PENGGUNAAN *6-dimethylaminopurine (6-DMAP)* 200 µM DAN *ETHANOL 7%* SEBAGAI AKTIVATOR TUNGGAL PARTENOGENESIS TELUR IKAN MAS (*Cyprinus carpio*)

SKRIPSI

oleh:
NOVIANTO HERY KURNIAWAN
0410910038-91

JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2009

PENGGUNAAN *6-dimethylaminopurine (6-DMAP)* 200 µM DAN *ETHANOL 7%* SEBAGAI AKTIVATOR TUNGGAL PARTENOGENESIS TELUR IKAN MAS (*Cyprinus carpio*)

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Biologi

oleh:
NOVIANTO HERY KURNIAWAN
0410910038-91

JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2009

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

PENGGUNAAN *6-dimethylaminopurine (6-DMAP)* 200 µM DAN *ETHANOL 7%* SEBAGAI AKTIVATOR TUNGGAL PARTENOGENESIS TELUR IKAN MAS (*Cyprinus carpio*)

oleh:
NOVIANTO HERY KURNIAWAN
0410910038-91

Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 28 Mei 2009
Dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Biologi

Pembimbing I	Pembimbing II
Dr. Drs. Agung Pramana W.M., M.Si	**Dr. Ir. M. Sasmito Djati., MS**
NIP. 131 971 480	**NIP. 132 090 387**

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Dr. Dra. Sri Rahayu., M.Kes
NIP. 131 652 677

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Novianto Hery Kurniawan
NIM : 0410910038-91
Jurusan : Biologi
Penulis Skripsi berjudul : **Penggunaan 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) 200 µM dan Ethanol 7% sebagai Aktivator Tunggal Partenogenesis Telur Ikan Mas (Cyprinus carpio)**

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari Skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini
2. Apabila dikemudian hari ternyata Skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan segala kesadaran.

Malang, 28 Mei 2009
Yang menyatakan,

(Novianto Hery Kurniawan)
NIM. 0410910038

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipannya hanya dilakukan seijin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

PENGGUNAAN *6-dimethylaminopurine* (6-DMAP) 200 µM DAN *ETHANOL 7%* SEBAGAI AKTIVATOR TUNGGAL PARTENOGENESIS TELUR IKAN MAS (*Cyprinus carpio*)

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penggunaan *ethanol 7%* dan *6-dimethylaminopurine* (6-DMAP) dalam mengaktivasi telur ikan mas (*Cyprinus carpio*). Aktivasi telur ikan mas secara buatan dilakukan dengan cara merendam telur dalam ethanol dengan konsentrasi 7% dan *6-dimethylaminopurine* (6-DMAP) dengan konsentrasi 200µM. Telur ikan mas direndam dalam kedua aktivator masing-masing selama 5, 10, 30 dan 60 menit. Telur ikan mas dari masing-masing perlakuan ditempatkan dalam akuarium yang terpisah. Kontrol perlakuan adalah fertilisasi normal. Analisis data dilakukan secara kuantitatif dan kualitatif. Analisa kualitatif dilakukan secara deskriptif. Sedangkan analisis kuantitatif dilakukan dengan menggunakan metode RAL faktorial. Telur ikan mas (*Cyprinus carpio*) setelah diaktivasi secara buatan menggunakan ethanol 7% dan *6-dimethylaminopurine* (6-DMAP) 200 µM teraktivasi 100 %. Variasi lama perendaman pada perlakuan aktivasi buatan menggunakan ethanol 7% dan *6-dimethylaminopurine* (6-DMAP) 200 µM memberikan pengaruh nyata ($p<0,05$) terhadap perkembangan telur.

Kata kunci : aktivasi, *6-dimethylaminopurine*, *ethanol 7%*, partenogenesis, telur ikan mas (*Cyprinus carpio*)

APPLICATION OF *6-dimethylaminopurine* (6-DMAP) 200 µM AND *ETHANOL 7%* AS PARTHENOGENETIC ACTIVATOR FOR CARP (*Cyprinus carpio)* EGGS

ABSTRACT

The purpose of this experiment was to find out the effect of *ethanol 7%* and *6-dimethylaminopurine (6-DMAP)* on Carp (*Cyprinus carpio*) eggs activation. The artificial egg activation was initiated by soak the egg into 7 % *ethanol* and then transferred into 200 µM *6-dimethylaminopurine (6-DMAP)* solution. Soaking with boths treatments were done in 5, 10, 30 and 60 minutes. The activated egg put down in separated aquarium. Normal fertilization was used as control treatment. Data's were analyzed by using quantitive and qualitative method. Qualitative analysis was done with descriptive analyzed, while quantitative analysis was done with *Factorial Randomized Completly Design (RCD)*. The result showed that all soaked egg by 7% ethanol and 200 µM 6-dimethylaminopurine were activated (reached 100%). The duration of soak in both of activators gave significant effect ($p<0,05$) on egg development.

Key word : activation, carp egg (*Cyprinus carpio*), *6-dimethylaminopurine, ethanol 7%,* parthenogenesis

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis sampaikan kehadirat Allah SWT, Tuhan seru sekalian alam, yang telah melimpahkan rahmat karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan Skripsi yang berjudul '**Penggunaan *6-dimethylaminopurine* (6-DMAP) 200µM dan Ethanol 7% sebagai Aktivator Tunggal Partenogenesis Telur Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)**'. Penulisan Skripsi ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak maka dalam kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

1. Dr. Drs. Agung Pramana W. M. M.Si dan Dr. Ir. M. Sasmito Djati, MS, selaku Dosen Pembimbing I dan II atas kesabaran dalam membimbing, mendampingi, dan memotivasi selama pelaksanaan skripsi ini.
2. Dr. Dra. Sri Rahayu, M.Kes. dan Muhaimin Rifa'I Ph.D selaku dosen penguji.
3. Dr. Dra. Sri Rahayu, M.Kes selaku Ketua Jurusan Biologi, Muhaimin Rifa'I Ph.D selaku Ketua Laboratorium Fisiologi Hewan.
4. Nia Kurniawan S.Si., MP selaku Dosen Pembimbing Akademik (PA) selama 7 semester.
5. Ibu, Budhe, Bapak, dan adikku atas doa, keikhlasan dan dukungan moril kepada penulis selama ini.
6. Citra Pradani Puspitasari S.Si yang telah membuat hidupku lebih hidup dan lebih berarti.
7. Rekan-rekan seperjuangan Muhammad Asyraf S.Si, Adi Nurcahyo S.Si, Vira Saamia S.Si, Elok Rifqi Firdiana S.Si, Lukman Haris Kurniawan S.Si dan seluruh Biologi angkatan 2004 atas kebersamaan, kekeluargaan selama menempuh perkuliahan di Biologi.
8. Adik-adikku Antonius Christianto S.Si, Hendra Prasastra S.Si, Fachresa Riski P., S.Si, Nur Christian S.Si, Muhammad Yusuf S.Si, atas kebersamaannya selama ini.

Banyak hal yang perlu diperbaiki dalam penyusunan skripsi ini karena penulis sadari masih jauh dari kesempurnaan oleh karena itu kritik membangun dan saran sangat penulis harapkan. Semoga skripsi ini dapat memberikan sumbangsih terhadap perkembangan ilmu pengetahuan.

Malang, 28 Mei 2009

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

JUDUL i
HALAMAN JUDUL ii
LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI iii
LEMBAR PERNYATAAN iv
PEDOKMAN PENGGUNAAN SKRIPSI v
ABSTRAK vi
ABSTRACT vii
KATA PENGANTAR viii
DAFTAR ISI ix
DAFTAR TABEL xi
DAFTAR GAMBAR xii
DAFTAR LAMPIRAN xiii

BAB I PENDAHULUAN
I.1. Latar Belakang 1
I.2. Rumusan Masalah 3
I.3. Tujuan Penelitian 3
I.4. Manfaat Penelitian 4

BAB II TINJAUAN PUSTAKA
2.1. Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) 4
2.2. Telur Ikan 4
2.3. Partenogenesis 5
2.4. Fertilisasi 6
2.5. Ethanol 7
2.6. *6-dimethylaminopurine* 8
2.7. Mekanisme Aktivasi Sel telur 9
2.8. Embriogenesis telur ikan 12
2.9. Hipotesis 14

BAB III METODE PENELITIAN
3.1. Waktu dan Tempat 15
3.2. Bahan dan Alat 15
3.2.1. Alat 15
3.2.2. Bahan 15
3.3. Pemilihan Induk Ikan Mas Punten (*Cyprinus carpio*) 15

3.4. Persiapan Kolam Pemijahan 15
3.5. Pemijahan dan *Stripping* Induk Ikan Mas 16
3.6. Pembuatan Larutan Aktivator Ethanol 7% 16
3.7. Pembuatan Larutan Aktivator 6-DMAP 200µM 16
3.8. Aktivasi Telur Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) 16
a. Aktivasi secara alami (fertilisasi) sebagai kontrol 17
b. Aktivasi Buatan 17
b.1. Aktivasi menggunakan ethanol 17
b.2. Aktivasi menggunakan 6-DMAP 200µM 17
3.9. Perawatan Telur 18
3.10. Pengamatan 18
3.11. Analisis Data 19

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN
4.1. Aktivasi Telur 20
4.2. Perkembangan Telur 25

BAB V PENUTUP
5.1. Kesimpulan 29
5.2. Saran 29

DAFTAR PUSTAKA 30
LAMPIRAN 35

DAFTAR TABEL

Halaman

4.2 Presentase perkembangan telur setelah perlakuan aktivasi buatan menggunakan ethanol 7% dan 6-DMAP 200µM 22
4.3 Uji regresi perlakuan ethanol 7% 24
4.4 Uji regresi perlakuan 6-DMAP 200µM..... 24

DAFTAR GAMBAR

Halaman

2.1 Telur Ikan 5
2.2 Struktur telur ikan dan mikropil 7
2.3 Rumus struktur Ethanol 8
2.4 Rumus struktur *6-dimethylaminopurine* 8
2.5 Struktur MPF 10
2.6. Mekanisme aktivasi sel telur 11
2.7 Mekanisme penghambatan aktivitas MPF oleh 6-DMAP 12
4.1 Oosit tidak teraktivasi dan tidak teraktivasi 21
4.5 Telur yang diaktivasi menggunakan ethanol 7% 25
4.6 Telur yang diaktivasi menggunakan ethanol 7% 26
4.7 Telur yang diaktivasi menggunakan 6-DMAP 200µM 27
4.8 Telur blastula abnormal yang mengalami kematian (diaktivasi menggunakan 6-DMAP 200µM) 28

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

1. Skema Kerja 35
2. Pembuatan larutan stok aktivators 37
3. Data oosit yang berhasil berkembang 38
4. Tabel uji statistik 39
5. Tabel uji lanjut BNJ 40
6. Tabel Subset 41

BAB I
PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyediaan bibit unggul bagi budidaya perikanan merupakan masalah yang mendapat perhatian paling serius bagi dunia perikanan khususnya di Indonesia dan mulai dicari pemecahannya. Hal ini dilakukan untuk mengantisipasi tingkat konsumsi yang tinggi dan mencegah kelangkaan beberapa jenis ikan tertentu. Salah satu jenis ikan yang paling banyak dibudidayakan dan diproduksi bibitnya dalam jumlah besar untuk tujuan konsumsi maupun non-konsumsi adalah ikan mas (*Cyprinus carpio*).

