



**Analisis Peranan Sperma dan Urin Sebagai Feromon Jantan
Terhadap Reproduksi Betina Ikan Kerapu Macan
(*Epinephelus fuscoguttatus*)**

DISERTASI



OLEH :

APRI. I. SUPRI

NIM. 147080100111004

**PROGRAM DOKTOR ILMU PERIKANAN DAN KELAUTAN
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2018



**Analisis Peranan Sperma dan Urin Sebagai Feromon Jantan
Terhadap Reproduksi Betina Ikan Kerapu Macan
(*Epinephelus fuscoguttatus*)**

DISERTASI

Untuk Memenuhi Persyaratan Memperoleh Gelar Doktor



OLEH :

APRI. I. SUPRI

NIM. 147080100111004

**PROGRAM DOKTOR ILMU PERIKANAN DAN KELAUTAN
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

**LEMBAR PENGESAHAN**

Judul : Analisis Peranan Sperma Dan Urin Sebagai Feromon Jantan Terhadap Reproduksi Betina Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*)

Nama Mahasiswa : Apri I Supii

NIM : 147080100111004

Program Studi : Program Doktor Ilmu Perikanan dan Kelautan

Program Minat : Budidaya Perairan Tropis

Menyetujui :
Komisi Pembimbing
Promotor

Prof. Dr. Ir. Diana Arfiati, MS
NIP : 195912301985032002

Ko-Promotor 1

Ko-Promotor 2

Dr. Ir. Maheno Sri Widodo, MS
NIP : 196004251985031002

Dr. Yuni Kilawati, S.Pi, MSi
NIP : 197307022005022004

Mengetahui

Dekan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Ir. Happy Nursyam, MS
NIP : 196003221986011001

**IDENTITAS PENGUJI DISERTASI**

Judul : Analisis Peranan Sperma Dan Urin Sebagai Feromon Jantan Terhadap Reproduksi Betina Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscogutattus*)

Nama Mahasiswa : Apri I Supii

NIM : 147080100111004

Program Studi : Program Doktor Ilmu Perikanan dan Kelautan

Program Minat : Budidaya Perairan Tropis

Komisi Pembimbing

Promotor : Prof. Dr. Ir. Diana Arfiati, MS

Ko-Promotor 1 : Dr. Ir. Maheno Sri Widodo, MS

Ko-Promotor 2 : Dr. Yuni Kilawati, S.Pi, MSi

Komisi Penguji

Penguji 1 : Dr. Uun Yanuhar, SPi, MSi

Penguji 2 : Dr. Ating Yuniarti, SPi, M.Aqua

Penguji 3 : Dr. Ir. Umie Lestarie, MSi

Penguji 4 : Dr. Akhmad Taufiq Mukti, SPi, MSi

**IDENTITAS TAHAPAN UJIAN DISERTASI**

Judul : Analisis Peranan Sperma Dan Urin Sebagai Feromon Jantan Terhadap Reproduksi Betina Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*)

Nama Mahasiswa : Apri I Supii

NIM : 147080100111004

Program Studi : Program Doktor Ilmu Perikanan dan Kelautan

Program Minat : Budidaya Perairan Tropis

Komisi Pembimbing

Promotor : Prof. Dr. Ir. Diana Arfiati, MS

Ko-Promotor 1 : Dr. Ir. Maheno Sri Widodo, MS

Ko-Promotor 2 : Dr. Yuni Kilawati, S.Pi, MSi

Tahapan Ujian

1. Ujian Kulaifikasi Proposal : 23 November 2015
2. Sidang Komisi Proposal Disertasi : 18 Januari 2016
3. Evaluasi Kelayakan Proposal Disertasi : 18 Oktober 2016
4. Ujian Proposal Disertasi : 20 Februari 2017
5. Sidang Komisi Hasil Disertasi : 8 Februari 2018
6. Evaluasi Kelayakan Disertasi : 6 Maret 2018
7. Seminar Hasil Disertasi : 31 Mei 2018
8. Ujian Akhir Disertasi : 11 Juli 2018

**PERNYATAAN ORISINALITAS**

Dengan ini saya menyatakan bahwa disertasi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang tertulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan disertasi ini merupakan hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut sesuai dengan Peraturan Menteri Pendidikan Nasional Republik Indonesia Nomor 17 Tahun 2010.

Malang, Juli 2018

Mahasiswa

Apri I. Supii

NIM. 14708010011100

**LEMBAR PENGESAHAN**

Judul : Analisis Peranan Sperma Dan Urin Sebagai Feromon Jantan Terhadap Reproduksi Betina Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*)

Nama Mahasiswa : Apri I Supii

NIM : 147080100111004

Program Studi : Program Doktor Ilmu Perikanan dan Kelautan

Program Minat : Budidaya Perairan Tropis

Menyetujui :

Komisi Pembimbing
Promotor

Prof. Dr. Ir. Diana Arfiati, MS

NIP : 195912301985032002

Ko-Promotor 1

Ko-Promotor 2

Dr. Ir. Maheno Sri Widodo, MS

NIP : 196004251985031002

Dr. Yuni Kilawati, S.Pi, MSi

NIP : 197307022005022004

Mengetahui

Dekan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Ir. Happy Nursyam, MS

NIP : 196003221986011001

**IDENTITAS PENGUJI DISERTASI**

Judul : Analisis Peranan Sperma Dan Urin Sebagai Feromon Jantan Terhadap Reproduksi Betina Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*)

Nama Mahasiswa : Apri I Supii

NIM : 147080100111004

Program Studi : Program Doktor Ilmu Perikanan dan Kelautan

Program Minat : Budidaya Perairan Tropis

Komisi Pembimbing

Promotor : Prof. Dr. Ir. Diana Arfiati, MS

Ko-Promotor 1 : Dr. Ir. Maheno Sri Widodo, MS

Ko-Promotor 2 : Dr. Yuni Kilawati, S.Pi, MSi

Komisi Penguji

Penguji 1 : Dr. Uun Yanuhar, SPI, MSi

Penguji 2 : Dr. Ating Yuniarti, SPI, M.Aqua

Penguji 3 : Dr. Ir. Umie Lestarie, MSi

Penguji 4 : Dr. Akhmad Taufiq Mukti, SPI, MSi

**IDENTITAS TAHAPAN UJIAN DISERTASI**

Judul : Analisis Peranan Sperma Dan Urin Sebagai Feromon Jantan Terhadap Reproduksi Betina Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*)

Nama Mahasiswa : Apri I Supii

NIM : 147080100111004

Program Studi : Program Doktor Ilmu Perikanan dan Kelautan

Program Minat : Budidaya Perairan Tropis

Komisi Pembimbing

Promotor : Prof. Dr. Ir. Diana Arfiati, MS

Ko-Promotor 1 : Dr. Ir. Maheno Sri Widodo, MS

Ko-Promotor 2 : Dr. Yuni Kilawati, S.Pi, MSi

Tahapan Ujian

1. Ujian Kulaifikasi Proposal : 23 November 2015

2. Sidang Komisi Proposal Disertasi : 18 Januari 2016

3. Evaluasi Kelayakan Proposal Disertasi : 18 Oktober 2016

4. Ujian Proposal Disertasi : 20 Februari 2017

5. Sidang Komisi Hasil Disertasi : 8 Februari 2018

6. Evaluasi Kelayakan Disertasi : 6 Maret 2018

7. Seminar Hasil Disertasi : 31 Mei 2018

8. Ujian Akhir Disertasi : 11 Juli 2018



PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa disertasi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang tertulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan disertasi ini merupakan hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut sesuai dengan Peraturan Menteri Pendidikan Nasional Republik Indonesia Nomor 17 Tahun 2010.

Malang, Juli 2018

Mahasiswa

Apri I. Supii

NIM. 147080100111004



RIWAYAT HIDUP



Buleleng, Bali

Penulis bernama lengkap Apri I. Supii lahir di Jombang

Propinsi Jawa Timur pada tanggal 20 April 1976 merupakan anak ketiga dari empat bersaudara. Penulis lahir dari

pasangan suami istri Bapak Miskan dan Ibu Chomujayanah.

Penulis sekarang bertempat tinggal di Perumahan Perikanan

Desa Sanggalangit, Kecamatan Gerokgak, Kabupaten

Buleleng, Bali

Penulis menyelesaikan pendidikan dasar di Sekolah Dasar Negeri 1 Rumah

Tiga Ambon pada tahun 1988, kemudian melanjutkan sekolah menengah pertama di

SLTP Negeri 7 Ambon dan lulus pada tahun 1991, dan kemudian melanjutkan

pendidikan di SMA Negeri 3 Ambon lulus pada tahun 1994, kemudian melanjutkan

jenjang pendidikan ke Universitas Pattimura pada Tahun 1994 dengan jurusan

Manajemen Sumberdaya Perairan Fakultas Perikanan. Penulis lulus S1 di

universitas ini pada tahun 1999.

Penulis berkesempatan bekerja sebagai PNS pada tahun 2003 di Balai

Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol, Bali. Penulis berkesempatan sekolah

kembali pada jenjang strata 2 di Universitas Udayana, Bali pada program

pascasarjana dengan jurusan ilmu lingkungan dengan minat lingkungan pesisir pada

tahun 2007 dan lulus pada tahun 2009. Pada tahun 2014 penulis mendapatkan

kesempatan tugas belajar di Universitas Barawijaya, Malang pada program doctor

perikanan dan ilmu kelautan. Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Doktor di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, penulis menyusun disertasi yang

berjudul “Analisis Peranan Sperma Dan Urin Sebagai Feromon Jantan Terhadap

Reproduksi Betina Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*)”.

UCAPAN TERIMA KASIH

Dengan memanjatkan puji syukur ke hadirat Allah Tuhan Yang Maha Esa, karena atas rahmat dan karuniannya, maka disertasi dengan judul “Analisis sperma dan urin sebagai feromon jantan terhadap reproduksi betina kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*)”. dapat diselesaikan.

Dalam menyelesaikan disertasi ini penulis banyak mendapat bimbingan, saran dan bantuan dari berbagai pihak, sehingga pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada :

1. Ibu Prof.Dr. Ir. Diana Arfiati, MS, selaku Promotor yang dengan ketelitian dan kesabaran telah memberikan bimbingan, saran dan masukan kepada penulis.
2. Bapak Dr. Ir Maheno Sri Widodo, MS. selaku Co promotor I yang telah memberikan, saran dan dorongan semangat selama penulisan disertasi ini.
3. Ibu Dr. Yuni Kilawati, SPi, MSi, selaku Co promotor II yang telah memberikan banyak masukan selama penulisan disertasi ini.
4. Ibu Dr Uun Yanuhar, SPi, MSi.; Ibu Dr. Ating Yuniarti, SPi, M.Aqua ; Ibu Dr. Ir. Umie Lestari, MSi dan Bapak Dr. Ahmad Tufiq Mukti, SPi, MSi selaku anggota penguji disertasi, yang telah memberikan koreksi dan saran konstruktif untuk penyempurnaan disertasi ini.
5. Bapak Ir. Bambang Sutanto MS selaku Kepala Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut (BBRPBL) Gondol; Ibu Ir Sari Budi Muria, M Biotec, yang banyak membantu dalam pelaksanaan penelitian dan proses analisis hasil penelitian.
6. Kepada sahabatku Ahmad Muzaki, Gigih dan P Katimin yang selama ini banyak membantu penulis.
7. Kepada istri dan anak-anak tercinta yang telah memberikan dukungan secara moril maupun materi kepada penulis.
8. Kepada semua rekan-rekan yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu yang telah memberikan dukungan dan bantuan dalam penulisan disertasi ini.



Akhir kata semoga disertasi ini bermanfaat bagi semua pihak yang menghargai ilmu pengetahuan. Penulis menyadari sepenuhnya atas segala kekurangan dan ketidak sempurnaan dalam penulisan disertasi ini, oleh karena itu dengan segala kerendahan hati, penulis menerima segala saran dan masukan-masukan yang mengarah pada penyempurnaan disertasi ini.

Malang, Juli 2018

Penulis



RINGKASAN

Apri I. Supii, NIM: 147080100111004. Analisis Peranan sperma dan urin sebagai Feromon Jantan Terhadap Reproduksi Betina Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). Dibimbing oleh Promotor: Prof. Dr. Ir. Diana Arfiati, MS, Ko-Promotor 1: Dr. Ir. Maheno Sri Widodo, MS. Ko-Promotor 2: Dr. Yuni Kilawati, S.Pi, MSi

Feromon merupakan stimuli kimia yang berkaitan erat dengan proses reproduksi. Ikan-ikan betina yang siap memijah akan mengeluarkan feromon atau bau-bauan tertentu sehingga dapat menarik kehadiran ikan jantan begitu juga sebaliknya. Feromon dan bau-bauan juga digunakan untuk mengenali kehadiran ikan lain yang berbeda spesies atau berasal dari populasi yang berbeda. Berbeda dengan hormon, feromon sex menyebar ke luar tubuh dan hanya dapat mempengaruhi dan dikenali oleh individu lain yang sejenis

Tujuan penelitian ini adalah a) mendapatkan senyawa hormon steroid pada urin induk ikan jantan kerapu macan. b) mendapatkan senyawa hormon steroid pada sperma induk ikan jantan kerapu macan. c) mengetahui peranan hormon steroid yang diduga feromon ikan jantan terhadap kematangan gonad ikan betina kerapu macan. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang kandungan feromon pada urin dan sperma induk ikan jantan kerapu macan terhadap proses pematangan dan pemijahann ikan betina. Penggunaan feromon ini diharapkan dapat menjadikan metode alternative dalam pematangan gonad dan pemijahan ikan kerapu macan di Indonesia.

Metodologi dalam penelitian ini meliputi ; pemeliharaan induk ikan kerapu macan, pengambilan sampel urin dan sperma induk ikan jantan, analisis feromon pada urin dan sperma ikan dan uji aplikasi terhadap kematangan gonad ikan betina kerapu macan. Analisis kandungan feromon pada urin dan sperma dilakukan dengan ELISA merupakan metode immunoassay yang menggunakan enzim sebagai label. Ini dilakukan untuk mengetahui kandungan hormon esterogen dan testoteron. Sedangkan untuk mengetahui unsur feromon pada urin dan sperma menggunakan LC-MS/MS dan FTIR. Urin dan sperma di ujikan pada beberapa induk betina kerapu macan, dengan cara di semprotkan ke media air pemeliharaan. Induk betina yang digunakan terlebih dahulu diamati stadia kematangan gonadnya dengan cara dikanulasi. Induk-induk ini ditempatkan pada bak beton dengan volume 12 ton. Masing-masing bak diisi dengan induk bertina kerapu macan sebanyak 4 ekor. Parameter yang diujikan adalah dosis urin ikan jantan, yaitu : 1 ml, 2 ml dan 3 ml. Sedangkan pada sperma dengan dosis yaitu, 2 ml, 4 ml dan 6 ml. Penyemprotan urin dan sperma jantan dilakukan malam hari, pada pukul 19.00. Selama perlakuan sirkulasi air dilakukan dengan system resirkulasi selama 6 jam. Hal ini diharapkan pengaruh urin maupun sperma tidak keluar. Pengamatan yang dilakukan meliputi aktivitas induk ikan betina, profil hormon dalam plasma darah dan tingkat kematangan gonad.

Hasil analisis menggunakan LC-MS/MS pada urin dan sperma ikan jantan kerapu macan berdasarkan peak yang muncul menunjukkan perkursor ion 255 ms dan 273 ms. Sedangkan produk ionnya menunjukkan 159F dan 255F. Hal ini berdasarkan hauser *et al* (2008) dan pencocokan dengan massbank database



ix

terdapat dua kelompok hormone steroid yaitu estrogen dan Androgen, dimana yang masuk esterogen adalah senyawa 17β -Estradiol dan yang tergolong dalam androgen adalah senyawa Androstenediol, Epiandosterone, Epietiocholanolone, Etiocholanolano, dan androsterone.

Berdasarkan hasil uji menggunakan FTIR terlihat untaian pita yang dihasilkan serapan infra merah memiliki pola karakter tertentu, dimana pada urin memiliki enam spectrum inframerah, sedangkan pada sperma terdapat Sembilan spectrum infra merah. Dari hasil ini dapat diduga adalah senyawa steroid golongan alcohol β -silosterol. Hasil pengamatan morfologi sperma ikan uji menggunakan mikroskop menunjukkan bahwa secara keseluruhan tampak homogeny dengan kepala berbentuk bulat. Nilai terkecil untuk diameter kepala sperma ikan kerapu macan adalah $1,68 \mu\text{m}$ dan yang paling besar adalah $1,97 \mu\text{m}$. Dimana setiap sperma ikan kerapu macan tersusun atas karbon sebesar 46, 49%, oksigen 34,58%, sodium 4,02%, magnesium 0,38%, fosfor 3,84%, klorin 6,80% dan kalsium 3,89%.

Hasil Pengamatan secara visual tingkah laku induk kerapu macan betina yang diberikan urin dan sperma jantan menunjukkan respon positif, yaitu gerakkan pada ikan betina lebih agresif dan pola renang yang tidak beraturan. Selanjutnya nafsu makan ikan betina mengalami penurunan dan pada hari keenam terlihat penampakan lubang genital yang membesar. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa yang keluar tercium oleh vomeronasalorgan (VNO) dan selanjutnya sinyal ini akan diteruskan ke hipotalamus agar memberikan respon/tanggapan.

Peran urin maupun sperma sebagai pembawa feromon yang diberikan pada induk ikan betina, diamati melalui konsentrasi hormon estradiol- 17β dan testosterone dalam plasma darah. Hasil penelitian menunjukkan bahwa didapatkan hormon estradiol- 17β dalam konsentrasi yang jauh tinggi jika dibandingkan dengan testosterone, baik saat sebelum ataupun sesudah perlakuan. Tingginya hormon estradiol ini berkaitan dengan tahapan pembentukan telur pada ikan betina menjelang musim pemijahan. Hasil pengamatan ini juga menunjukkan perbedaan yang nyata antara perlakuan pemberian urin maupun sperma terhadap kontrol (tanpa pemberian urin dan sperma).

Berdasarkan informasi diatas, tingginya konsentrasi hormon estradiol- 17β hingga akhir penelitian menunjukkan bahwa pada kisaran waktu tersebut induk betina sedang mengalami vitelogenesis. Hal ini menunjukkan kesamaan karakteristik antara sebelum dan sesudah perlakuan yaitu ukuran diameter telur bertambah besar dengan sitoplasma yang tampak dipenuhi oleh butiran kuning telur. Vitelogenesis merupakan tahapan terpanjang dalam oogenesis yang berkaitan dengan pembentukan precursor protein oleh organ hati setelah mendapat stimulasi estradiol- 17β yang dibawa melalui aliran darah. Selanjutnya protein ini akan dibawa oleh aliran darah dan diinternalisasi ke dalam oosit melalui reseptor spesifik atau mikropinositosis. Dari Hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa urin dan sperma ikan jantan kerapu macan adalah feromon yang dapat meningkatkan rangsangan dan kematangan gonad induk ikan betina.



SUMMARY

Apri I. Supii, NIM : 147080100111004. Analysis of Sperm and Urine Functions As Male Pheromones Against Female Reproduction of Tiger Grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*). Board of Advisor Promotor: Prof. Dr. Ir. Diana Arfiati, MS, Co-Promotor 1: Dr. Ir. Maheno Sri Widodo, MS. Co-Promotor 2: Dr. Yuni Kilawati, S.Pi, MSi

Pheromones are chemical stimuli that are closely related to the process of reproduction. Female fish that are ready to spawn will release a pheromone or certain smells that can attract the presence of male fish, and vice versa. Pheromones and odors are also used to recognize the presence of other fish of different species or those come from different populations. Unlike hormones, sex pheromones spread outside the body and can only affect and be recognized by other similar individuals.

The aims of this study were to a) identify the steroid hormone compound in urine and sperm of male broodstock tiger grouper, b) to know the role of steroid hormone suspected as pheromone of male fish in gonad maturity of female tiger grouper. Results of this study are expected to provide information about the content of pheromones in the urine and sperm of male tiger grouper in the process of maturation and spawning of female fish. The use of pheromones is expected as an alternative method in gonad maturity and spawning of tiger grouper in Indonesia.

Methods in this study include broodstock maintenance, collection of urine sample and male sperm, analysis of pheromones in urine and sperm, and test of urine application to female gonad maturity. Analysis of pheromone content in urine and sperm was performed with ELISA which is an immunoassay method that uses enzymes as a label. This was done to determine the content of hormone estrogen and testosterone. While the element of pheromone in urine and sperm was determined using the method of LC-MS / MS and FTIR. Urine and sperm were tested on some female tiger grouper by spraying it into the water treatment medium. Gonadal maturity stages of female were observed first by cannulation. The broodstock were stocked into concrete tanks with volume of 12 tones. Each tank was stocked with 4 female broodstock. The tested parameters were male urine with dose of 1 ml, 2 ml and 3 ml. While the sperm with a dose of 2 ml, 4 ml and 6 ml. Spraying of urine and sperm was done at night, at 19:00 pm. During treatment, the rearing water was circulated for 6 hours. Therefore, urine and sperm were not wasted. Observations made include the activity of female broodstock, hormone profile in blood plasma and level of gonad maturity.

Results of analysis using LC-MS / MS in urine and sperm of male tiger grouper showed some peak in the curve. These results showed the ion percussion 255 ms and 273 ms. While the ion products showed 159F and 255F. Based on massbank database, these products showed similarity with literature, based on Hauser et al (2008), that were 17β -Estradiol compounds, Androstenediol, Epiandosterone, Epietiocholanolone, Etiocholanolano, and androsterone. Results of FTIR test showed that the bands resulting from infrared absorption had a certain character pattern, where the urine exhibited six infrared spectrums, while in the sperm there were nine infrared spectrums. From this result, it was suspected that the



steroid compounds were alcohol group β -siloesterol. The results of sperm morphological observations using a microscope showed that overall sperm looked homogeneous with a round head. The smallest value for the sperm head diameter was 1.68 μm and the largest was 1.97 μm . Each tiger grouper sperm composed of carbon 46, 49%, oxygen 34.58%, sodium 4.02%, magnesium 0.38%, phosphorus 3.84%, 6.80% chlorine and 3.89% calcium.

Visual observations of female broodstock behavior administered with urine and male sperm showed a positive response, ie the movement of female fish was more aggressive and irregular swimming patterns. Subsequently, female appetite was decreased and on the sixth day, enlarged genital hole was appeared. This showed that the excreted compound was sensed by vomeronasalorgan (VNO) and then this signal was forwarded to the hypothalamus in order to provide a response.

The role of urine as well as sperm as a pheromone carrier given to female fish, was observed through the concentrations of estradiol-17 β hormone and testosterone in blood plasma. The results showed the hormone estradiol-17 β in concentrations was much higher when compared with testosterone, either before or after treatment. The high estradiol hormone was related to the stages of egg formation in female fish before the spawning season. The results also showed a marked difference between the treatment of urine or sperm and control (without urine and sperm).

Based on the above information, the high concentrations of estradiol-17 β hormone until the end of the study showed that within the timeframe, the female broodstock was experiencing vitelogenesis. This showed the characteristic similarity between before and after treatment i.e. the diameter of egg increases with the cytoplasm that appears filled with egg yolk grains. Vitelogenesis is the longest stage in oogenesis associated with the formation of protein precursors by liver organ after obtaining stimulation of estradiol-17 β carried through the bloodstream. Furthermore, this protein will be carried by the bloodstream and internalized into oocytes through specific receptors or micropinocytosis. From the results of this study, it could be concluded that male urine of tiger grouper was a pheromone that could increase the stimulation and gonad maturity of female broodstock.



KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan Puji Syukur ke hadirat Allah SWT, atas limpahan Rahmat dan Hidayah-Nya penulis dapat menyusun disertasi dengan judul "Analisis Peranan Sperma Dan Urin Sebagai Feromon Jantan Terhadap Reproduksi Betina Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscogutattus*)". Tujuan dari penelitian ini adalah ; menganalisis feromon pada urin dan sperma induk ikan jantan kerapu macan, dan mengetahui pengaruh feromon ikan jantan terhadap kematangan gonad ikan betina kerapu macan. Penggunaan feromon ini diharapkan dapat menjadikan metode alternatif dalam pematangan gonad dan pemijahan ikan kerapu macan di Indonesia. Selain itu diharapkan informasi ini dapat memberikan manfaat terhadap perkembangan ilmu fisiologi, khususnya ikan kerapu macan.

Sangat disadari bahwa dengan kekurangan dan keterbatasan yang dimiliki penulis, walaupun telah dikerahkan segala kemampuan untuk lebih teliti, tetapi masih dirasakan banyak kekurangan. Oleh karena itu penulis mengharapkan saran yang membangun agar tulisan ini bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, Juli 2018

Penulis



DAFTAR ISTILAH

ELISA : *Enzyme-linked immunosorbent assay* atau 'penetapan kadar imunisorben taut-enzim' merupakan uji serologis yang umum digunakan di berbagai laboratorium imunologi.

LC-MS : Liquid chromatography-mass spectrometry atau Kromatografi cair-spektrometri massa adalah teknik kimia analisis yang merupakan penggabungan dari pemisahan fisik menggunakan kromatografi cair dan deteksi massa molekul dengan spektrometri massa.

FTIR : Spektrofotometer Fourier Transform Infra Red adalah sama dengan Spektrofotometer Infra Red dispersi, yang membedakannya adalah pengembangan pada sistem optiknya sebelum berkas sinar infra merah melewati contoh.

Semen (reproduksi) : membawa sel-sel sperma yang dikeluarkan oleh organ-organ seksual jantan. Fungsi utama semen adalah untuk mengantarkan sel-sel sperma untuk membuahi sel telur.

Sperma : merupakan diferensiasi atau pematangan dari spermatid.

Urin : adalah cairan sisa yang diekskresikan oleh ginjal yang kemudian akan dikeluarkan dari dalam tubuh melalui proses urinasi.

Hormon : adalah pembawa pesan kimiawi antar sel atau antarkelompok sel.

Androgen : hormon steroid yang merangsang atau mengontrol perkembangan dan pemeliharaan karakteristik jantan vertebrata dengan mengikat reseptor androgen yang juga merupakan pendukung aktivitas organ seks jantan dan pertumbuhan karakteristik seks sekunder.

Estrogen : adalah sekelompok senyawa steroid yang berfungsi terutama sebagai hormon seks betina. Walaupun terdapat baik dalam tubuh jantan maupun betina, kandungannya jauh lebih tinggi dalam tubuh betina matang gonad.

Androstenediol : metabolit steroid yang dipercaya berperan sebagai regulator utama dari sekresi gonadotropin.

Testosteron : adalah hormon steroid dari kelompok androgen. Penghasil utama testosteron adalah testis pada jantan dan indung telur (ovari) pada betina.

Feromon : adalah sejenis zat kimia yang berfungsi untuk merangsang dan memiliki daya pikat seksual pada jantan maupun betina.

Vitellogenesis : adalah proses deposisi kuning telur, dicirikan oleh bertambah banyaknya volume sitoplasma yang berasal dari vitelogenin eksogen yang membentuk kuning telur.

**DAFTAR ISI****LEMBAR PENGESAHAN** i**IDENTITAS PENGUJI DISERTASI** ii**PERNYATAAN ORISINALITAS** iv**RIWAYAT HIDUP** v**UCAPAN TERIMA KASIH** vi**RINGKASAN** vii**SUMMARY** x**KATA PENGANTAR** xii**DAFTAR ISTILAH** xiii**DAFTAR ISI** xiv**DAFTAR GAMBAR** xviii**DAFTAR TABEL** xx**I. PENDAHULUAN** 1

I.1. Latar Belakang 1

I.2. Perumusan Masalah 6

I.3. Tujuan 6

I.4. Manfaat Penelitian 6

I.5. Hipotesis 7

I.6. Novelty 7

II. TINJAUAN PUSTAKA 8

II.1. Ikan Kerapu Macan 8

II.2. Reproduksi Ikan 9

II.3. Feromon Dan Fungsi Feromon Pada Ikan 10



II.4. Organ Penciuman.....	14
II.5. Otak Dan Bagian-Bagiannya.....	17
II.6. Feromon Dan Fungsinya Dalam Respon Penciuman Ikan	18
II.7. Mekanisme Kerja Feromon Pada Ikan	20
II.8. Hormon Steroid	25
II.9. Spermatozoa	26
II.10. Morfologi Spermatozoa	32
II.11. Testis	34
II.12. Spermiasi	36
II.13. Motilitas Dan Metabolisme Sperma	37
II.14. Ovarium	38
II.15. Perkembangan Gamet Betina	40
II.16. Pemijahan	43
II.17. Pembuahan	44
II.18. Analisa ELISA	47
III. KERANGKA KONSEP DAN OPERASIONAL PENELITIAN	49
III.1. Kerangka Konsep Penelitian.....	50
III.2. Kerangka Operasional Penelitian	51
IV. METODOLOGI	56
IV. 1. Persiapan Induk Kerapu Macan	56
IV.1.a. Tujuan Kegiatan	56
IV.1.b. Kegiatan Manejemen Pemeliharaan Induk.....	56
IV.2. Penelitian Tahap 1	57
IV.2.a. Tujuan Kegiatan.....	57
IV.2.b. Kegiatan Pengambilan urin ikan.....	57



	xvi
IV.2.c. Analisa Kandungan Feromon Pada Urin	58
IV.3. Penelitian Tahap 2	59
IV.3.a. Tujuan Kegiatan	60
IV.3.b. Kegiatan Pengambilan Sperma	60
IV.3.c. Analisa Kandungan Feromon Pada Sperma	60
IV.4. Penelitian Tahap 3	62
IV.4.a. Tujuan Kegiatan	62
IV.4.b. Adaptasi Ikan	62
IV.4.c. Pemasangan Tanda (chips)	62
IV.4.d. Kegiatan Aplikasi Penggunaan Urine Dan Sperma Untuk Pematangan Induk Ikan Betina	63
IV.4.e. Pengamatan Profil Hormone Dalam Darah	64
IV.4.f. Pengamatan TKG Betina Kerapu Macan	64
IV.4.g. Pembuatan histologis Gonad	64
V. HASIL DAN PEMBAHASAN	66
V.1. Analisa Kandungan Urin	66
V.2. Analisa Kandungan Sperma	72
V.3. Aplikasi Penggunaan Urine dan Sperma Untuk Pematangan Induk Betina	77
V.3.1. Hasil Pengamatan Visual Respon Tingkah Laku Induk Betina Pada Saat Pemberian Urine Dan Sperma Jantan	77
V.3.2. Hasil Analisa Hormon Pada Plasma Darah Setelah Pemberian Urine	78
V.3.3. Hasil Analisa Hormone Pada Plasma Darah Setelah Pemberian Sperma	83
	xvi



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Ikan kerapu macan (<i>Epinephelus fuscoguttatus</i> Forsskal, 1775).....	9
2. Posisi cuping hidung teleostei dan kulit yang menahan pergerakan air masuk ke dalam hidung depan	14
3. Otak <i>Epinephelus fuscoguttatus</i>	18
4. Urutan pembentukan spermatozoa dan pematangan pada ikan jantan (Mananos et al., in Cabrita et al.,2008)	28
5. Morfologi Testes Tubular (Kiri Atas) dan Lobular (Kanan Atas) serta Penampang Melintang Spermatid dari Masing – Masing Testes. (GA = Spermatogonium), (Cyst = Spermatisit), (sc = Sel Sertoli), (ed = Saluran eferen), (ic = Sel interstitial), (bm = Membran Berbentuk Batang) (Dikutip dari Billiard, 1986	30
6. Diagram spermatogenesis dan oogenesis (Sumber : Harder, 1975, hlm. 66....	37
7. Diagram folikel ikan. ZR zona radiata ; GC sel – sel granulosa; TC sel – sel theca; BM membran dasar; GV germinal vesikel (sumber : Evans, 1993, hlm 512).....	40
8. Aksi gonadotropin terhadap sintesis estrogen dan progesteron selama pematangan telur dan ovulasi	41
9. Telur matang yang belum terbuahi. (a) Potongan telur sepanjang kutub animal – vegetal, (b) Letak int, (c)Bagian permukaan telur; YG butir kuning telur; CA kantung korteks; PB I polar bodi I; ZR zona radiata.	42
10. Telur trout dengan spermatozoa yang berada dalam saluran mikrofil (sumber : Ginzburg, 1972, hlm.159)	45
11. Diagram reaksi korteks dan pembentukan ruang perivitelin sesaat setelah sperma masuk ke dalam sel telur (sumber : Gilbert: 1988, hlm.54....	45
12. Hasil Uji Spektrum FTIR pada Urin Ikan Kerapu Macan.....	66
13. Gugus Kimia Senyawa Steroid Golongan Alkohol β -silosterol	67
14. Grafik Analisis LC-MS Urine Jantan Kerapu Macan.....	68
15. Senyawa Kimia Yang Terdapat Pada Urine Dan Sperma.....	69
16. Hasil Uji Spektrum FTIR Pada Sperma Ikan Kerapu Macan.....	73



17. Grafik Analisis LC-MS Sperma Jantan Kerapu Macan	75
18. Pengukuran Sperma Ikan Kerapu Macan	76
19. Hubungan Antara Dosis Pemberian Urine Dalam Media Air Dengan Peningkatan Konsentrasi Hormon Estrodiol-17 β	81
20. Hubungan Antara Dosis Pemberian Sperma Dalam Media Air Dengan Peningkatan Konsentrasi Hormon Estrodiol-17 β	86
21. Histologi Telur Kerapu Macan	91

xix

xix



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Daftar nama-nama umum <i>Epinephelus fuscoguttatus</i>	2
2. Bagian utama dan sub bagian otak ikan.....	17
3. Hasil uji spektrum FTIR pada Urin Ikan Kerapu	66
4. Senyawa Kimia Hormone Pada Urine	68
5. Parameter Steroid Dari Hauser et al (2008)	70
6. Hasil uji spektrum FTIR pada sperma ikan kerapu.....	74
7. Senyawa kimia hormone pada sperma	74
8. Hasil uji kandungan sperma ikan kerapu	76
9. Tingkah laku ikan betina pada saat pemberian urine dan sperma ikan jantan	77
10. Kualitas air pemeliharaan selama penelitian	78
11. Konsentrasi hormon estradiol-17 β (pg/ml) dalam darah ikan kerapu macan betina pada perlakuan pemberian urine.....	78
12. Analisis Keragaman pemberian urine terhadap konsentrasi estradiol-17 β	79
13. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Dosis Pemberian Urine	80
14. Analisis keragaman regresi penambahan urin terhadap peningkatan konsentrasi hormon estradiol-17 β	80
15. Konsentrasi hormon testostosterone (pg/ μ l) dalam darah ikan kerapu macan betina pada perlakuan pemberian urin jantan.....	82
16. Analisis Keragaman pemberian urine terhadap konsentrasi testostosterone	83
17. Konsentrasi hormon estradiol-17 β (pg/ml) dalam darah ikan kerapu macan betina pada perlakuan pemberian sperma	83



18. Analisis Keragaman pemberian sperma terhadap konsentrasi estradiol-17 β (pg/ml)	84
19. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dosis pemberian sperma	85
20. Analisis keragaman regresi penambahan sperma terhadap peningkatan konsentrasi hormon estradiol-17 β	85
21. Konsentrasi hormon testosteron (pg/ μ l) dalam darah ikan kerapu macan betina pada perlakuan pemberian sperma	87
22. Analisis Keragaman pemberian sperma terhadap konsentrasi progesterone	87
23. Ukuran diameter telur kerapu macan sebelum dan sesudah perlakuan pemberian urin	88
24. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dosis pemberian urine	89
25. Ukuran diameter telur kerapu macan sebelum dan sesudah perlakuan pemberian sperma	90
26. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dosis pemberian sperma	90



**Sperm Characteristics of Tiger Grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*),
Comouflage Grouper (*Epinephelus polyphkadion*) and Giant Grouper
(*Epinephelus lanceolotus*) in Controled tanks**

**ARTIKEL DISERTASI
PROGRAM DOKTOR ILMU PERIKANAN DAN KELAUTAN
PROGRAM MINAT : BUDIDAYA PERAIRAN TROPIS**

Oleh:

APRI I SUPRI

NIM: 147080100111004



**PROGRAM DOKTOR ILMU PERIKANAN DAN KELAUTAN
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG
2018**



ARTIKEL DISERTASI

**Sperm Characteristics of Tiger Grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*),
Comouflage Grouper (*Epinephelus polyphkadion*) and Giant Grouper
(*Epinephelus lanceolotus*) in Controlled tanks**

Oleh:

APRI I SUPRI

NIM: 147080100111004

**Untuk Memenuhi Syarat Memperoleh Gelar Doktor
di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan**

Universitas Brawijaya

Menyetujui :

Komisi Pembimbing

Promotor

Prof. Dr. Ir. Diana Arfiati, MS

NIP : 195912301985032002

Ko-Promotor 1

Ko-Promotor 2

Dr. Ir. Maheno Sri Widodo, MS

NIP : 196004251985031002

Dr. Yuni Kilawati, S.Pi, MSI

NIP : 197307022005022004

Mengetahui

Dekan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Ir. Happy Nursyam, MS

NIP : 196003221986011001



Sperm Characteristics of Tiger Grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*), Comouflage Grouper (*Epinephelus polyphekadion*) and Giant Grouper (*Epinephelus lanceolatus*) in Controlled tanks

Apri I. Supii^{(1,2)*}, Diana Arifati⁽³⁾, Maheno Sri Widodo⁽³⁾ & Yuni Kilawati⁽³⁾

(1) Doctorete Student at Brawijaya University

(2) Research and Development Institute for Mariculture (RDIM)
Gondol-Bali, Indonesia

(3) Faculty of Fisheries and Marine Science, Brawijaya University

* Corresponding author; E-mail address: aprisupii@yahoo.co.id

Abstract

The research object is sperm of tiger grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*), camouflage grouper (*Epinephelus polyphekadion*) and giant grouper (*Epinephelus lanceolatus*). They are an important commodity used for hybridization in Asian. The research purpose is to know the sperm characteristics of the groupers. Sperm samples were obtained from selected mature male gonads. Parameters to determine the sperm characteristics are morphology, sperm plasma composition and the functional group analysis based on FTIR test. Morphological observations show that sperm of giant grouper (*Epinephelus lanceolatus*) has the largest head size. Six ion components observed in sperm plasma fishes were calcium, carbon, chlorine, oxygen, phosphorus and sodium. However, percentage of carbon and sodium ions in plasma sperm of camouflage grouper (*Epinephelus polyphekadion*) is unknown or nil. Information from the FTIR test shows that the three sperm tested have a functional group profile that tend same with wave number range of 667-3423 / cm.

