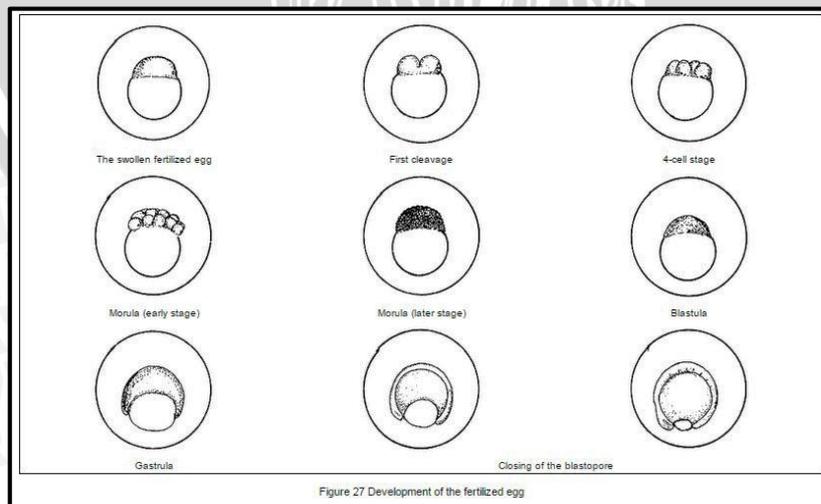
Menurut Bachtiar (2002), telur-telur ikan mas yang telah dibuahi akan menyerap air sehingga ukurannya menjadi besar atau menggelembung. Sel-sel di dalamnya pun mulai melakukan pembelahan secara mitosis. Pembelahan sel ini berlangsung selama sepuluh jam. Proses ini dinamakan embriogenesis yang menghasilkan larva ikan mas.

Menurut Balon (1975) dalam Sjafei, *et al.* (1991), periode embrio adalah periode individu ikan masih tergantung pada makanan yang disiapkan oleh induknya dalam bentuk kuning telur atau waktu individu itu masih berhubungan langsung dengan induknya melalui semacam plasenta, atau gabungan dari kedua keadaan tersebut. Periode ini berlangsung sejak pembuahan telur oleh sperma, atau pada ikan yang uniseksual, periode ini adalah pada waktu mulai berfungsinya rangsang pacu untuk terjadi pembelahan sel.

Periode embrio terbagi menjadi 3 fase, yaitu fase pembelahan sel telur menjadi zygote (*cleavage stage*), fase embrio dan fase embrio bebas. Fase pembelahan yaitu interval antara pembelahan sel pertama sampai munculnya ciri-ciri tertentu yang dapat dikenal antara lain sistem-sistem organ, terutama lempeng neural. Fase embrio, yaitu interval dimana embrio dikenal sebagai vertebrata atau bukan, ketiga sistem organ utama mulai muncul sampai terjadinya penetasan. Fase embrio bebas yaitu fase setelah embrio terlepas dari selaput/cangkang telur. Pada fase ini embrio tidak melengkung lagi bentuknya, tetapi lebih mirip ikan, masih menggunakan kuning telur sebagai sumber makanannya (atau dari plasenta, bagi ikan vivipar dan ovovivipar), biasanya masih tetap tinggal di lingkungan yang sama seperti pada fase sebelumnya (Sjafei, *et al.*, 1991).