Salah satu cara yang dapat digunakan untuk mengatasi permasalahan diatas adalah penggunaan metode partenogenesis dalam industri perikanan. Metode tersebut diharapkan dapat mempersingkat waktu yang dibutuhkan untuk proses penyediaan bibit dengan meningkatkan produktivitas bibit dalam jumlah banyak dalam waktu singkat. Selain itu, individu partenogenetik memiliki keunggulan yaitu genom yang terdapat pada individu partenogenetik mempunyai tingkat kesamaan dengan induk maternal sehingga sifat unggul dari induk betina akan terpelihara.

Partenogenesis merupakan proses perkembangan telur tanpa harus dibuahi oleh sperma, secara alamiah proses reproduksi ini terjadi pada kondisi yang menguntungkan individu pelaku (Campbell, 2000). Metode partenogenesis biasanya dilakukan dengan mengganggu tekanan osmosa cairan lingkungan sel telur dengan penggunaan berbagai jenis garam klorida dari K, Na, Ca, Mg (Yatim, 1994), sehingga menginduksi dan menyebabkan terjadinya pelepasan kalsium intraseluler dari *reticulum endoplasma* (RE) secara kimiawi.

Aktivasi embrio partenogenetik dapat dilakukan dengan beberapa cara antara lain secara kimia menggunakan *ethanol*, *inositol triphosphat* (IP3), atau *ionomycin* (Mitalipov dkk., 2001). Secara fisika embrio dapat diaktivasi menggunakan kejutan aliran listrik (Wolpent, 2002). Jenis bahan kimia yang sering digunakan untuk aktivator partenogenesis, baik secara tunggal maupun bervariasi, adalah *calsium ionophore, cycloheximide, ethanol, dan 6-dimethylaminophurine (6-DMAP)* (Suzuki dkk. , 2002). Penelitian ini

menggunakan dua macam aktivator partenogenesis yaitu ethanol dan 6-DMAP yang masing-masing akan dilihat tingkat keefisiensiannya dalam mengaktivasi sel telur. Ethanol merupakan aktivator yang paling sering digunakan untuk mengaktivasi sel telur pada beberapa penelitian tentang aktivasi sel telur. Penggunaan ethanol dapat menginduksi peningkatan konsentrasi *Calsium* (Ca^{2+}) intraseluler sehingga memicu proses aktivasi telur. Ethanol merupakan agen pengaktivasi telur ikan yang sering digunakan karena memiliki kemampuan memfasilitasi peningkatan ion Ca^{+} di dalam ooplasma yang merupakan tanda bahwa telur telah teraktivasi (Susko-Parrish dkk., 1994).

6-dimethylaminopurine (6-DMAP) adalah senyawa kimia yang dapat berperan sebagai penghambat fosforilasi dan inhibitor sintesis protein, senyawa ini umumnya digunakan secara kombinasi dengan aktivator yang lain. 6-DMAP digunakan untuk menstimulasi perkembangan sel telur yang matang, dan untuk mempercepat pembentukan pronukleus (Suzuki dkk., 2002). Menurut Zhang dan Masui dalam Alberio dkk (2001), sel telur golongan *Xenopus laevis* mengalami aktivasi tanpa didahului oleh peningkatan *Calsium* (Ca^{2+}) intraseluler dan membentuk pronukleus baru serta melanjutkan perkembangan menuju *blastocyst* saat dipaparkan dalam 6-DMAP. Pemaparan dalam 6-DMAP menyebabkan terbentuknya pronukleus dan mengarahkan individu partenot ke tahap interfase mitosis (Sushko-Parrish et al., 1994).

Hasil yang maksimal dalam metode partenogenesis sangat tergantung dan didukung oleh pengembangan yang berlanjut dari protokol aktivasi yang tepat. Protokol aktivasi ini meliputi penggunaan medium aktivasi yang tepat dan lama perlakuan perendaman pada medium aktivasi. Oleh karena itu penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan informasi tahap awal khususnya tentang pengaruh dan tingkat efisiensi medium aktivasi ethanol dan 6-DMAP sebagai aktivator tunggal partenogenenesis

1.2 Perumusan Permasalahan

Bagaimana pengaruh penggunaan *ethanol* 7% dan *6-dimethylaminopurine* (6-DMAP) 200 µM dalam mengaktivasi telur ikan mas (*Cyprinus carpio*) ?

1.3 Tujuan

Mengetahui pengaruh penggunaan *ethanol* 7% dan *6-dimethylaminopurine* (6-DMAP) 200 µM dalam mengaktivasi telur ikan mas (*Cyprinus carpio*).

1.4 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini adalah mendapatkan informasi tentang aktivator tunggal yang tepat dan efisien dalam pengembangan metode partenogenesis dalam rangka usaha untuk menghasilkan individu partenot secara in vitro, dalam rangka penyediaan bibit ikan unggul, dalam jumlah banyak dan waktu yang relatif singkat.

BAB II
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)

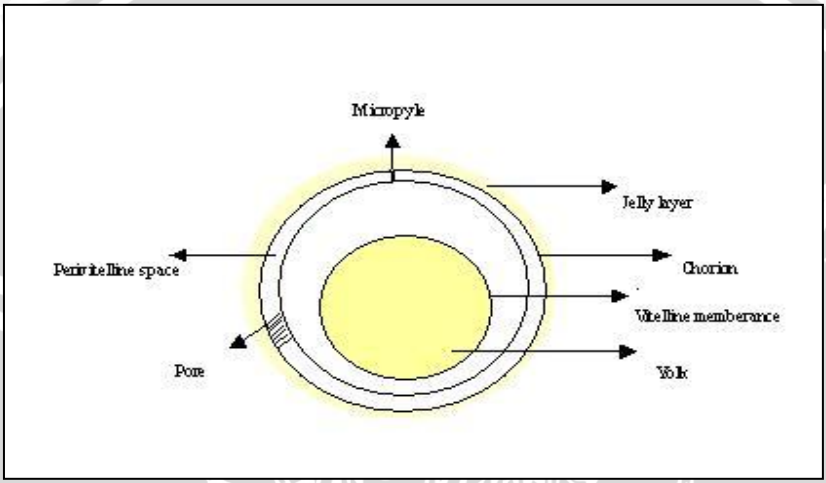
Spesies ikan mas (*Cyprinus carpio*) masuk dalam genus *Cyprinus* dari famili Cyprinidae. Di berbagai tempat ikan mas ini disebut sebagai ikan tambra, raya, atau ameh. Adapun ciri-ciri yang terdapat pada spesies ini adalah badan memanjang, sedikit pipih ke samping (*compressed*), mulut dapat disembulkan terletak diujung tengah (*terminal*), mempunyai sungut dua pasang, sirip punggung panjang dengan bagian belakang berjari keras, mempunyai sisik yang relatif besar dan tergolong tipe *cycloid*, gigi kerongkongan (*pharyngeal teeth*) terdiri dari tiga baris yang berbentuk geraham. Ikan mas hanya akan tumbuh baik pada tempat dengan ketinggian antara 150-1000 mdpl (Susanto, 2002).

2.2 Telur ikan

Secara umum, menurut (Kalthoff, 2001) pada beberapa jenis ikan perkembangan telur terbagi menjadi beberapa tahap yaitu : (1) tahap nuklear kromatin, yakni sel telur memiliki nukleus besar dengan distribusi kromatin seragam dan sedikit ooplasma, diameter sel telur 55-89 µm; (2) tahap perinukleolar, yakni nukleus tampak lebih kecil karena terjadi perubahan proporsi antara ooplasma dan nukleus, membran nukleus tampak berupa garis tak beraturan dan nukleoli berupa butiran, diameter sel telur 90-145 µm; (3) tahap kantung kuning telur, yakni kortikal alveoli terlihat pada tepi sel telur yang mengandung kuning telur, beberapa nuklei kecil tersebar pada tepi nukleus, membran folikel tampak jelas diameter sel telur 145-370 µm; (4) tahap vitelogenetik, yakni butir-butir kuning telur memadat dan kortikel alveoli terdesak ke tepi, diameter sel telur 370-600 µm; (5) tahap pematangan, yakni inti menghilang akibat *germinal vesicle breakdown*, diameter telur 507-650 µm; (6) stadia telur matang, diameter telur 575-690 µm; membran folikel yang terdiri dari zona radiata dapat diamati dengan jelas; terakhir (7) proses ovulasi.

Telur ikan mas memiliki ciri-ciri antara lain berbentuk oval, kuning telur berwarna pucat dan banyak terdapat granul, korion transparan, dan bersifat menempel pada substratnya (Anonymous,

2005). Telur ikan memiliki bagian khusus yaitu, mikropil, membran telur, dan lapisan periveteline (Shao dkk., 2001). Telur ikan ovipar mempunyai struktur unik yang dinamakan mikropil pada permukaan dari lapisan telur dimana sperma hanya dapat masuk melaluinya dan memasuki membran plasma telur, struktur ini tidak terdapat pada telur mamalia (Murata, 2006).



Gambar 2.1 Telur ikan (Shao dkk., 2001).

Telur kebanyakan invertebrata dan vertebrata yang belum dibuahi, pada bagian membran plasmanya memiliki suatu lapisan *vesicle* yang disebut *Specialized Golgi-derived Secretory Vesicles* atau kortikal granula. Telur ikan mas yang belum dibuahi memiliki ciri antara lain dilapisi oleh selaput pada bagian luarnya yang disebut dengan *chorion*, di bagian bawahnya terdapat selaput lagi yang disebut dengan *vitelline* (Tang, 2000) (Gambar 2.1). Pada telur ikan, isi alveoli kortikal dikeluarkan dengan *exocytosis* menuju ruang di antara *chorion* dan membran plasma (ruang perivitelline) saat terjadi aktivasi telur (Inoue dan Inoue, 1986).

2.3 Partenogenesis

Partenogenesis didefinisikan sebagai salah satu cara reproduksi yang ditandai dengan perkembangan gamet betina menuju *blastocyst* tanpa kontribusi dari gamet jantan (Alberio dkk., 2001).