Keywords: grouper, sperm, head length, electrolyte, functional form

1. Introduction

One successful determinant of fish reproduction is the quality of spermatozoa (Mekki and Osman, 2006). Spermatozoa acts as a haploid genetic material distribution agent in process of egg fertilization to create new individuals (Cosson, et al., 2008). Grouper is an important commodity for Asia, the one kind is camouflage grouper (*E. polyphekadion*) as a new export fishery product for Indonesia (Jayadi, et al., 2017). In addition, Indonesia became the second tiger grouper (*E. fuscoguttatus*) producer in ASEAN region



with seed production rate of 1-5 million per month (Sugama, 2014; Yulianto, et al., 2015; Pahlevi, 2016). The increase of grouper production in Indonesia has taken place since 2001 and currently become the group's main producer of Life Reef Food Fishes (LRFF) trading in Asia (Palm, et al., 2015). It includes giant grouper (*E lanceolatus*) cultivated on a small scale since 2003 (Bunting, 2013). Therefore, information on sperm characteristics of fish grouper in Gondol, Bali is reference important to enrich the purposes, future cultivation techniques development and comparison for other commodities.

Common parameters used to compare sperm characteristics among fish are morphology and sperm plasma ion content (Alavi, et al., 2011). Therefore, this study to determine the sperm characteristics of morphology, sperm plasma composition and functional group analysis based on FTIR test.

2. Methods and Materials

Sperm collection

The selected fishes are adapted for one month in a concrete tank with 5x5x1.5 m size, at a water circulation system of 300% per day. Mature male gonad is characterized by a pale white discharge when the stomach is pressed. Sperm collection is done by moving the fishes from the reservoir using a net scoop into a tray coated with a wet cloth. The urogenital part is wiped with tissue to avoid seawater contamination. The fishes stomach are pressed slowly at direction from below the lateral line (above the abdominal fins) toward the genital pit and the sperm taken with a 1 ml plastic spuit.

Observation of Sperm morphology

The fishes sperm morphology were observed by scanning electron microscope and fixation techniques (Verma et al., 2009). The preparation was done by modified Karnovsky solution to mix 0.2 M phosphate and 40 grams of paranormaldehyde into 960 ml of aquabides and 40 ml glutaraldehyde at 25% concentration, added by 0.1 M sodium phosphate buffer solution to maintain 7.4pH. Fixation was done for 3 hours at 4°C, rinsed by buffer solution 3 times with aquabides for 15 minutes. The sample is dried and placed into a cup for 20nm palladium gold plated (SEM Leo 435 UP). The observation was done by SEM6200 Series LabGeni microscope.



Observation of Plasma Sperm Composition

The sperm samples were fed into eppendorf tubes with centrifugation at 1000 g for 10. Supernatant was obtained after repeating this step three times. Samples were analyzed by Inductive coupled plasma emission spectroscopy (Perkin Elmer Optima, 3100RL), based on modified method of Widyatmoko (2004). All glassware was rinsed with 1% HNO₃ solution to remove dust and avoid contamination. A total of 0.1 ml sample was added with 1 ml of water, 1 ml of water regia and 6 ml of HF concentration of 40%. The mixture was moved into the graphite glass, then inserted into autoclave and heat for 90 minutes at 110°C. The sample was cooled by putting it into 150 ml PTX glass containing 20 ml of water and 2.8 gr of H₃BO₃ crystals, stirred by magnetic stirrer for 5 minutes. The 25 ml solution was taken and poured into 200 ml capacity measuring tab. Addition 2 ml with 10% Cs solution is used to remove interference and destruction in microwave.

FTIR Test

Fourier Transform Infra Red Analysis for sperm test refers to modification of Schütze (2015) research. The 1 ml sample was moved into microtube and centrifuged with speed 3000 rpm for 2 minutes. The supernatant was removed. The obtained pellet was added by 2 µlPBS. The sample was placed into attenuated total reflection (ATR) sample holder. The sample was treated for 10 minutes with automatic evaporation of CO₂ / H₂O, then put into infrared ray pathway. The spectrum was measured by FTIR spectrometer at wavelength 400-4000 cm⁻¹. The Perkin-Elmer software (PerkinElmer, Norwalk, CT, USA), and Omnic (Thermo-Nicolet, Madison, WI, USA) were used to analyze and display infrared spectrum. Observe the chart peak and save the image.

3. Research Results

Sperm morphology

Observation of sperm morphology showed that A, B and C fishes had round head shape. The A fishes (*E fuscoguttatus*) has a sperm-length range of 1.62-1.77 µm. The B fishes (*E polyphkadion*) has a sperm length range of 1.55-1.67 µm. Documentation of SEM microscope shows the test sperm C fishes (*E lanceolotus*) have the largest head length size of 2.03-2,23µm (Figure 1). Each type of fishes gets six observations and the average value was calculated. The sperm head of *E polyphkadion* were 1.61 µm; 1.55 µm; 1.58



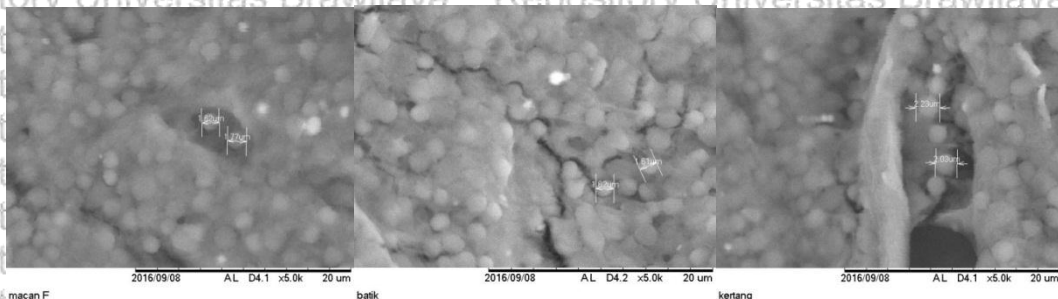
μm ; 1.64 μm ; 1.62 μm and 1.66 μm . The sperm head of *E. fuscoguttatus* samples were longer at 1.62 μm ; 1.77 μm ; 1.75 μm ; 1.66 μm ; 1.71 μm and 1.65 μm . The sperm head of *E. lanceolotus* were 2.03 μm and followed by 2.18 μm ; 2.21 μm ; 2.09 μm ; 2.14 μm to 2.23 μm . These were the largest sperm based on morphological appearance and head measurement. The analysis shows significant differences ($P < 0.05$) in each sperm head test, as shown in Table 1 and figure 1.

Table 1. Length Measurement of Fishes Sperm Head

Fishes type	Head length average (μm)
<i>Epinephelus fuscoguttatus</i>	1.69 \pm 0.060 ^b
<i>Epinephelus polyphkadion</i>	1.61 \pm 0.040 ^a
<i>Epinephelus lanceolotus</i>	2.14 \pm 0.081 ^c

The data was the mean and standard deviation ($n = 6$). There were significant differences ($P < 0.05$), as shown in figure 1 below.

Figure 1. The Morphological Appearance of Fishes Sperm with SEM Microscope at 5000x magnification



Epinephelus fuscoguttatus; *Epinephelus polyphkadion*; *Epinephelus lanceolotus*

Composition of Sperm Plasma

The experiments results for on each fish can be seen in Table 2. The plasma sperm of tiger groupers contain 57.83 mM carbon, 33.63 mM oxygen, 2.39 mM sodium or sodium, 2.4 mM potassium, 1.59 mM chlorine and 2.16 mM calcium. It is followed by a medium-sized group of giant grouper contain 40.7 mM of carbon, 48.06 mM oxygen, 3.42 mM sodium or sodium, 2.33 mM potassium, 3.42 mM chlorine and 2.07 mM calcium. The sperm plasma of camouflage grouper contain no value of carbon and sodium. The composition was only 67.56 mM oxygen, 8.98 mM potassium, 8.26 mM chlorine and 15.19 mM calcium.



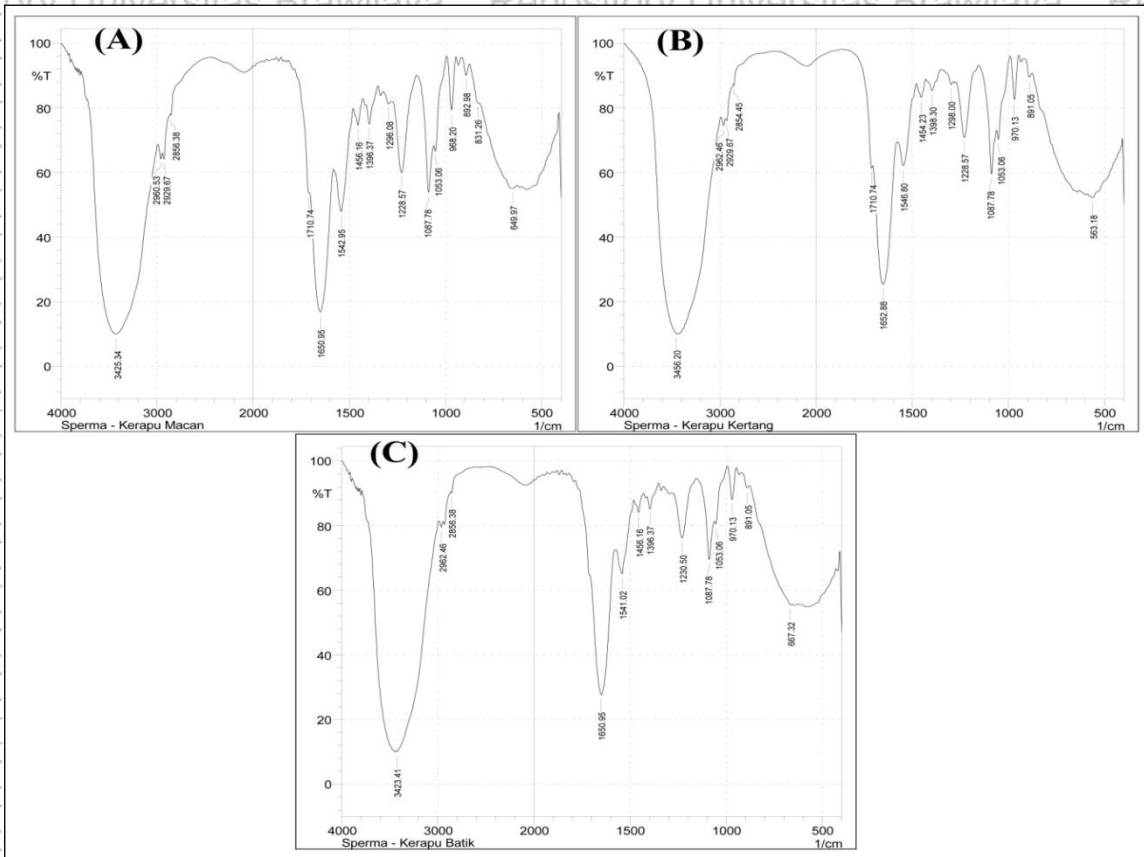
Table 2.Sperm Composition of Plasma Test

Elements	Weight %			Weight % σ			Atomic %		
	Tiger Grouper	Giant Grouper	Comouflage Grouper	Tiger Grouper	Giant Grouper	Comouflage Grouper	Tiger Grouper	Giant Grouper	Comouflage Grouper
Carbon	46.154	30.315	-	3.911	8.928	-	57.827	40.704	-
Oxygen	35.754	47.674	47.822	3.265	6.568	3.543	33.630	48.056	67.575
Sodium	3.658	4.875	-	0.603	1.094	-	2.394	3.420	-
Potassium	4.946	4.474	12.301	0.625	0.966	1.490	2.403	2.329	8.978
Chlorine	3.745	7.525	12.950	0.522	1.324	1.665	1.589	3.423	8.258
Calcium	5.743	5.138	26.928	0.678	1.035	2.401	2.156	2.067	15.189

Group Function of Sperm

The mass spectrum of tiger grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*), giant grouper (*Epinephelus lanceolotus*) and camouflage grouper (*Epinephelus polyphekadion*) are shown Figure 2. The infrared absorption tape have certain character patterns. Details of each tape wavelength can be seen in Table 3.

Figure 2.Sperm Ftir Test Results for (A) *Epinephelus fuscoguttatus*, (B) *Epinephelus lanceolotus* and (C) *Epinephelus polyphekadion*





The three sperm tests have similar infrared spectrum profile. The first spectrum detection was occurred in hydrogen vibration region with frequency 3423.41 cm^{-1} (*E polyphekadion*), 3425.34 cm^{-1} , (*E fuscoguttatus*) and 3456.20 cm^{-1} (*E lanceolatus*). These are categorized as acidic compounds within OH groups. The second spectrum also located at hydrogen vibration region, the alkane compound have frequency of 2960.53 cm^{-1} (*E fuscoguttatus*) and 2962.46 cm^{-1} (*E polyphekadion*), and containing the strand stratum $-\text{CH}_3$ (sp^3) group (*E lanceolatus*). The third spectrum has alkane compound with cluster $-\text{CH}_2$ (sp^3) stretched, present at 2854.45 cm^{-1} (*E lanceolatus*) and 2856.38 cm^{-1} for (*E fuscoguttatus*) and *E polyphekadion*. The fourth spectrum has alkene compound in fingerprint 1650.95 cm^{-1} for *E fuscoguttatus* and *E polyphekadion* and *E lanceolatus* with a frequency of 1652.88 cm^{-1} with $-\text{C}=\text{C}$ group (non strand conjugate bond). The fifth spectrum was detected at 1454.23 cm^{-1} (*E lanceolatus*) and 1456.16 cm^{-1} (*E fuscoguttatus*), (*E polyphekadion*) and categorized as other compounds with cluster content $-\text{CH}_2$ bend. The sixth spectrum has frequency of 1396.37 cm^{-1} (*E fuscoguttatus*), (*E polyphekadion*) and 1398.30 cm^{-1} (*E lanceolatus*), described as another compound with $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ bend group or called dimethyl germinal. The seventh spectrum has frequencies of 1228.57 cm^{-1} (*E fuscoguttatus*), (*E lanceolatus*) and 1230.50 cm^{-1} (*E polyphekadion*) and eighth spectrum of all three fishes has 1087 cm^{-1} , it is described as esters. These two spectra sequentially contain C-O-stretching group and then C-O alcohol. Finally, ninth spectrum is described as another compound with a cyclic group $=\text{C}-\text{H}$ band (OOP) content. Each sample of this spectrum has three frequencies: 968.20 , 892.98 , 649.97 cm^{-1} for *E fuscoguttatus* and 970.13 , 891.05 , 563.18 cm^{-1} for *E lanceolatus* and 970.13 cm^{-1} , 891.05 cm^{-1} and 667.32 cm^{-1} for *E lanceolatus*. Table 3 shows the FTIR result for fishes sperm

Table 3. FTIR results for Fishes Sperm

No	Wave (Cm^{-1})	Range (Socrates, 1994)	Vibration Type
1	3423	3550-3230	OH stretch
2	2962	3000-2800	$-\text{CH}_3(\text{sp}^3)$ stretch
3	2856	2870-2840	$-\text{CH}_2 - (\text{sp}^3)$ stretch
4	1650 and 1541	1680-1620	$-\text{C}=\text{C}$ stretch non conjugation
5	1456	1480-1440	$-\text{CH}_2$ bend
6	1396	1385-1365	$-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ bend or germinal dimethyl
7	1230	1300-1200	$-\text{C}-\text{O}$ stretch
8	1087	1125-1085	C-O alcohol 2^0
9	970, 891, 667	995-650	$=\text{C}-\text{H}$ cyclical band (OOP)



4. Discussion

Same as previous studies of longtooth grouper (*Epinephelus bruneus*) and giant grouper (*E lanceolatus*), the fishes sperm of this study also show round heads (Kim et al., 2013; Tian, et al., 2015). The length is shorter than Cod fishes sperm heads, ranging from 2.6 to 3.6 μm (Tuset, et al., 2008). Comouflage grouper has an average sperm head length of 1.61 μm . Tiger grouper fishes has an average sperm head length of 1.69 μm . The giant grouper has an average sperm head length of 2.14 μm . Each sperm significantly has a different head length. Differences size of sperm head can relate to morphology of egg micro filter hole of each species as the main door to accept the sperm in fertilization process (Rurangwa, 2004). In other words, generally the size of a species sperm is neither too large nor small from the egg-micropole hole of female parent.

The fishes must go to long path to get into micro file hole. It starts from active preparation of parent body into the waters until the competition to reach the egg. Therefore, naturally the existence of sperm in parent body is sustained by two main components, namely organic and inorganic. The organic materials content of proteins and glucose plays a role in formation of ATP for sperm survival (Hajirezae, et al., 2010). The ananhydallic material content from ions such as Na^+ , K^+ and Cl^- ions in spermplasma plays a role to maintain isotonic conditions to prevent early sperm movement (Bozkurt, et al., 2011). Inorganic electrolytes in sperm plasma fishes are carbon, oxygen sodium, potassium, chlorine and calcium. Carbon is most abundant in sperm plasma of tiger grouper and is not found in comouflage grouper. Among the three fishes, comouflage grouper has the highest oxygen content. The largest sodium or sodium is owned by plasma sperm of giant grouper and followed by tiger grouper. This value is similar to sodium range in Walleye fishes (*Sander vitreus*) 2.4-3.8 mM (Kestemont, et al., 2015). It is smaller than the rainbow trout (*Salmogardineri*) of 127 mM (Morisawa, et al., 1983). The third potassium content of the fishes is above black seabream (*Spondylios macantharus*) and puffer (*Arothron meleagris*) of 2-5.3 mM. However, this value is below the saltwater fishes of Atlantic salmon (*Salmosalar*) of 22-27.5 mM, especially goldfishes (*Carassius auratus*) of freshwater fishes of 55-70.2 mM (Suquet, et al., 1994). The content of chlorine tiger grouper and giant grouper are lower than Walleye (*Sander vitreus*) freshwater fishes ranging from 4.3-4.7 mM. The value of comouflage grouper is larger than walleye but still below Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) of is 88-115 mM



(Kestemont, et al., 2015). This value is very low when compared to other types of saltwater fishes of salmon (*Oncorhynchus masou*) containing chlorine of 130 mM (Morisawa, et al., 1983). Finally, calcium ion content of fishes (*Plecoglossus altivelis*) is 2.3 mM, within sea-water commodity and Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) of freshwater commodity of 1.7-2.8 mM (Morisawa et al. 1983; Kestemont et al., 2015). Differ with other other fishes, Tiger grouper contain up to 15.19 mM calcium. The sperm plasma contain Ca^{2+} ions, it relates to protein phosphorylation at base of sperm tail to trigger motility or movement (Dreanno, et al., 1999).

The FTIR examination in Table 3 shows that each test fishes sperm has nine color spectrum. Each color spectrum was matched by the Socrates guideline (1994) and obtained several types of compounds such as OH, CH with stretch bonds, C = C nonconjugated bonds, CH with covalent bonds, -CO with stretch bonds, CO alcohol and = CH cyclic bond. Patra (2010) said that the IR wave absorption data of β -sitosterol compounds is characterized by presence of alcohol groups in hydrogen vibration region with a frequency of 3549.99 cm^{-1} , alkyl groups at frequency of 2935.73 cm^{-1} and 2867.38 cm^{-1} and an alkenyl group at a frequency of 1637.63 cm^{-1} . Saeidnia, et. al. (2014) adds that in addition to above data there is also absorbs of ester-group IR waves for β -sitosterol at a lower frequency of 1063 cm^{-1} . There is strong allegations that sperm of fishes groupers contain steroids in form of β -sitosterol.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Maya, Komang Pull and Ahmad Muzaki for their help during preparation and the experiment. Moreover, the author would like to thank to anonymous reviewers who amply contributed to the improvement of this manuscript.

REFERENCES

- Alavi, S. M. H., A. A. E. Butts, A. Hatf, M. Mommens, E. A. Triple, M. K. Litvak and I. Babiak. 2011. Sperm morphology, ATP content, and analysis of motility in Atlantik halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Can. J. Zool.* **89**. 219-228.
- Bunting, S. W. 2013. Principles of sustainable aquaculture. Earthscan from Routledge. 2 Park Square, Milton Park, Abingdon Oxon, OX 14 4RN. Ebook. ISBN13: 978-0-203-12743-8. pp 129-130.
- Bozkurt, Y., F. Ogretmen, O. Kokcu and U. Ercin. 2011. Relationships between seminal plasma composition and sperm quality parameters of the



Salmo trutta macrostigma (Dumeril, 1858) semen: with emphasis on sperm motility. *Czech. J. Anim. Sci.* **56**(8): pp 355-364

Cosson, J., A. Groison, M. Suquet, C. Fauvel, C. Dreanno and R. Billard. 2008. Marine fish spermatozoa: racing ephemeral swimmers. *Review Reproduction* **136**: 277-294.

Dreanno, C., J. Cosson, M. Suquet, C. Cibert, C. Fauvel, G. Dorange and R. Billard. 1999. Effect of osmolality, morphology perturbations and intracellular nucleotide content during the movement of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*. **116**: pp 113-125.

Hajirezaee, S., B. M. Amiri, A. Mirvaghefi and A. S. Ahmadi. 2010. Evaluation of semen quality of endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) in different times of spermiation during the spawning season. *Czech J. Anim. Sci.* **55**(10): pp 445-455.

Jayadi, A. Mallawa, N. Nessa, I. Djawad and Ardiansyah. 2017. Growth patterns of camouflage grouper (*Epinephelus plyphekadion*, Bleeker, 1849) larvae. *J. Fish. Aquat. Sci.* **12**(1): pp 12-21.

Kestemont, P., K. Dabrowski and R. C. Summerfelt. 2015. Biology and Culture of Percid Fishes. Springer Sciences Business Media Doedrecht. *Ebook*. ISBN. 978-94-017-7227-3. pp 165-169.

Kim, S-H., C-H. Lee, Y-B. Song and Y-D. Lee. 2013. Ultrastructure of late spermatids and spermatozoa during spermiogenesis in longtooth grouper *Epinephelus bruneus* from jejeu, korea. *Tissue and Cell*. **45**. (4).

Mekawaty, I. A. A. and A. G. M. Osman. 2006. Ultrastructural studies of the morphological variations of the egg surface and envelopes of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) before and after fertilization, with a discussion of fertilization mechanism. *Scientia Marina*: pp 23-40. ISSN:0214-8358.

Morisawa, M., K. Suzuki and S. Morisawa. 1983. Effects of potassium and osmolality on spermatozoan motility of salmonid fishes. *J. Exp. Biol.* **107**: pp 105-113.

Pahlevi, R. S. 2016. F. L. Tunxi and C. J. Ying (eds). Japanese Trust Fund V: Traceability systems for aquaculture products in the ASEAN region 2010-2015. pp 19-28. ISBN 978-981-09-8684-1.

Palm, H. W., I. Yulianto, S. Theisen, S. Rueckert, S. Kleinnertz. 2015. *Epinephelus fuscoguttatus* mariculture in Indonesia: Implications from fish parasite infections. *Regional Studies in Marine Sciences*. [doi.org:10.1016/j.rsma.2015.07.003](https://doi.org/10.1016/j.rsma.2015.07.003).

Patra, A., S. Jha, P. N. Murthy, Manik and A. Sharone. 2010. Isolation and characterization of stigmast-5-en-3 β -ol (β -sitosterol) from the leaves of *Hygrophilaspinoso*. *International Journal of Pharma Sciences and Research*. **1**(2): pp 95-100.



Rurangwa, E., D. E. Kime, F. Ollevier and J. P. Nash. 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*. 234. pp: 1-28.

Schütze, S. 2015. DNA stability of stallion sperm: factors affecting chromatin integrity in individual stallions. *Thesis*. University of Veterinary Medicine Hannover. 83 pp.

Saeidnia, S., A. Manayi, A. R. Gohari and M. Abdollahi. 2014. The story of β -sitosterol – a review. *European Journal of Medicinal Plants*. 4(5): pp 590-609.

Sugama, K. 2014. Public policy for sustainable development of grouper aquaculture in Indonesia. pp 1-8.

Suquet, M., R. Billard, J. Cusson, G. Dorange, L. Chauvaud, C. Mugnier and C. Fauvel. 1994. Sperm features in turbot (*Scophthalmus maximus*): a comparison with other freshwater and marine fish species. *Aquat. Living. Resour.* 7: pp 283-294.

Tian, Y., W. Qi, J. Jiang, N. Wang, D. Wang, J. Zhai, C. Chen and S. Chen. 2013. Sperm cryopreservation of sex-reversed seven-band grouper, *Epinephelus spemtemfasciatus*. *Animal Report Science*. 137: pp 230-236.

Tuset, V. M., E. A. Trippel and J. de Monserrat. 2008. Sperm morphology and its influence on swimming speed in Atlantic cod. *J. Appl. Ichthyol.* 24: pp 398-405.

Verma, D. K., P. Routray, C. Dash, S. Dasgupta and J. K. Jena. 2009. Physical and biochemical characteristics of semen and ultrastructure of spermatozoa in six carp species. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 9: 67-76 pp.

Widyatmoko, H. 2004. Akurasi Wavelength-disperse x-ray fluorescence. *Makara Teknologi*. 8(2): pp 61-68.

Yulianto, I., C. Hammer, B. Wiryawan, H. W. Palm. 2015. Potential and risk of grouper (*Epinephelus* spp., Epinephelidae) stock enhancement in Indonesia. *J Coast Zone Manag.* 18: 394. doi:10.4172/2473-3350.1000394.



BAB I PENDAHULUAN

I.1. Latar Belakang

Indonesia merupakan produsen terbesar benih kerapu, dengan tempat-tempat pembenihan di Bali Utara yang memproduksi 200.000–1.000.000 per bulan (Ismi *et al.*, 2013 ; Sugama *et al.*, 2013). Beberapa jenis kerapu yang diproduksi adalah kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*), kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*), kerapu sunu (*Plectropomus leopardus*) dan kerapu hibrid. Hal ini memberikan kontribusi bagi pendapatan petani dan kesempatan kerja serta pendapatan ekspor (Heerin, 2002; Siar *et al.*, 2002).

Ikan kerapu termasuk dalam subfamilia *Epinephelinae*, familia *Serranidae*, dan merupakan ikan komersial, terutama untuk pasar ikan hidup di Asia seperti Hong Kong, Cina, Taiwan, Singapura dan Malaysia (Johnston and Yeetin, 2006).

Tiga jenis ikan kerapu hidup yang umum dipasarkan ini diwakili oleh genus: *Epinephelus*, *Cromileptes* dan *Plectropomus*. Harga jual ikan kerapu hidup sangat mahal sehingga merangsang pelaku usaha untuk membudidayakannya (Rimmer *et al.*, 2004). Dari beberapa jenis kerapu yang telah dapat dibudidayakan, kerapu macan memiliki permintaan yang cukup tinggi dan memiliki keunggulan tersendiri, yaitu sebagai jenis ikan yang sering dilakukan hibridisasi. Hal ini karena sifatnya yang lebih dapat beradaptasi sehingga sintasannya lebih tinggi.

Ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) ini diperkirakan hidup di alam dengan kepadatan hanya 0,5-0,6 ton per km² atau sekitar 0,0005-0,0006 kg/m², mengingat ikan ini tergolong ikan buas (spesies predator, karnivora) yang cenderung hidup soliter dan membangun teritori. Kerapu macan memiliki nama



umum perdagangan internasional yaitu 'kerapu marmer coklat', namun nama-nama umum lainnya tercantum dalam Tabel 1.

Tabel 1. Daftar nama-nama umum *Epinephelus fuscoguttatus*

Nama umum	Negara/wilayah
Tiger grouper	Nama berbahasa Inggris — penggunaan umum
Brown-marbled grouper	Nama berbahasa Inggris — perdagangan
Flowery cod	Australia
Lo fu pan	Hong Kong
Kala cobra	India (Kepulauan Andaman)
Kerapu macan	Indonesia
Kerapu kodok	Aceh, Indonesia
Kerapu hitam	Malaysia
Lapu-lapu	Filipina
Kerapu hitam, lao hu ban	Singapura
Pla karang-lai-hin-on	Thailand
Ca song hoa nau	Vietnam

Sumber : Sugama *et al.*, (2013)

Kerapu macan hidup berasosiasi dengan terumbu karang, pada kedalaman berkisar antara 1 sampai 60 m. Kerapu macan ini tersebar secara luas di wilayah Indo-Pasifik: dari Laut Merah dan Afrika Timur, bagian timur seperti Samoa dan Kepulauan Phoenix, utara Jepang dan selatan Australia. Di alam liar, Ikan ini dapat mencapai panjang total 120 cm. Ikan kerapu macan bersifat karnivora, dan dalam isi perutnya dilaporkan ditemukan sisa-sisa pakan berupa ikan, kepiting, dan cepalopoda (Heemstra dan Randall, 1993). Distribusi ikan ini tidak terlepas dari habitatnya di perairan yang berasosiasi dengan karang. Ikan kerapu macan banyak ditemukan pada daerah yang kaya terumbu karangnya serta air yang jernih, sampai kedalaman 60 m. Habitat ini termasuk perairan dangkal terumbu karang, dasar laut berbatu, puncak laguna, kanal karang serta tubir (Ismi *et al.*, 2013; Sugama *et al.*, 2013).

Kerapu macan memiliki sifat hermiprodit protogini, yaitu tumbuh dewasa sebagai betina pada awalnya, dan kemudian berganti kelamin menjadi jantan pada



usia yang lebih lanjut (Sugama *et al.*, 2013). Namun, dalam tangki indukan perubahan ini mungkin dicegah secara sosial, dan adanya ikan jantan dapat menekan perubahan jenis kelamin betina. Ukuran terkecil kerapu macan dewasa yang ditangkap dari alam liar yang tercatat di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Budidaya Laut, Gondol adalah 3,7 kg (betina) dan 8,2 kg (jantan). Di Filipina, ukuran terkecil yang tercatat dari kerapu macan dewasa yang tumbuh di penangkaran dan diberi makan pelet kering adalah 2,2 kg (betina) dan 3,5 kg (jantan). Untuk hasil budidaya diperlukan waktu sekitar 4 tahun untuk menjadi induk (Sugama *et al.*, 2013).

Pemijahan ikan kerapu dapat dibagi atas 3 yaitu pemijahan alami (natural spawning), pemijahan buatan (stripping atau artificial fertilization) dan penyuntikan atau pijah rangsang (induced spawning). Pada induk ikan kerapu yang telah dewasa kelamin dapat dipijahkan secara alami maupun dengan penggunaan rangsangan hormon. Pemijahan biasanya terjadi beberapa hari sesudah dan sebelum bulan gelap dan pemijahan terjadi pada malam hari.

Pemijahan rangsang biasanya dilakukan dengan menyuntikan hormon atau campuran beberapa hormon ke dalam tubuh induk ikan yang akan dipijahkan. Hormon yang umumnya digunakan adalah *Human Chorionic Gonadotropin* (HCG), Gonatropin, Puberogen (mengandung FSH dan gonadotropin) dan pregnyl. Ekstrak kelenjar hipofisa ikan salmon juga dapat digunakan untuk merangsang pematangan gonad.

Pematangan gonad dan ovulasi ikan merupakan suatu proses di bawah kendali kerja hormon. Secara umum mekanisme kerja hormon untuk perkembangan dan pematangan gonad merupakan suatu rangkaian. Stimulasi oleh adanya pelepasan *Gonadotropin Releasing Hormon* (GnRH) dari hipotalamus menyebabkan



kelenjar hipofisa mengsekresikan Gonadotropin (GtH) untuk dialirkan ke dalam darah (Swanson, 2008).

Walaupun teknologi reproduksi ikan kerapu macam ini cukup baik, namun penggunaan hormon luar ini dapat memberikan perubahan sistem hormonal tubuh ikan berubah secara drastis. Hal ini akan menyebabkan kekebalan pada penggunaan hormon tersebut. Selain itu dapat menyebabkan residu pada tubuh ikan yang disuntik hormon. Untuk itu perlu adanya penggunaan metode stimulasi lain seperti penggunaan feromon. Feromon merupakan stimuli kimia yang berkaitan erat dengan proses reproduksi. Ikan-ikan betina yang siap memijah biasanya akan mengeluarkan feromon atau bau-bauan tertentu sehingga dapat menarik kehadiran ikan jantan. Sebagian hewan menggunakan feromon seks selama musim reproduksi, tetapi banyak yang tidak teridentifikasi (Marchlewska-KOJ *et al.*, 2001).