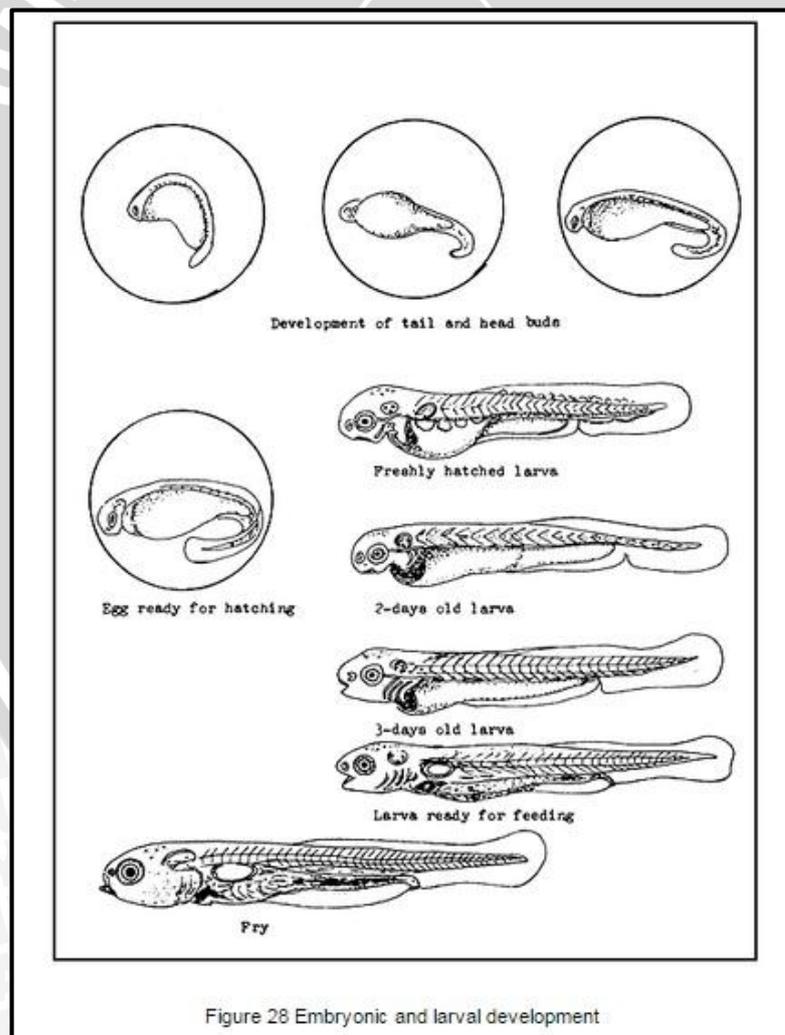
Menurut Woynarovich dan Horvarth (1980), pada saat *swelling* atau mengembang telur telah lengkap, telur mengalami dua fase, yaitu inti menjadi

bentuk yang lebih mudah dibedakan, baik dari bentuk maupun dari warna. Kutub anima berkembang berbentuk bukit kecil dan kuning telur berkembang menjadi warna kuning gelap. Proses tersebut tergantung pada temperatur air. Pembelahan kutub anima dimulai dan satu sel berturut-turut menjadi 2, 4, 8, 16 dan 32 sel. Stadia ini terlihat seperti sebuah "mulberry" dan hal ini merupakan akhir dari stadia morulla. Selanjutnya, memasuki fase banyak sel atau blastoderm, yang dimulai dengan satu selaput sel. Sel-sel tersebut disebut blastomer. Jumlah blastomer meningkat, ukurannya menjadi semakin kecil. Pada stadia morulla perkembangan embrio sangat sensitif terhadap guncangan dan sel tersebut mudah terlepas dari permukaan sehingga menyebabkan kematian dari embrio. Dalam sel terbentuk sebuah ruang yang berukuran kecil antara kuning telur dan massa sel yang disebut *segmentation cavity*. Embrio pada stadia ini disebut blastula. Sel-sel blastoderm pada mulanya tersusun pada bagian atas kuning telur berbentuk mangkuk. Pada tingkat selanjutnya, sel mulai menutup kuning telur sampai seluruhnya. Yang tersisa hanya bagian akhir dengan bukaan yang kecil dari blastophore dan akhirnya blastophore ini juga tertutup seluruhnya. Ini merupakan fase transisi dari perkembangan embrionik dan memulai stadia perkembangan germ atau inti (lihat Gambar 3).



Gambar 3. Perkembangan Telur yang Terbuahi (Woynarovich dan Horvarth, 1980).

Massa sel menebal pada bagian lingkaran blastophore, kepala dan ujung ekor kelihatan pada kedua ujungnya, sesaat kemudian, kedua ujung ekor dan kepala menjadi sangat jelas dan ruas pertama dari badan menjadi kelihatan. Mata berkembang berupa “*optice sides*” pada kepala, dan ekor mulai tumbuh secara longitudinal. Jantung berkembang dan mulai berdenyut. Pada waktu yang sama sistim kapiler atau pembuluh darah berkembang pada permukaan kuning telur. Ekor embrio berangsur-angsur mulai bergerak, diikuti oleh pergerakan badan, bahkan selanjutnya mulai memutar pada ruang perivitelin. Perputaran dan pergerakan lainnya menjadi sangat aktif menjelang menetas (Woynarovich dan Horvarth, 1980) (lihat Gambar 4).



Gambar 4. Perkembangan Embrio dan Larva (Woynarovich dan Horvarth, 1980).