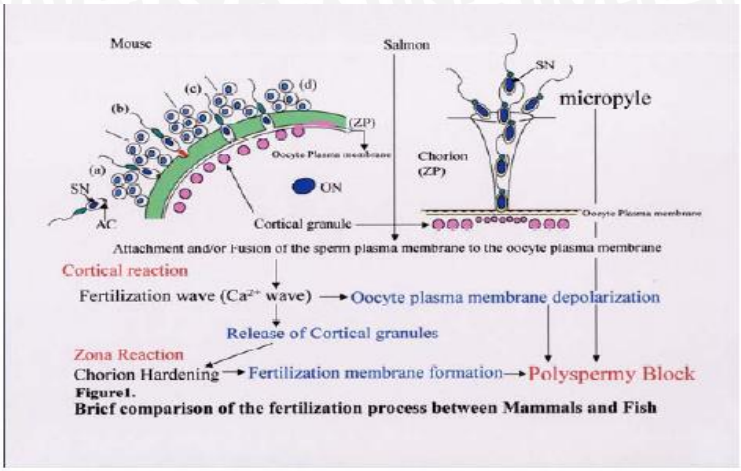
Partenogenesis merupakan reproduksi yang menghasilkan keturunan berupa individu betina tanpa adanya kontribusi genetik dari individu jantan (Hipp dan Anthony, 2004). Partenogenesis dapat terjadi secara alami pada semut dan lebah serta pada beberapa jenis reptilia, amphibia dan ikan (Saunders, 2004). Partenogenesis merupakan proses perkembangbiakan dan pembentukan embrio yang berasal dari ovum tanpa campur tangan dari spermatozoa, sehingga unsur genetik pada embrio partenogenesis hanya berasal dari induk betina (Wolpent, 2002). *Natural parthenogenesis* adalah partenogenesis yang terjadi secara alamiah, normal (Yatim, 1994).

Embrio partenogenetik dapat diupayakan melalui aktivasi oosit dengan menggunakan bahan kimia, aliran listrik ataupun proses maturasi yang diperpanjang (Mohammad *et* al., 2000), ionomycin, etanol, atau inositol 1,4,5-triphospate untuk meningkatkan konsentrasi Ca^{2+} intraseluler (Hipp dan Anthony, 2004).

Hewan dewasa yang dihasilkan melalui partenogenesis seringkali haploid, dan sel-selnya tidak mengalami meiosis dalam pembentukan telur-telur baru. Beberapa vertebrata; ikan, amfibia, dan kadal bereproduksi secara eksklusif melalui suatu bentuk kompleks partenogenesis yang melibatkan penggandaan kromosom setelah meiosis untuk menciptakan "zigot" diploid (Campbell, 2000). Metode partenogenesis secara eksperimental biasanya dilakukan pada echinodermata, golongan pisces, dan amphibia (Danford dkk., 2006).

2.4 Fertilisasi

Mekanisme reproduksi seksual adalah melalui mekanisme fertilisasi, yaitu peleburan sperma dengan telur (Campbell, 2000). Setelah terjadi peleburan diatas akan terjadi penyatuan antara pronukleus jantan dan pronukleus betina yang sebelumnya sel telur akan melanjutkan proses perkembangannya yang tertunda setelah diovulasikan (Runft dkk., 2002). Pada ikan fertilisasi terjadi saat sperma masuk ke dalam mikropil yang dimiliki oleh permukaan telur dan kemudian terjadi peningkatan Ca^{2+} dalam telur ikan sehingga telur melanjutkan siklus selnya dan mengawali perkembangan embrio (Gambar 2.2).

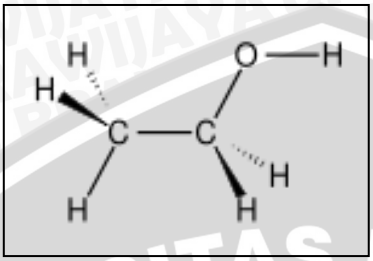


Gambar 2.2 Struktur telur ikan dan mikropil (Murata, 2006).

Telur ikan ovipar mempunyai struktur unik yang dinamakan mikropil pada permukaan dari lapisan telur dimana sperma hanya dapat masuk melaluinya dan memasuki membran plasma telur, struktur ini tidak terdapat pada telur mamalia (Murata, 2006).

2.5 Ethanol

Ethanol merupakan salah satu dari bahan kimia yang mempunyai molekul dari golongan hydroxyl, -OH dan diikat oleh atom karbon (Gambar 2.3). Beberapa sifat ethanol antara lain tidak mempunyai warna (jernih) dan dapat larut dalam air. Penggunaan ethanol sebagai obat dapat mempengaruhi sistem syaraf pusat dan secara umum dapat digunakan sebagai anestesi (Shakhashiri, 2005). Induksi partenogenesis juga dapat dilakukan secara kimiawi dengan menggunakan bahan-bahan kimia seperti ethanol dan stronsium (Meo dkk., 2003). Ethanol dapat meningkatkan pembentukan blastosis pada embrio tikus (Stachecki, 1994). Pressice *et al*. (1994), melaporkan bahwa ethanol 7% mampu mengaktivasi telur sapi dengan presentase telur teraktivasi tinggi.



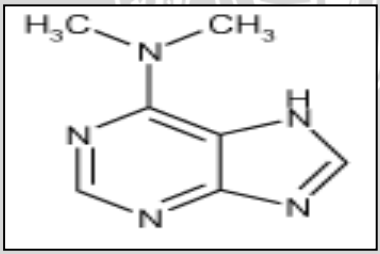
Gambar 2.3 Rumus struktur ethanol (Wikipedia, 2008)

Penggunaan ethanol dapat menginduksi peningkatan konsentrasi *Calsium* (Ca^{2+}) intraseluler sehingga memicu proses aktivasi telur. Terjadinya proses aktivasi tersebut menyebabkan telur yang berada pada fase istirahat akan kembali melanjutkan siklus selnya (Ongeri dkk., 2000). Pelepasan kalsium ini akan menyebabkan reaksi sistemik pada telur yang menyebabkan telur dapat memulai kembali dan menyelesaikan pembelahan meiosisnya.

2.6 *6-dimethylaminopurine*

6-DMAP dapat menghambat komponen *Mitogen Activating Protein Kinase* (MAPK) yang dapat menghambat pemisahan kromosom (Runft dkk., 2002), terhambatnya komponen MAPK dapat mempengaruhi penurunan aktivitas *Maturation Promoting Factor* (MPF).

Jenis bahan kimia yang sering digunakan untuk aktivator partenogenesis, baik secara tunggal maupun bervariasi, adalah *calsium ionophore, cycloheximide, ethanol, dan 6-dimethylaminophurine (6-DMAP)* (Suzuki dkk., 2002).

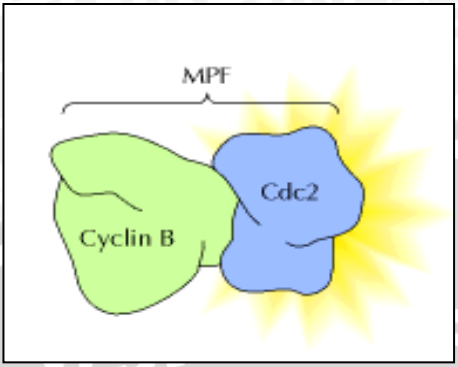


Gambar 2.4 Rumus struktur *6-Dimethylaminopurine(DMAP)* (Axxora, 2006)

6-DMAP adalah senyawa kimia yang dapat berperan sebagai penghambat fosforilasi dan inhibitor sintesis protein (Suzuki dkk., 2002). 6-DMAP digunakan untuk menstimulasi perkembangan sel telur yang matang, dan untuk mempercepat pembentukan pronukleus. Menurut Zhang dan Masui dalam Alberio dkk (2001), sel telur golongan *Xenopus laevis* mengalami aktivasi tanpa didahului oleh peningkatan *Calsium* (Ca^{2+}) intraseluler dan membentuk pronukleus baru serta melanjutkan perkembangan menuju *blastocyst* saat dipaparkan dalam 6-DMAP. 6-DMAP sebagai inhibitor kinase dapat menyebabkan *c-Mos* mengalami *proteolysis* sehingga sel telur golongan *Xenopus* dapat melanjutkan pembelahannya namun tanpa disertai degradasi dari *cyclin B* (Bodart dkk., 2001).

2.7 Mekanisme Aktivasi Sel Telur

Sel telur setelah diovulasikan merupakan telur sekunder, hasil pembelahan meiosis pertama, yang mengalami fase istirahat dan tertahan pembelahannya pada fase metafase II sampai nantinya difertilisasi. Sel telur pada hampir seluruh golongan *vertebrata* pembelahannya berhenti untuk sementara pada fase metafase II (Runft dkk., 2002), golongan *Spisula* dan *cacing laut* pada fase profase I, golongan *ascidians* pada metafase meiosis I (Stricker, 1999). Penahanan pembelahan pada fase metafase II ini disebabkan oleh tingginya aktivitas *Maturation Promoting Factor* (MPF) dalam sel telur, yang merupakan regulator pembelahan meiosis dan mitosis. MPF merupakan protein heterodimer yang terdiri dari *cyclin B* dan *cyclin-dependent kinase* (CDK2 atau Cdc2) yang dapat menstimulasi pembelahan meiosis dan mitosis (Draeta, 1997) (Gambar 2.4). Menurut Goudet dkk (1998), MPF tersusun atas 2 subunit kompleks heterodimer serine-threonin protein kinase, $p34^{cdc2}$ dan *cyclin B*. Sintesis cyclin B dikontrol oleh aktivitas *Mitogen Activating Protein Kinase* (MAPK) (Ito dkk., 2004).



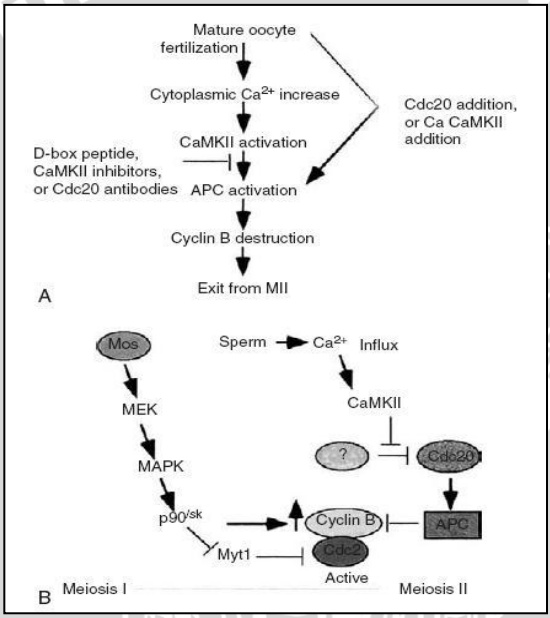
Gambar 2.5 Struktur MPF

Aktivitas *Maturation Promoting Factor* (MPF) sangat tergantung pada keseimbangan *cyclin B*, dimana pada sel telur fase metafase II, saat aktivitas MPF tinggi, sintesis *cyclin B* distabilkan oleh *Cytostatic Factor* (CSF), yang terdiri dari 3 macam protein, Mos, *Mitogen Activating Protein Kinase* (MAPK) dan $p90^{Rsk}$ (Alberio dkk., 2001). Pada beberapa penelitian yang telah dilakukan CSF dapat mencegah aktivitas *Anaphase-promoting complex* (APC) (Florman dan Ducibella, 2006). Pada sel telur golongan Xenopus, sel telur tertahan perkembangannya oleh CSF dimana, salah satu komponennya, yaitu c-Mos mempertahankan aktivitas MPF, yang tersusun atas *cdk1/cyclin B*, dalam sel telur tetap tinggi (Bodart dkk., 2001).