Ikan menggunakan penciuman untuk mencari pasangan yang siap untuk bertelur dan menentukan kesiapan gonad mereka. Bau ini juga merangsang pematangan gonad dan mendorong proses pemijahan. Bau seksual banyak digunakan oleh ikan jantan sebagai penanda kimia (Olsén dan Liley, 1993; McLennan dan Ryan, 1997). Sebagian besar ikan telah berevolusi untuk membedakan bau dari ikan jantan yang telah matang dan ikan betina pengirim rangsangan untuk melakukan pemijahan (Liley, 1982). Seperti halnya ikan mas koki jantan akan meningkatkan aktivitas berenang ketika menemukan bau dari vitelogenik betina atau estrogen betina (Kobayashi *et al.*, 2002). Sebagai responnya, jantan yang matang akan mengeluarkan bau dari androstenedione (steroid androgenik yang dikeluarkan dalam kuantitas yang besar oleh jantan lainnya), sehingga mengeluarkan sifat agresif yang tinggi (Sorensen *et al.*, 2004).



Pada waktu sebelum dan selama pemijahan, sebagian besar respon ikan teleostei terhadap bau pengirim sinyal adalah dengan peningkatan perkembangan gonad dan perubahan hormonal yang menginduksi pematangan gamet (Liely, 1982; Stacey and Sorensen, 2002). Ketika ada informasi pada senyawa kimia alami pada bau-bauan ini, telah ditemukan bahwa steroid gonad, prostglandin, atau prekursor dan metabolitnya, merupakan jenis feromon hormonal (Stacey and Sorensen, 2002). Keanekaragaman senyawa telah mengarah pada fungsi sebagai feromon termasuk tetradotoksin (Matsumura, 1995), asam amino spesifik (Kawabata, 1993), purin (Pfeiffer *et al.*, 1985), garam empedu (Doving *et al.*, 1980; Polkinghorne *et al.*, 2001), steroid gonad (Sorensen *et al.*, 1990), dan F Prostglandin (Sorensen *et al.*, 1988). Namun, khusus untuk steroid gonad, prostaglandin, dan garam empedu yang dikeluarkan dapat dideteksi oleh olfaktori, dan responsif biologis. Colombo *et al.*, (1980) mengatakan bahwa senyawa utama pada feromon yang teridentifikasi merupakan produk hormonal, dimana respon pelepas rangsangan pada konjugasi steroid gonadal (etiocolanolone glucuronide) pada Black Goby (*Gobius jozo* = *G. niger*), ini mengindikasikan bawah feromon hormonal tersebar diantara ikan. Rekaman *Underwater Electro-olfactogram* (EOG) telah mendemonstrasikan bahwa epitel olfaktori dari beberapa spesies (seperti Cypriniformes, Siluriformes, Characiformes, Salmoniformes, Perciformes) mengeluarkan sensitivitas khusus pada senyawa hormonal (Stacey and Cardwell, 1995 ; Stacey and Sorensen, 2002). Pentingnya fungsi feromon dalam siklus reproduksi ikan ini tidak terlepas dari fungsi sistem olfaktori dari ikan tersebut. Sistem penciuman ikan mampu mendeteksi dan membedakan antara ribuan bau/odorants, hal ini karena reseptor bau berfungsi secara kombinatorial.



I.2. Perumusan Masalah

Atas dasar uraian diatas maka dapat dirumuskan masalah penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Apakah terdapat hormon steroid pada urin induk jantan kerapu macan dan fungsinya sebagai feromon.
2. Apakah terdapat hormon steroid pada sperma induk kerapu macan dan fungsinya sebagai feromon.
3. Apakah hormon steroid yang diduga feromon ikan jantan kerapu macan dapat mempengaruhi tingkat kematangan gonad dan proses ovulasi pada ikan betina.

I.3. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah ;

1. Mengidentifikasi senyawa hormon steroid sebagai feromon pada urin induk ikan jantan kerapu macan.
2. Mengidentifikasi senyawa hormon steroid sebagai feromon pada sperma induk ikan kerapu macan.
3. Mengetahui peranan hormon steroid sebagai feromon ikan jantan terhadap kematangan gonad ikan betina kerapu macan.

I.4. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang kandungan feromon pada urin dan sperma induk ikan jantan kerapu macan terhadap proses pematangan dan pemijahann ikan betina. Penggunaan feromon ini diharapkan dapat menjadikan metode alternative dalam pematangan gonad dan



pemijahan ikan kerapu macan di Indonesia. Selain itu diharapkan informasi ini dapat memberikan manfaat terhadap perkembangan ilmu fisiologi, khususnya ikan kerapu macan.

I.5. Hipotesis

Hipotesis yang diambil pada penelitian ini adalah :

1. Urin jantan ikan kerapu macan mengandung senyawa feromon.
2. Sperma ikan kerapu macan mengandung senyawa feromon.
3. Senyawa feromon pada urin dan sperma ikan jantan mempengaruhi kematangan gonad induk betina kerapu macan.

I.6. Novelty

Kebaharuan yang diharapkan dari penelitian ini adalah :

1. jenis senyawa feromon pada urin jantan ikan kerapu macan.
2. jenis senyawa feromon pada sperma ikan kerapu macan.
3. dosis jumlah urin dan sperma yang mengandung feromon, yang dapat meningkatkan kematangan gonad induk betina kerapu macan.

**BAB II****TINJAUAN PUSTAKA****II.1. Ikan Kerapu Macan**

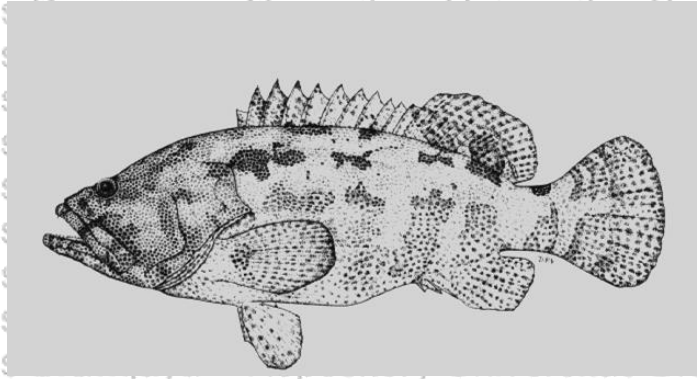
Ikan kerapu memiliki 15 genera yang terdiri atas 159 spesies. Ikan kerapu termasuk famili Serranidae, Subfamili *Epinephelinae*, yang umumnya dikenal dengan nama *groupers*, *rockcods*, *flowery* dan *manchado*. Ikan kerapu ditemukan diperairan Laut Merah, Afrika Selatan dan Indo-Pasifik (Heemstra and Randall, 1993). Ikan kerapu macan diklasifikasikan sebagai berikut (Heemstra and Randall,

1993) :

Kelas	: Pisces
Sub kelas	: Teleostei
Ordo	: Percomorphi
Sub ordo	: Percoidea
Devisi	: Perciformis
Famili	: Serranidea
Sub famili	: Epinephelinae
Genus	: Epinephelus
Spesies	: <i>Epinephelus fuscoguttatus</i>

Secara morfologi ikan kerapu macan memiliki sirip dorsal (punggung), sirip anal (perut), sirip pectoral (dada), sirip caudal (ekor) dan garis lateral (gurat sisi).

Sirip dorsal memanjang hampir sepanjang bagian punggung dengan jumlah duri keras dan lunak yang sama yaitu 14-15 buah. Sirip anal terdiri dari 3 buah duri. Sirip ekor berbentuk membulat dengan jumlah duri sebanyak 15-17 buah.



Gambar 1. Ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) (Forsskal, 1775)

Sisik pada ikan kerapu menutupi seluruh permukaan tubuh berbentuk kecil, mengkilat dengan bentuk sikloid. Warna dasar ikan kerapu macan adalah cokelat, dengan perut berwarna putih serta bercak hitam dan putih disekujur tubuh yang tidak beraturan (Heemstra and Randall, 1993). Ikan kerapu memiliki bentuk tubuh memanjang agak membulat dengan mulut berukuran lebar. Posisi mulut kerapu macan sedikit serong keatas dan bibir bawah menonjol keatas.

Penyebaran kerapu macan cukup luas di wilayah Indo-Pasifik: dari Laut Merah dan Afrika Timur, bagian timur seperti Samoa dan Kepulauan Phoenix, Utara Jepang dan selatan Australia. Kerapu macan berasosiasi dengan terumbu karang, pada kedalaman berkisar antara 1 sampai 60 m. Ikan tersebut dilaporkan dapat mencapai TL 120 cm. Seperti ikan kerapu lainnya, kerapu macan bersifat karnivora, dan dalam isi perutnya dilaporkan ditemukan sisa-sisa pakan berupa ikan, kepiting, dan cephalopoda (Heemstra and Randall, 1993).

II.2. Reproduksi Ikan

Ikan kerapu macan bersifat hermiprodit protogini mengalami proses diferensiasi gonadnya berjalan dari fase betina ke fase jantan. Pada ikan yang



termasuk golongan ini sering terjadi setelah beberapa kali proses pemijahan, dimana jaringan ovariumnya mengkerut kemudian jaringan testisnya berkembang. Ikan ini memiliki siklus reproduksi sebagai ikan betina yang berfungsi terlebih dahulu, kemudian berubah menjadi ikan jantan yang berfungsi. Urutan daur hidupnya yaitu : masa juvenil yang hermaphrodit, masa betina yang berfungsi, masa intersek dan masa terakhir masa jantan yang berfungsi (Rimmer *et al.*, 2004).

Proses pemijahan ikan kerapu ini terjadi secara bersama-sama atau berkelompok. Sejumlah ikan jantan dan betina mengeluarkan sperma dan telur secara bersama dalam suatu lingkungan yang cocok. Jumlah telur yang banyak dibiarkan hanyut dalam perairan terbuka, yang akan terbawa dan terapung oleh turbulensi arus.

II.3. Feromon Dan Fungsi Feromon Pada Ikan

Secara umum feromon pada ikan digunakan dalam interaksi sosial dan pada perilaku seksualnya. Dalam interaksi sosial, feromon digunakan sebagai alarm dan pengenalan spesies, pengenalan wilayah, pemilihan dan pengenalan makanan (Sorensen and Stacey 1999 ; Sorensen and Wyatt 2001 ; Stacey and Sorensen, 2002)..

a. Alarm dan pengenalan spesies

Feromon sebagai alarm digunakan ketika terjadi suatu keadaan bahaya terutama pada serangan predator. Ikan-ikan akan mengeluarkan zat berupa lendir yang dikeluarkan melalui permukaan kulit. Pada ikan minnow (*Phoxinus phoxinus*) menyimpan feromon dalam sel epidermis khusus yang hanya akan terlepas jika sel tersebut rusak karena adanya gangguan dari lingkungan. Hal ini menyebabkan, ikan



lain akan menyebar dan menghindari dari serangan lanjutan (Purbayanto *et al.*, 2010).

Feromon dapat mempengaruhi tingkah laku sosial pada ikan yaitu untuk membedakan antara dua ikan dari spesies yang sama serta pola tingkah laku ikan ketika terjadi persaingan wilayah atau perkawinan (Fujaya, 2004). Maruska dan Fernald (2012) menyatakan bahwa pada ikan *A. burtoni* yang dominan, memiliki fungsi feromon dalam tingkah laku sosialnya yaitu melalui urin. Sinyal kimia urin digunakan pejantan terhadap pejantan lain yang dianggap pesaing. Hal ini menunjukkan bahwa, selain sinyal visual seperti perubahan warna (seperti garis mata menjadi gelap selama terjadi persaingan), pejantan juga memanfaatkan komunikasi kimia untuk menyampaikan tingkatan sosial, kepemilikan wilayah atau tingkat dominasi. Hal ini menunjukkan bahwa pelepasan urin dari pejantan yang dominan berfungsi untuk menekan pejantan dominan lain di dekatnya. Seperti pada pejantan dominan ikan Nila *O. mossambicus* juga terbukti menyimpan urin dan kemudian melepaskannya untuk secara aktif yang menunjukkan status dominasi mereka, hal ini untuk menunjukan pada pejantan saingannya dalam suatu kawasan atau populasinya.

Imre *et al.*, (2010) menyebutkan bahwa pada jenis ikan Lamprey juga memanfaatkan sinyal kimia sebagai alarm untuk mengetahui adanya predator. Sinyal kimia tersebut lebih menguntungkan dan efektif dibandingkan isyarat visual karena ikan dapat bertahan lebih lama di lingkungan dan memberikan informasi tentang keberadaan predator yang tersembunyi atau sebagai penyamaran oleh warna gelap atau kekeruhan dari air.



b. Pengenalan wilayah

Peranan feromon dalam pengenalan wilayah terlihat pada tingkah laku ikan salmon yang melakukan pemijahan di sungai kemudian bermigrasi kelaut dan kembali lagi ke sungai. Feromon merupakan signal bagi larva ikan salmon (smolt) selama melakukan migrasi kelaut. Dalam perjalanannya menuju laut, smolt akan merekam berbagai ciri-ciri bau khusus sepanjang perjalanannya pada electroencephalogram yang terdapat pada indra penciuman. Bau ini tidak hanya dari feromon tetapi juga dari lingkungan seperti bau tanah dan tumbuhan. Selanjutnya orientasi migrasi kembali ke sungai bergantung pada pengenalan karakter bau air yang terekam selama migrasi ke laut pada fase smolt (Wisenden, 2003).

c. Pendeteksian, pemilihan dan pengenalan makanan

Penelitian tentang organ olfactory ikan, menunjukkan bahwa ikan dapat mengenali makanan melalui bau. Pendeteksian mangsa jenis ikan *Ictalurus nebulosus* akan hilang ketika olfaction terhalangi. Sebaliknya, jenis bullhead menunjukkan perilaku pencarian makan menggunakan organ penciuman epitheliumnya, bahkan dengan forebreinnya (Purbayanto *et al.*, 2010). Berdasarkan penelitian Widhiastuti (2007), bahwa umpan yang memberikan respon tercepat untuk menarik perhatian kepiting bakau adalah umpan yang masih segar (dengan ciri-ciri berbau segar, mata bening, kulit belum pudar daging cerah dan elastis) yaitu 14,05 menit dibandingkan umpan busuk yaitu 20,39 menit dari total pengamatan selama 60 menit.

d. Pengenalan seks dan perubahan tingkah laku seksual

Komunikasi seksual pada ikan dilakukan dengan perantara signal kimia. Ikan berkomunikasi dengan sinyal kimia ini untuk mengontrol fertilitas, koordinasi seksual,



dan koordinasi tingkah laku seksual. Pada beberapa spesies, ikan jantan tertarik untuk berintegrasi dengan betina melalui bau.

Steroid seks merupakan salah satu bahan kimia yang secara spontan membangkitkan rangsangan elektrik organ olfaktori (Sorensen and Wyatt 2001 ; Stacey and Sorensesn 2002). Pada ikan mas jantan dewasa dapat membedakan ikan betina matang gonad melalui feromon yang terkandung dalam cairan ovary yang dilepaskan sesaat setelah ovulasi. Substansi daya tarik dari gonad umumnya bersumber dari feromon seks yang terlarut dalam air. Ikan guppy (*Poecilia reticulata*) jantan tertarik pada air yang sebelumnya ditempati betina, terutama oleh betina yang sedang matang gonad. Feromon seks juga menyebabkan sinkronisasi pelepasan sperma dari jantan dan telur dari betina ikan karper (*Cyprinus carpio*) sehingga pembuahan dapat terjadi secara efektif. Selain itu, ikan-ikan betina yang siap memijah biasanya akan mengeluarkan feromon atau bau-bauan tertentu sehingga menarik kehadiran ikan jantan.

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa hormon dan metabolisme ikan dapat bertindak sebagai reproduksi feromon. Ovarian feromon pada ikan tidak hanya untuk perilaku mendekati lawan jenis tetapi juga menghindari perkelahiran pada ikan jantan yang menunjukkan perilaku agresif pada ikan betina.

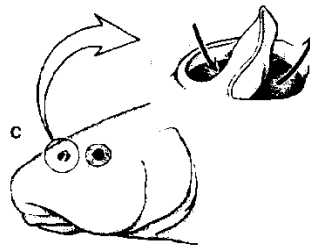
Hormon steroid dikenal untuk mempengaruhi mekanisme penciuman, terutama mempengaruhi area otak yang mempengaruhi kendali gelembung penciuman. Analisis elektro fisiologi terhadap bahan kimia menunjukkan bahwa lendir insang ikan salmon berisi komposisi asam amino spesifik yang berfungsi sebagai rangsangan penciuman. Beberapa jenis ikan dapat mengenali ikan lain dengan bantuan lendir insang (Purbayanto *et al.*, 2010).



Menurut Maruska dan Fernald (2012) dalam penelitiannya tentang *chemosensory sinyal* urin pada ikan *A. burtoni*, mengatakan bahwa ikan jantan umumnya memiliki frekuensi pengeluaran urin yang lebih tinggi ketika bertemu dengan betina yang sudah matang gonad. Selain itu, urin yang dikeluarkan jantan diduga mengandung senyawa yang merangsang ovulasi pada betina. Ini diduga merupakan umpan balik penciuman dari betina untuk menunjukkan penerimaan. Rosenthal *et al.*, (2011) juga menjelaskan bahwa ikan Swordtail menggunakan urin sebagai isyarat kimia dalam perilaku seksnya. Ikan tersebut akan mengeluarkan lebih banyak urin ketika berada di dekat betina.

II. 4. Organ Penciuman

Organ yang berperan dalam penerimaan rangsangan penciuman pada ikan adalah olfactory bulb (Stower and Logan, 2010). Dasar bentuk hidung dibentuk oleh epithelium penciuman atau mukosa berupa lipatan/lamella berbentuk bunga ros (Gambar 2). Susunan bentuk dan tingkatan perkembangan lamella sangat bervariasi pada setiap spesies.



Gambar 2. Posisi cuping hidung teleostei dan kulit yang menahan pergerakan air masuk ke dalam hidung depan

Organ penciuman ikan sangat berbeda dengan hewan lain. Menurut Evans (1940) cyclostomes pada ikan adalah monorhinal, yaitu mempunyai satu organ penciuman dengan satu lubang hidung. Pada sebagian besar hewan bertulang



belakang, letak olfactory bulb berdekatan dengan dinding rongga hidung dan bidang olfaktorinya pendek. Pada jenis ikan yang bertulang keras, letak olfaktorinya dipisahkan dari telencephalon oleh bidang olfactory yang panjang (Hoar and Randall, 1971). Sistem penciuman ikan berisi tiga komponen neuroanatomikal yaitu epithelium penciuman, olfactory bulb, dan bidang terminal dalam otak (saraf pusat) (Stacey *et al.*, 2010).

Penciuman ikan sangat sensitif terhadap bahan organik maupun anorganik yang dikenal melalui indera penciuman. Ikan juga dapat mengenali bau mangsanya, predator dan spesies sejenis. Bau-bau tersebut akan merangsang reseptor pada organ penciuman ikan sehingga menimbulkan reaksi pada ikan tersebut. Ikan mendeteksi adanya reseptor pembau dalam bentuk stimulus kimia. Stimulus tersebut melalui lubang hidung (nostril) dirubah dalam bentuk signal elektrik yang berasal dari gerakan silia yang kemudian melewati olfactory lamella yang berbentuk *rosette*. Sinyal yang dihasilkan pada olfactory lamella diteruskan pada olfactory bulb dan olfactory tract yang kemudian diterjemahkan pada otak telencephalon.

Sel reseptor penciuman adalah sel sensitif utama, yaitu sel saraf (neuron sensorik). Sel reseptor memiliki dendrit tebal, yang keluar dari bagian inti (nuklir) neuron dan mencapai permukaan epitel. Bagian epikal dendrit berakhir di ujung yang berbentuk bulat (kenop) yang memproyeksikan permukaan epitel. Pada ikan, sel reseptor di epitel penciuman diwakili oleh dua jenis: bersilia dan sel reseptor mikrovilik (Zeiske *et al.*, 1992; Kasumyan, 2004). Dewasa ini, jenis ketiga sel telah ditemukan di epitel penciuman spesies ikan yang berbeda: sel crypt, yang relatif jarang dan kenopnya tidak sampai ke permukaan epitel tetapi terbuka di rongga kecil yang terletak tepat di bawah permukaan luarnya (Hansen and Finger, 2000; Zeiske *et al.*, 2003). Sejumlah sel reseptor bersilia-mikrovilik dapat ditemukan di epitel



penciuman ikan tertentu (misalnya ikan sturgeon), organ-organ dari sel-sel ini memiliki silia dan mikrovili (Pyatkina, 1976). Cilia sel reseptor bergerak perlahan dan asinkron dan biasanya membentang di sepanjang permukaan epitel. Proses sentral yang panjang, akson, keluar dari sisi berlawanan sel reseptor.

Molekul reseptor protein khusus terkandung dalam membran seluler silia dan mikrovili. Ketika protein reseptor menghubungi zat penciuman, rangkaian transformasi molekuler terjadi di dalam sel, yang disebut proses transduksi sinyal. Proses ini mengubah fungsi saluran ion dalam sel, menghasilkan potensi reseptor, dan distribusinya sebagai dorongan saraf listrik dari lokasi generasi ke primer dan pusat penciuman sekunder (Brand and Bruch, 1992).

Bagian inti (inti) sel reseptor terletak di epitel penciuman pada tingkat yang berbeda. Lima lapisan seperti itu biasanya dibedakan dalam epitel. Semakin rendah lapisan dengan nukleus sel reseptor, semakin lama dendritnya, yang mencapai permukaan luar epitel. Ditemukan bahwa bagian inti dari sel reseptor bersilia biasanya terletak di lapisan yang lebih dalam dari epitel penciuman daripada di mikrovillous. Oleh karena itu, dendritnya lebih panjang. Dendrit terpendek adalah karakteristik sel reseptor kriptografi, yang terletak di lapisan atas epitel (Hansen dan Finger, 2000; Hamdani *et al.*, 2001; Hamdani dan Døving, 2002).

Sel reseptor terjadi di epitel penciuman di daerah yang meliputi permukaan samping lamelle penciuman, yang tidak ada di punggung lamella, dan pada rongga penciuman. Daerah dari sel epitel reseptor penciuman diberi nama zona reseptor atau epitel reseptor (sensorik). Zona ini bergantian dengan zona epitel non-reseptor. Distribusi sel reseptor pada permukaan lateral lamella pada spesies ikan yang



berbeda mungkin berbeda. Distribusi epitel sensorik terus-menerus, zona besar, halus, dan tidak teratur biasanya dapat dibedakan (Yamamoto, 1982).

Fungsi organ olfactory pada ikan merupakan salah satu sistem reseptor kimia yang beradaptasi terhadap substansi kimia spesifik lingkungan, baik berupa bahan organik maupun anorganik. Dalam berbagai pola tingkah laku ikan, fungsi tambahan dari olfactory antara lain homing, migrasi, sosial, seksual dan perilaku yang berkenaan dengan kematangan gonad (Hara *dalam* Purbayanto *et al.*, 2010).

II.5. Otak dan Bagian-bagiannya

Otak merupakan cerminan berkembang tidaknya fungsi organ-organ sensoris pada hewan. Menurut Bone dan Marshall (1982) otak ikan memiliki bagian-bagian yang memiliki susunan yang berbeda. Secara umum, otak ikan dibagi ke dalam tiga bagian besar, yaitu otak depan (forebrain) disebut juga prosencephalon, otak tengah (mesencephalon) dan otak belakang (rhombencephalon) (Indrawatie, 2010). Pembagian otak ikan dapat dilihat pada

Tabel 2.

Tabel 2. Bagian utama dan sub bagian otak ikan

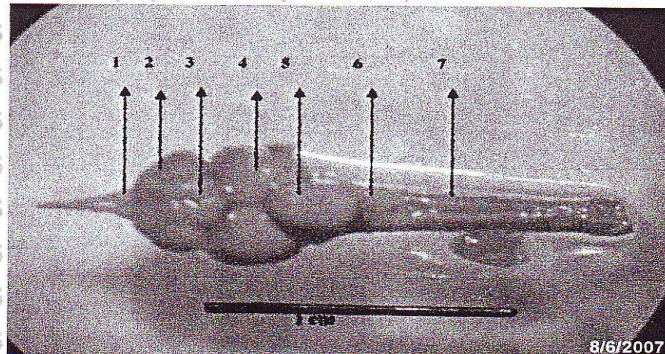
No	Bagian Utama	Sub Bagian
1	<i>Forebrain (prosencephalon)</i>	<i>Lobus olfactoris</i> <i>Telencephalon (cerebral hemisphere)</i> <i>Diencephalon (between brain)</i>
2	<i>Midbrain (mesencephalon)</i>	<i>Lobus opticus</i>
3	<i>Hindbrain (rhombencephalon)</i>	<i>Metencephalon (cerebellum)</i> <i>Myelencephalon (medulla oblongata)</i>

Sumber: Bone dan Marshall (1982)

Telencephalon adalah pusat penciuman pada bagian otak depan. Bagian ini disebut otak depan (forebrain). Pada ikan, telencephalon merupakan tempat

penerimaan, elaborasi dan meneruskan impuls aroma. Mesencephalon adalah otak tengah (midbrain), pada ikan relatif besar terdiri dari lobus opticus dorsal, di bagian dorsal terdapat dua lobus opticus dan ventral tegmentum. Lobus opticus adalah bagian depan dari retina yang diteruskan proyeksinya ke dalam bagian belakang contra-lateral dari lobus opticus dari sisi yang lain pada ikan.

Hasil penelitian Sejati (2008) dan Fitri (2008), menunjukkan bahwa otak *Epinephelus fuscoguttatus* memiliki bagian telencephalon berukuran besar, demikian juga pada bagian optic tectum. Cerebellum melengkung ke atas dan di belakang cerebellum ditemukan medulla oblongata. Otak ikan kerapu menunjukkan bahwa telencephalon dan optic tectum berkembang. Gambar otak *Epinephelus fuscoguttatus* dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. otak *Epinephelus fuscoguttatus*

Keterangan: 1) Olfactory bulb (Ob); 2) telencephalon (Tel); 3) sulcus ypsilonformis; 4) optic tectum (Ot); 6) eminentia granularis (Eg); 7) spinal cord (Sc) Sumber: Sejati (2008) dan Fitri (2008)

II.6. Feromon Dan Fungsinya Dalam Respon Penciuman Ikan

Feromon merupakan zat kimia yang berfungsi untuk merangsang seksual pada hewan jantan maupun betina. Zat ini berasal dari kelenjar eksokrin dan digunakan oleh ikan untuk mengenali sesama jenis, individu lain, kelompok, dan untuk membantu proses reproduksi. Berbeda dengan hormon, feromon menyebar ke



luar tubuh dan hanya dapat mempengaruhi dan dikenali oleh individu lain yang sejenis (satu spesies) (Anonim, 2011).

Feromon merupakan substansi yang disekresikan oleh setiap individu dan diterima oleh individu yang lain dalam satu spesies pada perilaku khusus, misalnya dalam perilaku harian (releaser feromon) proses perkembangan/primer feromon. Kerja feromon diantara individu berlawanan dengan kerja hormon sebagai signal internal dalam satu individu. Beberapa fungsi feromon yaitu sebagai *sex pheromone* dan *aggregation pheromone*. Selain itu, menurut Green *et al.*, (2012) dalam penelitiannya tentang *Automated high-throughput neurofenotipe* perilaku sosial ikan zebra, yaitu dapat meningkatkan *schoaling* pada ikan jenis ini.

Feromon digunakan sebagai cara oleh beberapa hewan yang berbeda untuk berkembangbiak, yaitu digunakan untuk mengenali jenisnya. Pada satu populasi feromon berfungsi untuk menunjukkan status suatu individu ikan agar dapat dikenali oleh individu lainnya. Feromon sebagai isyarat kimia banyak digunakan oleh spesies-spesies *centrarchid*, *salmonid* (jenis ikan-ikan salmon), *cyprinid* (jenis ikan hias), *cyprinodontiform* (jenis ikan hias), *esocid* (kelompok ikan air tawar atau air payau), dan *poeciliid* (jenis ikan hias) (Elvidge and Brown, 2012). Ikan-ikan betina yang siap memijah biasanya akan mengeluarkan feromon tertentu sehingga dapat menarik kehadiran ikan jantan. Mekanisme ini juga digunakan oleh ikan untuk mempertahankan daerah teritorialnya dari ikan asing. Pada ikan *Goldfish*, feromon sex juga digunakan oleh ikan jantan untuk membedakan ikan betina yang sudah matang kelamin dengan ikan betina yang belum matang kelamin (Anonim, 2011).

Senyawa feromon dapat menimbulkan rasa ketertarikan antara spesies yang berlainan jenis dimana cara kerjanya sebagai inisiator/pemicu dalam reaksi-reaksi kimia. Prosesnya ketika spesies yang berlainan jenis berdekatan dan bertatapan



mata, maka feromon yang kasat mata dan volatil, akan tercium oleh organ tubuh yang paling sensitif yaitu vomeronasalorgan (VNO) yaitu organ dalam lubang hidung yang mempunyai kepekaan ribuan kali lebih besar daripada indera penciuman. Organ VNO ini terhubung dengan hipotalamus pada bagian tengah otak melalui jaringan-jaringan syaraf.

Senyawa yang keluar ini akan tercium oleh VNO dan selanjutnya sinyal ini akan diteruskan ke hipotalamus agar memberikan respon/tanggapan. Waktu yang diperlukan untuk menanggapi respon tersebut hanya sepersepuluh ribu detik, maka akan ada respon dari otak melalui perubahan psikologi, seperti peningkatan pada kelenjar hormon dan kerja dari produksi hormon testoteron (pada jantan) atau hormon esterogen (pada betina) (Anonim, 2010).

II.7. Mekanisme Kerja Feromon Pada Ikan

Umumnya semua organisme selain insekta, menghasilkan feromon melalui kelenjar eksokrin. Kelenjar eksokrin adalah kelenjar yang mempunyai saluran untuk mengeluarkan zat kimia yang bermuara pada permukaan apikal. Setelah kelenjar eksokrin memproduksi feromon, feromon akan diteruskan ke abdomen. Dari abdomen, feromon akan dikeluarkan dan akan ditangkap berupa sinyal pada spesies sejenisnya. Sinyal tersebut kemudian diterjemahkan menjadi sebuah rangsangan.

Rangsangan yang diterjemahkan dari sinyal kimia yang dihasilkan dikatakan berhasil saat mencapai konsentrasi tertentu. Ini menunjukkan bahwa, semakin dekat jarak antara spesies yang mengeluarkan rangsangan dan target penerima rangsangan maka konsentrasinya semakin tinggi, demikian pula semakin menjauh dari sumber emisi konsentrasi semakin rendah dan tidak mampu menimbulkan



rangsang. Dengan demikian terbentuk semacam ruang tempat suatu spesies atau organisme lain menangkap isyarat atau rangsang kimiawi untuk kemudian bereaksi menanggapi rangsang tersebut. Selain itu, jika feromon dilepaskan dalam jangka waktu yang cukup lama, maka ruang aktif akan menjadi cukup besar. Ruang aktif yang lebih besar diperlukan bila penerima rangsangan memiliki alat deteksi isyarat yang sangat peka. Feromon yang mampu menarik spesies lawan jenis pada jarak yang cukup jauh, sedangkan yang bekerja pada jarak dekat dan penerima rangsang menanggapi dengan serangkaian perilaku "courtship" atau mencari pasangan. Feromon seperti ini tidak diproduksi secara terus menerus, tetapi hanya ketika suatu spesies mencapai usia cukup dewasa untuk kawin.

Pada beberapa kasus, menunjukkan jarak pandang ikan yang terbatas karena air yang sering keruh, sehingga fungsi penciuman sangat diandalkan. Penciuman, adalah alat sensorik yang menguntungkan karena epitel penciuman terkena campuran bahan kimia terlarut dalam air yang berasal dari sumber yang berbeda seperti tanaman, tanah dan hewan lain. Kemampuan untuk mendeteksi dan membedakan bahan kimia sangat bermanfaat bagi hewan air, ini merupakan cara berkomunikasi kimiawi hewan air sebelum berevolusi (Burnard *et al.*, 2008.); bahkan bakteri memanfaatkan chemoreception (Winans and Bassler, 2008).

Beberapa hewan air berevolusi dalam meningkatkan kemampuan untuk melepaskan dan mendeteksi aroma yang merangsang respons spesifik dan adaptif antara individu-individu dari spesies yang sama (residen). Molekul berbau yang merupakan cara berkomunikasi antar individu sejenis, yang dikenal sebagai feromon, mengatur berbagai perilaku seperti identifikasi individu, hubungan antara kelompok, hubungan induk dan anakan, tanda teritorial, ketertarikan seks, sinkronisasi proses reproduksi, dan migrasi. Molekul feromon yang digunakan oleh



hewan air yang larut dalam air dan laju difusinya dapat mencapai 10.000 kali lebih rendah daripada di udara. Dalam lingkungan air feromon mengalami turbulensi dan arus variabel. Pengaruh arus air dan lingkungan dapat menguatkan efektivitas isyarat feromon. Akan tetapi molekul feromon dapat diubah atau terganggu oleh senyawa lain yang terlarut seperti asam humat, yang dapat mengikat molekul feromon atau menghambat reseptor (Hubbard *et al.*, 2002), atau dengan logam berat yang dapat mengganggu fungsi neuron sensorik penciuman atau menyebabkan degenerasi sistem penciuman (Brown *et al.*, 1982).

Banyak ikan menggunakan feromon seks selama musim reproduksi. Tetapi sebagian besar feromon seks vertebrata tetap tidak teridentifikasi (Marchlewska-KOJ *et al.*, 2001). Døving (1976) berhipotesis bahwa ikan cenderung berkembang fungsi feromon untuk hormon seks. Colombo *et al.*, (1980) melaporkan bahwa fungsi etiocholanolone glukuronida sebagai feromon jantan ikan goby hitam (*Gobius niger* atau *Gobius jazo*) dan Hurk and Lambert (1983) mengatakan bahwa seks glucuronides steroid berfungsi sebagai feromon seks betina pada ikan zebra.

Feromon secara umum juga disebut "feromon hormon" karena bertindak sebagai hormon atau metabolit hormon pada ikan. Pada beberapa penelitian feromon ikan, telah digunakan untuk mengidentifikasi senyawa feromon. Biasanya, sebuah molekul hormon akan dianalisis dengan EOG dan / atau tes perilaku untuk mengkonfirmasi fungsi feromon, seperti pada ikan mas (*Carassius auratus*) (Dulka *et al.*, 1987). Feromon preovulasi Ikan mas betina adalah campuran dari androstenedion (AD), 17α , 20β -dihidroksi-4-pregnen-3-one ($17, 20\beta$ -P), dan $17, 20\beta$ -P- 20β -sulfat ($17, 20\beta$ -PS), dimana rasio steroid berubah secara dramatis selama luteinizing hormone preovulasi (LH). Pada ovulasi (12 jam setelah peningkatan LH), feromon preovulasi turun secara drastis, dan oosit oviductal merangsang sintesis



prostaglandin F2a (PGF2a) yang bertindak serbagai hormon untuk memicu perilaku seksual betina. PGF2a dan 15-keto-PGF2a, dirilis dalam urin sebagai feromon postovulatory yang bekerja pada reseptor penciuman sensitif untuk memicu meningkatkan LH dan semen mulai produksi pada jantan. Selain tanggapan ikan jantan terhadap feromon betina, ikan betina lain juga menanggapi $17, 20\beta$ -P dengan meningkatkan ovulasi, menunjukkan mekanisme betina untuk melakukan ovulasi (Sorensen and Stacey, 1999; Stacey and Sorensen, 2002; Stacey, 2003).