Fertilisasi yang terjadi pada sel telur hasil ovulasi menginduksi osilasi kalsium dan menstimulasi sel telur keluar dari fase metafase II (Florman dan Ducibella, 2006). Pada sel telur echinodermata, ascidians, dan vertebrata, peningkatan Ca^{2+} intraseluler saat terjadi fertilisasi disebabkan oleh *inositol1,4,5-triphospate* (IP_3) yang menginduksi pelepasan Ca^{2+} dari retikulum endoplasma (Runft dkk., 2002). IP_3 dihasilkan oleh phospolipase C_γ (PLC_γ), yang menghidrolisis phosphatidylinositol 4,5-biphospate (PIP_2) untuk menghasilkan IP_3 dan diacylglycerol (Rhee, 2001). *Diacylgliserol (DAG)* yang terbentuk mengaktifkan pembentukan *Protein Kinase C (PKC)*. *Diacylgliserol (DAG)* dan kenaikan *Calcium (Ca)* dapat mengaktivasi terjadinya pertukaran ion H^+ dari dalam membran sel dengan ion Na^+ dari luar membran sel yang dapat menstimulasi pembentukan DNA, RNA dan pembelahan sel dan aktivasi telur (Tortora, 2000). Pengeluaran kalsium selama aktivasi telur diinduksi

oleh aksi IP_3 pada reseptor IP_3 (IP_3R), yang berfungsi sebagai *channel* kation.

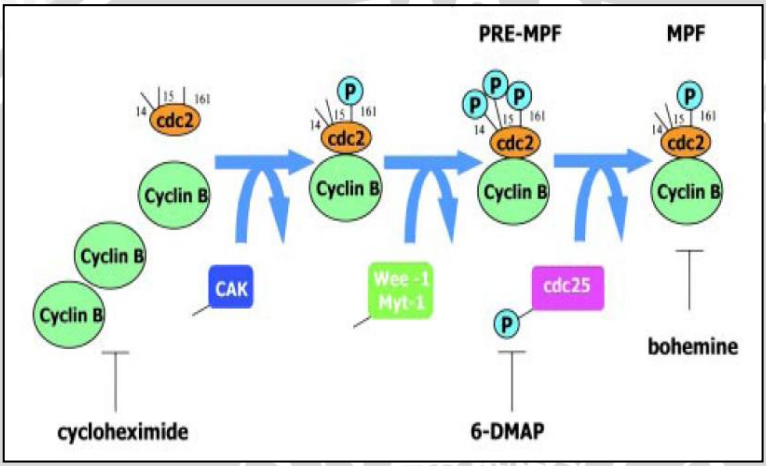
Osilasi kalsium meregulasi *calmodulin* (CaM) yang kemudian mengaktifkan *CaM-dependent kinase* (CaMKII). *calmodulin* (CaM) merupakan protein pengikat kalsium yang dapat meregulasi *CaM-dependent kinase* (CaMKII). Sinyal kalsium dan aktivasi *CaM-dependent kinase* (CaMKII) menginduksi *Anaphase-promoting complex (APC)* untuk mendegradasi *cyclin B*, sehingga menurunkan aktivitas MPF dan membuat sel telur melanjutkan pembelahannya (Florman dan Ducibella, 2006) (Gambar 2.6).



Gambar 2.6 Mekanisme aktivasi sel telur (Florman dan Ducibella, 2006)

Penggunaan ethanol dapat menginduksi peningkatan konsentrasi *Calsium* (Ca^{2+}) intraseluler sehingga memicu proses aktivasi telur. Terjadinya proses aktivasi tersebut menyebabkan telur yang berada pada fase istirahat akan kembali melanjutkan siklus selnya (Ongeri dkk., 2000). Membran sel telur dapat mengalami polarisasi akibat berinteraksi dengan ethanol dan dapat menyebabkan terjadinya perpindahan Ca^{2+} dari membran fosfolipid (Gruppen dkk., 2002).

6-DMAP dapat menghambat komponen MAPK yang dapat menghambat pemisahan kromosom (Runft dkk, 2002), terhambatnya komponen MAPK dapat menghambat sintesis dari *cyclin B* sehingga akan terbentuk pronukleus prematur serta mempengaruhi penurunan aktivitas MPF. Menurut Alberio dkk (2001), 6-DMAP dapat menghambat aktivitas MPF secara langsung dengan menghambat cdc25 (Alberio dkk., 2001) (Gambar 2.7).



Gambar 2.7 Mekanisme penghambatan aktivitas MPF oleh 6-DMAP (Alberio dkk., 2001)

2.8 Embriogenesis telur ikan

Pembelahan (*cleavage*) adalah suksesi pembelahan sel secara cepat yang terjadi setelah fertilisasi dan merupakan suatu rangkaian pembelahan mitosis dengan membagi volume sitoplasma telur menjadi lebih kecil, berupa sel-sel berinti. Sel-sel pada tahapan *cleavage* ini disebut *blastomeres* (Gilbert, 2000). Selama pembelahan tersebut, sel-sel mengalami fase S (sintesis DNA) dan fase M (mitosis) siklus sel. Embrio tidak membesar selama perkembangan ini (Campbell, 2000). Zigot hanya membelah berulang kali sampai terdiri dari banyak sel yang lebih kecil yang disebut *blastomer* (Yatim, 1994).

Tipe pembelahan pada ikan adalah *discoidal cleavage*. Setelah fertilisasi sitoplasma mengalir ke kutub animal membentuk

blastodisc (Kalthoff, 2001). Cleavage pada ikan terjadi pada *blastodisc*, bagian sitoplasma yang tanpa kuning telur dan tipis pada kutub animal telur, pembelahan ini tidak lengkap pada seluruh bagian sel telur, yang mana tipe ini disebut sebagai pembelahan meroblastik (Gilbert, 2000). Pembelahan pada ikan disebut juga sebagai pembelahan parsial dimana setiap sel yang terbentuk pada belahan akan terikat pada puncak dan sisi membran sel, tapi dasarnya berhubungan langsung dengan *yolk* (kuning telur) (Kimball, 1999).

Sel telur ikan mempunyai kuning telur yang berlimpah dan mempunyai pengaruh paling jelas pada pembelahan sel telur tersebut. Pembelahan pada sel telur kaya kuning telur dikenal sebagai pembelahan meroblastik. Pembelahan sel tersebut, setelah fertilisasi, hanya terjadi pada cakram kecil sitoplasma yang bebas kuning telur pada kutub animal sel telur tersebut (Campbell, 2000).

Menurut Fujaya (2002) Perkembangan embrio ikan pada umumnya dibagi menjadi 3 tahap yaitu:

1. Tahap pembelahan: Tahap ini terjadi berturut-turut setelah terjadi pembuahan.
2. Blastulasi, Gastrulasi dan Neurulasi: blastulasi adalah tahap pembentukan blastula, terbentuknya rongga di tengah saat sel-sel morula mengalami pembelahan, yang disebut *blastocoel*. Proses selanjutnya adalah gastrulasi dimana terjadi pembentukan ektoderm, mesoderm, dan endoderm. Neurulasi adalah tahap pembentukan sistem syaraf.
3. Tahap Organogenesis: Tahap ini merupakan tahap pembentukan organ dan alat tubuh.

Setelah tahap gastrulasi, terjadi pembentukan *germ ring* yang mengelilingi seluruh bagian tepi embrio, dan *deep cell* membentuk 2 lapisan, yaitu *epiblast* (bagian luar), yang akan menumbuhkan *ectoderm*, dan *hypoblast* (bagian dalam), yang akan menumbuhkan *endoderm* (Kalthoff, 2001). Gastrulasi dimulai saat blastoderm memipih ke arah kuning telur dan menutupi kuning telur.Pada tahap neurulasi kuning telur yang tertutup blastoderm mengelilingi kutup vegetal dan mulai terbentuk kepala, otak dan syaraf. Tahap somite terjadi dengan ditandai adanya pmbentukan sirip pektoral, notochord, pembuluh darah dan insang. Setelah itu terjadi pelengkapan organ somite untuk persiapan penetasan (Ornamental Fish Information, 2003).

2.9 Hipotesis

Telur ikan mas (*Cyprinus carpio*) dapat teraktivasi dan melanjutkan perkembangan ke tahap selanjutnya setelah diaktivasi menggunakan ethanol 7% atau 6-DMAP.

BAB III

METODE PENELITIAN

1.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli 2008 sampai Mei 2009 di Laboratorium Fisiologi Hewan, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang dan di Balai Benih Ikan (BBI) Punten, Batu Malang.

1.2 Bahan dan Alat

3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: gelas ukur, erlenmeyer, *aluminium foil*, kain, wadah telur, *cotton bud*, cawan petri, baskom, *stopwatch*, *spuit*, aquarium, aerasi (pompa dan pipa), *heater*, termometer, *handtally counter*, mikroskop binokuler dan kamera digital.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: induk betina ikan mas, induk jantan ikan mas, telur ikan mas, sperma ikan mas, *ethanol* 7% (Sigma chemical Co.), *6-dimethylaminopurine* (6-DMAP) 200µM (Sigma chemical Co.), larutan *DMSO* (Sigma chemical Co.), akuades, *laktat ringer* (Otsuka), *methylen blue*.

3.3 Pemilihan Induk Ikan Mas Punten *(Cyprinus carpio)*

Induk ikan mas yang digunakan merupakan induk yang sudah dewasa (kira-kira berumur 1.5-3 tahun tahun) atau setelah induk mencapai berat tubuh 1.5-2.0 kg dan sudah matang gonad. Pemilihan induk juga harus memperhatikan kondisi fisiologis induk tersebut, induk harus dalam keadaan sehat (tidak menderita penyakit). Ikan-ikan yang sehat dan masih produktif biasanya ditandai juga dari gerakannya yang tangkas dan gesit, terutama induk jantan.

3.4 Persiapan Kolam Pemijahan

Kolam yang akan digunakan untuk kolam pemijahan induk ikan mas harus dibersihkan terlebih dahulu dan diisi dengan air bersih. Bagian dasar dari lantai kolam diberi kekaban untuk membantu ikan

dalam proses pemijahan. Kolam ini dibuat dengan ukuran kecil karena hanya berfungsi untuk mempertemukan induk jantan dan betina dan penetasan yaitu berukuran, 3x10 m^2 atau 6x10 m^2. Ketinggian pematang 1 meter dengan kedalaman air 60 cm sedangkan bagian pengeluaran 75 cm. Sebelum proses pemijahan dimulai biasanya kolam dikeringkan dan dijemur terlebih dahulu selama 2-3 hari.

3.5 Pemijahan dan *Stripping* Induk Ikan Mas

Pemijahan ikan dilakukan dengan cara memasangkan induk ikan mas jantan dan betina di dalam kolam pemijahan ikan dengan perbandingan jantan dan betina adalah 3:1. Selanjutnya ikan mas akan melakukan perkawinan secara alami yang berlangsung pada dini hari (tengah malam) dengan lama waktu yang dibutuhkan adalah 18 jam setelah dipasangkan. Setelah nampak tanda-tanda ikan mas mulai akan memijah, induk betina dan jantan ikan mas ditangkap dan dilakukan pengurutan (*stripping*) untuk mendapatkan telur dan sperma ikan mas. Telur-telur yang diperoleh ditampung dalam wadah telur dan sperma ditampung dalam *spuit* , kemudian wadah telur dan *spuit* ditutup dengan *aluminium foil* untuk menghindari kontak dengan udara dan sinar ultraviolet secara langsung yang dapat menyebabkan kerusakan dan kematian pada sperma maupun telur.

3.6 Pembuatan Larutan aktivator Ethanol 7%

Pembuatan larutan stok ethanol 7% dilakukan dengan mengencerkan ethanol absolut sebanyak 7 mL dalam aquades sampai volume larutan mencapai 100 mL.

3.7 Pembuatan Larutan aktivator 6-DMAP 200 µM

Pembuatan larutan stok 6-DMAP dilakukan dengan melarutkan 2,53 gram bubuk 6-DMAP dalam larutan *DMSO*. Setiap perlakuan memerlukan larutan sebanyak 5 mL dan kemudian diencerkan dalam aquades hingga 50mL.

3.8 Aktivasi Telur Ikan Mas *(Cyprinus carpio)*

Proses aktivasi telur Ikan Mas *(Cyprinus carpio)* dilakukan melalui 2 cara yaitu :

a. Aktivasi secara alami (fertilisasi) sebagai kontrol

Aktivasi telur secara alami dilakukan dengan mencampurkan antara telur dan sperma ikan mas. Sperma ikan mas terlebih dahulu diencerkan dengan laktat ringer dengan perbandingan 1:9 (1 ml sperma ikan mas ditambah 9 ml *laktat ringer*) kemudian dihomogenkan.

Telur ikan mas hasil stripping diambil sebagian dan diletakkan dalam mangkuk pengumpul telur yang berbeda. Sperma yang telah diencerkan dengan laktat ringer kemudian dimasukkan dalam mangkuk pengumpul telur sambil diaduk dengan menggunakan *cotton bud* untuk memaksimalkan pencampuran telur dengan sperma ikan mas dan dibiarkan selama 10 menit. Telur kemudian di tebar diatas cawan petri dengan menggunakan *cotton bud*, dicuci terlebih dahulu dengan air mengalir, kemudian diinkubasi dalam akuarium yang telah disiapkan.

b. Aktivasi buatan

b.1. Aktivasi menggunakan ethanol

Aktivasi telur ikan mas secara buatan dilakukan dengan cara merendam telur dalam ethanol dengan konsentrasi 7%. Ethanol dituang dalam cawan petri (kurang lebih ¾ cawan petri) kemudian telur hasil *stripping* ditebar dalam cawan petri dengan menggunakan *cotton bud*. Telur yang ditebar dalam cawan petri kurang lebih 50 butir. Telur direndam dalam ethanol selama 5, 10, 30 dan 60 menit kemudian dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan sisa ethanol.

Penebaran telur diusahakan secara merata dan tidak bertumpuk untuk mempermudah pengamatan dan agar proses aktivasi berlangsung maksimal. Proses aktivasi telur secara alami (fertilisasi) digunakan sebagai pembanding keberhasilan aktivasi telur secara buatan dengan menggunakan ethanol.

b.2. Aktivasi menggunakan 6-DMAP 200 µM

Aktivasi telur ikan mas secara buatan yang kedua dilakukan dengan cara merendam telur dalam 6-DMAP dengan konsentrasi 200µM. 6-DMAP dituang dalam cawan petri (kurang lebih ¾ cawan petri) kemudian telur hasil *stripping* ditebar dalam cawan petri dengan menggunakan *cotton bud*. Telur yang ditebar dalam cawan petri kurang lebih 50 butir. Telur ikan direndam dalam 6-DMAP

selama 5, 10, 30, dan 60 menit kemudian dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan sisa 6-DMAP.

Penebaran telur diusahakan secara merata dan tidak bertumpuk untuk mempermudah pengamatan dan agar aktivasi berjalan optimal. Proses aktivasi telur secara alami (fertilisasi) digunakan sebagai pembanding keberhasilan aktivasi telur secara buatan dengan menggunakan 6-DMAP.

3.9 Perawatan Telur

Telur dari masing-masing perlakuan ditempatkan dalam akuarium yang terpisah. Kondisi akuarium harus diperhatikan untuk menunjang proses perkembangan telur tersebut. Pada akuarium ditambahkan pemanas (*heater*) untuk menjaga suhu air sekitar 26-28^{0}C selain itu pada akuarium ditambahkan aerator/pompa sebagai penyuplai kebutuhan oksigen telur.

Kebersihan akuarium juga menjadi salah satu faktor utama yang mempengaruhi keberhasilan proses perkembangan telur. Diatur pH dan konduktivitas, air dalam akuarium harus diganti setiap 12 jam selain itu perlu ditambahkan *methylen blue* untuk mencegah serangan jamur. Telur yang tidak teraktivasi segera dibuang untuk menghindari adanya kontaminasi jamur.

3.10 Pengamatan

Pengamatan pada telur dilakukan pada setiap perlakuan, dimulai saat 10 menit setelah aktivasi dan kemudian pengamatan dilanjutkan setiap 1 jam setelah masuk *cleavage* sampai perkembangan embrio terakhir. Pengamatan dilakukan dibawah mikroskop binokuler. Telur yang teraktivasi akan tampak transparan dan jernih, zona perivetelin meluas dan tampak adanya pergerakan dalam sitoplasma sedangkan telur yang tidak teraktivasi akan putih pucat. Telur yang berkembang menjadi embrio ditandai dengan adanya bentukan menonjol pada bagian kutub animal. Telur yang berhasil teraktivasi dan melanjutkan perkembangan embrionya serta menetas dihitung pada setiap perlakuan.

3.12 Analisis Data

Penelitian ini diperlakukan dengan menggunakan ethanol 7 % dengan variasi lama perendaman 5, 10, 30, 60 menit; 6-DMAP 200µM dengan variasi lama perendaman 5, 10, 30, dan 60 menit, pada masing-masing unit percobaan diulang sebanyak 3 kali. Parameter yang diamati adalah aktivasi dan perkembangan telur pada setiap perlakuan. Data yang didapat dikonversi dalam satuan % dan dianalisis secara kualitatif dan kuantitatif. Analisa kualitatif dilakukan secara deskriptif. Sedangkan analisis kuantitatif dilakukan dengan menggunakan metode RAL faktorial yang diuji menggunakan ANOVA serta uji BNJ dengan α=0,05 bila berbeda nyata.

BAB IV
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Aktivasi Telur

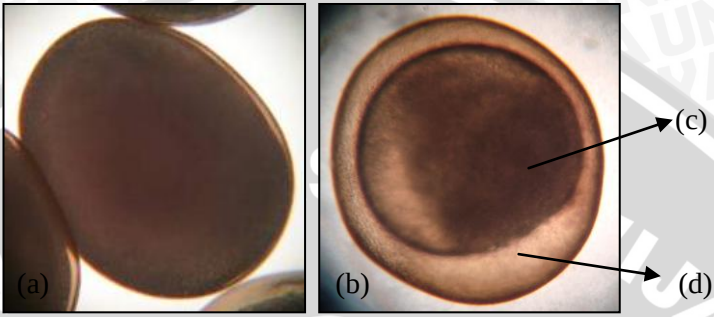
Pada penelitian ini aktivasi oosit dilakukan dengan pemberian ethanol 7% dan 6-DMAP 200 µM, masing-masing sebagai aktivator tunggal, dengan variasi waktu lama perendaman untuk setiap aktivator adalah 5, 10, 30 dan 60 menit. Variasi waktu yang digunakan bertujuan untuk melihat pengaruh dari lama perendaman terhadap keberhasilan oosit mengalami aktivasi dan melanjutkan perkembangannya. Perendaman telur dalam aktivator dapat memicu pelepasan kalsium intraselular dalam oosit. Pelepasan kalsium tersebut akan meningkatkan konsentrasi kalsium dalam oosit dan mengeluarkan oosit dari fase istirahat. Besarnya konsentrasi kalsium yang dihasilkan dimungkinkan dipengaruhi oleh lama perendaman pada aktivator yang digunakan. Fluktuasi konsentrasi kalsium mempunyai pengaruh besar terhadap respon oosit dan perkembangan oosit tersebut selanjutnya (Liu dkk., 2005).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa seluruh oosit yang diaktivasi dengan menggunakan kedua aktivator tersebut teraktivasi 100%. Oosit yang berhasil teraktivasi ditunjukkan dengan ciri-ciri visual yang dapat dilihat yaitu, melebarnya ruang perivettelin dan adanya aliran sitoplasma menuju ke bagian kutub animal dari oosit tersebut (Gambar 4.1), serta menurut Yamamoto *et al* (2001) aktivasi oosit ditandai dengan terjadinya reaksi *cortical alveoli*.

Menurut Murata (2006), reaksi kortikal ini disebabkan oleh perlekatan membran plasma sperma pada membran plasma telur sehingga menginduksi ion Ca^{2+} dalam telur pada sisi yang berlawanan dengan sisi perlekatan sperma dan telur, sehingga terjadi pelepasan muatan granula kortikal telur (terjadi reaksi kortikal). Sebagai akibat dari adanya reaksi kortikal granula tersebut maka terjadi pelebaran dari zona perivetellin telur.

Pada penelitian ini oosit yang diaktivasi secara partenogenesis, masing-masing memberikan respon yang sama dengan telur yang difertilisasi secara normal sebagai kontrol yaitu, semua oosit teraktivasi. Hal ini dimungkinkan bahwa setiap aktivator mampu memicu pelepasan kalsium intraselular dalam oosit sehingga oosit keluar dari fase istirahat dan dapat melanjutkan perkembangannya.

Menurut Sun *et* al (1991), pelepasan kalsium ke dalam ooplasma penting untuk mengaktivasi reaksi sistemik pada oosit yang kemudian akan berakhir dengan terjadinya pembelahan meiosis.



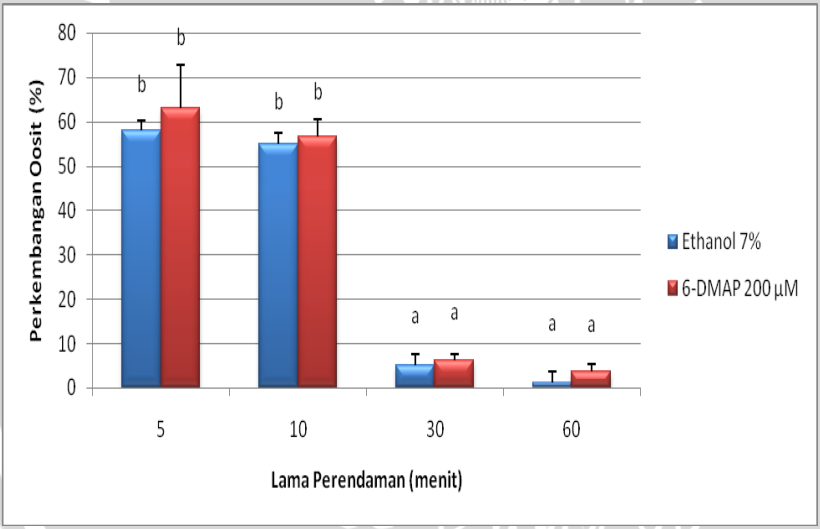
Gambar 4.1 Oosit tidak teraktivasi (a) dan oosit teraktivasi (b), c) pelebaran ruang perivetellin, (d) aliran sitoplasma menuju kutub animal telur

Perlakuan aktivasi buatan dengan pemberian ethanol 7% dengan variasi waktu 5, 10, 30 dan 60 menit menunjukkan bahwa perkembangan telur yang terbaik adalah pada waktu pemberian ethanol 7% selama 5 menit yaitu sekitar 58,15% (Gambar 4.2). Hasil perlakuan selama 5 menit tersebut mempunyai nilai yang paling tinggi dari seluruh perlakuan dengan pemberian ethanol 7%. Hasil perlakuan dengan nilai oosit yang berkembang tertinggi kedua adalah dengan pemberian ethanol 7% selama 10 menit, yang menunjukkan nilai perkembangan telur sekitar 54,92% (Gambar4.2). Nilai tersebut tidak jauh berbeda dengan hasil perlakuan selama 5 menit.