Reproduksi pada ikan-, sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Faktor-faktor lingkungan termasuk feromon diterima oleh sistem syaraf pusat dan dilanjutkan ke hipotalamus. Sel-sel neuroendokrin pada hipotalamus mensintesis dan mensekresikan gonadotropin releasing hormone (GnRH) (Sherwood and Coe, 1991) yang akan mengaktifkan hipofisis untuk mensintesis dan mensekresikan gonadotropin. Gonadotropin diperlukan untuk aktivitas gametogenesis dan pembentukan hormon-hormon gonad seperti estradiol, progesterone testosteron dan 11-ketotestosteron (Yaron, 1995). Pada ikan dikenal adanya tiga macam GnRH, akan tetapi pada kebanyakan ikan hanya satu GnRH yang berperan dalam sekresi gonadotropin (Peter and Yu, 1997). Penelitian pada hipofisis dari berbagai ikan telah berhasil diisolasi dua tipe gonadotropin yang kemudian disebut GTH-I dan GTH-II. GTH-I memiliki sub-unit yang sama dengan GTH-II sedangkan sub-unit pada GTH-I dan GTH-II sangat berbeda (Kawauchi *et al.*, 1989; Swanson, 1991; Lin *et al.*, 1992; Van der Kraak *et al.*, 1992). Peranan GTH-I dan GTH-II bervariasi pada berbagai spesies ikan. Pada ikan salmon, GTH-I dan GTH-II memiliki kemampuan yang sama dalam memacu sekresi estradiol dari folikel, tetapi GTH-II lebih potensial dalam memacusekresi $17,20$ -P dari folikel postvitelogenik (Suzuki *et al.*, 1988; Swanson *et al.*, 1991). Pada ikan rainbow trout, hanya GTH-I yang mampu memacu sekresi



estradiol dari folikel postvitelogenik (Sumpter *et al.*, 1991). Pada ikan karper, GTH-I dan GTH-II memiliki kemampuan yang sama dalam memacu sekresi steroid dari ovarium dan memacu pemasakan oosit pada kondisi *in vitro* (Van der Kraak *et al.*, 1992). Terlepas dari perbedaan kemampuan dalam memacu steroidogenesis pada gonad berbagai spesies ikan, terdapat kesamaan pada fungsi GTH-I dan GTH-II dalam gametogenesis. GTH-I berperan dalam proses awal gametogenesis (oogenesis dan spermatogenesis) sedangkan GTH-II berperan dalam pemasakan gamet tahap akhir dan pemijahan (diulas dalam Kawauchi *et al.*, 1989 dan Swanson, 1991). Hormon-hormon gonad pada gilirannya akan memberikan umpan balik untuk mengatur aktivitas hipotalamus ataupun hipofisis sehingga siklus reproduksi dapat berlangsung (Peter and Yu, 1997).

Proses oogenesis pada ikan dapat dibedakan atas empat tahapan perkembangan (Wallace and Shelman, 1990). Tahap I berupa perkembangan struktur seluler dasar meliputi perbesaran nukleus, pembentukan nukleoli dan organel subseluler seperti cortical alveoli yang memegang peranan penting dalam fertilisasi. Di sekeliling oosit berkembang dua lapisan sel yaitu sel theca dan sel granulosa yang berperan dalam produksi hormon steroid ovarium. Tahap II, berupa vitelogenesis. Vitelogenesis melibatkan interaksi antara hipofisis anterior, sel-sel folikel, hepar dan oosit. Gonadotropin yang disekresikan oleh hipofisis anterior memacusel-sel theca untuk memproduksi testosteron. Testosteron berdifusi ke sel-sel granulosa dan diaromatisasi menjadi estradiol-17 (Kagawa *et al.*, 1982). Estradiol-17 dibawa oleh aliran darah menuju hepar untuk memacu organ tersebut membentuk vitelogenin yaitu prekursor protein yolk (Pelissero *et al.*, 1991; Peyon *et al.*, 1992). Vitelogenin dibawa oleh aliran darah dan diinternalisasi ke dalam oosit melalui reseptor spesifik. Di dalam oosit, vitelogenin diproses lebih lanjut menjadi

protein yolk berukuran lebih kecil yang akan digunakan sebagai cadangan makanan bagi embryo (Wallace and Begovac, 1985; Tyler, 1991). Vitelogenesis merupakan tahapan terpanjang dalam oogenesis. Tahap III, adalah tahap pemasakan oosit. Selama pemasakan, oosit bergerak dari posisi tengah menuju posisi tepi sitoplasma kemudian inti oosit menghilang, proses ini dikenal dengan germinal vesicle break down (GVBD). Proses ini menandai berakhirnya proses meiosis pertama. Selanjutnya kromosom mengalami kondensasi, benang-benang spindel terbentuk dan polar bodi pertama dilepaskan pada akhir meiosis pertama. Hasil penelitian pada beberapa spesies ikan menunjukkan bahwa hormon yang berperan dalam pemasakan oosit adalah 17,20-P. 17,20-P dihasilkan atas kerjasama sel-sel theca dan sel granulosa dibawah kendali hormon gonadotropin. *Sel theca* menghasilkan 17-hydroxyprogesteron. Hormon ini berdifusi ke dalam sel-sel granulosa dan diubah menjadi 17,20-P yang juga dikenal sebagai maturation inducing hormone (MIH) (Nagahama, 1987). Tahap ini harus tercapai agar oosit dapat diovulasikan dan diovoposisikan pada saat pemijahan. Beberapa penelitian mengindikasikan bahwa ovulasi dipacu oleh prostaglandin, terutama prostaglandin F₂ α (Goetz, 1987). Tahap IV, oosit yang telah mengalami GVBD diovoposisikan dalam proses pemijahan.

II.8. Hormon Steroid

Hormon steroid dihasilkan oleh adrenal, ovarium, testis, plasenta, dan pada tingkat tertentu di jaringan perifer. Hormon steroid berasal dari kolesterol setelah pembelahan enzimatik rantai samping. Struktur kimia utama kolesterol, hormon steroid adalah molekul lipid-larut kecil dengan empat cincin yang saling berhubungan dari atom karbon, yang dasar karakteristik fisiko-kimia memungkinkan untuk mudah melintasi membran sel terdiri dari lipid bilayer.



Hormon steroid adalah steroid yang bertindak sebagai hormon (Karimia *et al.*, 2015). Hormon steroid dapat dikelompokkan menurut reseptor yang diikat: glukokortikoid, mineralokortikoid, androgen, estrogen, dan progesteron. Hormon steroid pada umumnya disintesa dari kolesterol di dalam gonad dan kelenjar adrenal. Bentuk dari hormon ini, biasanya adalah lipid, bukan peptida, dan mempunyai kurir khusus berbentuk globulin. Hormon steroid biasanya bersifat katabolisme (Hajirezaee *et al.*, 2011).

Semua hormon steroid berikatan dengan protein plasma hingga tingkat tertentu, pengikatan berafinitas tinggi dengan globulin spesifik dan secara relatif berafinitas rendah dan ikatan nonspesifik dengan protein seperti albumin (Hajirezaee *et al.*, 2011). Protein pengikat utama adalah globulin pengikat-kortikosteroid (CBG; transkortin), yang mengikat kortisol maupun progesteron, dan globulin pengikat hormon seks (SHBG), yang mengikat testosteron dan estradiol (testosteron lebih ketat ketimbang estradiol). Protein ini ditemukan dalam konsentrasi yang cukup sehingga lebih dari 90% kortisol total dan sekitar 98% dari testosteron dan estradiol terikat.

III.9. Spermatozoa

Spermatozoa atau sel gamet jantan dibentuk melalui serangkaian proses yang disebut dengan spermatogenesis. Hafez (1987) mengatakan, bahwa organ reproduksi jantan terdiri dari sepasang testis, vasikular semina dan saluran-saluran sperma. Ginzburg (1972) menjelaskan, bahwa testis ikan teleostei, *Liza aurata* terdiri dari tubulus-tubulus seminiferi yang dibatasi oleh lamina basal. Di dalam tubulus-tubulus tersebut terdapat sel-sel germinal dan sel-sel sertoli, sedangkan di luar tubulus terdapat sel-sel interstitial atau sel Leydig. Sel-sel germinal terkumpul di



dalam siste-siste semeniferi yang berbeda, yaitu: spermatisit primer, spermatisit sekunder, spermatid pada tingkatan yang berbeda dan spermatozoa masing-masing sistem dibatasi oleh sel-sel sertoli.

Testis ikan berbentuk memanjang dalam rongga badan di bawah gelembung renang di atas usus. Jaringan pengikat yang disebut mesentrium (mesorchium) menempelkan testis ini pada rongga badan di bagian depan gelembung renang.

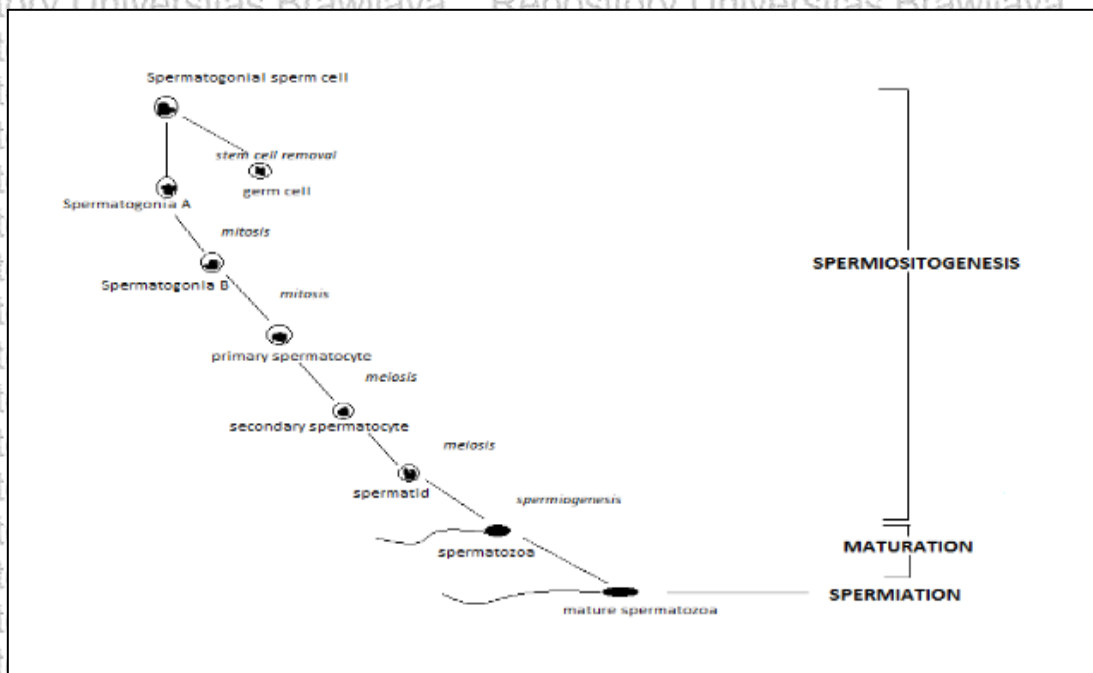
Biasanya testis ikan ada sepasang, dapat sama panjang dan ada pula yang satu lebih panjang dari yang lainnya. Struktur testis terdiri dari rongga-rongga yang tidak teratur dan banyak sekali. Disekitar dinding rongga (lumina) terdapat spermatogonia (sel indung sperma) yang nantinya akan berkembang menjadi spermatozoa melalui proses yang disebut "spermatogenesis" sebagai berikut: Spermatogonia membelah secara mitosis berkali-kali sampai menjadi 'spermatisit primer', selanjutnya dengan beberapa kali pembelahan lagi menjadi "spermatisit sekunder", hasil dari pembelahan "spermatisit sekunder" menjadi "spermatids" yang nantinya akan bermetamorfose menjadi gamet yang dapat bergerak aktif disebut sebagai "spermatozoa", sperma. Proses metamorfose dari spermatid tersebut sering juga disebut sebagai "spermiogenesis". Secara umum, perkembangan kematangan testis kurang lebih sejalan dengan tingkat perkembangan ovarium.

Ada dua tipe tubulus testis yang dikemukakan oleh Ginzburg (1972), yaitu:

(1) tipe spermatogonia tertutup, spermatogonia membentuk suatu deretan panjang dan tinggi, terdapat hampir pada semua jenis ikan teleostei, (2) tipe spermatogonia tertutup, seluruh spermatogonia tertutup oleh bagian ujung distal tunica albuginea.

Selanjutnya, Ginzburg (1972) juga menjelaskan, ada dua tipe struktur testikular jenis ikan teleostei berdasarkan perbedaan pola spermatogenesis, spermatologi, dan fisiologi reproduksi, yaitu: (1) tipe spermatogonia A adalah sama dengan tipe

spermatogonia tertutup, (2) tipe spermatogonia B adalah proses akhir dari spermatogonia A dimana tubulus-tubulus akan membelah dan membentuk kelompok siste-siste, spermatid menempel pada sel-sel sertoli, spermatozoa yang dihasilkan mempunyai kromatin yang lebih tinggi, panjang, dan tebal dengan lapisan tengah yang penuh dengan glikogen.



Gambar 4. Urutan pembentukan spermatozoa dan pematangan pada ikan jantan (Cabrita *et al.*, 2008).

Nikolsky (1971), menguraikan tingkat perkembangan testis ikan secara umum, yaitu :

Tingkat I : Tahap muda (immature), individu-individu muda belum mempunyai keinginan reproduksi dan ukuran testis sangat kecil.

Tingkat II : Tahap istirahat (resting stage), testis belum mulai berkembang dan ukurannya masih sangat kecil.



Tingkat III : Proses pemasakan (maturation), penambahan berat testis sangat cepat, testis berubah dari transparan menjadi warna pucat.

Tingkat IV : Masak (maturity), testis sudah mencapai berat maksimum, tetapi spermatozoa tidak bisa keluar pada saat perutnya ditekan perlahan.

Tingkat V : Kondisi salin (spent condition), spermatozoa telah dikeluarkan, lubang genitalia meradang kemerah-merahan, gonad telah mengempis dan testis berisi spermatozoa sisa.

Tingkat istirahat (resting stage) : Spermatozoa telah dikeluarkan, lubang genitalia tidak kemerah-merahan lagi dan ukuran testis sangat kecil.

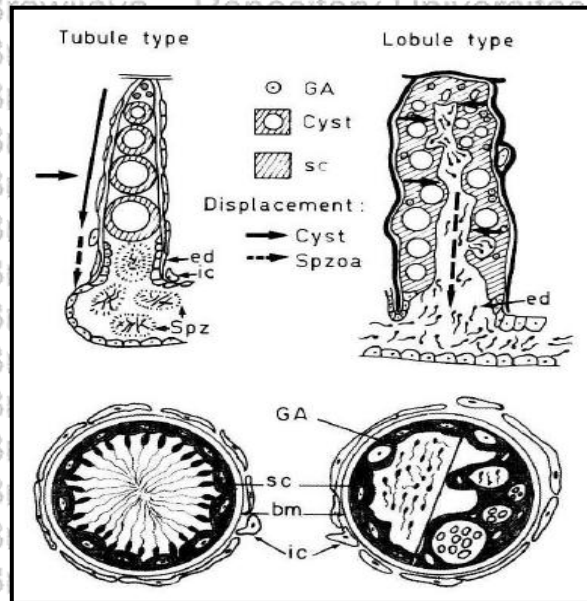
Secara umum, testis terdiri dari tubulus seminiferus dan sel sertoli. Testis sendiri dapat dibedakan menjadi dua jenis yaitu lobular dan tubular. Sejenis ikan tawes *Puntius sp.* tergolong dalam ikan teleostei yang memiliki testis berbentuk lobular (Bhuiyan *et al.*, 2006). Testis lobular tampak seperti pipa yang terbungkus kapsul, dan memiliki pembuluh di sepanjang epitel spermatogonium yang terpusat secara vertikal di atas saluran pengumpul sperma. Pembelahan epitel spermatogonium berlawanan arah dengan membran testis. Spermatogonium ditemukan di sepanjang rongga dan ketika spermatogenesis hanya sedikit spermatid yang berpindah ke tengah rongga serta spermatozoa yang sudah terbentuk akan dikeluarkan menuju sistem eferen. Sedangkan pada testis tubular yang dimiliki oleh kelompok ikan *Poeciliidae*, spermatogonium hanya terletak di puncak dan spermatozoa akan disalurkan melalui pembuluh yang tersebar dibagian tepi rongga testis (Billard, 1986). Morfologi testis lobular dan tubular ikan disajikan pada

Gambar 5.

Jika sel sertoli yang mengelilingi testis diketahui berperan sebagai pelindung sperma dari kondisi eksternal dan pengatur nutrisi serta sekresi cairan, maka lain



halnya dengan tubulus seminiferus. Tubulus seminiferus merupakan lokasi terjadinya serangkaian proses biologi kompleks dari sel induk spermatogonia diploid yang berubah menjadi sel kelamin haploid dan disebut dengan spermatogenesis (Cheng, 2008).



Gambar 5. Morfologi Testis Tubular (Kiri Atas) dan Lobular (Kanan Atas) serta Penampang Melintang Spermatid dari Masing – Masing Testis. (GA = Spermatogonium), (Cyst = Spermatisit), (sc = Sel Sertoli), (ed = Saluran eferen), (ic = Sel interstitial), (bm = Membran Berbentuk Batang) (Dikutip dari Billiard, 1986).

Spermatozoa dihasilkan dalam tubula seminiferus (Salisbury and Van Demark, 1961). spermatozoa ikan tergolong dalam tipe flagellata, karena mempunyai ekor flagellata yang panjang. Spermatozoa yang sudah matang terdiri dari kepala, leher, dan ekor flagellata. Inti spermatozoa terdapat pada bagian kepala (Salisbury and Van Demark, 1961). Ada yang mempunyai *middle piece* sebagai penghubung atau penyambung antara leher dan ekor. Ekor flagellata berguna sebagai organ renang. Pada saat dikeluarkan dari alat kelamin jantan, spermatozoa berada dalam seminal plasma. Campuran antara seminal plasma dengan spermatozoa disebut semen. Dalam setiap tetes semen terdapat jutaan



spermatozoa. Pada testis bagian dorsal terdapat saluran pengeluaran spermatozoa yang disebut vas deferens. Secara radial, lumina bermuara ke vasdeferens tersebut.

Sel spermatozoa secara umum terdiri atas dua bagian besar, yaitu kepala dan ekor, tetapi ada juga yang terdiri atas tiga bagian, diman tiap bagian berbeda-beda ukuran tergantung pada jenis ikannya.

Spermatozoa ikan teleostei memiliki struktur yang sederhana, dengan ukuran panjang kepala 2-3 μm dan panjang total 40 sampai dengan 60 μm . Kepala spermatozoa mengandung DNA yang berperan dalam penyimpanan dan menerjemahkan informasi genetik yang dibawa oleh spermatozoa (Hafez, 1987).

Konsentrasi spermatozoa penting untuk diketahui karena hal ini sebagai kriteria penentu kualitas semen (Toelihere, 1981). Derajat kekeruhannya ditentukan oleh konsentrasi spermatozoa. Semakin banyak konsentrasinya semakin keruh warna semennya (Herrick and Self, 1962).

Faktor-faktor yang mempengaruhi daya tahan hidup spermatozoa adalah sifat-sifat fisik dan kimia bahan pengencer, suhu, cahaya, pH, tekanan osmotik, elektrolit, nonelektrolit. Spermatozoa akan tahan hidup lama pada pH 7.0 dan tetap motil dalam waktu lama pada media isotonik darah dan spermatozoa lebih mudah dipengaruhi oleh keadaan hipertonik daripada hipotonik (Toelihere, 1981).

Spermatozoa ikan imotil didalam cairan plasma semennya sendiri dan baru bergerak apa bila telah bercampur dengan air. Respon rangsangan aktifitas spermatozoa tergantung pada pH, tekanan osmotik, dan kandungan ion pada medium yang mengelilinginya (Ernawati, 1999). Salisbury and Vandemark (1961) menyatakan bahwa sel spermatozoa diselubungi oleh membran lipoprotein. Apabila sel tersebut mati maka permeabilitas selnya meningkat terutama di daerah pangkal kepala, dan



hal ini merupakan dasar pewarnaan semen yang membedakan spermatozoa yang hidup dan mati.

Spermatozoa ikan imotil di dalam cairan plasma semennya sendiri dan baru bergerak apabila telah bercampur dengan air. Respons rangsangan aktifitas spermatozoa tergantung pada pH, tekanan osmotik, dan kandungan ion pada medium yang mengelilinginya. Spermatozoa ketika berada di dalam alat reproduksinya memiliki pH yang berkisar pada 7.0 dan suhu sekitar 6°C, dan ketika dikeluarkan sebaiknya suhu spermatozoa tetap dipertahankan dibawah 6°C (Bobe and Labbe *dalam* Cabrita *et al.* , 2008).

II.10. Morfologi Spermatozoa

Spermatozoa merupakan sel kecil yang kompak dan sangat khas dengan bentuk yang menyerupai kecebong serta tidak tumbuh dan membelah diri.

Pengetahuan terhadap morfologi spermatozoa diperlukan mengingat sudah cukup banyak penelitian-penelitian yang membahas korelasi antara morfologi dengan fertilitas pada berbagai ternak. Menurut bentuknya, spermatozoa terbagi atas kepala dan ekor. Kepala spermatozoa dibagi menjadi dua daerah yaitu daerah akrosom anterior yang dibungkus oleh tudung akrosom dan daerah post akrosomal posterior.

Tudung akrosom berasal dari apparatus golgi selama tahap awal spermiogenesis.

Tudung akrosom mengandung akrosin, hyaluronidase, dan enzim-enzim hidrolitik lainnya yang terlibat pada proses fertilisasi (Cheng, 2008).

Bentuk kepala oval memanjang, lebar dan datar yang terisi sepenuhnya dengan materi yang homogen sebagai informasi genetik dari pejantan yaitu kromosom. Benang-benang kromatin terdiri dari *deoxyribonucleic acid* (DNA)



kompleks dan bersifat haploid. Sel sperma yang haploid dihasilkan dari proses meiosis yang terjadi selama proses spermatogenesis.

Ekor sperma berasal dari sentriol spermatid selama proses spermiogenesis yang berfungsi memberikan gerak maju atau lokomosi kepada spermatozoa dengan gelombang-gelombang yang dimulai di daerah implantasi ekor-kepala dan berjalan ke arah belakang. Ekor sperma terbagi atas tiga bagian yaitu bagian utama (*principal piece*) bagian tengah (*midpiece*) dan bagian ujung (*endpiece*) (Cheng, 2008).

Permukaan spermatozoa dibungkus oleh suatu membran lipoprotein. Bila sel tersebut mati maka permeabilitas sel akan meningkat terutama di daerah pangkal kepala. Hal ini dijadikan dasar pewarnaan sperma untuk membedakan sperma hidup dan sperma mati berdasarkan kemampuan zat warna untuk menembus membran sel yang rusak.

Parameter yang dianggap penting bagi spermatozoa yang akan menentukan fertilitasnya antara lain: kapasitas produksi, daya tahan spermatozoa dan persentase morfologi sperma normal. Abnormalitas sperma diketahui disebabkan oleh berbagai factor, antara lain penyakit, stres panas dan musim, termasuk perlakuan preservasi dan kriopreservasi semen. Beberapa peneliti telah menyebutkan bahwa tingkat abnormalitas juga bisa disebabkan oleh teknik pengumpulan semen dan teknik pewarnaan.

Secara umum abnormalitas spermatozoa terdiri dari abnormalitas primer dan sekunder. Abnormalitas primer adalah segala sesuatu perubahan yang terjadi pada saat proses spermatogenesis di tubuli seminiferi, sedangkan abnormalitas sekunder terjadi setelah sperma meninggalkan tubuli seminiferi, selama perjalanannya melalui epididimis, ejakulasi atau penanganan ejakulat termasuk



pemanasan yang berlebihan, pendinginan yang cepat, kontaminasi dengan air, urine, antiseptik dan sebagainya.

Herrick and Self (1962), mengklarifikasikan abnormalitas spermatozoa menjadi abnormalitas primer, dan abnormalitas sekunder. Abnormalitas primer terjadi pada proses spermatogenesis, abnormalitas sekunder kemungkinan terjadi pada epididimis, dan juga terjadi pada saat ejakulasi termasuk handling semen (temperatur, pH dan tekanan osmotik).

Abnormalitas primer meliputi kepala yang terlampau besar atau terlampau kecil, kepala pendek dan melebar, ekor ganda, ekor melingkar, putus atau bercabang. Sedangkan abnormalitas sekunder meliputi kepala tanpa ekor, bagian tengah yang terlipat, adanya butiran-butiran sitoplasmik proksimal atau distal dan selubung akrosom yang terlepas (Hafez, 1987).

II.11. Testis

Testis merupakan sepasang organ memanjang yang terletak pada dinding dorsal (Tang dan Affandi, 2002). Pada ikan testis berbentuk lonjong dan berwarna putih susu. Testis pada gonad jantan memiliki fungsi sebagai penghasil spermatogonia dan mensekresi hormon androgen (Nalbandov, 1990). Testis muda hanya terlihat sel spermatogonia dan sel sertoli pada tubulusnya (Prasetyaningtyas, 2006). Tubulus biasanya belum mengandung rumen dan terdapat jaringan ikat yang tebal di sekitar tubulus (Prasetyaningtyas, 2001).

Beberapa jaringan di dalam testis, yaitu : 1). Tubuli seminiferi, epitelnya terdiri dari dua macam sel yang berbeda, yaitu sel germinatif dan sel sertoli. Sel Germinatif akan mengalami perubahan selama proses spermatogenesis sebelum fertilisasi. Sel sertoli merupakan sel yang berbentuk panjang seperti piramid yang



terletak dekat atau diantara sel germinatif. Sel ini memberi makan kepada spermatozoa yang masih muda, memfagosit sel-sel spermatozoa yang telah mati atau mengalami degradasi; 2). Sel stroma atau tenunan pengikat di luar tubuli seminiferi, yang mengandung pembuluh darah, limfe, sel saraf dan sel makrofag; 3).

Sel interstitial dan sel-sel Leydig. Sel Leydig dapat menghasilkan hormon testosteron, yang juga dihasilkan oleh spermatozoa dan kelenjar adrenal (Pergiwa, 2003).

Sel spermatozoa adalah hasil perkembangan dari sel spermatogonia yang diproduksi oleh tubul seminiferi dari testis pada epitel germinatif dengan cara pembelahan. Hal ini terjadi melalui proses spermatogenesis, secara sempurna setelah individu mencapai dewasa kelamin. Proses spermatogenesis dibagi menjadi empat tahap (Ownby, 1999) yaitu:

- 1) Tahap proliferasi, yaitu dimulai sejak sebelum lahir sampai saat setelah lahir. Bakal sel kelamin yang ada pada lapisan basal dari tubuli seminiferi melepaskan diri dan membelah secara mitosis sampai dihasilkan banyak sel spermatogonia;
- 2) Tahap tumbuh, yaitu spermatogonia membelah diri secara mitosis sebanyak empat kali sehingga dihasilkan 16 sel spermatogonia;
- 3) Tahap menjadi masak, yaitu sel spermatogonia menjadi sel spermatosit. Pada tahap ini terjadi pembelahan meiosis sehingga sel spermatosit primer berubah menjadi sel spermatosit sekunder. Kemudian sel spermatosit sekunder akan berubah menjadi spermatid bersamaan dengan pengurangan jumlah kromosom dari diploid ($2n$) menjadi haploid (n);
- 4) Tahap transformasi, yaitu terjadi proses metamorfosa seluler dari sel spermatid sehingga terbentuk sel spermatozoa;

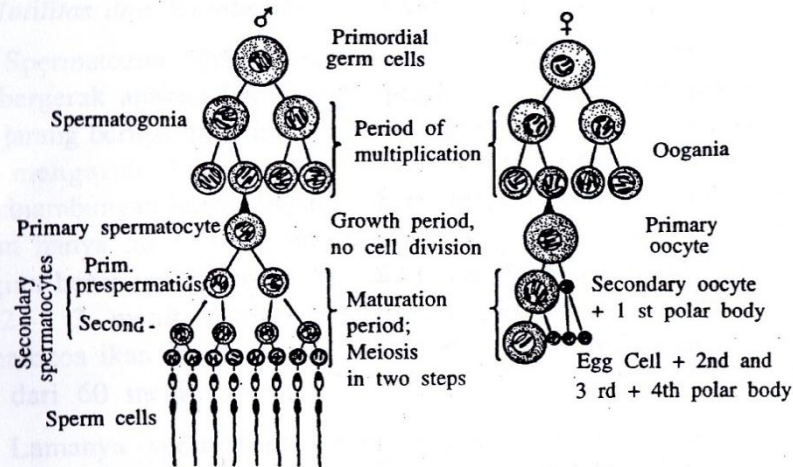
Menurut Djuwita *et al.*, (2000), bahwa ada dua proses spermatogenesis yaitu :

- 1). Spermatositogenesis, adalah pertumbuhan jaringan spermatogenik dengan pembelahan mitosis yang diikuti dengan pembelahan reduksi (meiosis). Pada fase ini spermatogonia mempunyai kemampuan memperbaharui diri, sehingga menjadi dasar spermatogonial stem cell (Ogawa *et al.*, 1997). Pada pembelahan meiosis jumlah kromosom dibagi dua sama banyak yaitu dari diploid ($2n$) menjadi haploid (n), sehingga pada saat yang bersamaan sel benih primordial juga berkembang menjadi spermatogonia yang selanjutnya akan berdiferensiasi menjadi spermatosit primer. Spermatosit primer akan berkembang menjadi spermatosit sekunder. Spermatosit sekunder melalui pembelahan meiosis akan menghasilkan spermatid;
- 2). Spermiogenesis, yaitu sel spermatid akan mengalami metamorfosa dan membentuk spermatozoa secara sempurna. Perubahan proses metamorfosa ini meliputi pembentukan akrosom, kepala, badan, dan ekor dari spermatozoa.

II.12. Spermiasi

Proses spermiasi adalah pelepasan spermatozoa dari lumen lobulus masuk ke dalam saluran sperma. Pelepasan spermatozoa ini disebabkan oleh kenaikan tekanan hidrostatik yang terjadi di dalam lobul untuk mengeluarkan cairan oleh sel – sel sertoli dibawah rangasangan gonadotropin. Spermatozoa kemudian di dorong kedalam sistem pengeluaran yang bercampur dengan sperma (milt). Beberapa penjelsan mengemukakan bahwa hormon steroid dan GtH berguna untuk mengatur komposisi ion pada cairan seminal, akibat akibat terjadinya perubahan – perubahan selama periode proses spermiasi. Perangsangan perkembangan sperma tidak terlepas dari peran serta hormon androgen, yakni testosteron. Sedangkan,

testosteron yang memegang peranan utama pada spermatogenesis dan spermiasi adalah 11-Ketotestistosteron (11-KT).



Gambar 6. Diagram spermatogenesis dan oogenesis (Sumber : Harder, 1977)

II.13. Motilitas Dan Metabolisme Sperma

Spermatozoa bersifat immotil pada saat berada pada cairan plasmanya, dan akan bergerak apabila bercampur dengan air. Pergerakan spermatozoa umumnya berbentuk spiral. Gerakan ini hanya terjadi 1 menit setelah bersentuhan dengan air dan hanya 50 % yang masih dapat berenang setelah 3 menit. Umumnya spermatozoa ikan air tawar dapat motil tidak lebih dari 2–3 menit setelah bersentuhan dengan air. Sedangkan spermatozoa ikan air laut dapat motil lebih lama bahkan ada yang lebih dari 60 menit.

Waktu yang diperlukan spermatozoa motil sangat dipengaruhi oleh umur dan kematangan spermatozoa, temperature dan faktor lingkungan lain seperti ion – ion, pH dan osmolalitas. Sedangkan kecepatan Bergeraknya tergantung spesies.

Pergerakan pada sperma *trout* dan *whitefish* dapat mencapai 164 – 330 μ /detik.

Penurunan spermatozoa dalam motilitas terjadi setelah aktivasi ini berhubungan dengan pengurangan dari kandungan Adenosine triphosphate (ATP)



intraseluler. Pada akhir fase motilitas, 50 – 80 % dari ATP dihidrolisis. Pemulihan potensi motilitas dapat terjadi setelah spermatozoa diinkubasi dalam larutan 150/200 mM KCL di mana di dalamnya spermatozoa menjadi immotil (Billard *et al.*, 1995). Spermatozoa yang tidak teraktivasi secara progressive tetap menunjukkan penurunan dalam konsentrasi ATP mereka (Perchec *et al.*, 1993 dalam Billard *et al.*, 1995). ATP dihasilkan dari glikolisis dan dari respirasi mitokondria.

II.14. Ovarium

Pada Teleost terdapat sepasang ovarium berbentuk memanjang dan kompak. Ovarium tergantung pada bagian atas rongga tubuh dengan perantara mesovaria, di bawah atau di samping gelembung renang. Ukuran dan perkembangannya pada rongga tubuh bervariasi dengan tingkat kematangannya. Ovarium terdiri dari oogonia dan jaringan penunjang atau stroma. Ovarium bisa yang matang dapat mencapai 70 % dari berat tubuhnya. Sebagian besar pada stadia awal berwarna keputih-putihan dan menjadi kekuning-kuningan pada saat matang. Pada chondrichthyes, oviduct (Mullerian duct) dengan corong masuk (ostium tubes abdominalis) di ujung terletak di bagian depan rongga tubuh.

Telur melewati oviduct menuju cloaca dan keluar melalui lubang genital. Pada chondrichthyes yang ovipar, bagian depan jaringan oviduct dimodifikasi menjadi kelenjar cangkang (shell gland); sedangkan pada ovipar dan vivipar, bagian belakang oviduct membesar menjadi suatu uterus tempat penyimpanan anak ikan selama perkembangan embrioniknya. Keadaan yang demikian ditemukan pada ikan dipnoi, cipenceriformes dan bowfin. Pada ovarium terdapat oosit pada berbagai stadia tergantung pada tipe reproduksinya (Nagahama dalam Hoar, 1983).



Menurut Harder (1977) tipe reproduksi dibagi menjadi a) tipe sinkronisasi total dimana oosit berkembang pada stadia yang sama. Tipe ini biasanya terdapat pada spesies ikan yang memijah hanya sekali dalam setahun; b) tipe sinkronisasi kelompok dengan dua stadia, yaitu oosit besar yang matang, disamping itu ada oosit yang sangat kecil tanpa kuning telur; dan c) tipe asinkronisasi dimana ovarium terdiri dari berbagai tingkat stadia oosit. Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi fungsi reproduksi pada spesies ikan terdiri dari faktor eksternal dan faktor internal. Faktor eksternal meliputi curah hujan, suhu, sinar matahari, tumbuhan dan adanya ikan jantan. Pada umumnya ikan-ikan di perairan alami akan memijah pada awal musim hujan atau pada akhir musim hujan, karena pada saat itu akan terjadi suatu perubahan lingkungan atau kondisi perairan yang dapat merangsang ikan-ikan untuk berpijah.

Faktor internal meliputi kondisi tubuh dan adanya hormon reproduksi (Redding and Reynaldo, 1993). Adapun faktor internal yaitu tersedianya hormon steroid dan gonadotropin baik dalam bentuk hormon Gonadotropin I (GtH I) dan Gonadotropin II (GtH II) dalam jumlah yang cukup dalam tubuh untuk memacu kematangan gonad diikuti ovulasi serta pemijahan.