Perbedaan hasil tersebut dimungkinkan karena lama perendaman yang relatif tidak jauh berbeda menyebabkan kenaikan ion kalsium yang terjadi tidak jauh berbeda pula, sehingga perkembangan oosit yang dihasilkan relatif sama. Menurut Florman dan Ducibella (2006), keberhasilan perkembangan oosit tidak hanya bergantung dari kandungan ion kalsium (Ca^{2+}) dalam sel dan protein regulatornya, namun juga dipengaruhi oleh besarnya konsentrasi dan jumlah kalsium tersebut. Menurut Mcdougall dan Mark (1996), kenaikan ion kalsium secara signifikan saat proses aktivasi dapat mempengaruhi perkembangan telur lebih lanjut.

Hasil perlakuan dengan pemberian ethanol 7% mulai menunjukkan perbedaan yang signifikan atau berbeda nyata ($p<0,05$) yaitu antara lama perendaman selama 5 dan 10 menit dengan lama

perendaman selama 30 dan 60 menit, dimana perkembangan oosit pada pemberian ethanol 7% selama 30 dan 60 menit bernilai sekitar 5,15% dan 1,21% (Gambar 4.2). Selain itu, perlakuan aktivasi buatan dengan pemberian ethanol 7% menghasilkan tahap akhir perkembangan dari telur yang teraktivasi hanya mencapai fase blastula, kebanyakan telur mengalami kematian setelah berhasil teraktivasi, terutama pada perendaman selama 30 dan 60 menit. Hal tersebut dimungkinkan karena sifat negatif yang dimiliki oleh ethanol yang dapat merusak telur bila dipaparkan dalam waktu yang lama. Ethanol dapat mengganggu keseimbangan fungsi fisiologis sel yaitu dapat merusak membran plasma (Kinseth, 2006). Menurut Pressice (1994), pemaparan dalam ethanol dalam waktu yang pendek efisien mengaktivasi telur. Menurut Igusa *et al* (1996) dan Izant *et al* (1993) dalam Loi *et al* (1998), pelepasan kalsium dalam waktu yang lama dapat mereduksi viabilitas telur secara dramatis.



Gambar 4.2 Presentase perkembangan telur setelah perlakuan aktivasi buatan menggunakan ethanol 7% dan 6-DMAP 200 µM

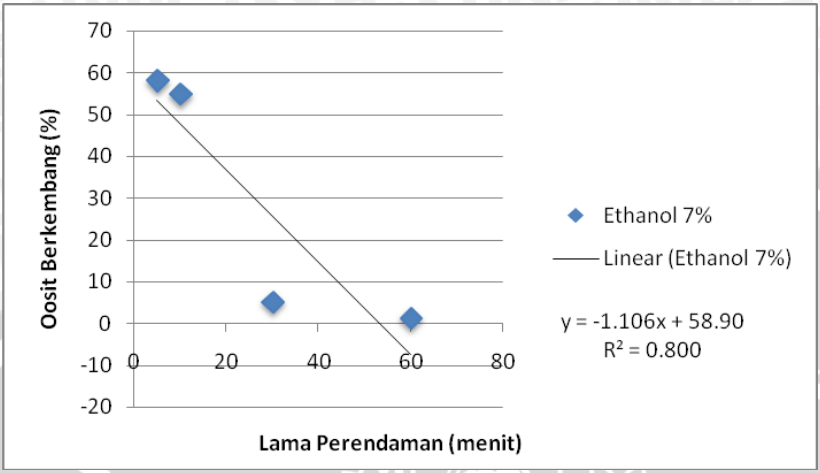
Perlakuan aktivasi buatan dengan pemberian 6-DMAP 200 µM menunjukkan hasil yang serupa dengan perlakuan aktivasi menggunakan ethanol 7%, dimana hasil perendaman dengan durasi waktu 5 dan 10 menit menghasilkan hasil yang lebih baik dan berbeda nyata ($p<0,05$) dengan hasil perlakuan perendaman selama

30 dan 60 menit. Perlakuan tersebut menunjukkan hasil terbaik perkembangan oosit yaitu pada perendaman selama 5 menit dengan nilai sebesar 62,94% (Gambar 4.2). Hasil perlakuan dengan nilai oosit berkembang tertinggi kedua adalah dengan pemberian ethanol 7% selama 10 menit, yang menunjukkan nilai perkembangan telur sekitar 56,52% (Gambar4.2). Hal tersebut mungkin disebabkan karena perendaman dalam waktu singkat lebih efisien dalam mengaktivasi sel telur serta dapat menjaga regulasi dalam sel telur sehingga tetap dapat berkembang dengan baik. Menurut Loi *et al*. (1998), perlakuan aktivasi pada telur mamalia yang diikuti dengan perendaman 6-DMAP, menunjukkan perkembangan partenogenetik yang maksimal.

Oosit yang berhasil berkembang dengan aktivasi buatan menggunakan 6-DMAP 200 µM ini juga menunjukkan perbedaan hasil yang signifikan saat dilakukan perendaman selama 30 dan 60 menit, yaitu masing-masing bernilai 6,34% dan 3,67% (Gambar 4.2). Hal tersebut dimungkinkan karena efek toksik dari larutan tersebut yang dapat merusak telur jika dipaparkan dalam waktu yang lama. Hal tersebut juga serupa dengan hasil perlakuan aktivasi buatan menggunakan ethanol 7 %. Menurut Kato *et al*. (1992) dalam Loi (1998) larutan 6-DMAP juga dapat bersifat toksik terhadap perkembangan embrio.

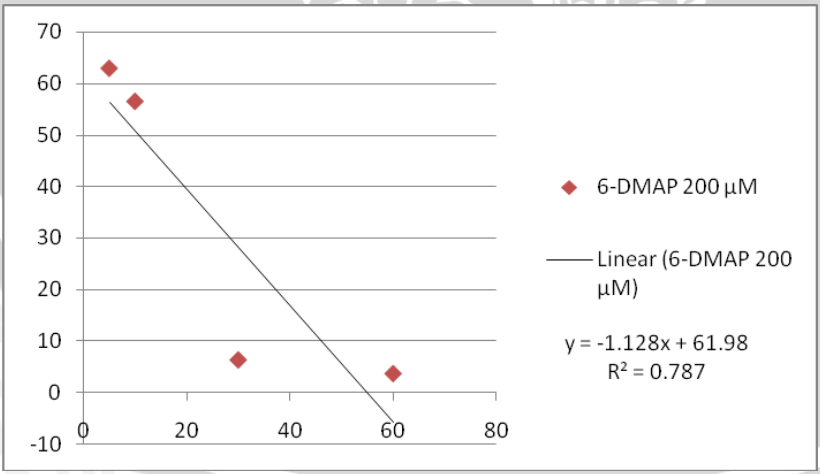
Menurut Fuadiyah (2007), selain dapat mengaktivasi telur larutan 6-DMAP juga dapat berperan sebagai penghambat fosforilasi protein, yaitu dengan menginduksi kondensasi kromatin dan mitosis sehingga sel mampu melanjutkan perkembangannya ke tahap berikutnya. Telur yang diaktivasi dengan menggunakan ethanol akan teraktivasi dengan baik, namun akan cepat mengalami kerusakan karena terjadi fosforilasi protein yang jika tidak dihambat akan menyebabkan telur tidak mengalami pembelahan mitosis. Menurut Alberio (2001), 6-DMAP menginduksi terjadinya defosforilasi protein yang dapat berperan sebagai kontrol mitosis.

Secara keseluruhan telur yang diaktivasi menggunakan 6-DMAP 200 µM dan ethanol 7% menunjukkan hasil perkembangan yang tidak jauh berbeda, perbedaan nyata terlihat pada lama perendaman selama 10 dan 30 menit (Gambar 4.2). Perkembangan telur yang diaktivasi dengan kedua aktivator hanya berbeda dengan kontrol perlakuan yang mencapai 91,38%.



Gambar 4.3 Uji regresi perlakuan Ethanol 7%

Variasi lama perendaman yang digunakan mempunyai pengaruh negatif terhadap perkembangan oosit, dimana pada kedua perlakuan, menggunakan 6-DMAP 200µM maupun ethanol 7%, semakin lama waktu perendaman yang dilakukan, oosit yang mampu berkembang semakin sedikit atau semakin kecil nilai prosentasenya ($p<0,05$) (Gambar 4.3 dan 4.4).



Gambar 4.4 Uji regresi perlakuan 6-DMAP 200 µM

4.2 Perkembangan Telur

Perlakuan aktivasi buatan menggunakan ethanol 7% menghasilkan bentukan *blastodisc* yang ditandai dengan masih adanya aliran sitoplasma menuju kutub animal dapat dilihat dengan jelas (Gambar 4.5). Hal ini sama dengan tahap awal pembelahan pada proses fertilisasi normal. Tahapan tersebut selanjutnya diikuti oleh tahap pembelahan 2 sel, yang juga dapat dilihat dengan jelas. Tahapan 2 sel ini ditandai dengan terbentuknya 2 *blastomer*, sel-sel kecil hasil pembelahan, pada daerah *blastodisc*. Kedua *blastomer* ini mempunyai ukuran yang sama besar (Gambar 4.5) Tahapan ini ditemukan pada setiap telur yang diaktivasi menggunakan ethanol 7% pada masing-masing lama perendaman.

(a)

(b)

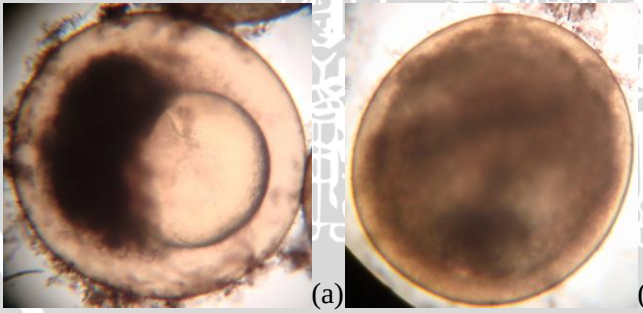
Gambar 4.5 Telur yang diaktivasi menggunakan ethanol 7%, (a) tahapan pembentukan blastodisc, (b) tahapan 2 sel

Perkembangan telur setelah proses aktivasi diawali dengan terbentuknya *animal pole* (kutub animal) telur dan *vegetal pole* (kutub vegetal) telur, yang ditandai dengan adanya aliran sitoplasma menuju kutub animal. Proses ini kemudian dilanjutkan dengan terbentuknya *blastodisc*, bentukan bukit hasil aliran sitoplasma yang bebas *yolk* (kuning telur)yang kemudian akan dilanjutkan dengan proses *cleavage* (pembelahan) pada daerah tersebut dan diikuti pula dengan tahapan pembelahan selanjutnya (Gilbert, 2001). Hal tersebut terjadi pada sel telur yang diaktivasi dengan ethanol 7% maupun 6-DMAP 200 µM (Gambar 4.5). Menurut Gilbert (2001), pembelahan pada telur ikan hanya terjadi pada daerah sitoplasma bebas kuning telur yang terdapat di daerah kutub animal telur, daerah ini disebut

dengan *blastodisc*. Pembelahan ini disebabkan adanya fluktuasi kalsium yang dapat menstimulasi kontraksi sitoskeleton aktin dan menekan sitoplasma bebas kuning telur menuju kutub animal.

Tahapan 2 sel merupakan tahap terakhir yang paling banyak dicapai oleh telur yang diaktivasi menggunakan ethanol 7%, adapun tahap lain yang dapat dicapai adalah tahap blastula abnormal. Tahapan ini merupakan tahapan akhir yang dapat dicapai, karena setelahi tiu sel telur mengalami kematian. Tahap ini dapat dicapai setelah 6-7 jam perlakuan (Gambar 4.6). Menurut *Liu et al*. (1998), Telur yang diberi perlakuan dengan ethanol saja mampu mencapai tahapan blastosis.

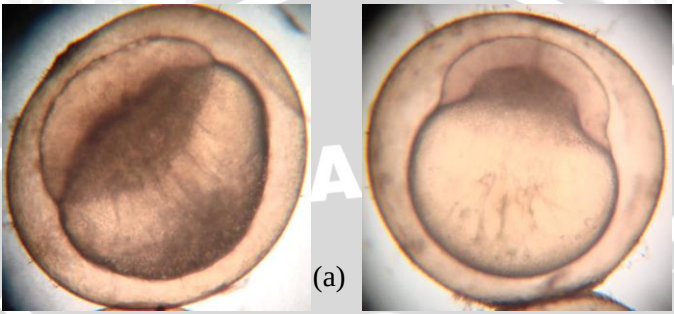
Tahapan blastula abnormal ditemukan pada telur yang direndam dalam ethanol 7% selama 5 dan 10 menit. Sedangkan telur yang lain, terutama yang direndam selama 30 dan 60 menit banyak yang mengalami kematian terutama setelah 2-3 jam setelah perlakuan (Gambar 4.6). Hal ini dimungkinkan karena efek negatif yang dihasilkan ethanol, yang dapat menyebabkan rusaknya oosit. Menurut Kinseth (2006), ethanol dapat menyebabkan fungsi fisiologis sel terganggu dan dapat pula menyebabkan dehidrasi sel jika dipaparkan terlalu lama pada telur. Selain itu kandungan ion kalsium yang diduga semakin tinggi akibat pemaparan ethanol yang terlalu lama dapat menyebabkan proses fosforilasi protein semakin meningkat dan dapat merusak telur itu sendiri.



Gambar 4.6 Telur yang diaktivasi menggunakan ethanol 7%, (a) blastula abnormal yang mengalami kematian, (b) telur mati

Perlakuan aktivasi menggunakan 6-DMAP 200 µM menunjukkan hasil yang serupa dengan perlakuan aktivasi buatan menggunakan ethanol 7%. Tahapan pembelahan telur yang diaktivasi

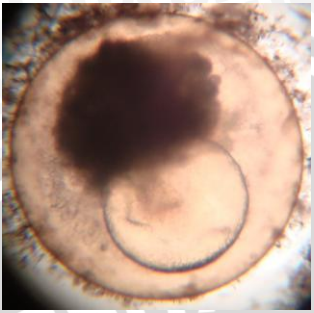
dengan 6-DMAP 200 µM diawali dengan terbentuknya *blastodisc* (Gambar 4.7). Hal ini sama dengan hasil perlakuan fertilisasi normal dan aktivasi buatan menggunakan ethanol 7%



Gambar 4.7 Telur yang diaktivasi menggunakan 6-DMAP 200 µM, (a) tahap pembentukan *blastodisc*, (b) tahap *blastodisc* abnormal

Tahapan *blastodisc* yang dihasilkan dari perlakuan 6-DMAP 200 µM banyak yang mengalami perkembangan abnormal dan tidak berhasil mengalami pembelahan 2 sel, meskipun tidak semua telur mengalami hal yang serupa. Tahap tersebut ditandai dengan *blastodisc* yang menjadi mengecil dan melengkung ke samping dalam dengan warna gelap di bagian tengah (Gambar 4.7). Hal ini dimungkinkan karena penghambatan fosforilasi protein oleh 6-DMAP yang dapat mempengaruhi perkembangan telur selanjutnya setelah teraktivasi.

Menurut Fuadiyah (2007), perubahan morfologi sel secara abnormal dapat disebabkan oleh proses sitokinesis yang tidak sempurna, sehingga mempengaruhi pembagian sitoplasma yang berpengaruh pada abnormalitas pembelahan sel. Larutan 6-DMAP berpengaruh langsung pada komponen sitoskeleton. Sitoskeleton berperan dalam mengatur dan menjaga bentuk sel, penempatan organel, membantu proses endositosis dan sitokinesis, pemisahan anakan sel setelah pembelahan sel selama perkembangan sel (Simily, 1997). Menurut Fuente dan King (1998), pengaruh 6-DMAP terjadi pada kromatin dan susunan mikrotubulus selama meiosis melalui penghambatan fosforilasi protein.



Gambar 4.8 Telur tahap blastula abnormal yang mengalami kematian setelah diaktivasi menggunakan 6-DMAP 200 µM

Tahapan terbaik yang dapat dicapai oleh telur yang diaktivasi menggunakan 6-DMAP 200 µM adalah blastula abnormal, hal ini sama dengan tahapan terbaik yang dapat dicapai oleh telur yang diaktivasi menggunakan ethanol 7%. Tahapan ini dapat dicapai 5-6 jam setelah perlakuan dan ditemukan pada perlakuan perendaman selama 5 dan 10 menit. Sama halnya dengan perlakuan ethanol 7% selama 30 dan 60 menit, kebanyakan telur yang direndam 6-DMAP 200 µM selama 30 dan 60 menit tidak dapat melanjutkan perkembangannya karena mengalami kematian (Gambar 4.8). Hal ini dimungkinkan efek toksik serta sebagai akibat dari penghambatan fosforilasi protein oleh 6-DMAP sehingga mengganggu perkembangan telur jika dipaparkan dalam waktu lama.

BAB V
PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Telur ikan mas (*Cyprinus carpio*) setelah diaktivasi secara buatan menggunakan ethanol 7% dan 6-DMAP 200 µM teraktivasi 100 %. Variasi lama perendaman pada perlakuan aktivasi buatan menggunakan ethanol 7% yaitu 5, 10, 30 dan 60 menit menghambat perkembangan telur dimana semakin lama waktu perendaman, oosit yang mampu berkembang semakin kecil nilai presentasenya.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang hubungan fluktuasi kalsium sebagai proses awal aktivasi oosit dengan aktivator tunggal yang digunakan, sehingga dapat diketahui lebih lanjut tingkat keefektifan aktivator tunggal dalam mengaktivasi oosit.

DAFTAR PUSTAKA

Alberio, R., V. Zakhartchenko., J. Motlik., dan E. Wolf. 2001. Mamalian Oocyte Activation: Lessons from the Sperm and Implication for Nuclear Transfer. Int. J. Dev. Biol. 45: 797-809

Anonymous. 2005. Common Carp-*Cyprinus carpio*. http://elib.cs.berkeley.edu/kopec/tr9/html/sp-common-carp.html. Diakses 10 Januari 2008.

Axxora. 2006. Cyclin-dependent Kinase [CDKs] & cyclin Related Product. http://www..axxora.com. Diakses 10 Januari 2008.

Bodart, J. F., J. L. Rodeau., J. P. Vilain., dan S. Flamen. 2001. C-Mos Proteolysis Is Independent of The Ca^{2+} Rice Induced by 6-DMAP in *Xenopus* Oocytes. Experimental Cell Research. Vol: 266. Pages: 187-192

Campbell, N.A., J.B. Reece., dan L.G. Mitchell. 2000. BIOLOGY Fifth Edition. Addison Wesley Longman, Inc. New York.

Draetta G, E. J. (1997). "Cdc25 protein phosphatases in cell proliferation.". *Biochim. Biophys. Acta* 1332 (2): M53-63

Florman, H.M., dan T. Ducibella. 2006. Fertilization in Mammals. Knobil And Neills Physiology Of Reproduction Third Edition Volume I. Elsevier Inc. St Louis

Fuadiyah, S. 2007. Pengaruh Variasi Waktu Perendaman Telur Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) dalam *6-dimethylaminopurine* (6-DMAP) Terhadap Aktivasi dan Perkembangan Embrio Partenogenetik. Universitas Brawijaya. Malang

Fujaya, Y. 2002. Fisiologi Ikan Dasar Pengembangan teknologi Perikanan

Gilbert, S. F. 2000. Developmental Biology, Sixth Edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts

Goudet G., Francois B., Bezart J., dan Nadine G. 1998. Maturation-Promoting Factor and Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) expression in Relating to Oocyte Competence for Invitro Maturation in the Mare. Molecular Human Reproduction vol 4 no. 6 pp. 563-570

Grupen, C. G., M. B. Nottle., dan H. Nagasawa. 2002. Calsium release at fertilisation: Artificially Mimicking the Oocyte's Response to Sperm. Journal of Reproduction and Development, vol. 48, No.4

Inoue, S., dan Y. Inoue. 1986. Fertilization (Activation)-induced 200- to 9-kDa Depolymerization of Polysialoglyeoprotein, a Distinct Component of Cortical Alveoli of Rainbow Trout Eggs. The Journal of Biological Chemistry, Vol. 261, No. 12

Ito J., M. Shimada., dan T. Terada. 2004. Mitogen-Activated Protein Kinase Inhibitor Suppresses cyclin B1 Synthesis and Reactivation of $p34^{cdc2}$ Kinase, Which Improve Pronuclear Formation Rate in Mature Porcine Oocyte Activated by Ca^{2+} Ionophore. Biology of Reproduction 70, 797-804

Kalthoff, K. 2001. Analysis of Biologycal Development. McGraw Hill. New York

Kimball, J.W. 1999. Biologi edisi ke-5. Alih bahasa: Siti Soetarmi dan Sugiri. Erlangga. Jakarta

Liu, L., J. C. Ju., dan X. Yang. 1998. Differential of Maturation-Promoting Factor and Mitogen-Activated Protein Kinase Following Parthenogenesis Activation of Bovine Oocytes. http://www.biolreprod.com/cgi/content/full/59/3/537

Liu, S.Z., J. M. Xi., Y. L. Ying., J. Yan., O.Y. Chun., S. Q. Yuan., dan C. D. Yuan. 2005. Parthenogenetic and Nuclear Transfer

Rabbit Embryo Development and Apoptosis After Activation Treatments. Mol Reprod. 72:48-53

Loi, P., S. Ledda, J.Fulka, Jr., P. Cappai, dan R.M. Moor. 1998. Development of Parthenogenetic and Cloned Ovine Embryo: Effect of Activation Protocols. Biology of Reproduction 58, 1177-1187

Runft, L. L., L. A. Jaffe., dan L. M. Mehlmann. 2002.Egg Activation at Fertilization: Where Tt All Begins. Int. J. Dev. Biol.245: 237-254

Meo, S. C., L. V. Claudia, dan M. C. Joaquim. 2003. Activation And Early Partenogenesis Of Bovine Oocytes Treated With Ethanol And Strontium. Animal repro. Science.