Kekurangan salah satu atau kedua hormon tersebut dalam tubuh maka perkembangan oosit dalam ovarium terganggu bahkan akan berhenti dan mengalami atresia (Pitcher, 1995). Faktor lingkungan merupakan stimuli yang dapat ditangkap oleh alat indera ikan seperti kulit, mata dan hidung. Informasi berasal dari lingkungan sampai di otak melalui reseptor yang terdapat pada masing-masing organ sensoris. Selanjutnya melalui ujung-ujung saraf akan diteruskan ke hipotalamus untuk mengeluarkan *Gonadotropic Releasing Hormon* (GnRH) yang dapat merangsang kelenjar hipofisa anterior untuk memproduksi hormone

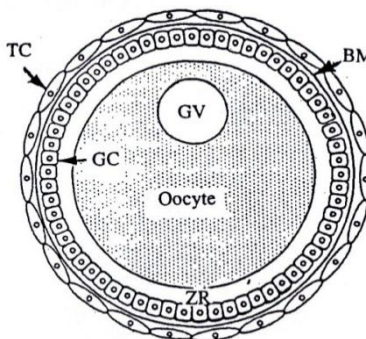


Gonadotropic (GtH). Hormon Gonadotropik ini melalui aliran darah akan menuju ke gonad, kemudian akan merangsang pertumbuhan gonad yang selain mendorong pertumbuhan oosit juga untuk memproduksi hormone steroid yang merupakan mediator langsung untuk pemijahan.

II. 15. Perkembangan Gamet Betina

Perkembangan gamet betina atau oogenesis terjadi didalam ovarium.

Oogenesis diawali dengan berkembang biaknya oogonium beberapa kali melalui pembelahan mitosis, untuk memasuki tahap oosit primer. Selanjutnya terjadi pembelahan meiosis I, membentuk oosit sekunder dan polar bodi I. Melalui meiosis II oosit sekunder membelah menjadi oosit dan polar bodi II.



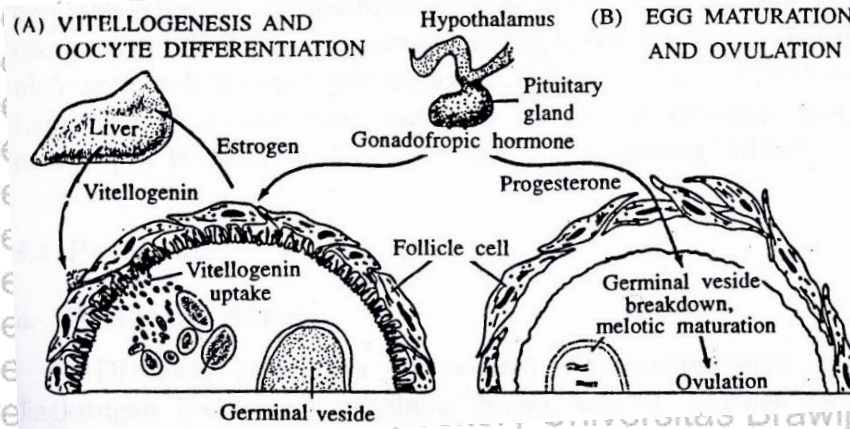
Gambar 7. Diagram folikel ikan. ZR zona radiata ; GC sel – sel granulosa; TC sel – sel theca; BM membran dasar; GV germinal vesikel (sumber : Evans, 1940)

Oogenesis adalah proses kompleks yang merupakan pengumpulan kuning telur. Secara substansial, kuning telur terdiri atas tiga bentuk, yakni ; kantung kuning telur (yolk vasicles), butiran kuning telur (yolk globule) ; dan tetesan minyak (oil droplet). Kantung kuning telur berisi glikoprotein dan pada perkembangan selanjutnya, menjadi kortikal alveoli. Butir – butir kuning telur terdiri atas lipoprotein, karbohidrat dan karoten. Oil droplet secara umum terdiri atas gliserol dan sejumlah kecil kolestrol (Hibiya, 1982).

a. Tahap-tahap Perkembangan Telur

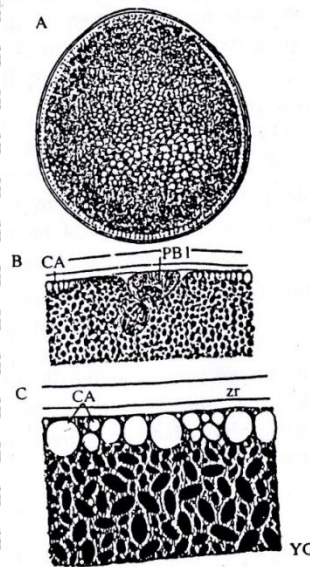
Menurut Wallace and Selman (1990) dalam Billard (1986), perkembangan telur ikan secara umum meliputi empat tahap, yakni : awal pertumbuhan, tahap pembentukan kantung kuning telur, tahap vitolegenesis dan tahap pematangan.

Pertumbuhan awal adalah terjadinya pelepasan hormon gonadotropin (GtH-independent) yang dicirikan dengan bertambahnya ukuran nucleus . sejumlah besar dari RNA 95sRNA dan transfer RNA) disimpan dalam sitoplasma sel telur sebagai bekal bagi embrio untuk menghasilkan protein dari dirinya sendiri sebagai cadangan.



Gambar 8. Aksi gonadotropin terhadap sintesis estrogen dan progesteron selama pematangan telur dan ovulasi (sumber : Drowder, 1980 dalam Gilbert, 1988)

Tahap pembentukan kantung kuning telur, dicirikan dengan terbentuknya kantung atau vesikel. Pada perkembangan telur selanjutnya, kantung kuning telur ini akan membentuk kortikal aveoli yang berisi butir – butir korteks. Tahap ini juga dicirikan dengan terbentuknya zona radiate, perkembangan ekstra seluler, dan bakal korion.



Gambar 9 Telur matang yang belum terbuahi. (a) Potongan telur sepanjang kutub animal – vegetal, (b) Letak int, (c) Bagian permukaan telur; YG butir kuning telur; CA kantung korteks; PB I polar bodi I; ZR zona radiata

Vitolegenesis, dicirikan oleh bertambah banyaknya volume sitoplasma yang berasal dari luar sel, yakni kuning telur atau disebut juga vitelogenin. Vitelogenin disintesis oleh hati dalam bentuk lipophosphoprotein-calsium kompleks dan hasil mobilisasi lipid dari lemak visceral. Selanjutnya, kuning telur dibawa oleh darah dan ditransfer ke dalam sel telur secara endositosis. Tahap akhir dari perkembangan telur adalah tahap pematangan, yakni tahap pergerakan germinal vesikel ke tepid an akhirnya melebur (germinal vesicle break down) selanjutnya membentuk pronuklei dan polar bodi II.

b. Ovulasi

Proses ovulasi terjadi dengan cepat setelah telur mengalami pematangan dan mengakibatkan pecahnya dinding folikel, pada waktu bersamaan sel – sel mikropil yang menutupi lubang mikropil berpisah sehingga spermatozoa dapat menembus korion setelah telur dikeluarkan (oviposition). Pecahnya dinding folikel ini di duga



disebabkan oleh pengaruh hormon prostaglandin. Menurut Goetz (1983 dalam Lam, 1985), prostaglandin mungkin merupakan mediator aksi gonadotropin terhadap ovulasi atau pecahnya dinding folikel.

II.16. Pemijahan

a. Pemijahan Alami

Di alam pemijahan (*spawning*) dipengaruhi oleh kondisi lingkungan (*eksternal*) misalnya hujan, habitat, oksigen terlarut, daya hantar listrik, cahaya, suhu, kimia, fisika, waktu (malam hari) dan lain – lain. Kondisi lingkungan ini akan mempengaruhi control endokrin untuk menghasilkan hormon – hormon yang mendukung proses perkembangan gonad dan pemijahan.

Berdasarkan daerah pemijahan dikenal adanya ikan : (1) Anadromus, yaitu ikan yang hidup di perairan laut dan melakukan pemijahan di hulu sungai, (2) Katadromus, yaitu ikan yang hidup di sungai dan melakukan pemijahan di samudra (laut) (3) Protodromus, yaitu ikan yang hidup di perairan tawar dan melakukan pemijahan di perairan tawar dan (4) Oceanodromus, yaitu ikan yang hidup di perairan laut dan memijah di perairan yang sama.

b. Induksi Pemijahan

Pada ikan betina, induksi pemijahan dilakukan pada akhir vitelogenesis untuk menginduksi *germinal vesicle breakdown* (GVBD) yang merupakan akhir pematangan sel telur dan ovulasi serta pemijahan. Induksi pemijahan, dewasa ini banyak dilakukan, yakni dengan menciptakan kondisi lingkungan yang sesuai dengan kondisi di alam sebagai persyaratan untuk pemijahan. Sedangkan untuk merangsang pemijahan walaupun dalam kondisi yang kurang tepat dapat diupayakan dengan pendekatan hormonal.



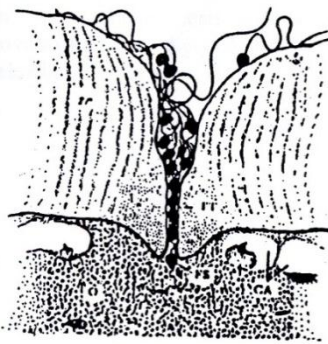
Berbagai hormon eksogen telah digunakan untuk menginduksi pemijahan, misalnya dengan hipofisasi, penyuntikan hormon LHRH, dan lain – lain. Pada dasarnya, upaya ini dilakukan untuk menambah konsentrasi hormone gonadotropin ke dalam darah sehingga mampu menginduksi perkembangan telur dan pemijahan.

Hipofisasi adalah usaha merangsang ikan yang matang kelamin agar terjadi ovulasi atau pemijahan dengan suntikan ekstrak kelenjar hipofisa. Hipofisasi merupakan metode yang praktis dan sederhana, sering tidak dapat atau sulit diukur.

Kelenjar hipofisa yang digunakan untuk hipofisasi dapat berupa kelenjar yang masih segar maupun yang telah diawetkan.

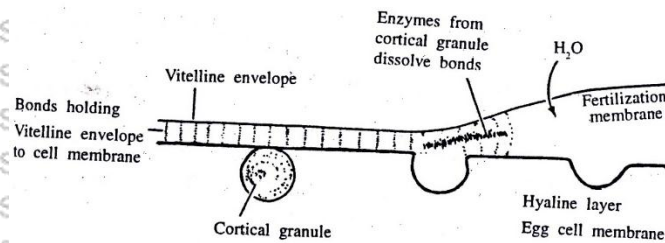
II.17. Pembuahan

Pembuahan adalah bersatunya oosit (telur) dengan sperma berbentuk zigot. Pada pembuahan ini terjadi pencampuran inti sel telur dan inti sperma. Kedua inti ini masing – masing mengandung gen (pembawa sifat keturunan) sebanyak satu set (haploid). Hanya satu sperma yang dibutuhkan untuk membuahi satu sel telur (monospermi). Jumlah spermatozoa dikeluarkan sangat banyak pada saat pemijahan dan menempel pada sel telur tetapi hanya satu yang dapat melewati mikrofil, satu – satunya lobang masuk spermatozoa pada sel telur. Kepala spermatozoa menerobos mikrofil dan bersatu dengan inti sel telur, sedangkan ekornya tertinggal pada saluran mikrofil tersebut dan berfungsi sebagai sumbat untuk mencegah spermatozoa yang lain masuk (gambar. 10)



Gambar 10. Telur trout dengan spermatozoa yang berada dalam saluran mikrofil (sumber : Ginzburg, 1972,)

Cara lain untuk mencegah sel telur untuk mencegah spermatozoa masuk adalah terjadinya reaksi kortikal sehingga mikrofili menjadi lebih sempit dan spermatozoa yang bertumpuk pada saluran mikrofili terdorong ke luar. Reaksi korteks juga berfungsi membersihkan korion dari spermatozoa yang melekat karena akan mengganggu proses pernapasan zigot yang sedang berkembang. Reaksi korteks diilustrasikan pada gambar 11.



Gambar 11. Diagram reaksi korteks dan pembentukan ruang perivitelin sesaat setelah sperma masuk ke dalam sel telur (sumber : Gilbert: 1988, hlm.54)

Ada beberapa hal yang mendukung berlangsungnya pembuahan, yakni spermatozoa yang tadinya tidak bergerak dalam cairan plasmanya, akan bergerak setelah bersentuhan dengan air dan dengan bantuan ekornya, bergerak ke arah



telur. Selain itu, telur mengeluarkan zat gimnogamon yang berperan menarik spermatozoa ke arahnya.

II.18. Analisa LC-MS/MS

Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS, atau alternatif KCKT-MS) adalah teknik kimia analitik yang menggabungkan kemampuan pemisahan fisik dari kromatografi cair (atau KCKT) dengan kemampuan analisis massa spektrometer massa. Aplikasi ini berorientasi pada deteksi dan identifikasi potensi spesifik bahan kimia terhadap kehadiran bahan kimia lainnya (dalam campuran yang kompleks) (Sorensen *et al.*, 2005).

Liquid Chromatography Mass Spectrophotometer (LC-MS) atau dikenal sebagai kromatografi cair spektroskopi massa merupakan teknik kimia analitik yang menggabungkan kemampuan pemisahan fisik kromatografi cair (HPLC) dengan kemampuan analisa massa (MS). Analisis LC-MS digunakan untuk pemisahan suatu komponen serta menentukan struktur kimia dari molekul organik berdasarkan perhitungan masa dari molekul tersebut serta pola fragmentasinya.

Tahapan proses MS dapat dibagi menjadi injeksi, ionisasi, akselerasi, fragmentasi dan deteksi. Injeksi merupakan proses pemasukan sampel kedalam alat. Sampel yang telah dimasukkan kemudian dipanaskan melebihi titik didihnya, sehingga beralih fasa menjadi gas dan masuk ke dalam ruang ionisasi. Partikel sampel kemudian ditembak dengan elektron berenergi tinggi, yaitu 70 eV (elektron volt) atau 6700 kJ/mol. Adanya penembakan ini membuat sampel terbombardir sehingga salah satu elektronnya keluar. Dengan demikian, partikel tersebut menjadi bermuatan positif. Ion bermuatan positif kemudian didorong hingga melewati celah kecil dan melaju dengan kecepatan tinggi ke tahap selanjutnya (akselerasi). Ion



positif yang bergerak dengan cepat tersebut selanjutnya dibelokkan dengan medan magnet sehingga terjadi pemisahan fragmen ion sesuai dengan rasio massa per muatannya. Setelah ion-ion dipisahkan berdasarkan massa per muatan (m/z), selanjutnya dideteksi beratnya secara elektrik (Zwiener and Frimmel, 2004; McMurry et al., 2010).

II.18. Analisa ELISA

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) merupakan suatu teknik biokimia untuk mendeteksi kehadiran antibodi atau antigen dalam suatu sampel.

Penggunaan ELISA melibatkan setidaknya satu antibodi dengan spesifitas untuk antigen tertentu. Umumnya ELISA dibedakan menjadi dua jenis, yaitu *competitive assay* yang menggunakan konjugat antigen–enzim atau konjugat antibodi–enzim, dan *non-competitive assay* yang menggunakan dua antibodi. Pada ELISA *non-competitive assay*, antibodi kedua akan dikonjugasikan dengan enzim sebagai indikator. Teknik kedua ini seringkali disebut sebagai "*Sandwich*" ELISA.

Uji ini dilakukan pada *plate 96-well* berbahan polistirena. Untuk melakukan teknik "*Sandwich*" ELISA ini, diperlukan beberapa tahap yang meliputi: Well dilapisi atau ditemeli antigen ; Sampel (antibodi) yang ingin diuji ditambahkan ; ditambahkan antibodi kedua yang dikonjugasikan dengan enzim tertentu seperti peroksidase alkali. Antibodi kedua ini akan menempel pada antibodi sampel sebelumnya ; dimasukkan substrat enzim yang dapat menimbulkan warna tertentu saat bereaksi ; intensitas warna campuran diukur dengan spektrofotometer yang disebut ELISA reader hingga mendapatkan hasil berupa densitas optis (OD).

Dengan menghitung rata-rata kontrol negatif yang digunakan, didapatkan nilai cut-off untuk menentukan hasil positif-negatif suatu sampel. Hasil OD yang berada di



BAB III

KERANGKA KONSEP DAN OPERASIONAL PENELITIAN

III.1. Kerangka Konsep Penelitian

Tahapan penting dalam proses pematangan gonad ikan kerapu macan adalah faktor eksternal dan internal. Salah satu faktor eksternal adalah feromon seks yang dikeluarkan oleh lawan jenis. Feromon seks adalah senyawa kimia yang dikeluarkan oleh ikan pada saat proses pematangan gonad dan pemijahan. Feromon yang dikeluarkan umumnya melalui urin dan sperma.

Ikan mendeteksi adanya reseptor pembau dalam bentuk stimulus kimia. Stimulus tersebut melalui lubang hidung (nostril) dirubah dalam bentuk signal elektrik yang berasal dari gerakan silia yang kemudian melewati olfactory lamella yang berbentuk *rosette*. Sinyal yang dihasilkan pada olfactory lamella diteruskan pada olfactory bulb dan olfactory tract yang kemudian diterjemahkan pada otak telencephalon. Sel reseptor penciuman adalah sel sensitif utama, yaitu sel saraf (neuron sensorik). Sel reseptor memiliki dendrit tebal, yang keluar dari bagian inti (nuklir) neuron dan mencapai permukaan epitel. Bagian epikal dendrit berakhir di ujung yang berbentuk bulat (kenop) yang memproyeksikan permukaan epitel.

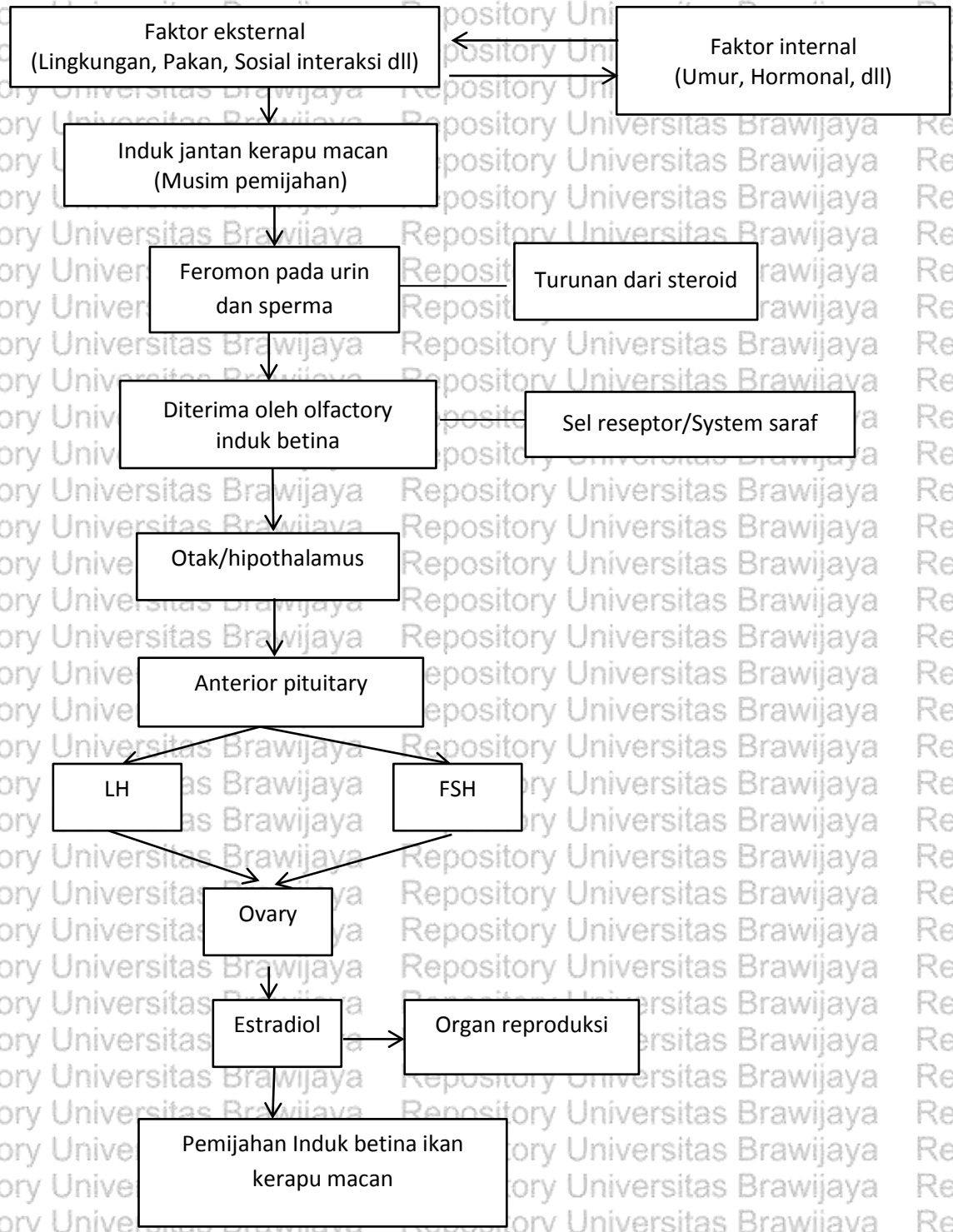
Senyawa yang keluar ini akan tercium oleh vomeronasalorgan (VNO) dan selanjutnya sinyal ini akan diteruskan ke hipotalamus agar memberikan respon/tanggapan. Waktu yang diperlukan untuk menanggapi respon tersebut hanya sepersepuluh ribu detik, maka akan ada respon dari otak melalui perubahan psikologi, seperti peningkatan pada kelenjar hormon dan kerja dari produksi hormon testosteron (pada jantan) atau hormon esterogen (pada betina)



Sebagai respon, hipotalamus akan melepaskan GnRH yang selanjutnya bekerja pada kelenjar hipofisis. Pada tahap ini hipofisis mensekresikan hormon LH (Luteinizing hormon) yang bekerja pada lapisan teka oosit. Akibat kerja LH, lapisan teka akan mensintesis hormon 17α -hidroksiprogesteron yang kemudian di lapisan granulosa akan diubah menjadi $17\alpha,20\beta$ -dihidroksiprogesteron (maturation inducing steroid, MIS) oleh enzim 20β -hidroksysteroid dehydrogenase.

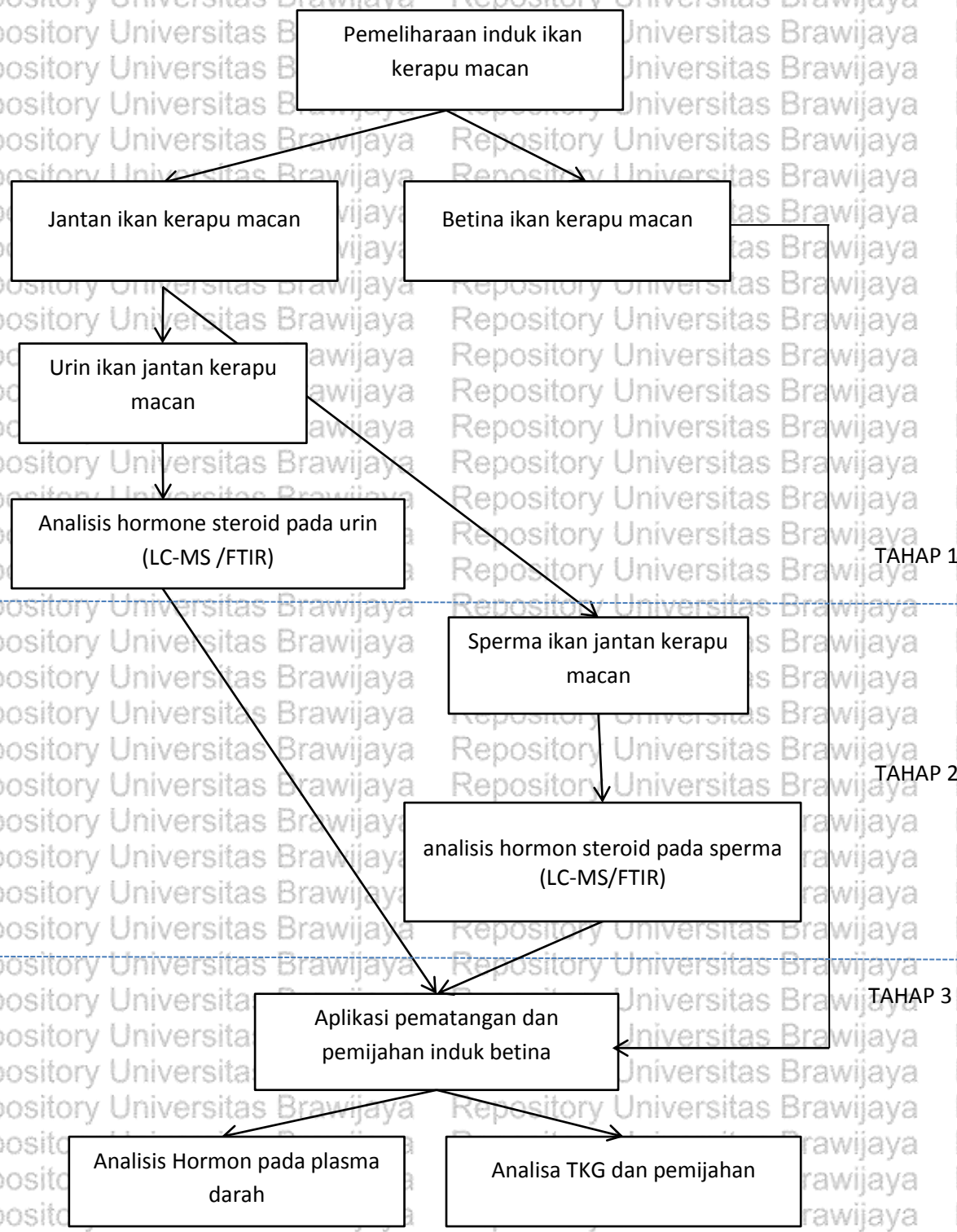


Diagram kerangka konsep penelitian

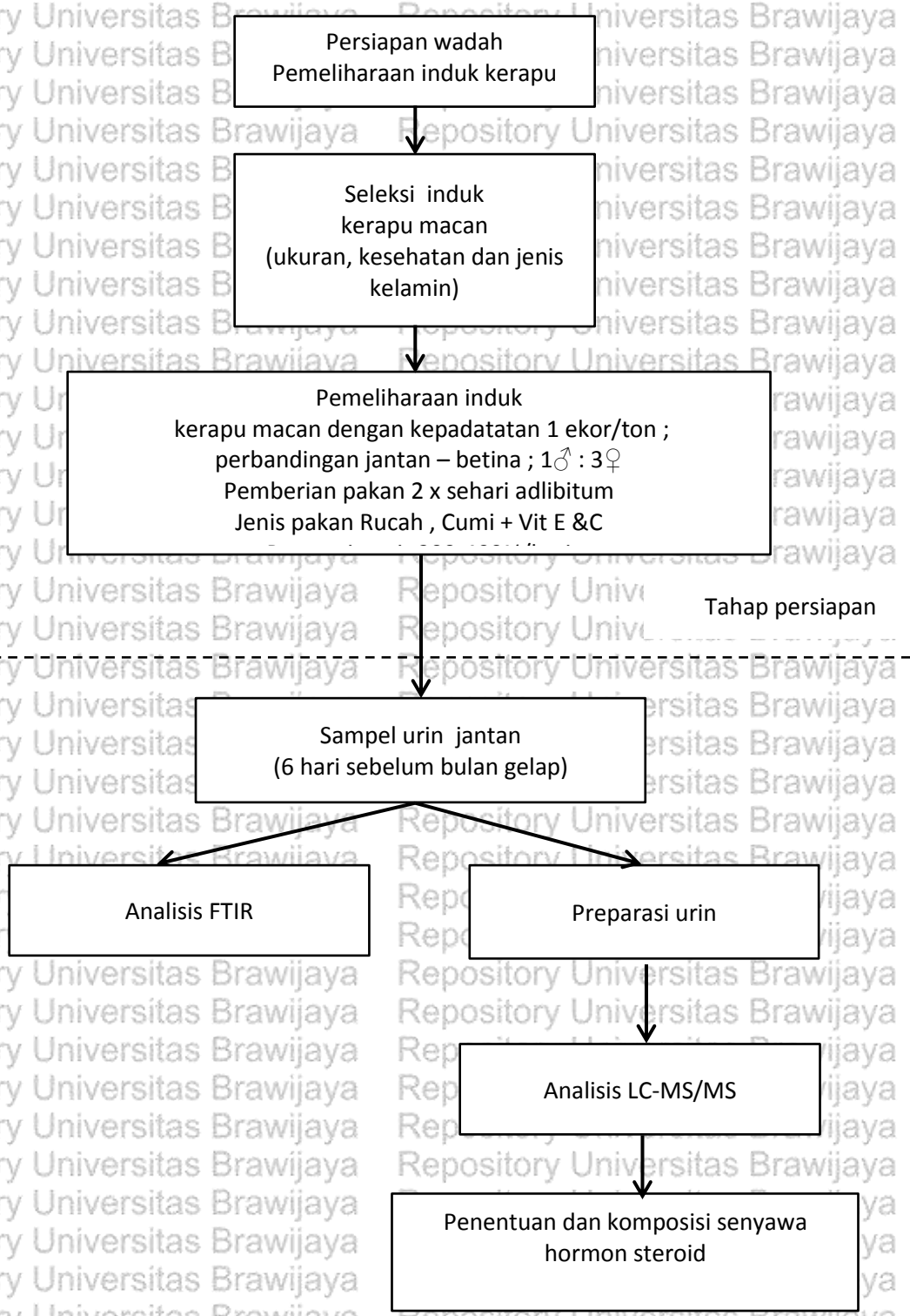




III.2. Kerangka Operasional Penelitian

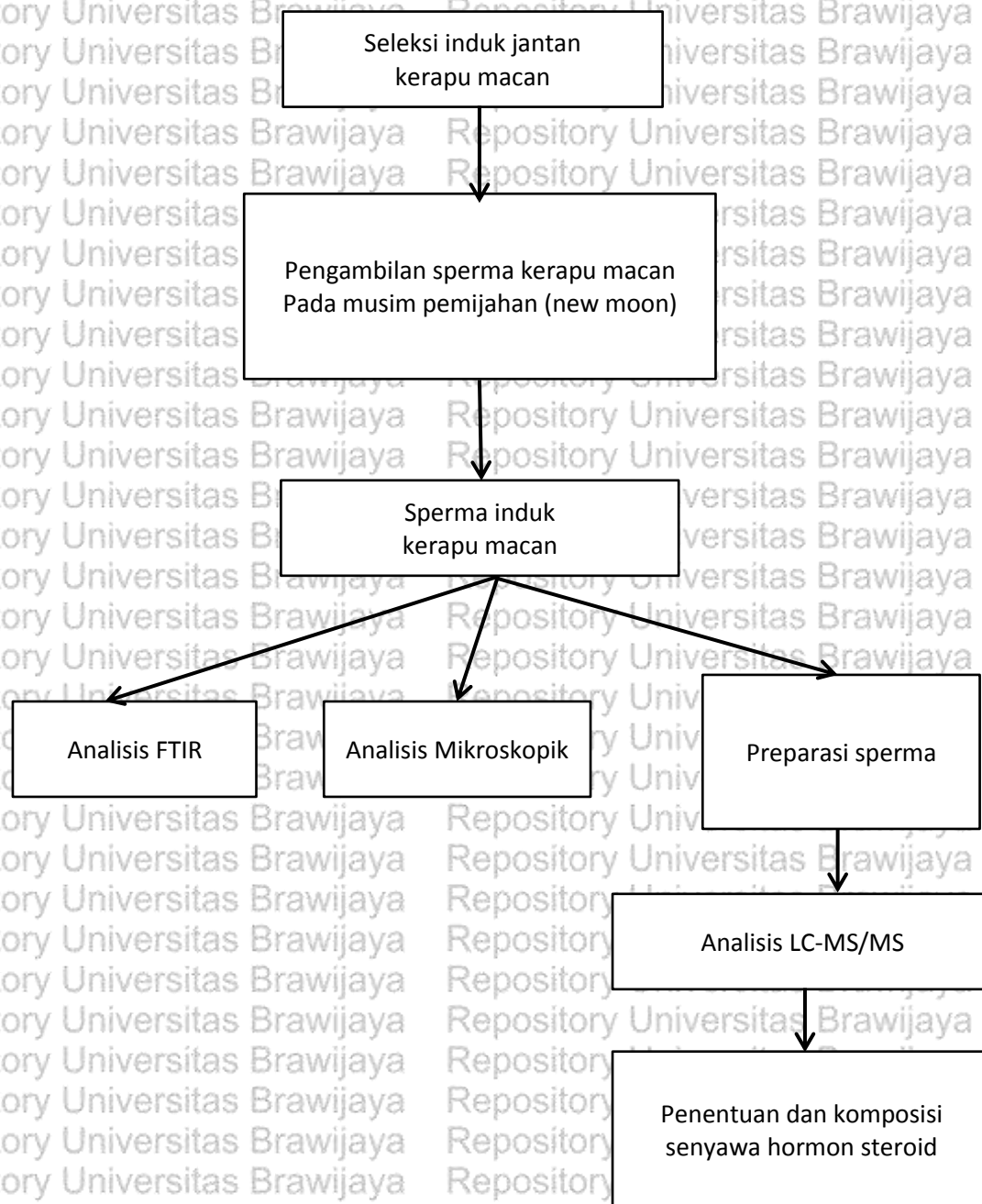


a. Tahap 1. Analisa urin

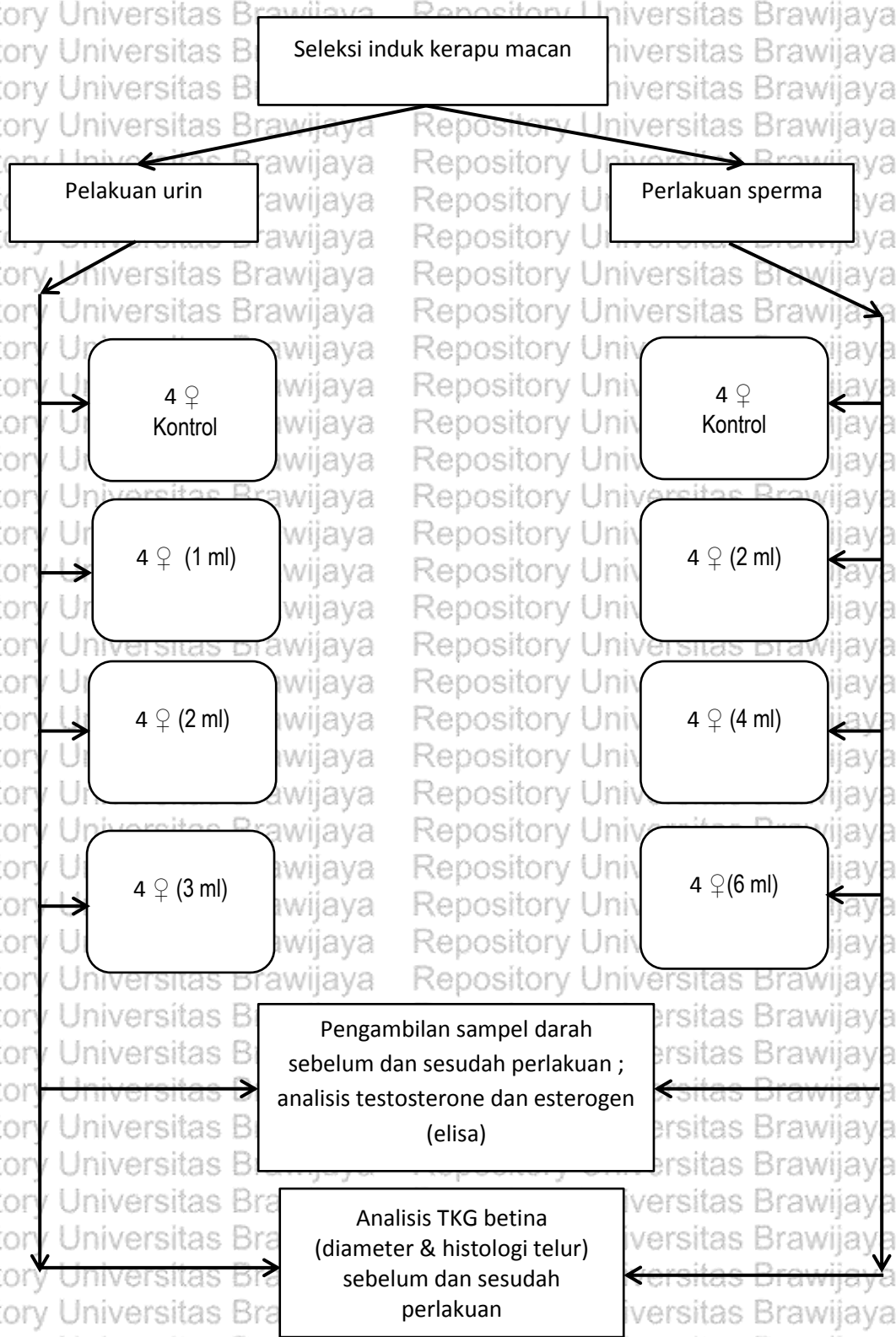




b. Tahap 2. Analisa sperma



c. Tahap 3. Aplikasi





BAB IV METODOLOGI

IV. 1. Persiapan Induk Kerapu macan.

IV.1.a. Tujuan Kegiatan

Tujuan dari kegiatan ini adalah mendapatkan induk kerapu macan yang sehat dan telah beradaptasi dengan lingkungan serta dengan tingkat kematangan gonad yang telah mencapai TKG 2 dan 3. Kegiatan ini diharapkan dapat memberikan ketersediaan induk baik jantan dan betina untuk digunakan pada tahapan kegiatan penelitian selanjutnya. Tujuan selanjutnya adalah mendapatkan induk jantan fungsional yang diambil sampel urin dan spermanya, untuk mengetahui kandungan senyawa feromon pada urin dan sperma tersebut.