Murata, K. 2006. Early Life Stages of Carp *(Cyprinus Carpio* L.) Depend on Ambient Magnesium for Their Development. http://www.lib.noaa.gov/japan/aquaculture/proceedings/report32/murataUS_corrected.pdf. Tanggal akses 10 Desember 2007.

Ornamental Fish Information. 2003. Cara Reproduksi Ikan. http://o-fish.com/Artikel/CaraReproduksiIkan.htm

Ongeri, E. M, C.L. Borman, R. E. Butler, D. Melican, W. G. Gavin, Y. Echelard, R. L. Krisher dan E. Behbodi. 2000. Development of Goat Embryos After In Vitro Fertilization and Parthenogenetic Activation By Different Method. J. Theriogenelogy Vol 55(9):1933-1945

Pressice G.A., Yang X. 1994. Partenogenetic Development of Bovine Oocytes Matured In Vitro for 24 Hour and Activated by Ethanol an Cycloheximide. Mol Reprod. 380-5

Rhee, S.G. 2001. Regulation of phosphoinositide-spesific phospholipase C. Annu. Rev. Biochemistry. 70: 281-312

Saunders, M.D. 2004. Virgin Birth or Partenogenesis. Http://www. Braincourse.com/virga.html. Tanggal akses : 3 Januari 2007

Shakhashiri. 2005. Ethanol. Http://scifun.chem.wisc.edu/chemweek/ETHANOL/ethanol.html. Tanggal akses : 10 Februari 2008.

Shao, K.T., J.S. Yang, K.C. Chen, dan Y.S. Lee. 2001. An Identification Guide of Marine Fish Eggs from Taiwan. http://fishdb.sinica.edu.tw/2001new/fishegg/fisheggintro_e.htm. Diakses tanggal 10 Februari 2008.

Stricker, S.A. 1999. Comparative Biology of Calcium Signaling during Fertilization and Egg Activation in Animals. Developmental Biology 211, 157-176

Suryati, D. 1999. Ikan Mas. Http://www.kpel.or.id/TTGP/komoditi/MAS1.htm. Tanggal akses : 2 Desember 2007.

Susanto, H. 1987. Budidaya Ikan Pekarangan. Penebar Swadaya. Jakarta

Susko-Parrish JL, Liefried-Rutledge ML, Northey DL, Schutzkus V, Fist NL. 1994. Inhibition Of Protein Kinase After Induced Calcium Transient Causes Transition Of Bovine Oocytes To Embryonic Cycles Without Meiotic Completion. Developmental Biology 166: 729-739

Suzuki, H., N. Kagawa dan K. Tokoyama. 2002. Pronuclear Migration and Cytoskeletal Organization of Porcine Oocytes activated by Various Stimuli. http://www.nature.cc.hirosaki-u.ac.jp/lab/3/animsci/PDF/JMOR_19_096.pdf. Diakses 5 Februari 2008.

Tang, U. M., Affandi, dan Ridwan. 2000. Biologi Reproduksi Ikan. Pusat Penelitian Kawasan Pantai dan Perairan Universitas Riau. Pekanbaru

Yamamoto, S., Nakagawa, K., Nakasaka, H., Aono, T. 2001. Fertilization Failure and Oocyte Activation Center for Maternity and Perinatal Care and Department of Obstetrics and Gynecology. The University of Tokushima School of Medicine, Tokushima, Japan

Yatim, W. 1994. Reproduksi dan Embriologi. Tarsito. Bandung.

Wikipedia. 2008. Ethanol. http://wikipedia.org. diakses tanggal 12 Januari 2008.

Lampiran 1. Skema Kerja

a. Skema Percobaan

1. Pengambilan telur dan sperma

Induk Jantan dan Induk Betina (siap memijah)

- di *stripping*
- telur ditampung dalam wadah telur dan ditutup *aluminium foil*
- sperma disedot menggunakan spuit dan dilapisi dengan *aluminium foil*
- sperma diencerkan dengan *laktat ringer* dengan perbandingan 1:9 (sperma : laktat ringer)

Telur dan sperma

2. Aktivasi tunggal dengan ethanol 7% dan *6-dimethylaminopurine* (200µM)

2.1 Cawan petri

- diisi dengan ethanol 7%

Telur

- ditebar dalam cawan menggunakan *cotton bud*
- direndam selama 5,10,30 dan 60 menit
- dibilas dengan air mengalir 3 kali

Inkubasi

- diinkubasi dalam aquarium sampai perkembangan embrio yang terakhir atau sampai menetas
- diamati 10 menit setelah proses aktivasi dan setiap 1 jam setelah masuk *cleavage*
- di dokumentasikan, dicatat dan dihitung setiap perkembangan embrio
- Air aquarium diganti setiap 12 jam+methylen blue

Telur berkembang

2.2 Cawan petri

- diisi dengan *6-dimethylaminopurine* (200µM)

Telur

- ditebar dalam cawan menggunakan *cotton bud*
- direndam selama 5,10,30 dan 60 menit
- dibilas dengan air mengalir 3 kali

Inkubasi

- diinkubasi dalam aquarium sampai perkembangan embrio yang terakhir atau sampai menetas
- diamati 10 menit setelah proses aktivasi dan setiap 1 jam setelah masuk *cleavage*
- di dokumentasikan, dicatat dan dihitung setiap perkembangan embrio
- Air aquarium diganti setiap 12 jam+methylen blue

Telur berkembang

3. Kontrol fertilisasi normal

Cawan petri

- telur dan sperma dicampur selama 10 menit

Telur terfertilisasi

- ditebar dalam cawan petri berair menggunakan *cotton bud*
- dibilas dengan air mengalir 3 kali

Inkubasi

- diinkubasi dalam aquarium sampai perkembangan embrio yang terakhir atau sampai menetas
- diamati 10 menit setelah proses aktivasi dan setiap 1 jam setelah masuk *cleavage*
- di dokumentasikan, dicatat dan dihitung setiap perkembangan embrio
- Air aquarium diganti setiap 12 jam+methylen blue

Telur berkembang

Lampiran 2. Pembuatan larutan Stok

1. **Pembuatan larutan ethanol 7%**
   1 kali perlakuan membutuhkan 100 mL ethanol 7%
   pengenceran : 7 mL ethanol absolute diencerkan dengan aquades sebanyak 93 mL
2. **Pembuatan larutan 6-DMAP**
   Konsentrasi yang dibutuhkan = 200 µM
   Volume akhir yang dibutuhkan = 50 mL
   BM 6-DMAP = 253
   Jika volume stok yang dibuat 5 mL maka:
   M1 x V1 = M2 x V2
   M1 x 5 mL = 200 µM x 50 mL
   M1 = 2000 µM = 2×10^{-3} M
   w = mol x BM
   mol =M x V
   mol = 2×10^{-3} M x 5 mL = (2×10^{-3} M) x (5×10^{-3} L)
   mol = 10×10^{-6} mol
   w (gram) = mol x BM
   w (gram) = 10×10^{-6} mol x 253
   w (gram) = 2530×10^{-6}
   w = 2,53 mg

Lampiran 3. Data Oosit yang berhasil berkembang

Aktivator	Lama Perendaman	Tahap Perkembangan	
		Rata-rata telur teraktivasi (%)	Rata-rata telur berkembang (%)
Ethanol 7%	5 menit	100	58.15
	10 menit	100	54.92
	30 menit	100	5.15
	60 menit	100	1.21
DMAP 200 µM	5 menit	100	62.94
	10 menit	100	56.52
	30 menit	100	6.34
	60 menit	100	3.67
Kontrol		100	91.38

Lampiran 4. Tabel uji Statistik

TABEL ANOVA

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	Teraktivasi	.000[a]	7	.000	.	.
	TelurBerkembang	18372.413[b]	7	2624.630	136.830	.000
Intercept	Teraktivasi	247741.935	1	247741.935	.	.
	TelurBerkembang	23982.398	1	23982.398	1250.279	.000
Perlakuan	Teraktivasi	.000	1	.000	.	.
	TelurBerkembang	39.020	1	39.020	2.034	.172
LamaPerendaman	Teraktivasi	.000	3	.000	.	.
	TelurBerkembang	18338.025	3	6112.675	318.673	.000
Perlakuan * LamaPerendaman	Teraktivasi	.000	3	.000	.	.
	TelurBerkembang	12.710	3	4.237	.221	.881
Error	Teraktivasi	.000	17	.000		
	TelurBerkembang	326.088	17	19.182		
Total	Teraktivasi	250000.000	25			
	TelurBerkembang	44611.129	25			
Corrected Total	Teraktivasi	.000	24			
	TelurBerkembang	18698.501	24			

a. R Squared = . (Adjusted R Squared = .)

b. R Squared = .983 (Adjusted R Squared = .975)

Lampiran 5.

TABEL UJI LANJUT BNJ

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) LamaPerendaman	(J) LamaPerendaman	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
TelurBerkembang	5	10	4.4831	2.43663	.290	-2.4432	11.4094
		30	54.4548*	2.43663	.000	47.5285	61.3810
		60	57.7564*	2.43663	.000	50.8302	64.6827
	10	5	-4.4831	2.43663	.290	-11.4094	2.4432
		30	49.9717*	2.52861	.000	42.7839	57.1594
		60	53.2733*	2.52861	.000	46.0856	60.4611
	30	5	-54.4548*	2.43663	.000	-61.3810	-47.5285
		10	-49.9717*	2.52861	.000	-57.1594	-42.7839
		60	3.3017	2.52861	.572	-3.8861	10.4894
	60	5	-57.7564*	2.43663	.000	-64.6827	-50.8302
		10	-53.2733*	2.52861	.000	-60.4611	-46.0856
		30	-3.3017	2.52861	.572	-10.4894	3.8861

Based on observed means.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran 6. Tabel Subset

TABEL SUBSET

TelurBerkembang

Tukey HSD[a,b,c]

LamaPerendaman	N	Subset	
		1	2
60	6	2.4450	
30	6	5.7467	
10	6		55.7183
5	7		60.2014
Sig.		.558	.305

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = 19.182.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.222.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

c. Alpha = .05.