IV.1.b. Kegiatan Manajemen Pemeliharaan Induk

Induk kerapu macan dipelihara pada bak beton dengan volume 50 ton, dengan kepadatan 25 ekor/bak. Pergantian air dilakukan dengan cara air mengalir sebanyak 300-400% dari total volume per hari. Setiap hari diberikan pakan berupa ikan dan cumi-cumi (2:1) 1 kali per hari sampai kenyang (2-5% biomass per hari).

Pemeliharaan induk ini dilakukan di hatchery swasta yang berlokasi di Gondol, Bali.

Pengamatan terhadap panjang total dan berat tubuh serta kematangan gonad dilakukan setiap bulan sekali pada bulan gelap (bulan baru). Pengamatan kematangan gonad di dilakukan dengan pengambilan sampel isi gonad dengan cara kanulasi yaitu dengan memasukan selang kateter ke lubang kelamin induk, kemudian telur atau sperma dipindahkan ke chamber yang dilengkapi tutup agar sample gonad tidak mengering. Sampel isi gonad yang didapat diperiksa di mikroskop yang dilengkapi dengan micrometer untuk membedakan jenis kelamin



ikan; serta pengukuran diameter telur dalam gonad (oocyt) pada induk betina (Rimmer *et al.*, 2004). Untuk mengetahui tingkat kematangan gonad induk (TKG) awal dilihat dari diameter oocyt dalam gonadnya.

IV. 2. Penelitian Tahap 1.

Pada penelitian tahap satu ini meliputi koleksi urin dan menganalisisnya, Pengambilan urin di dilakukan pada bulan gelap pada saat induk jantan mulai terangsang untuk memijah. Proses terangsang induk jantan ini di tandai dengan pola warna pada beberapa tubuhnya menjadi lebih terang, dan gerakannya lebih agresif terhadap induk betina.

IV.2.a. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Hatchery milik swasta yang berlokasi di Desa Penyabangan, Kecamatan Gerokgak, Kabupaten Buleleng, Bali. Waktu pelaksanaan kegiatan dari Bulan Oktober 2016 sampai dengan Bulan Januari 2017. Analisa Urin dilakukan di Laboratorium Politeknik Negeri Malang.

IV.2.b. Tujuan Kegiatan

Kegiatan ini bertujuan untuk mendapatkan sampel urin serta analisis senyawa feromon yang didapat dari urin induk jantan kerapu macan dengan metode LC-MS dan FTIR.

IV.2.c. Kegiatan Pengambilan urin ikan

Pengambilan urin ini dilakukan dengan cara mengangkat induk jantan, yang kemudian diletakan pada wadah yang telah diisi air dan obat bius. Obat bius yang digunakan adalah MS222 (*tricaine methanesulfonate*) dengan dosis 15 – 30 mg/L (Yamazaki, 1990; Kathleen *et al.*, 2011). Setelah terjadi proses penenangan, induk jantan tersebut akan distriping perutnya guna mendapatkan urinnnya. Proses striping



dilakukan dengan menekan secara lembut perut dengan arah ke anterior ke papilla genital dan mengumpulkan urin langsung ke botol kaca.

IV.1.d. Analisa Kandungan Feromon Pada Urin

Isolasi feromon mengacu pada penelitian Yambe, *et al.* (2006) yang dimodifikasi, sebanyak \pm 10 ml urine dikumpulkan dari beberapa ekor ikan uji. Ditambahkan aquadest dengan volume yang sama kemudian direndam dengan dietil eter atau etil asetat n-hexan dengan perbandingan (1:1).

Analisa urin dengan LC-MS/MS

Sepuluh mikroliter sampel urin yang dilarutkan disuntikkan ke Pro C18 RS kolom YMC-Pack (150 x 2,0 mm, ukuran partikel 5 m, Jepang). Sampel dikirimkan pada laju alir 200 ml / menit. Fase gerak terdiri dari 0,1% asam format dalam air suling (A) dan 2 mM amonium asetat dengan metanol: asetonitril (2: 1 v / v) (B). Pemisahan LC dilakukan dengan program gradien pelarut linier dari: 60% A 40% B pada 0 menit, 57% A ke 43% B pada 4 min, 0% A ke 100% B pada 10 menit, dan 60% A 40% B pada 15 menit. Total waktu LC berjalan adalah 15 menit.

Sistem LC itu dihubungkan langsung dengan tahap quadropole tiga TSQ Quantum spektrometer Ultra massa (Thermo Scientific, USA) yang dilengkapi dengan pemanas elektro-semprot ionisasi (H-ESI) penyelidikan. Spektrometer massa berjalan dalam modus ion negatif ([M-H]⁻) dan digunakan sebagai sarana ionisasi dengan suhu kapiler 350 ° C, tegangan semprotan 5.0 kV, suhu menguap dari 250 ° C, tekanan selubung gas dari 60 psi, dan tekanan gas tambahan dari 40 psi.

Analisa urin dengan FTIR

Urin disaring secara steril menggunakan alat Millipore ukuran 0,2 μ m (Balerica, MA), dibilas terlebih dahulu menggunakan 20 ml etanol dan 60 ml



aquades lalu dilewatkan kolom resin polistirene (1 g TSK-G3000S; Tohso Chemical, Tokyo, Japan) sebanyak 30ml/menit. Dibilas kolom menggunakan 20 ml etanol 50%, 80% dan absolut secara berurutan. Berikutnya adalah ekstraksi pada kolom Sephadex LH-20 (10 x 500 mm; Amersham, Piscataway, NJ) dengan etanol 50% diikuti etanol 70% sebanyak 0,5 ml/menit. Selanjutnya dimasukan sampel ke dalam kolom kromatografi 5C18-AR-II (4,5 x 250 mm) kartrid Waters "Sep-Pak ®", Waters Corporation, Milford, MA, USA) yang dialiri 0,2 ml/menit metanol 28%.

Analisa dengan *Fourir Transform Infra Red* memodifikasi penelitian yang telah dilakukan Schutze (2015) yaitu sebanyak 1 ml sampel urine ikan uji masing-masing diletakkan dalam mikrotube dan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 2 menit. Dibuang supernatant, sedangkan pellet yang didapat ditambah dengan PBS sebanyak 2 µl. Sampel dietakkan pada *attenuated total reflection (ATR) sample holder*. Sebelum disalurkan ke lintasan sinar inframerah, sampel akan mendapat treatment penguapan CO₂/H₂O selama 10 menit secara otomatis. Selanjutnya spectrum diukur menggunakan spectrometer FTIR pada panjang gelombang 400-4000 cm⁻¹. Untuk menganalisa dan menampilkan spectrum inframerah, digunakan software Perkin-Elmer (PerkinElmer, Norwalk, CT, USA), and Omnic (Thermo-Nicolet, Madison, WI, USA). Pengamatan dilakukan terhadap kemunculan puncak grafik yang kemudian gambarnya disimpan.

IV.3. Penelitian Tahap 2

Kegiatan tahap ini adalah menganalisis kandungan senyawa feromon pada sperma jantan fungsional. Induk jantan kerapu macan yang diambil spermanya harus memiliki kriteria sebagai berikut ; induk telah terangsang untuk memijah dengan ciri warna organ operculum memutih, induk lebih agresis dan selalu berenang di dekat induk betina.



IV.3.a. Tujuan Kegiatan

Kegiatan ini bertujuan untuk mendapatkan sampel sperma menganalisis senyawa feromon yang didapat dari sperma induk jantan kerapu macan dengan metode LC-MS dan FTIR.

IV.3.b. Kegiatan Pengambilan Sperma

Sebelum pengambilan sperma, terlebih dahulu ikan di bius dengan obat anastesi MS-222. Pengambilan sperma dilakukan dengan cara memberikan tekanan pada bagian perut ikan (striping), dengan arah dari bawah linea lateralis (di atas sirip perut) ke arah lubang genital. Sebelum melakukan penekanan ini terlebih dahulu dilakukan penekanan-penekanan lembut, sehingga urin dan kotoran dapat keluar. Setelah kotoran dan urin tidak keluar lagi maka pengambilan sperma dapat dilakukan. Sperma yang keluar diambil dengan spuit plastik 1 ml.

IV.3.c. Analisa Kandungan Feromon Pada Sperma

Pengamatan Morfologi Sperma

Morfologi sperma ikan dalam penelitian ini diamati menggunakan *scanning electron microscope* dan teknik fiksasi yang mengacu pada Verma *et al.* (2009). Diawali pembuatan larutan Karnovsky yang telah dimodifikasi yaitu mencampur 0,2 M fosfat dan 40 gram *paranormaldehyde* ke dalam 960 ml aquabides serta 40 ml glutaraldehyde konsentrasi 25% yang ditambahkan larutan penyangga 0,1 M natrium fosfat untuk mempertahankan pH 7,4. Fiksasi berlangsung selama 3 jam pada suhu 4°C. Dilanjutkan dengan pembilasan menggunakan larutan penyangga lalu sebanyak 3 kali dengan aquabides selama 15 menit. Sampel dikeringanginkan lalu diletakkan kedalam cawan untuk dilapisi emas palladium berukuran 20nm (SEM Leo



435 UP). Terakhir ialah pengamatan menggunakan mikroskop SEM6200 Seri LabGeni.

Pengamatan Komposisi Seminal Plasma

Sampel sperma ikan uji dimasukkan ke dalam tabung eppendorf sebelum di sentrifugasi dengan kecepatan 1000 g selama 10. Supernatant didapatkan setelah mengulang langkah ini sebanyak tiga kali. Sampel dianalisa menggunakan Inductively coupled plasma emission spectroscopy (Perkin Elmer Optima, 3100RL), berdasarkan metode Widyatmoko (2004) yang telah dimodifikasi. Semua peralatan yang terbuat dari kaca dibilas dengan larutan HNO_3 1% untuk menghilangkan debu dan menghindari kontaminasi. Sebanyak 0.1 ml sampel ditambah dengan 1 ml air, 1 ml air regia dan 6 ml HF konsentrasi 40%. Pindahkan campuran tersebut ke dalam gelas grafit, lalu masukkan dalam autoklaf dan panaskan selama 90 menit pada suhu 110°C . Selanjutnya, dinginkan sampel dengan cara memasukkannya dalam 150 ml gelas PTX yang berisi 20 ml air dan 2,8 gr Kristal H_3BO_3 , aduk menggunakan magnetic stirrer selama 5 menit. Ambil 25 ml larutan dan tuang dalam tabu ukur kapasitas 200 ml. Tambahkan 2 ml larutan Cs 10% untuk menghilangkan interference lalu destruksi dalam microwafe.

Analisa sperma dengan FTIR

Analisa *Fourier Transform Infra Red* untuk sperma ikan uji adalah mengacu dan memodifikasi penelitian yang telah dilakukan Schütze (2015) yaitu sebanyak 1 ml sampel masing-masing diletakkan dalam mikrotube dan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 2 menit. Dibuang supernatant, sedangkan pellet yang didapat ditambah dengan PBS sebanyak 2 μl . Sampel dietakkan pada *attenuated total reflection (ATR) sample holder*. Proses selanjutnya sama dengan perlakuan pada urin.



Analisa sperma dengan LC-MS/MS

Sampel sperma yang didapat disentrifugasi selama 5 menit pada kecepatan 3000 rpm, dan diambil supernatan. Simpan pada - 20°C untuk keperluan analisa.

Proses selanjutnya pada penggunaan alat LC-MS/MS dilakukan sama dengan perlakuan pada urin.

IV.4. Penelitian Tahap 3.

Kegiatan ini merupakan kegiatan aplikasi penggunaan urin dan sperma sebagai feromon jantan terhadap reproduksi betina kerapu macan. Pada tahapan penelitian ini memerlukan persiapan yang matang.

IV.4.a. Tujuan Kegiatan

Tujuan kegiatan tahap 3 ini adalah mengetahui pengaruh dan peranan urin dan sperma jantan terhadap TKG induk betina kerapu macan, yang meliputi tingkat hormon estradiol dan testosteron dalam plasma darah juga diameter telur ikan.

IV.4.b. Adaptasi Ikan

Ikan yang telah diseleksi, terlebih dahulu di lakukan adaptasi di bak percobaan sebelum di beri perlakuan. Kegiatan ini dilakukan selama kurang lebih satu bulan. Ini bertujuan untuk menghindari ikan stress dan dapat hidup dengan baik di tempat pemeliharaan atau lingkungan yang baru. Indikator dari kegiatan ini adalah apabila ikan telah memiliki nafsu makan yang cukup tinggi. Pada tahap ini induk ikan dipelihara pada bak beton dengan ukuran 4x3x1 m, dengan system sirkulasi pergantian air sebanyak 300% per hari.

IV.4.c. Pemasangan Tanda (chips)

Kegiatan pemasangan chips ini dilakukan agar data dan informasi yang didapat lebih akurat pada masing-masing individu ikan. Chips terbuat dari logam



tahan karat yang di dalamnya terdapat alat elektronik yang dapat memunculkan kode pada saat dibaca dengan tag reader. Proses penanaman chips dilakukan pada punggung ikan yang terlebih dahulu ikan dipingsankan menggunakan anasthesi (obat bius) MS222 (*tricaine methanesulfonate*) dengan dosis 15 – 30 mg/L (Yamazaki, 1990 ; Kathleen *et al.*, 2011). Pemasangan chips menggunakan implanter ke dalam tubuh ikan.

IV.4.d. Kegiatan Aplikasi Penggunaan Urine dan Sperma Untuk Pematangan Induk Ikan Betina

Urine dan sperma di ujikan pada beberapa induk betina kerapu macan, dengan cara di semprotkan ke media air pemeliharaan. Induk betina yang digunakan terlebih dahulu diamati stadia kematangan gonadnya dengan cara dikanulasi. Induk-induk ini ditempatkan pada bak beton dengan volume 12 ton. Masing-masing bak diisi dengan induk betina kerapu macan sebanyak 4 ekor. Ukuran induk betina yang digunakan sebagai hewan uji adalah panjang 55 – 59 cm dengan berat 4 – 4,5 kg. Parameter yang diujikan adalah dosis urin ikan jantan yaitu : 1 ml, 2 ml dan 3 ml. Sedangkan perlakuan pemberian sperma adalah 2 ml, 4 ml dan 6 ml. Penyemprotan urin dan sperma jantan dilakukan malam hari, pada pukul 19.00. Pada penelitian ini rancangan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL).

Kegiatan ini dilakukan selama 6 hari sebelum gelap bulan hingga puncak bulan gelap. Pada saat perlakuan sistem air yang digunakan adalah resirkulasi, dengan tujuan agar urin atau sperma tidak terbuang. Setelah 6 jam dari pemberian perlakuan, sistem pergantian air dirubah menjadi sirkulasi kembali. Hal ini agar kualitas air terjaga dengan baik. Pengamatan yang dilakukan meliputi aktivitas induk ikan betina dan kematangan gonad.



IV.4.e. Pengamatan profil hormon dalam plasma darah

Pengukuran konsentrasi hormon dalam darah dilakukan pada awal dan akhir perlakuan. Mekanisme pengambilan sampel darah yaitu dengan terlebih dahulu dibius dengan menggunakan anasthesi MS222. Ikan yang pingsan, darahnya diambil pada bagian pangkal ekor sebanyak 1 ml dengan menggunakan syringe kapasitas 3 ml yang sudah diberi anti koagulan (larutan citrate -phosphate-dextrose,), kemudian dimasukkan ke dalam microtube volume 1.5 ml dan disimpan dalam cool box. Darah yang ditampung dalam microtube disentrifusi pada kecepatan 10000 rpm selama 15 menit. Supernatan plasma darah diambil dan dimasukkan ke dalam microtube baru dan disimpan dalam freezer pada suhu minus 4°C (Wijayanti *et al.*, 2009).

Pengukuran hormon ini menggunakan metode ELISA. ELISA merupakan metode immunoassay yang menggunakan enzim sebagai label. Ini dilakukan untuk mengetahui kandungan hormone esterogen dan testoteron (Yun *et al.*, 2002).

Pengukuran kadar hormon dalam darah menggunakan Vidas ELISA kit untuk 17-estradiol (REF 30 330) dan testoteron (REF 30-406) (BioMarieux, Inc, Perancis).

IV.4.f. Pengamatan TKG betina kerapu macan

Pengambilan sampel telur dilakukan dengan cara di kanulasi. Waktu pengambilan dilakukan sebelum dan sesudah perlakuan pemberian urin dan sperma jantan. Telur yang didapat disimpan dengan larutan bouin yang kemudian akan dilakukan proses atau tahapan histologi. Hasil histologi ini yang akan dijadikan parameter untuk melihat tingkat kematangan gonad.

IV.4.g. Pembuatan histologis Gonad

Sampel telur yang didapat dari hasil kanulasi difiksasi dalam larutan nuetral buffered formalin selama 48 jam, selanjutnya di dehidrasi dalam larutan alkohol



bertingkat dari 70% hingga absolut, didealkoholasi dalam xylol, diinfiltasi dalam campuran xylol-parafin dan dicetak dalam paraplast (Sigma p3858). Telur yang telah ditanam dalam blok parafin diiris secara transversal dengan ketebalan 3 μ m dan diwarnai dengan larutan haematoxylin dan eosin. Irisan Telur tersebut diamati diameternya dengan mikroskop (Wijayanti *et al*, 2009). Preparat gonad diamati di bawah mikroskop berkamera (perbesaran 40x) Laboratorium Tuna Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut.

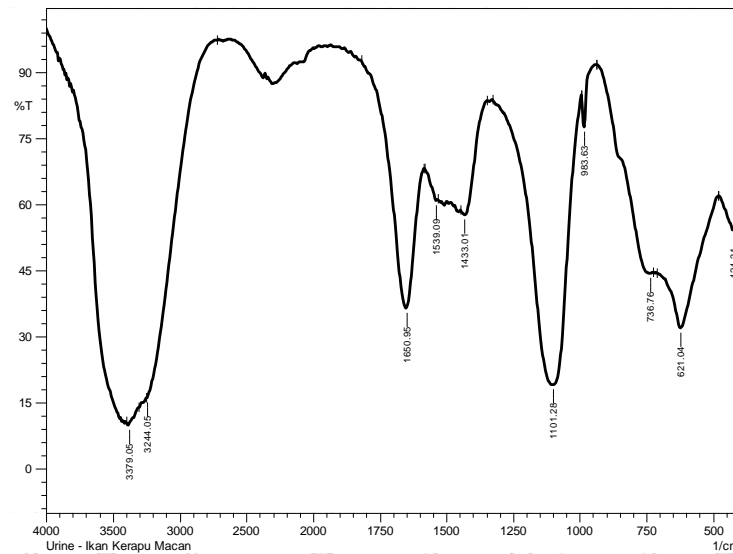


BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

V.1. Analisa Kandungan Urin

Hasil pengamatan spektrum massa menggunakan FTIR yang terdapat pada urin ikan kerapu macan ditunjukkan oleh Gambar 12. Terlihat untaian pita yang dihasilkan serapan infra merah memiliki pola karakter tertentu. Rincian masing-masing bilangan panjang gelombang dari pita tersebut dapat dilihat pada Tabel 3.



Gambar 12. Hasil Uji Spektrum FTIR pada Urin Ikan Kerapu Macan

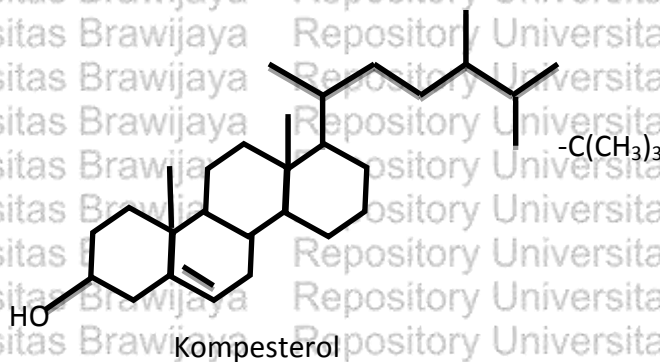
Tabel 3. Hasil uji spektrum FTIR pada Urin Ikan Kerapu

No	Bil. Gelombang (Cm ⁻¹)	Range (Socrates, 1994)	Jenis Vibrasi
1	3379,05	3550-3230	OH stretch
2	3244,05	~3280	-CO-O-OH
3	1650,95 dan 1539,09	1680-1620	-C=C straching non konjugasi
4	1433,01	1480-1440	-CH ₂ bend
5	1101,28	1125-1085	C-O alcohol 2 ^o
6	983,63	995-650	= C-H siklik band (OOP)



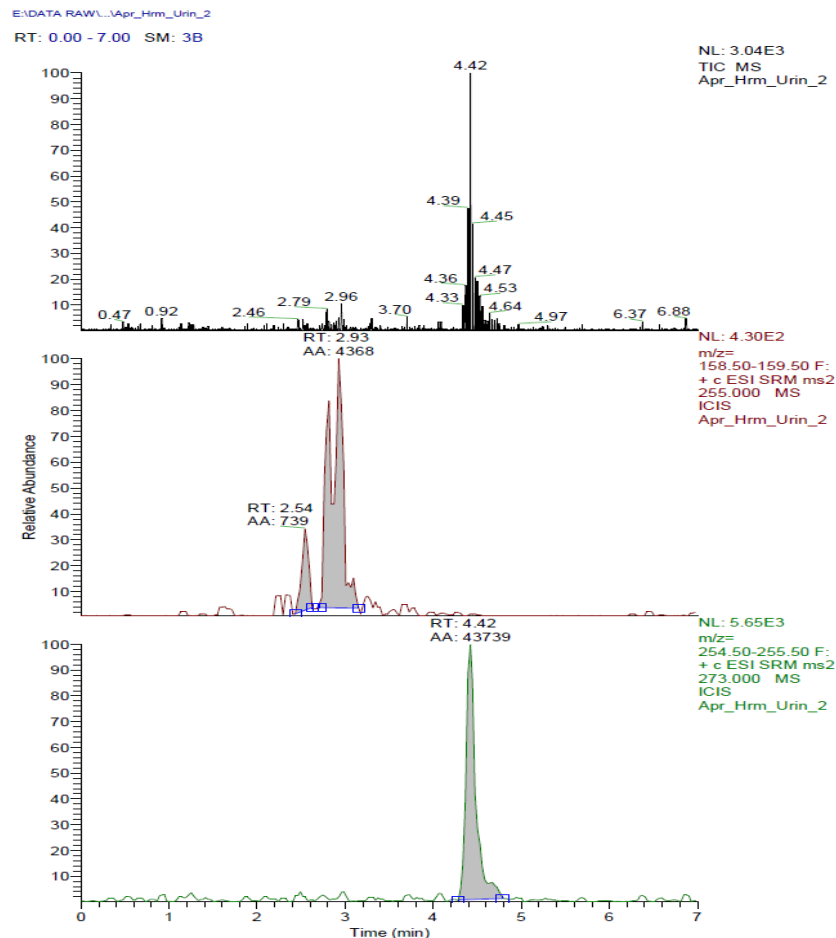
Berdasarkan Tabel diatas, urin dari ikan uji yang digunakan pada penelitian ini memiliki enam spektrum inframerah. Deteksi spektrum pertama terjadi pada daerah vibrasi ulur hydrogen dengan frekuensi $3379,05 \text{ cm}^{-1}$, dikategorikan sebagai senyawa asam karena adanya gugus OH yang mengalami peregangan. Spektrum ke-2 juga terdapat pada daerah vibrasi ulur hydrogen frekuensinya $3244,05 \text{ cm}^{-1}$ dan tergolong dalam alkohol karena kandungan gugus $-\text{CO}-\text{O}-\text{OH}$. Spektrum ke-3 terdapat pada daerah sidik jari dengan frekuensi $1650,95 \text{ cm}^{-1}$ dan $1539,09 \text{ cm}^{-1}$ yang dideskripsikan sebagai alkena karena kandungan gugus $-\text{C}=\text{C}$ non konjugasi yang sedang meregang. Spektrum ke-4 merupakan senyawa lain yang memiliki gugus $-\text{CH}_2$ bend yang berada pada daerah sidik jari dengan frekuensi $1433,01 \text{ cm}^{-1}$. Spektrum ke-5 tergolong dalam ester dengan kandungan gugus C-O alkohol 2^0 dan ditemukan pada frekuensi $1101,28 \text{ cm}^{-1}$. Spektrum ke-6 pada frekuensi $983,63 \text{ cm}^{-1}$ merupakan senyawa lain dengan kandungan gugus $=\text{C}-\text{H}$ siklik band (OOP).

Dari hasil spektrum dan gugus ikatan senyawa diatas dapat diduga bahwa terdapat senyawa steroid golongan alkohol β -silosterol, dengan gugus ikatan seperti pada gambar dibawah ini.



Gambar 13. Gugus kimia senyawa steroid golongan alkohol β -silosterol

Hasil analisis menggunakan LC-MS/MS pada urin ikan jantan kerapu macan terdapat beberaspuncak kurva atau peak (gambar 14). Hasil ini menunjukkan perkursor ion 255 ms dan 273 ms. Sedangkan produk ionnya menunjukkan 159F dan 255F (tabel 4). Hasil pencocokan dengan *massbank database* menunjukkan kemiripan dengan literature, berdasarkan Hauser *et al* (2008) yaitu senyawa 17 β -Estradiol, Androstenediol, Epiandosterone, Epietiocholanolone, Etiocholanolano, dan androsterone (tabel 5).

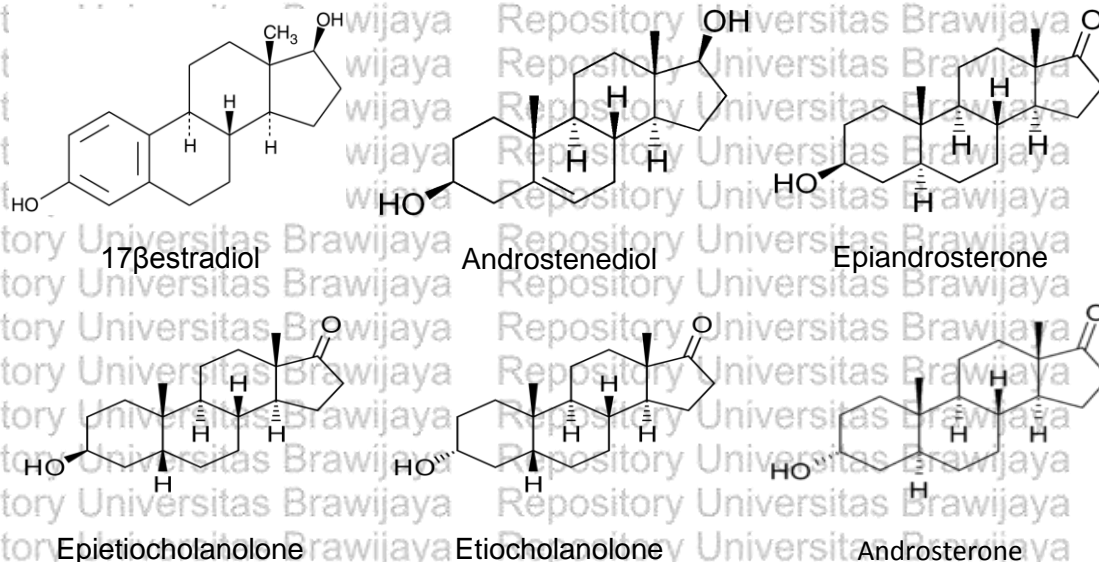


Gambar 14. Grafik analisis LC-MS/MS urin jantan kerapu macan

**Tabel 4.** Senyawa kimia hormone pada urin

Class of analytes	Analyte	Retention time (min)	Precursor ion (m/z)	Product ion (F)
Oestrogens	17 β -Estradiol	2.93	255	159
	Androstenediol	4.42	273	255
Androgens	Epiandrosterone	4.42	273	255
	Epietiocholanolone	4.42	273	255
	Etiocholanolone	4.42	273	255
	Androsterone	4.42	273	255

Hasil analisa senyawa hormon steroid hanya terdapat dua kelompok yaitu Estrogen dan Androgen, masing-masing dengan kelimpahan sebanyak 4369 dan 43739, dengan masing-masing waktu tahan (resistant time) 2,93 menit dan 4,42 menit. Lebih jelasnya senyawa esterogen dapat dilihat pada gambar 14, pada grafik di tengah sedangkan untuk senyawa androgen dapat dilihat pada grafik 14 bagian bawah. Struktur molekul dari hormon yang terdapat pada urin dapat dilihat pada gambar 15.

**Gambar 15.** Senyawa kimia yang terdapat pada urine dan sperma



Tabel 5. Paramater steroid dari Hauser *et al* (2008)

Compound specific MRM parameters of target steroids modified from Hauser *et al.* [21]. IS = internal standard.

Class of analytes	Analyte	Retention time (min)	Precursor ion m/z	Product ions (1/2)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)	Polarity	
Corticoids	α -Cortol	6.0	333	273/255	25	26/20	ESI+	
	Cortisol	6.4	363	121/97	30	26/30	ESI+	
	Cortisone	6.6	361	91/163	41/17	59/10	ESI+	
	Tetrahydrocortisol	8.2	349	301/295	17	13/13	ESI+	
	Tetrahydrocortisone	9.1	365	347/329	19	9/13	ESI+	
	Corticosterone	10.8	347	121/91	29	25/51	ESI+	
	11 β -Hydroxyetiocholanolone	13.1	307	271/253	14	9/13	ESI+	
	11-Oxoetiocholanolone	14.4	287	229/91	30	21/57	ESI+	
	Oestrogens	Estriol	5.0	271	133/157	25	26/20	ESI+
		17 β -Estradiol	15.9	255	159/133	25	19/20	ESI+
Estrone		19.2	271	159/157	25	20/20	ESI+	
Androgens	Androstenediol	16.0	273	255/159	18	12/21	ESI+	
	Testosterone	17.0	289	97/109	33	26/26	ESI+	
	4-Androstenedione	19.4	287	97/109	30	22/26	ESI+	
	Dehydroepiandrosterone	19.9	289	271/253	17	9/9	ESI+	
	Epitestosterone	21.0	289	109/97	33	26/26	ESI+	
	Epandrosterone	22.3	273	255/91	26	13/42	ESI+	
	Dihydrotestosterone	23.4	291	255/105	32	15/41	ESI+	
	Androstenediol	23.6	275	257/95	24	11/25	ESI+	
	Epitiocholanolone	23.7	273	255/147	26/30	13/20	ESI+	
	Etiocholanolone	26.3	273	255/91	26	13/42	ESI+	
	Androstenedione	26.3	289	271/253	30	13/17	ESI+	
	Androsterone	27.8	273	255/147	26/30	13/20	ESI+	
	Gestagens	Progesterone	30.9	315	97/109	30	25/25	ESI+
		Pregnanediol	31.9	285	175/189	30	18/18	ESI+
	IS	Prednisolone	6.1	361	343	17	10	ESI+
		Testosterone-d3	16.8	292	97	33	26	ESI+
		Estrone-d4	19.1	275	135	25	26	ESI+
Methyl testosterone		20.0	303	97	33	28	ESI+	
Progesterone-d9		30.6	324	100	30	25	ESI+	

Estradiol adalah steroid ester. Estradiol ini juga dikenal sebagai 17 β -estradiol (untuk membedakannya dari 17 α -estradiol) atau sebagai estro-1,3,5 (10) -triene-3,17 β -diol. Ia memiliki dua gugus hidroksil, satu pada posisi C3 dan yang lainnya pada posisi 17, serta tiga ikatan rangkap dalam cincin A. Karena dua gugus hidroksilnya, estradiol sering disingkat sebagai E2. Estrogen yang terkait secara struktural, estrone (E1), estriol (E3), dan estetrol (E4) masing-masing memiliki satu, tiga, dan empat gugus hidroksil. (Kuhl, 2005).

Sedangkan Androstenediol, dikenal sebagai androst-5-ene-3 β , 17 β -diol, adalah steroid androstane yang terjadi secara alami. [5] Ini terkait erat secara struktural dengan androstenedione (A4; androst-4-ene-3,17-dione), dehydroepiandrosterone (DHEA; androst-5-en-3 β -ol-17-one), dan testosteron (androst-4-en). -17 β -ol-3-one), serta 3 β -androstenediol (5 α -androstane-3 β , 17 β -diol). (Elks, 2014).



Epiandrosterone, atau isoandrosterone, disebut juga sebagai 3β -androsterone, 3β -hydroxy- 5α -androstane-17-one, atau 5α -androstane- 3β -ol-17-one, adalah hormon steroid dengan androgenik lemah aktivitas. Ini adalah metabolit testosteron dan dihidrotestosteron (DHT). Epiandrosterone secara alami diproduksi oleh enzim 5α -reduktase dari hormon adrenal DHEA. Epiandrosterone juga dapat dikonversi dari steroid alami androstenediol melalui dehidrogenase 17β -hydroxysteroid atau dari androstenedione melalui 3β -hydroxysteroid dehydrogenase (Yalkowsky *et al*, 2016).

Epietiocholanolone, dikenal sebagai 5β -androstane- 3β -ol-17-one atau sebagai etiocholan- 3β -ol-17-one, adalah etiocholane (5β -androstane) steroid serta metabolit testosteron aktif yang terbentuk di hati. Nagrath. *et al* (2012) mengatakan bahwa Jalur metaboliknya adalah testosteron menjadi 5β -dihidrotestosteron (melalui 5β -reduktase), [1] 5β -dihidrotestosteron menjadi 3β , 5β -androstenediol (melalui 3β -hydroxysteroid dehydrogenase), dan 3β , 5β -androstenediol ke epietiocholanolone (melalui 17β -hydroxysteroid dehydrogenase). Epietiocholanolone juga dapat dibentuk langsung dari 5β -androstenedione (melalui 3β -hydroxysteroid dehydrogenase). Ini adalah glucuronidated dan sulfat di hati dan diekskresikan dalam urin (Hauser *et al*. 2008).

Etiocholanolone, disebut sebagai 5β -androsterone, serta 3α -hydroxy- 5β -androstane-17-one atau etiocholan- 3α -ol-17-one, adalah etiocholane (5β -androstane) steroid serta endogen 17- ketosteroid yang dihasilkan dari metabolisme testosteron.. Etiocholanolone juga dikenal sebagai penghambat androstane neurosteroid.



Etiocholanolone dihasilkan dari 5β -dihidrotosteron, dengan 3α , 5β -androstenediol sebagai perantara. (Reddy, 2010).

Androsterone, atau 5α -androstan- 3α -ol-17-one, adalah hormon steroid endogen, neurosteroid, dan feromon putatif. [1] Ini adalah androgen lemah dengan potensi yang kira-kira $1/7$ dari testosteron. [2] Androsterone adalah metabolit testosteron dan dihidrotosteron (DHT). Selain itu, ia dapat diubah kembali menjadi DHT melalui dehidrogenase 3α -hydroxysteroid dan dehidrogenase 17β -hydroxysteroid, melewati intermediet konvensional seperti androstenedione dan testosteron (Motofei, 2011).

V.2. Hasil Analisa Kandungan Sperma

Hasil pengamatan dengan FTIR menunjukkan spektrum massa yang terdapat pada urin ikan kerapu macan ditampilkan pada Gambar 17. Terlihat untaian pita yang dihasilkan serapan infra merah memiliki pola karakter tertentu. Rincian masing-masing bilangan panjang gelombang dari pita tersebut dapat dilihat pada Tabel 6.

Sperma ikan uji penelitian ini memiliki lebih banyak profil spektrum inframerah jika dibandingkan dengan hasil pengamatan pada urin. Deteksi spektrum pertama terjadi pada daerah vibrasi ulur hydrogen dengan frekuensi 3243 cm^{-1} , dikategorikan sebagai senyawa asam karena didalamnya terkandung gugus OH.

Spektrum ke-2 yang juga terdapat pada daerah vibrasi ulur hydrogen merupakan senyawa alkane dengan frekuensi 2962 cm^{-1} kandungan gugus $-\text{CH}_3(\text{sp}^3)$ yang meregang. Begitu pula dengan spektrum ke-3, merupakan senyawa alkane dengan gugus $-\text{CH}_2(\text{sp}^3)$ yang meregang, terdapat pada frekuensi 2856 cm^{-1} . Spektrum ke-4 merupakan senyawa alkene yang ditemukan pada daerah sidik jari dengan frekuensi



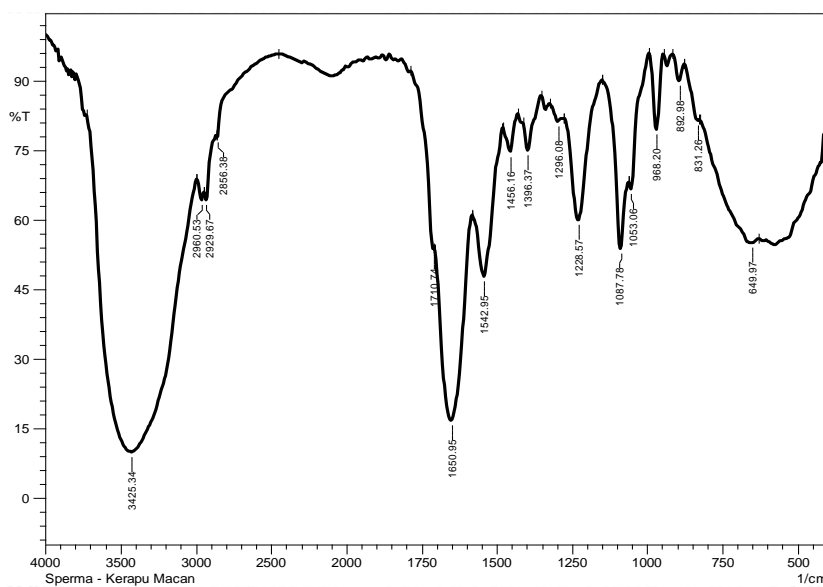
1650 cm^{-1} dan 1541 cm^{-1} serta memiliki gugus -C=C (ikatan non konjugasi regang).

Selanjutnya spectrum ke-5 yang dideteksi pada frekuensi 1456 cm^{-1} dan dikategorikan sebagai senyawa lain dengan kandungan gugus -CH_2 bend.

Spektrum ke-6 terdapat pada frekuensi 1396 cm^{-1} dideskripsikan sebagai senyawa lain dengan gugus $\text{-C(CH}_3)_2$ bend atau disebut germinal dimetil. Spektrum ke-7 terdapat pada frekuensi 1230 cm^{-1} dan diikuti spektrum ke-8 pada frekuensi 1087 cm^{-1} dideskripsikan sebagai ester. Kedua spektrum ini secara berurutan memiliki

kandungan gugus -C-O yang meregang dan C-O alcohol 2^o. Terakhir, spektrum ke-9 juga dideskripsikan sebagai senyawaan lain dengan kandungan gugus =C-H siklik band (OOP) yang terdapat pada tiga frekuensi yaitu 970, 891 dan 667 cm^{-1} . Hasil dari pengamatan ikataan kimia diatas dapat diduga bahwa terdapat kemiripan gugus senyawa yang terdapat pada urin, yaitu senyawa steroid golongan alkohol β -

silosterol.



Gambar 16. Hasil Uji Spektrum FTIR pada Sperma Ikan Kerapu Macan

**Tabel 6.** Hasil uji spektrum FTIR pada Sperma Ikan Kerapu

No	Bil. Gelombang (cm ⁻¹)	Range (Socrates, 1994)	Jenis Vibrasi
1	3423	3550-3230	OH stretch
2	2962	3000-2800	-CH ₃ (sp ³) stretch
3	2856	2870-2840	-CH ₂ - (sp ³) stretch
4	1650 dan 1541	1680-1620	-C=C stretch non konjugasi
5	1456	1480-1440	-CH ₂ bend
6	1396	1385-1365	-C(CH ₃) ₂ bend Atau germinal dimetil
7	1230	1300-1200	-C-O stretch
8	1087	1125-1085	C-O alcohol 2 ^o
9	970, 891, 667	995-650	= C-H siklik band (OOP)

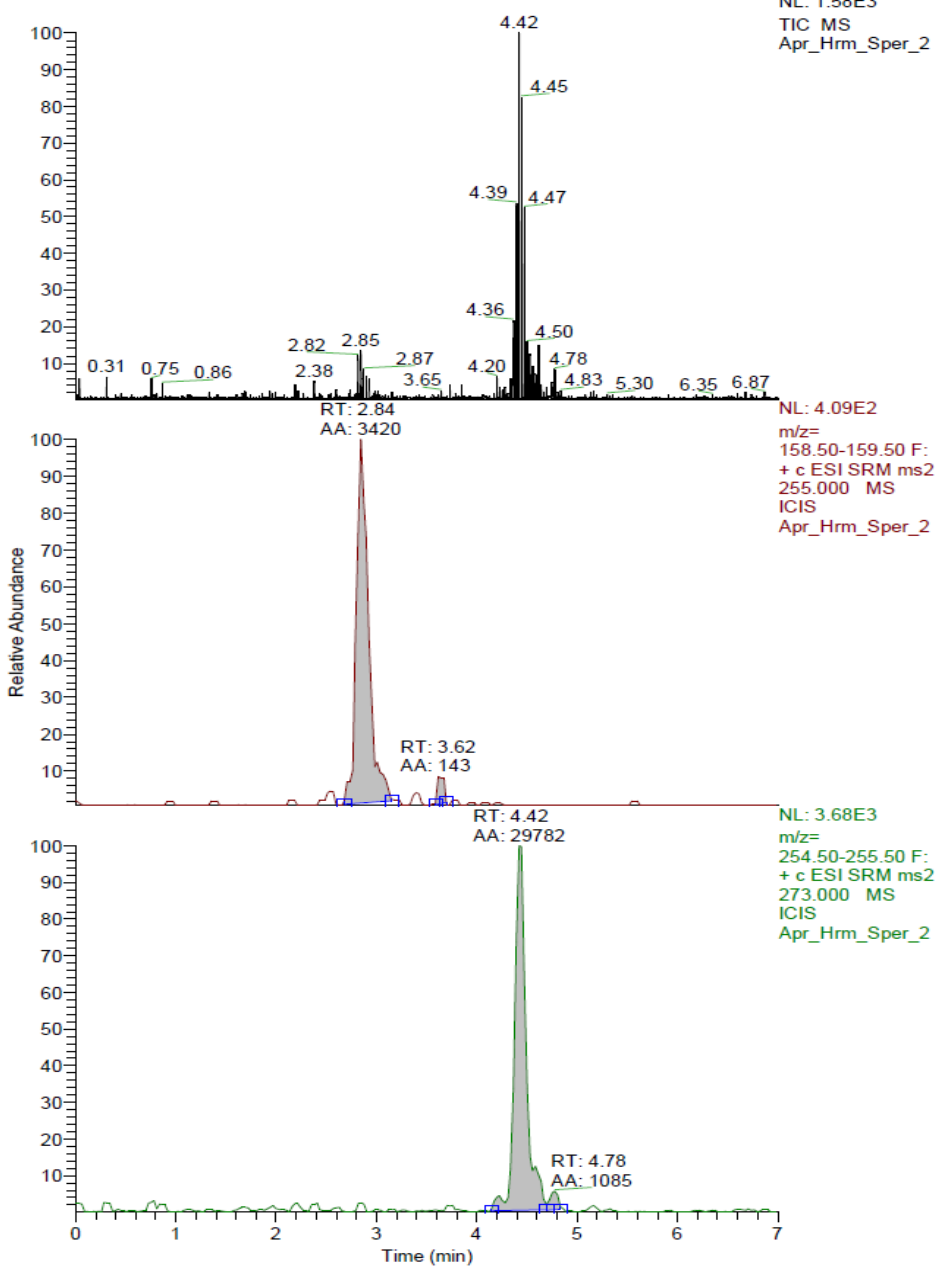
Hasil analisa uji LC-MS/MS menunjukkan kesamaan dengan hasil yang didapat pada urine, yaitu senyawa 17 β -Estradiol, Androstenediol, Epiandrosterone, Epietiocholanolone, Etiocholanolone, dan Androsterone. Hasil ini juga menunjukkan dua kelompok hormon yaitu Estrogen dan Androgen, masing-masing dengan kelimpahan sebanyak 3420 dan 29782, dengan resisten time 2,84 menit dan 4,42 menit (tabel 7).

Tabel 7. Senyawa kimia hormon pada sperma

Class of analytes	Analyte	Retention time (min)	Precursor ion (m/z)	Product ion (F)
Oestrogens	17 β -Estradiol	2.84	255	159
	Androstenediol	4.42	273	255
Androgens	Epiandrosterone	4.42	273	255
	Epietiocholanolone	4.42	273	255
	Etiocholanolone	4.42	273	255
	Androsterone	4.42	273	255



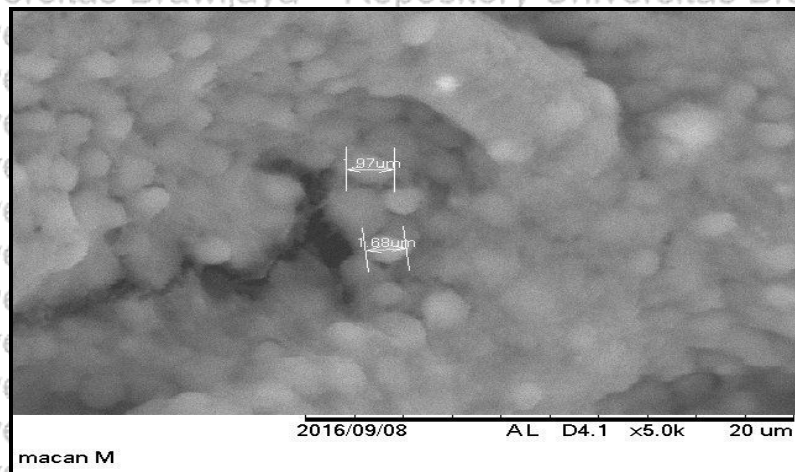
E:\DATA RAW\...Apr_Hrm_Sper_2
RT: 0.00 - 7.01 SM: 3B



Gambar 17. Grafik analisis LC-MS sperma jantan kerapu macan

Hasil pengamatan morfologi sperma ikan uji menggunakan mikroskop menunjukkan bahwa secara keseluruhan tampak homogeny dengan kepala

berbentuk bulat. Nilai terkecil untuk diameter kepala sperma ikan kerapu macan adalah 1,68 μm dan yang paling besar adalah 1,97 μm . Tian *et al.* (2015) dalam penelitiannya mendokumentasikan bahwa sperma *giant grouper* memiliki ukuran diameter kepala diatas 1 μm .



Gambar 18. Pengukuran Sperma Ikan Kerapu Macan

Kumpulan sperma yang ditampilkan Gambar 16. hanya tampak bagian kepala saja tanpa ekor maupun leher. Hal ini dimungkinkan karena jumlah kepadatan yang terlalu tinggi sebagai sampel uji. Di alam, ikan mengalami fertilisasi secara eksternal. Kompetisi sperma untuk dapat berhasil mencapai telur dan menembus lubang mikrofil tergolong besar. Kondisi ini menjadi alasan utama banyaknya volume sperma yang dibutuhkan oleh ikan di setiap musim pemijahan (Browne *et al.*, 2015).

Tabel 8. Hasil uji kandungan sperma ikan kerapu

Element	Weight %	Weight % σ	Atomic %
Carbon	46.493	1.653	58.336
Oxygen	34.583	1.338	32.576
Sodium	4.016	0.244	2.632
Magnesium	0.379	0.110	0.235
Phosphorus	3.838	0.230	1.867
Chlorine	6.803	0.313	2.892
Calcium	3.888	0.230	1.462



Hasil pengamatan di laboratorium menunjukkan bahwa setiap ekor sperma ikan kerapu macan tersusun atas karbon sebesar 46,49%, oksigen 34,58%, sodium 4,02%, magnesium 0,38%, fosfor 3,84%, klorin 6,80% dan kalsium 3,89% (tabel 8).

V.3. Aplikasi Penggunaan Urine dan Sperma Untuk Pematangan Induk Betina

V.3.1. Hasil Pengamatan visual Respon Tingkah Laku Induk Betina Pada Saat

Pemberian Urin Dan Sperma Jantan

Hasil Pengamatan secara visual tingkah laku induk kerapu macan betina yang diberikan urin dan sperma jantan kerapu macan dapat dilihat pada tabel 9 dibawah ini. Jika dilihat dari hasil pengamatan yang telah dilakukan didapatkan hasil yang berbeda antara pemberian urin dan sperma jika dibandingkan dengan kontrol.

Tabel 9. Tingkah laku ikan betina pada saat pemberian urin dan sperma ikan jantan

Tingkah Laku Ikan Betina	Pemberian Urin	Pemberian Sperma	Kontrol
Lebih agresif	√	√	-
Pola renang yang tidak beraturan	√	√	-
Nafsu makan berkurang	√	√	-
Lubang genital membesar	√	√	-

Dua hari setelah pemberian urin dan sperma menunjukkan bahwa tingkah laku ikan betina mulai menampakkan respon yaitu gerakkan pada ikan betina lebih agresif dan pola renang yang tidak beraturan. Pengamatan pada hari keempat menunjukkan bahwa nafsu makan ikan betina mengalami penurunan dan pada hari keenam terlihat penampakan lubang genital yang membesar.

Hasil pengamatan terhadap kualitas air pemeliharaan relatif cukup baik untuk kehidupan kerapu macan. Pada waktu selama penelitian kualitas air pemeliharaan



cukup stabil dengan kisaran suhu 28-30°C dengan nilai pH berkisar 7-8. Hasil

lengkapya dapat dilihat pada tabel 10 dibawah ini.

Tabel 10. Kualitas air pemeliharaan selama penelitian

Parameter	Nilai
Suhu	28 - 30°C
Salinitas	33 – 34 ppt
pH	7 – 8
Amoniak	0 – 0,25 mg/l

V.3.2. Hasil Analisa Hormon Pada Plasma Darah Setelah Pemberian Urin

a) Estradiol-17 β

Berdasarkan uji plasma darah pada ikan betina diketahui bahwa pemberian urin mampu meningkatkan konsentrasi hormon estradiol-17 β . Hal ini dapat dilihat pada hasil uji plasma darah sebelum dan akhir setelah perlakuan (Tabel 11).

Tabel 11. Konsentrasi hormon estradiol-17 β (pg/ml) dalam darah ikan kerapu macan betina pada perlakuan pemberian urin

Perlakuan	Ulangan	Sebelum	Sesudah	Peningkatan
Kontrol	1	97.031	130.4.33	33.402
	2	99.864	122.509	22.645
	3	105.683	137.887	32.204
	4	75.877	100.555	24.678
A	1	85.08	183.298	98.218
	2	98.871	152.071	53.20
	3	100.77	169.276	68.506
	4	110.256	201.28	91.024
B	1	148.892	225.552	76.66
	2	95.745	197.906	102.161
	3	108.792	205.922	97.13
	4	86.565	198.842	112.277
C	1	122.576	232.025	109.449
	2	92.698	215.54	122.842
	3	119.755	224.465	104.71
	4	87.071	158.077	71.006



Hasil menunjukkan bahwa pada ikan kontrol terdapat peningkatan hormon sebesar 28,232 (pg/ml) dengan kisaran 22,645-33,402 (pg/ml) sedangkan dengan pemberian 1 ml urine ke ikan betina didapati peningkatan hormone sebesar 77,737 (pg/ml) atau 2,75 kali dibandingkan kontrol dengan kisaran 53,2-98,218 (pg/ml). Perlakuan pemberian urine sebanyak 2 ml memiliki kemampuan dalam meningkatkan hormone 97,057 (pg/ml) atau 3,48 kali dari kontrol dengan kisaran 97,13-112,277 (pg/ml).

Perlakuan dengan pemberian urin sebanyak 3 ml mampu meningkatkan hormone 102,002 (pg/ml) atau 3,61 kali dari kontrol dengan kisaran 71,006-122,842 (pg/ml). Berdasarkan uji plasma darah dari masing-masing perlakuan, diketahui bahwa pemberian 3 ml urin memiliki kemampuan tertinggi dalam meningkatkan konsentrasi hormone estradiol-17 β dan hasil terendah pada perlakuan kontrol.

Berdasarkan analisis sidik ragam, potensi pemberian urine dalam meningkatkan hormone estradiol-17 β pada ikan betina menunjukkan adanya pengaruh berbeda sangat nyata (*highly significant*) antar perlakuan, seperti terlihat pada Tabel 12 berikut.

Tabel 12. Analisis Keragaman pemberian urine terhadap konsentrasi estradiol-17 β

ANOVA						
SK	db	JK	KT	Fhitung	F5%	F1%
Perlakuan	3	13616.00	4538.67	15.56	3.49	5.95
Acak	12	3501.23	291.7695	Ket : **		
Total	15	17117.23				

Hasil sidik ragam menunjukkan bahwa pemberian urine memberikan pengaruh berbeda sangat nyata (*highly significant*) terhadap konsentrasi hormone estradiol-17 β pada ikan betina. Hal ini ditunjukkan dengan nilai F hitung yang lebih besar dari F 1% dan F 5% yang berarti dosis urin sangat berpengaruh terhadap peningkatan



hormone estradiol-17 β pada ikan betina atau H₁ diterima (H₀ ditolak). Untuk mengetahui tingkat perbedaan dari masing-masing perlakuan maka dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada taraf 0,05 dan 0,01 yang dapat dilihat pada Tabel 13.

Tabel 13. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Dosis Pemberian Urine

Perlakuan	Rerata	28.23	77.74	97.06	102.00	Notasi
K	28.23	0	0	0	0	a
A	77.74	**49.50	0	0	0	b
B	97.06	**68.82	^{ns} 19.32	0	0	b
C	102.00	**73.77	^{ns} 24.26	^{ns} 4.94	0	b

BNT 5% = 26,317 BNT 1% = 36,898

Berdasarkan hasil uji BNT, perlakuan kontrol tanpa pemberian urine memiliki mengalami peningkatan konsentrasi hormone paling rendah. Kemudian, antar perlakuan tidak memiliki perbedaan yang nyata dalam memicu peningkatan konsentrasi hormone estradiol-17 β . Untuk mengetahui hubungan antara perlakuan pemberian urin di media air dengan nilai konsentrasi hormone estradiol-17 β maka digunakan analisis regresi.

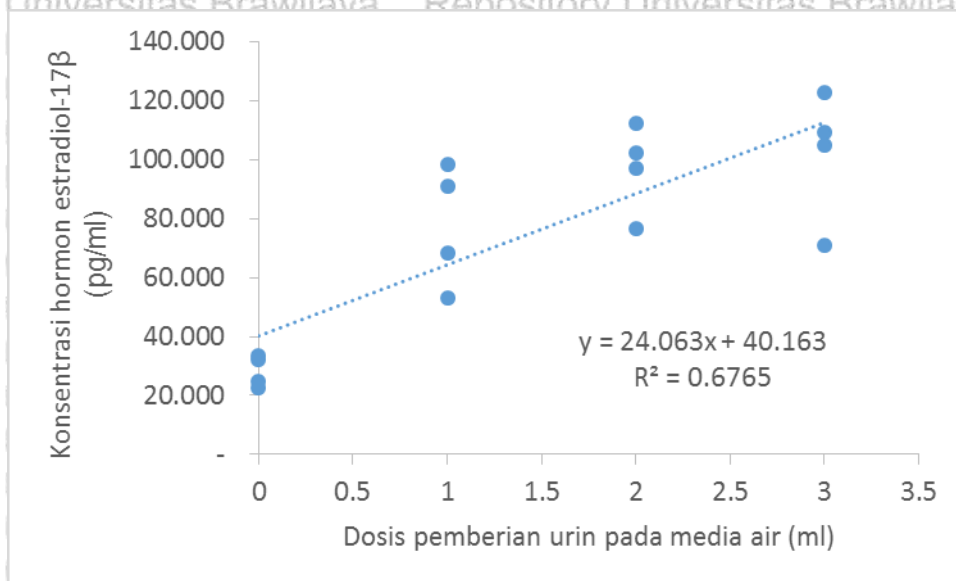
Tabel 14. Analisis keragaman regresi penambahan urin terhadap peningkatan konsentrasi hormon estradiol-17 β

SK	db	JK	KT	F hit	F5%	F1%
Perlakuan	3	13615.997				
linier	1	11580.415	11580.415	36.38**	4.84	9.65
kuadratik	1	1985.594	1985.594	6.24*	4.84	9.65
kubik	1	49.988	49.988	0.16 ^{ns}	4.84	9.65
Acak	11	3,501.23	318.294			
Total	14					

Hasil sidik ragam regresi pada Tabel 14 menunjukkan bahwa nilai F hitung linier dan kuadratik lebih besar daripada F tabel 1%. Artinya pemberian urin berpengaruh sangat nyata terhadap peningkatan hormone estradiol-17 β dalam darah induk ikan betina. Bentuk regresi yang digunakan adalah linier karena

perbedaan yang sangat nyata dan didapatkan persamaan $y = 240,63x + 401,63$ (Lampiran 2).

Dalam analisis regresi, terdapat dua koefisien yang biasa digunakan yaitu determinasi (R^2) dan korelasi (r). Pada penelitian ini, koefisien determinasi yang didapatkan yaitu (R^2) = 0,68 artinya 68% peningkatan konsentrasi hormone estradiol-17 β dalam darah induk ikan betina dipengaruhi oleh dosis urin yang diberikan kedalam media air. Pada penelitian ini, didapatkan koefisien korelasi sebesar 0,83 (mendekati 1) yang artinya dosis pemberian urin dan konsentrasi hormone estradiol-17 β yang dihasilkan memiliki korelasi yang tinggi. Peningkatan hormone estradiol-17 β tertinggi dalam darah induk ikan betina terdapat pada perlakuan pemberian urin sebanyak 3 ml kedalam 4 ton media air (Gambar 19).



Gambar 19. Hubungan Antara Dosis Pemberian Urin dalam Media Air dengan Peningkatan Konsentrasi Hormon Estradiol-17 β

b) Testosteron

Berdasarkan Tabel 15. diketahui bahwa hormone testosteron ikan kontrol meningkat sebesar 0,1737 (pg/ μ l) dengan kisaran 0,90-0,356 (pg/ μ l) sedangkan

dengan pemberian 1 ml urine ke ikan betina didapati peningkatan hormone sebesar 0,1662 (pg/ μ l) atau 0,96 kali dibandingkan kontrol dengan kisaran 0,77-0,339 (pg/ μ l). Perlakuan pembarian urine sebanyak 2 ml memiliki kemampuan dalam meningkatkan hormone 0,1417 (pg/ μ) atau 0,82 kali dari kontrol dengan kisaran 0,61-0,374 (pg/ μ). Perlakuan dengan pemberian urin sebanyak 3 ml mampu meningkatkan hormone 0,1477 (pg/ μ) atau 0,85 kali dari kontrol dengan kisaran 0,40-0,393 (pg/ μ). Berdasarkan uji plasma darah dari masing-masing perlakuan, diketahui bahwa ikan kontrol memiliki kemampuan tertinggi dalam meningkatkan konsentrasi hormon testosteron dan hasil terendah pada perlakuan pemberian 2 ml urine.

Tabel 15. Konsentrasi hormon testosteron (pg/ μ l) dalam darah ikan kerapu macan betina pada perlakuan pemberian urin jantan

Perlakuan	Ulangan	Sebelum	Sesudah	Peningkatan
Kontrol	1	0.328	0.482	0.154
	2	0.411	0.420	0.90
	3	0.390	0.566	0.176
	4	0.266	0.622	0.356
A	1	0.342	0.438	0.96
	2	0.290	0.629	0.339
	3	0.502	0.579	0.77
	4	0.394	0.547	0.153
B	1	0.421	0.487	0.66
	2	0.255	0.629	0.374
	3	0.322	0.388	0.66
	4	0.521	0.582	0.61
C	1	0.278	0.671	0.393
	2	0.437	0.549	0.112
	3	0.439	0.521	0.82
	4	0.348	0.388	0.40

Berdasarkan analisis sidik ragam, potensi pemberian urine dalam meningkatkan hormon testosteron pada ikan betina tidak menunjukkan pengaruh yang berbeda nyata (*no significant*) antar perlakuan, begitu pula dengan kontrol seperti terlihat pada Tabel 16. Hal ini ditunjukkan oleh nilai F hitung yang lebih kecil

dari nilai tabel F dengan nilai derajat bebas 12 dan probabilitas 5% ataupun 1%.

Sehingga tidak perlu dilakukan uji lanjut untuk mengetahui perbedaan nyata terkecil, karena semua perlakuan memiliki pengaruh yang hampir sama.

Tabel 16. Analisis Keragaman pemberian urine terhadap konsentrasi testosteron ANOVA

SK	db	JK	KT	Fhitung	F5%	F1%
Perlakuan	3	0.00228	0.00076	0.03617	3.49	5.95
Acak	12	0.25264	0.02105	Ket : ns		
Total	15	0.25493				

V.3.3. Hasil Analisa Hormon Pada Plasma Darah Setelah Pemberian Sperma

a) Estradiol 17- β

Hasil uji plasma darah pada ikan betina sebelum dan akhir dan setelah perlakuan tertera pada Tabel 17. Ikan kontrol diketahui mengalami peningkatan hormon sebesar 29,278 (pg/ml) dengan kisaran 22,620-46,432 (pg/ml) sedangkan pemberian 2 ml sperma didapati peningkatan hormone sebesar 96,871 (pg/ml) atau 3,31 kali dibandingkan kontrol dengan kisaran 59,006-138,010 (pg/ml).

Tabel 17. Konsentrasi hormon estradiol-17 β (pg/ml) dalam darah ikan kerapu macan betina pada perlakuan pemberian sperma

Perlakuan	Ulangan	Sebelum	Sesudah	Peningkatan
Kontrol	1	99.088	145.52	46.432
	2	95.844	118.464	22.62
	3	95.248	114.369	19.121
	4	89.885	118.822	28.937
A	1	96.01	234.02	138.01
	2	88.564	147.57	59.006
	3	97.23	187.526	90.296
	4	92.25	192.42	100.17
B	1	97.822	210.544	112.722
	2	92.795	184.955	92.16
	3	98.244	196.887	98.643
	4	95.535	184.865	89.33
C	1	97.524	218.649	121.125
	2	96.842	197.52	100.678
	3	99.015	235.298	136.283
	4	97.695	232.522	134.827

Pemberian sperma sebanyak 4 ml memiliki kemampuan dalam meningkatkan hormone 98,214 (pg/ml) atau 3,36 kali dari kontrol dengan kisaran 89,330-112,722 (pg/ml). Perlakuan dengan pemberian sperma sebanyak 6 ml mampu meningkatkan hormone 123,228 (pg/ml) atau 4,21 kali dari kontrol dengan kisaran 100,678-136,283 (pg/ml). Berdasarkan uji plasma darah dari masing-masing perlakuan, diketahui bahwa pemberian 6 ml sperma memiliki kemampuan tertinggi dalam meningkatkan konsentrasi hormone estradiol-17 β dan hasil terendah pada perlakuan kontrol.

Berdasarkan analisis sidik ragam, potensi pemberian urine dalam meningkatkan hormone estradiol-17 β pada ikan betina menunjukkan adanya pengaruh berbeda sangat nyata (*highly significant*) antar perlakuan, seperti terlihat pada Tabel 18 berikut.

Tabel 18. Analisis Keragaman pemberian sperma terhadap konsentrasi estradiol-17 β (pg/ml)

ANOVA						
SK	db	JK	KT	Fhitung	F5%	F1%
Perlakuan	3	19470.02	6490.01	16.34	3.49	5.95
Acak	12	4766.30	397.1914	Ket : **		
Total	15	24236.32				

Hasil sidik ragam menunjukkan bahwa pemberian sperma memberikan pengaruh berbeda sangat nyata (*highly significant*) terhadap konsentrasi hormone estradiol-17 β pada ikan betina. Hal ini ditunjukkan dengan nilai F hitung yang lebih besar dari F 1% dan F 5% yang berarti dosis sperma sangat berpengaruh terhadap peningkatan hormone estradiol-17 β pada ikan betina atau H_1 diterima (H_0 ditolak). Untuk mengetahui tingkat perbedaan dari masing-masing perlakuan maka dilakukan

uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada taraf 0,05 dan 0,01 yang dapat dilihat pada

Tabel 19.

Tabel 19. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Dosis Pemberian Sperma

Perlakuan	Rerata	29.28	96.87	98.21	123.23	Notasi
K	29.28	0	0	0	0	a
A	96.87	**67.59	0	0	0	b
B	98.21	**68.94	^{ns} 1.34	0	0	b
C	123.23	**93.95	^{ns} 26.36	^{ns} 25.01	0	b

BNT 5% = 30,707 BNT 1% = 43,051

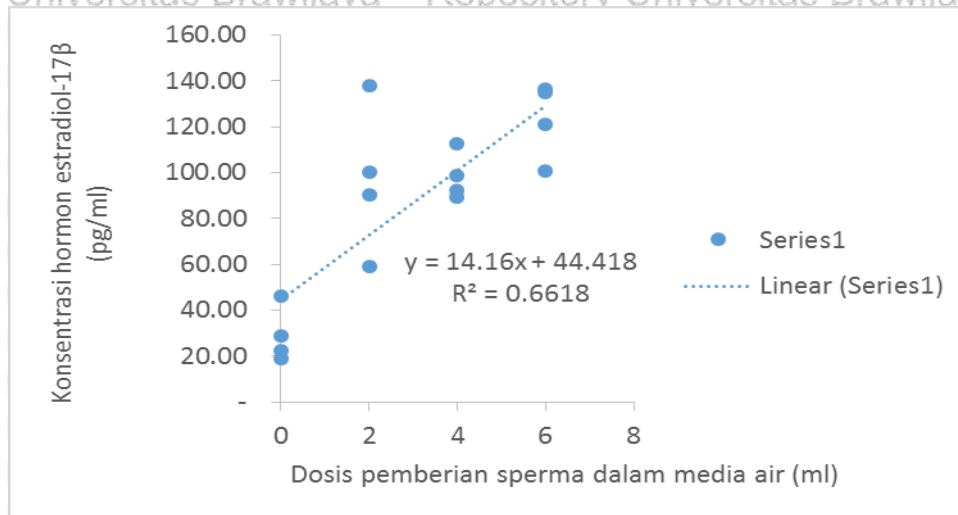
Berdasarkan hasil uji BNT, perlakuan kontrol tanpa pemberian sperma memiliki mengalami peningkatan konsentrasi hormone estradiol-17 β paling rendah, yaitu sebesar 29,278 (pg/ml). Kemudian, antar perlakuan yaitu A dengan B, A dengan C dan B dengan C saling tidak memiliki perbedaan nyata terkecil. Hal ini memungkinkan bahwa efektivitas ketiga perlakuan ini dalam memicu peningkatan konsentrasi hormone estradiol-17 β tergolong mirip. Untuk mengetahui hubungan antara perlakuan tersebut, maka dilakukanlah analisis regresi.

Tabel 20. Analisis keragaman regresi penambahan sperma terhadap peningkatan konsentrasi hormon estradiol-17 β

SK	db	JK	KT	F hit	F5%	F1%
Perlakuan	3	19470.02				
Liner	1	16039.94	16039.94	**37.02	4.84	9.65
kuadratik	1	1812.93	1812.93	^{ns} 4.18	4.84	9.65
Kubik	1	1617.16	1617.16	^{ns} 3.73	4.84	9.65
Acak	11	4766.30	433.30			
Total	14					

Hasil sidik ragam regresi pada Tabel 20 menunjukkan bahwa nilai F hitung linier lebih besar daripada F tabel 1%. Artinya, pemberian sperma berpengaruh sangat nyata terhadap peningkatan hormone estradiol-17 β dalam darah induk ikan betina. Bentuk regresi yang digunakan adalah hanyalah linier karena F hitung

kuadratik dan kubik lebih kecil dibanding F tabel dan didapatkan persamaan $y = 141,6x + 444,18$ (Lampiran 3).



Gambar 20. Hubungan Antara Dosis Pemberian Sperma dalam Media Air dengan Peningkatan Konsentrasi Hormon Estradiol-17 β

Dalam analisis regresi, terdapat dua koefisien yang biasa digunakan yaitu determinasi (R^2) dan korelasi (r). Pada penelitian ini, koefisien determinasi yang didapatkan yaitu (R^2) = 0,66 artinya 66% peningkatan konsentrasi hormone estradiol-17 β dalam darah induk ikan betina dipengaruhi oleh dosis sperma yang diberikan kedalam media air. Pada penelitian ini, didapatkan koefisien korelasi sebesar 0,81 (mendekati 1) yang artinya dosis pemberian sperma dan konsentrasi hormone estradiol-17 β yang dihasilkan memiliki korelasi yang tinggi (Gambar 19).

b) Testosteron

Berdasarkan Tabel 21, diketahui bahwa hormon testosteron ikan kontrol meningkat sebesar 0,965 (pg/ μ l) dengan kisaran 0,018-0,199 (pg/ μ l) sedangkan dengan pemberian 2 ml sperma ke ikan betina didapati peningkatan hormone sebesar 0,1012 (pg/ μ l) atau 0,105 kali dibandingkan kontrol dengan kisaran 0,045-0,197 (pg/ μ l). Perlakuan pemberian sperma sebanyak 4 ml memiliki kemampuan

dalam meningkatkan hormone 0,1492 (pg/ μ) atau 0,155 kali dari kontrol dengan kisaran 0,034-0,245 (pg/ μ). Perlakuan dengan pemberian sperma sebanyak 6 ml mampu meningkatkan hormon 0,1735 (pg/ μ) atau 0,18 kali dari kontrol dengan kisaran 0,104-0,276 (pg/ μ).

Tabel 21. Konsentrasi hormon testosteron (pg/ μ l) dalam darah ikan kerapu macan betina pada perlakuan pemberian sperma

Perlakuan	Ulangan	Sebelum	Sesudah	Peningkatan
Kontrol	1	0,366	0,431	0,065
	2	0,472	0,454	0,018
	3	0,386	0,490	0,104
	4	0,324	0,523	0,199
A	1	0,428	0,625	0,197
	2	0,388	0,433	0,045
	3	0,498	0,556	0,058
	4	0,365	0,470	0,105
B	1	0,385	0,458	0,073
	2	0,324	0,610	0,286
	3	0,450	0,458	0,008
	4	0,496	0,530	0,034
C	1	0,354	0,630	0,276
	2	0,420	0,524	0,104
	3	0,454	0,568	0,144
	4	0,480	0,680	0,200

Berdasarkan analisis sidik ragam, potensi pemberian sperma dalam meningkatkan hormon testosteron pada ikan betina tidak menunjukkan pengaruh yang berbeda nyata (*no significant*) antar perlakuan, begitu pula dengan kontrol seperti terlihat pada Tabel 22. Hal ini ditunjukkan oleh nilai F hitung yang lebih kecil dari nilai tabel F dengan nilai derajat bebas 12 dan probabilitas 5% ataupun 1%. Sehingga tidak perlu dilakukan uji lanjut untuk mengetahui perbedaan nyata terkecil, karena semua perlakuan memiliki pengaruh yang hampir sama.



Tabel 22. Analisis Keragaman pemberian sperma terhadap konsentrasi testosteron ANOVA

SK	db	JK	KT	Fhitung	F5%	F1%
Perlakuan	3	0,02006	0,00669	0,83	3,49	5,95
Acak	12	0,09676	0,00806	Ket : ns		
Total	15	0,11682				

V. 4. Pengamatan telur ikan kerapu macan

Tabel 23. menunjukkan bahwa keseluruhan telur ikan uji mengalami peningkatan ukuran diameter menjelang bulan gelap. Seperti contoh ikan kontrol, tanpa adanya pemberian urin, sampel telur yang awalnya berukuran 441,375 μm diameternya membesar menjadi 547,625 μm ketika diamati pada hari ke-6.

Tabel 23. Ukuran diameter telur kerapu macan sebelum dan sesudah perlakuan pemberian urin

Perlakuan	Ulangan	Pemberian urin		Peningkatan (μm)
		Sebelum (μm)	Sesudah (μm)	
Kontrol	1	515	620	105
	2	420	525	105
	3	420	460,5	40,5
	4	410,5	585	174,5
	rerata	441,375	547,625	106,25
A	1	515,5	755	239,5
	2	420	760	340
	3	435	710,5	275,5
	4	405,5	760	354,5
	rerata	444	746,375	302,375
B	1	520	780	260
	2	410	720,5	310,5
	3	425,5	765	339,5
	4	410	745	335
	rerata	441,375	752,625	311,25
C	1	510,5	770	259,5
	2	420	755,5	335,5
	3	410	795	385
	4	415	740	325
	rerata	438,875	765,125	326,25

Kemudian, 6 hari pasca pemberian urin sebanyak 1 ml (A) pada media pemeliharaan diameter telur ikan menjadi 746,375 μm dari ukuran 444 μm . Induk yang diberi perlakuan 2 ml urin (B) mengalami peningkatan ukuran diameter telur dari 441,375 μm menjadi 752,625 μm . Ikan dengan penambahan 3 ml urin (C) dalam media pemeliharaan juga memiliki respon yang sama yaitu diameter telurnya meningkat dari ukuran 438,875 μm menjadi 765,125 μm .

Tabel 24. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Dosis Pemberian urin

Perlakuan	Rerata	106,562	302,375	311,25	326,25	Notasi
K	106,5625	0				a
A	282,375	175,8125	0			b
B	311,25	204,6875	28,875			c
C	326,25	219,6875	43,875	15	0	c

BNT 5% = 26,317 BNT 1% = 36,898

Hasil uji ANOVA menunjukkan bahwa pada perlakuan kontrol berbeda nyata dengan perlakuan A, B dan C. Sedangkan perlakuan A berbeda nyata dengan perlakuan B dan C. Hasil uji ini juga didapat bahwa perlakuan B dan C memberikan hasil yang lebih baik dari perlakuan A ataupun control (tabel 24).

Disisi lain, penambahan sperma kedalam media pemeliharaan induk betina sebanyak 2 ml (A), 4 ml (B) dan 6 ml (C) selama 6 hari juga diikuti penambahan ukuran diameter telur. Pada kontrol dari 469 μm membesar menjadi 593,875 μm , perlakuan A, terjadi peningkatan sebanyak 302,75 μm dari ukuran diameter awal 476,375 μm menjadi 779,125 μm . Diameter sampel telur ikan perlakuan B semula berukuran 476,375 μm dan menjadi 793,875 μm . Nilai peningkatan diameter telur pada perlakuan C adalah 325,75 μm dari ukuran diametere telur sebelum perlakuan adalah 463,875 μm menjadi berdiameter 787,625 μm di akhir pengamatan. Hasil pengamatan ini dapat dilihat pada tabel 25.

Tabel 25. Ukuran diameter telur kerapu macan sebelum dan sesudah perlakuan pemberian sperma

Perlakuan	Ulangan	Pemberian sperma		Peningkatan (μm)
		Sebelum (μm)	Sesudah (μm)	
Kontrol	1	530	615	85
	2	500,5	595	94,5
	3	420,5	580	159,5
	4	425	585,5	160,5
	rerata	469	593,875	124,875
A	1	535	785,5	250,5
	2	510	790	280
	3	435,5	775,5	340
	4	425	765,5	340,5
	rerata	476,375	779,125	302,75
B	1	530	790,5	260,5
	2	510,5	800	289,5
	3	425	790	365
	4	440	795	355
	rerata	476,375	793,875	317,5
C	1	525	805	280
	2	460,5	765,5	305
	3	455	790	335
	4	415	790	375
	rerata	463,875	787,625	323,75

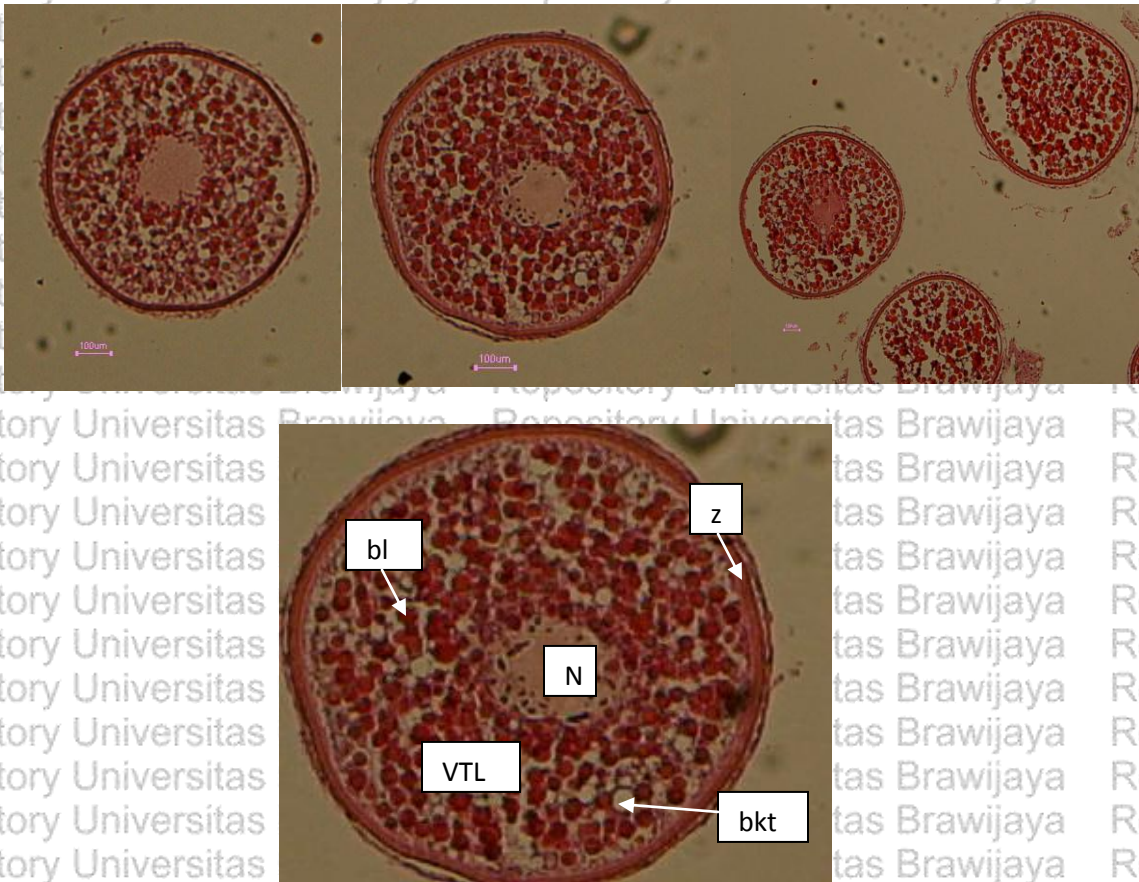
Hasil uji ANOVA pada perlakuan pemberian sperma didapat bahwa perlakuan kontrol berbeda nyata dengan perlakuan A,B dan C. Sedangkan pada perlakuan A, B dan C tidak berbeda nyata (tabel 26).

Tabel 26. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Dosis Pemberian sperma

Perlakuan	Rerata	124,88	310,00	317,50	323,75	Notasi
K	124,88	0				a
A	310,00	185,13*	0			b
B	317,50	192,63*	7,50	0		b
C	323,75	198,88*	13,75	6,25	0	b

BNT 5% = 72,501 BNT 1% = 101,647

Hasil histologi telur setelah perlakuan pemberian urin dan sperma dapat dilihat pada gambar 21 dibawah ini. Ini menunjukkan bahwa telur mengalami peningkatan pada tahap awal ovulasi. Hal ini terlihat pada inti telur berada pada bagian tengah. Tahap vitelogenesis ditandai setelah kortikal alveoli, terjadi pertambahan ukuran serta jumlah butiran kuning telur dan lemak mengisi sitoplasma. Tahap ini disebut awal vitelogenesis (early vitellogenesis).



Gambar 21. Histologi telur kerapu macan. N (nucleus); VTL (vitellogenesis); bl (butiran lemak); bkt (butiran kuning telur); z (zona radiate).

V. 5 Pembahasan

Respon induk betina yang diberikan urin dan sperma langsung terlihat, dimana induk betina mencoba mencari sumber urin dan sperma yang diberikan. Hal



ini menunjukkan bahwa senyawa yang keluar tercium oleh *Vomeronasalorgan* (VNO) dan selanjutnya sinyal ini akan diteruskan ke hipotalamus agar memberikan respon/tanggapan. Waktu yang diperlukan untuk menanggapi respon tersebut hanya sepersepuluh ribu detik, maka akan ada respon dari otak melalui perubahan psikologi, seperti peningkatan pada kelenjar hormon dan kerja dari produksi hormon testosteron (pada jantan) atau hormon esterogen (pada betina) (Anonim, 2010).

Respon ikan ini tidak terlepas dari sistem saraf ikan. Sistem saraf digambarkan dengan kehadiran jenis sel reseptor yang disebut neuron sensorik.

Neuron secara fundamental berkomunikasi dengan neuron yang lain melalui synapses, dimana simpangan antar membran berisi mesin molekuler yang memungkinkan transmisi atau signal dengan cepat, juga signal elektrik atau bahan kimia. Sel reseptor memiliki dendrit tebal, yang keluar dari bagian inti (nuklir) neuron dan mencapai permukaan epitel. Bagian dendrit berakhir di ujung bulat (kenop) yang memproyeksikan permukaan epitel. Pada ikan, sel reseptor di epitel penciuman dibagi menjadi dua jenis: bersilia dan sel reseptor mikrovilik (Zeiske *et al.*, 1992; Kasumyan, 2004).

Penghantaran impuls baik yang berupa rangsangan ataupun tanggapan melalui serabut saraf (akson) dapat terjadi karena adanya perbedaan potensial listrik antara bagian luar dan bagian dalam sel. Pada waktu sel saraf beristirahat, kutub positif terdapat di bagian luar dan kutub negatif terdapat di bagian dalam sel saraf.

Diperkirakan bahwa rangsangan (stimulus) pada indra menyebabkan terjadinya pembalikan perbedaan potensial listrik sesaat. Perubahan potensial ini (depolarisasi) terjadi berurutan sepanjang serabut saraf. Kecepatan perjalanan gelombang perbedaan potensial bervariasi antara 1 sampai dengan 120 m per detik, tergantung



pada diameter akson dan ada atau tidaknya selubung myelin (Brand and Bruch, 1992; Achyani, 2011).

Pada serabut saraf yang bermielin, depolarisasi hanya terjadi pada nodus ranvier sehingga terjadi lompatan potensial kerja, akibatnya impuls saraf lebih cepat merambat. Semakin besar diameter serabut saraf semakin cepat rambatan impuls sarafnya. Impuls melalui sinapsis yang merupakan titik temu antara ujung neurit dari suatu neuron dengan ujung dendrit dari neuron lainnya. Setiap ujung neurit membengkak membentuk bonggol yang disebut bonggol sinapsis. Pada bonggol sinapsis tersebut terdapat mitokondria dan gelembung-gelembung sinapsis. Gelembung-gelembung sinapsis tersebut berisi zat kimia neurotransmitter yang berperan penting dalam merambatkan impuls saraf ke sel saraf lain. Antara ujung bonggol sinapsis dengan membran sel saraf berikutnya terdapat celah sinapsis yang dibatasi oleh membran prasinapsis dan membrane postsinapsis dari sel saraf berikutnya atau membran efektor. Apabila impuls saraf sampai pada bonggol sinapsis, maka gelembung-gelembung sinapsis akan mendekati membran prasinapsis, kemudian melepaskan isinya, yaitu neurotransmitter, ke celah sinapsis. Impuls saraf dibawa oleh neurotransmitter ini. Neurotransmitter menyeberang celah sinapsis menuju membrane postsinapsis. Zat kimia neurotransmitter mengakibatkan terjadinya depolarisasi pada membran postsinapsis dan terjadilah potensial kerja. Ini berarti impuls telah diberikan ke serabut saraf berikutnya. Dengan demikian impuls saraf menyeberangi celah sinapsis dengan cara perpindahan zat-zat kimia, yang kemudian dilanjutkan pada sel saraf berikutnya dengan cara rambatan potensial kerja (Kasumyan, 2004).



94

Kepadatan rata-rata sel reseptor di epitel reseptor berkisar antara 20-30 ribu per mm² sampai 400-500 ribu per mm², dan jumlah totalnya dapat mencapai beberapa jutaan atau lebih (Thommesen, 1983; Devitsyna dan Attar, 1988).

Kepadatan sel bersilia dan sel mikrovilik dapat berbeda di daerah lamella penciuman namun jumlah sel silianya dua kali lebih banyak daripada mikrovili (Thommesen, 1983). Bertambahnya umur pada ikan akan meningkatkan jumlah sel reseptor, sehingga individu yang besar memiliki organ pencium lebih besar dan sel reseptor yang lebih banyak (Kasumyan, 2004). Sel-sel bersilia, mikrovillous dan cryptik mengkhususkan pada persepsi berbagai kelompok rangsangan kimia (Thommesen, 1983; Hamdani et al., 2001; Sato dan Suzuki, 2001; Hamdani dan Døving, 2002, 2003).

Feromon yaitu paduan senyawa kimia tertentu yang secara alami dihasilkan oleh individu, dapat menimbulkan respon spesifik dan adaptif bagi individu lainnya. (Sorensen and Stacey, 2004). Senyawa yang diduga feromon pada ikan jantan kerapu macan yang terdapat pada urin dan sperma menunjukkan gabungan antara beberapa senyawa yaitu 17 β -Estradiol, Androstenediol, Epiandosterone, Epietiocholanolone, Etiocholanolone, dan Androsterone. Hal ini sedikit berbeda dengan feromon pada ikan mas. Feromon preovulasi Ikan mas betina adalah campuran dari androstenedion (AD), 17 α , 20 β -dihidroksi-4-pregnen-3-one (17, 20 β -P), dan 17, 20 β -P-20 β -sulfat (17, 20 β -PS), dimana rasio steroid berubah secara dramatis selama *luteinizing hormone* preovulasi (LH). Pada ovulasi (12 jam setelah peningkatan LH), feromon preovulasi turun secara drastis, dan oosit oviductal merangsang sintesis prostaglandin F_{2a} (PGF_{2a}) yang bertindak serbagai hormon untuk memicu perilaku seksual betina. PGF_{2a} dan 15-keto-PGF_{2a}, dirilis dalam urin



sebagai feromon postovulatory yang bekerja pada reseptor penciuman sensitif untuk memicu meningkatkan LH dan semen mulai produksi pada jantan. Selain tanggapan ikan jantan terhadap feromon betina, ikan betina lain juga menanggapi $17, 20\beta$ -P dengan meningkatkan ovulasi, menunjukkan mekanisme betina untuk melakukan ovulasi (Sorensen and Stacey, 1999; Stacey and Sorensen, 2002; Stacey, 2003).

Argentini (1976) menyatakan bahwa rangsangan yang digunakan oleh ikan *minnow* merupakan hypoxanthine-3-N-oksida, meskipun penjelasan mengenai aktivitas olfaktori dari senyawa ini maupun keberadaan pada ikan masih belum terdemonstrasikan (Kasumyan and Ponomarev, 1987 ; Smith 1999). Brown *et al.*, (2002, 2003) menunjukkan bahwa senyawa hypoxanthine-3-N-oksida merupakan salah satu komponen kompleks yang berhubungan dengan respon rangsangan yang diharapkan adalah feromon.

Pada ikan nila jantan diketahui akan mengeluarkan urin lebih sering sebelum terjadinya proses pemijahan (Barata *et al.*, 2008; Barata *et al.*, 2007; Miranda *et al.*, 2005). Kandung kemih ikan jantan yang dominan lebih besar dan lebih berotot dibandingkan jantan yang lain, ini memungkinkan untuk penyimpanan volume urin yang lebih besar (Keller-Costa *et al.*, 2012). Urin yang dikeluarkan oleh jantan membangkitkan peningkatan $17,20\beta$ -P pada pematangan oosit steroid betina (Nagahama, 1987; Huertas *et al.*, 2014), sedangkan pencegahan hasil buangan urin lebih sedikit pada pertemuan ikan jantan dengan jantan lainnya (Keller-Costa *et al.*, 2012). Ini sangat menunjukkan bahwa persaingan jantan untuk mendekati betina melalui feromon kemih. Pada pemijahan ikan haring dipicu oleh kedua bahan semen (sperma dan mani) yg diduga feromon yang mungkin mengandung steroid (Stacey and Hourston, 1982; Carolsfeld *et al.*, 1992).



Colombo *et al.* (1980) melaporkan bahwa fungsi *etiocholanolone glukuronida* sebagai feromon jantan pada ikan goby hitam (*Gobius niger* atau *Gobius jozo*) dan van den Hurk dan Lambert (1983) mengatakan bahwa senyawa glucuronides steroid berfungsi sebagai feromon seks betina pada ikan zebra. Hipotesis ini telah diperkuat dengan identifikasi terbaru dari 5β -pregnane- 3α , 17α , 20β -triol- 3α -glukuronida dan 5β -pregnane- 3α , 17α , 20α -triol- 3α -glukuronida dalam urin jantan, konsentrasi yang tergantung pada status sosial ikan dan yang juga bertindak sebagai feromon kuat pada betina (Keller-Costa *et al.*, 2014). Tingkat steroid pada urin (11-ketotestosterone, 11-KT) yang lebih tinggi mengikuti interaksi sosial di beberapa spesies ikan cichlid (Oliveira *et al.*, 1996; Hirschenhauser *et al.*, 2004; Hirschenhauser *et al.*, 2008). Glucuronides steroid telah terbukti sebagai feromon yang berperan dalam reproduksi beberapa spesies ikan (Stacey and Sorensen, 2002).

Organ penciuman ikan jantan secara morfologis berkembang secara signifikan lebih banyak daripada pada betina. Perhitungan untuk menentukan jumlah waktu yang dibutuhkan ikan jantan untuk menemukan betina yang matang dengan menggunakan penglihatan dan penciuman. Perhitungan tersebut didasarkan pada perilaku biologi dan feromon seks ikan yang dikeluarkan. Hasil penelitian Jumper and Baird, (1991); kepadatan populasi rata-rata *Argyropelecus hemigymnus* adalah sekitar $3 \times 10^{-5} / m^3$ dengan kecepatan berenang jantan sebelum dan sesudah menerima sinyal kehadiran betina masing-masing adalah 1,5 dan 3,0 cm/s. Betina mengambil posisi diam selama memproduksi feromon dan menghasilkan sekitar 2×10^{14} molekul. Sensitivitas jantan terhadap feromon adalah $2 \times 10^{10} / m^3$, baunya menyebar secara homogen dalam jarak 10 cm dari lapisan air



horizontal. Hasil menunjukkan bahwa dengan parameter tersebut, 90% jantan dapat menemukan kehadiran betina 1-2 jam setelah betina mengeluarkan feromon seksual, dan dapat menemukan betina selama 30 menit jika bau itu ditemukan pada jarak 20 m dari betina. Jika jantan dari *Argyropelecus hemigymnus* hanya mengandalkan penglihatan (radius visual diambil sama dengan 1 m), diperlukan waktu selama delapan hari untuk menemukan betina yang tidak aktif atau 5-6 hari mencari apakah betina tersebut bergerak secara acak (gerakan tanpa vektor)).

Dipilih 6 hari menjelang bulan gelap sebagai waktu penelitian adalah upaya untuk dapat mengetahui regulasi hormon reproduksi yang terdapat pada ikan kerapu. Ikan kerapu melakukan pemijahan ketika bulan tidak bersinar terang yaitu antara tanggal 25 hingga tanggal 5 di bulan arab berikutnya (Putri *et al.*, 2013).

Seperti yang diungkapkan oleh Garcia *et al.* (2013) bahwa pembentukan hormon steroid berjalan lebih aktif ketika memasuki musim pemijahan dibandingkan hari-hari biasanya.

Hormon steroid pada umumnya disintesa dari kolesterol di dalam gonad dan kelenjar adrenal. Berupa lipid yang mempunyai kurir khusus berbentuk globulin dan bersifat katabolisme (Hajirezaee *et al.*, 2011). Pembentukan hormone steroid mencakup sintesa estrogen maupun androgen. Pada ikan hermaprodit, proses ini dikatalis oleh enzim asal sitokrom P450 berupa kompleks aromatase yang memegang peranan penting dalam diferensiasi ovary melalui konversi testosterone menjadi estradiol (Garcia *et al.*, 2013)

Peran urin maupun sperma sebagai pembawa feromon yang diberikan pada induk ikan betina, diamati melalui konsentrasi hormone estradiol-17 β dan testosterone. Hasil penelitian menunjukkan bahwa didapatkan hormone estradiol-17 β



dalam konsentrasi yang jauh tinggi jika dibandingkan dengan testosteron, baik saat sebelum ataupun sesudah perlakuan. Tingginya hormon estradiol ini berkaitan dengan tahapan pembentukan telur pada ikan betina menjelang musim pemijahan.

Berdasarkan informasi diatas, tingginya konsentrasi hormon estradiol-17 β hingga akhir penelitian atau 6 hari sebelum bulan gelap menunjukkan bahwa pada kisaran waktu tersebut induk betina sedang mengalami vitelogenesis. Hal ini didukung pula oleh dokumentasi telur ikan uji yang menunjukkan kesamaan karakteristik antara sebelum dan sesudah perlakuan yaitu ukuran diameter bertambah besar dengan sitoplasma yang tampak dipenuhi oleh butiran kuning telur (Gambar 17). Vitelogenesis merupakan tahapan terpanjang dalam oogenesis yang berkaitan dengan pembentukan precursor protein oleh organ hati setelah mendapat stimulasi estradiol-17 β yang dibawa melalui aliran darah (Pelissero *et al.*, 1991; Peyon *et al.*, 1992). Selanjutnya protein ini akan dibawa oleh aliran darah dan diinternalisasi ke dalam oosit melalui reseptor spesifik atau mikropinositosis. Di dalam oosit, vitelogenin diproses lebih lanjut menjadi protein yolk berukuran lebih kecil yang akan digunakan sebagai cadangan makanan bagi embrio (Wallace and Begovac, 1985; Tyler, 1991).

Sebaliknya, konsentrasi hormone estradiol-17 β akan turun menjelang pemijahan. Pasca vitelogenesis, berkurangnya aktivitas aromatase diikuti penurunan kadar estradiol-17 β yang menghasilkan umpan balik negative terhadap hipotalamus. Akibatnya, hipofisa akan mensekresi *Luteinizing Hormon* (LH) yang berfungsi untuk memicu terjadinya ovulasi dan pelepasan hormone estrogen serta progesterone (Falahatkar *et al.*, 2013). Progesteron dihasilkan oleh gonad ikan betina yang berfungsi merangsang proses pematangan telur hingga mencapai fase



(*Germinal Vesicle Break Down*) GVBD yaitu Bergeraknya inti sel oosit dari bagian tengah menuju bagian tepi sitoplasma dekat mikrofil lalu menghilang. Pada fase ini telur dinyatakan siap untuk ovulasi dan dibuahi oleh sperma (Garcia *et al.*, 2013).

Sehingga, secara alami konsentrasi hormon progesterone akan ditemukan dalam jumlah besar hanya jika induk ikan sudah berada pada fase siap untuk berovulasi.

Perkembangan diameter telur baik pada perlakuan pemberian urin dan sperma, menunjukkan bahwa feromon yang terkandung didalamnya memberikan dampak yang positif bagi tingkat kematangan gonad induk betina. Hasil hubungan antara kadar hormon estradiol-17 β dengan perkembangan diameter telur ikan kerapu memiliki pola respons linear dan berkorelasi positif. Dimana terjadi peningkatan hormon estradiol-17 β dalam darah seiring dengan peningkatan diameter telur. Hubungan antara konsentrasi hormon estradiol-17 β dalam plasma darah dengan perubahan perkembangan gonad telah menjadi salah satu indikator yang penting dalam memahami peranan hormon dalam proses reproduksi ikan (Lee and Yang, 2002).

Hasil pengamatan telur ikan uji menggunakan mikroskop cahaya menunjukkan bahwa terdapat keanekaragaman ukuran dalam satu bidang pandang. Kumpulan telur diselubungi oleh selaput dan setiap selnya memiliki sitoplasma yang hampir dipenuhi oleh substansi serta tampak keruh. Menurut Luan *et al.* (2006) ukuran telur ikan *orange-spotted grouper* sebelum fertilisasi ialah $690 \pm 31 \mu\text{m}$. Sedangkan Mayunar (1993) mengatakan bahwa diameter telur kerapu macan yang dibuahi adalah 816-935 μm . Selama penelitian perkembangan diameter telur induk betina tidak terlepas dari rangsangan hormon. Pembentukan, perkembangan dan pematangan gamet betina dan sel telur (oogenesis) merupakan proses yang rumit



yang membutuhkan koordinasi hormon (Arukwe dan Goksoyr 2003). Adapun tahapan perkembangan telur ikan secara umum yaitu diferensiasi, vitelogenesis, pematangan oosit dan ovoposisi (Wijayanti, 2009). Sebelum memasuki vitelogenesis, oosit yang telah terbentuk akan dikelilingi oleh dua lapisan sel yaitu theca dan granulosa. Testosterone yang diproduksi oleh sel theca karena stimulus dari gonadotropin, akan didifusi dan diaromatisasi menjadi estradiol-17 (Kagawa *et al.*, 1982). Pematangan oosit ditandai dengan pergerakan inti sel dari posisi tengah menuju posisi tepi sitoplasma dan kemudian oosit menghilang, proses ini dikenal dengan germinal vesicle break down (GVBD). Terakhir yaitu telur akan diovolusi dan dilanjutkan ovoposisi.

Proses pematangan oosit, tidak semua oosit yang telah mengalami vitelogenesis dapat diovolusikan. Bila keadaan lingkungan tidak mendukung, oosit akan mengalami degradasi atau kegagalan ovulasi yang dikenal dengan proses atresia. Proses ini terjadi karena penyerapan materi oosit oleh sel-sel granulosa yang mengalami hipertropi. Bila keadaan lingkungan mendukung, maka akan terjadi proses praovulasi dan ovulasi (Woynarovich dan Horvath, 1980).

Kucharczyk *et al.* (2008) menjelaskan bahwa posisi inti telur dapat menentukan tahap kematangan telur, posisi ini dapat dibagi dalam empat tahap yaitu : tahap 1: inti telur (GV) berada di tengah, tahap 2: awal migrasi inti (kurang dari setengah jari-jari telur), tahap 3: akhir migrasi inti (lebih dari setengah jari-jari telur), dan tahap 4: peleburan inti atau germinal vesicle breakdown (GVBD).

Menurut Unal *et al.* (2005) selama perkembangan gonad, setiap folikel ovarium terdiri dari oosit yang berkembang yang dikelilingi oleh dua lapisan sel somatik, yaitu sel-sel granulosa dalam dan sel-sel teka luar. Selama awal pertumbuhan oosit



(stadia perinukleolar), oosit dikelilingi oleh lapisan sederhana sel-sel granulosa yang rata (skuamosa) dan munculnya lapisan sederhana sel teka luar. Dua tipe sel tersebut dipisahkan oleh membran dasar nonselular (Arukwe dan Goksoyr, 2003; Zaki *et al.* 2005; Masitha, 2013).



BAB VI KESIMPULAN

VI.1. Kesimpulan

1. Senyawa feromon yang terdapat pada urin induk jantan kerapu macan dengan LC-MS/MS adalah senyawa 17β -Estradiol, Androstenediol, Epiandosterone, Epitiocholanolone, Etiocholanolano dan Androsterone, yang ditandai dengan perkursor ion 255 ms dan 273 ms, dengan produk ionnya 159F dan 255F. Sedangkan hasil spectrum dengan FTIR adalah enam spektrum yang merupakan senyawa steroid golongan alkohol β -silosterol,
2. Senyawa feromon yang terdapat pada sperma dengan LC-MS/MS menunjukkan senyawa 17β -Estradiol, Androstenediol, Epiandosterone, Epitiocholanolone, Etiocholanolano dan Androsterone, yang menunjukkan dua kelompok hormon yaitu Estrogen dan Androgen, masing-masing dengan kelimpahan sebanyak 3420 dan 29782, dengan resisten time 2,84 menit dan 4,42 menit. Sedangkan hasil spectrum dengan FTIR adalah sembilan spektrum yang juga merupakan senyawa steroid golongan alkohol β -silosterol,
3. Respon induk betina kerapu macan terhadap pemberian urin dan sperma jantan adalah peningkatan kandungan hormon 17β -Estradiol didalam plasma darah selama 6 hari penelitian pada waktu menjelang bulan gelap. Feromon yang terdapat pada urin dan sperma induk jantan dapat meningkatkan tingkat kematangan gonad induk betina, yang ditandai dengan peningkatan diameter telur.



VI.2. Saran

Hasil penelitian peranan feromon pada sperma dan urin jantan ini diharapkan sebagai pengganti penggunaan hormon komersil yang selama ini digunakan.

Kiranya perllu dilakukan penelitian lanjutan mengenai senyawa feromon yang terdapat pada betina sehingga dapat merangsang dan meningkatkan jumlah sperma pada induk jantan kerapu macan.

**BAB VII****DAFTAR PUSTAKA**

- Achyani. R. 2011. Mekanisme Pengaturan Sistim Saraf Pada Tubuh Ikan Di Lingkungan Perairan Yang Terkontaminasi Oleh Sianida. *Jurnal Harpodon Borneo* Vol.4 No.2. pp. 51-61
- Anonim. 2010. Feromon perangsang sex pasangan. <http://kibayu.wordpress.com/2010/09/25/>. Diakses, 2 Oktober 2015
- Anonim. 2011. Feromon. <http://indonesiakimia.blogspot.com/2011/05/>. Diakses, 2 Oktober 2015
- Arukwe A, Goksoyr A. 2003. Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption. *Comp Hepatol* 2:1-21.
- Argentini, M. 1976: Isolierung des Schreckstoffes aus der Haut der Elritze *Phoxonius phoxinus* (L.). Dissertation, Chemisches Institut (Leiter: M. Viscontini) der Universität Zurich.
- Barata, E. N., Hubbard, P. C., Almeida, O. G., Miranda, A. and Canário, A.V. M. (2007). Male urine signals social rank in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*, Peters 1852). *BMC Biology* 5, 54.
- Billard R., 1986. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reprod. Nutr. Dev.*, 26, 877-920.
- Billard R, Cosson J, Crim LW. 1993. Motility of fresh and aged halibut sperm. *Aquat Living Resour* 6:67-75.
- Billard R, Cosson J, Percec G et al. 1995. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture* 124:95-112.
- Bhuiyan, A. S., M. K. Islam and T. Zaman. 2006. Induced spawning of *Puntius gonionotus* (Bleeker). *J. Bio.Sci.* 14: pp 121-125.
- Bjerselius, R., Olse'n, K. H., and Zheng, W. 1995. Endocrine, gonadal and behavioral responses of male crucian carp (*Carassius carassius*) to the hormonal pheromone 17 α ,20 β dihydroxy-4-pregnen-3-one. *Chem. Senses* 20, 221-230.
- Bond, C. E. 1979. *Biology of Fishes*. W. B. Saunders, Philadelphia Bone Q dan Marshall NB. 1982. *Biology of Fishes*. Glasgow. London:Blakcie and Sons Ltd.
- Brand. J. G, and R. C. Bruch. 1992. "Molecular Mechanisms of Chemosensory Transduction: Gestation and Olfaction," in *Fish Chemoreception*, Ed. by T. J. Hara (Chapman and Hall, London, 1992), pp. 126-149.
- Brown SB, Evans RE, Thompson BE, Hara TJ. 1982. Chemoreception and aquatic pollutants. In: Hara TJ (ed) *Chemoreception in fish*. Elsevier, Amsterdam, pp 363-393
- Brown, G. E.; Adrian, J. C. Jr.; Lewis, M. G.; Tower, J. M. 2002. The effects of reduced pH on chemical alarm signaling in ostariophysan fishes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 59: 1331-1338.
- Brown, G. E.; Adrian, J. C. Jr.; Naderi, N. T.; Harvey, M. C.; Kelly, J. M. 2003. Nitrogen oxides elicit antipredator responses in juvenile channel catfish, but not in convict cichlids or rainbow trout: conservation of the

ostariophysan alarm pheromone. *Journal of Chemical Ecology* 29: 1781-1796.

Browne, R. K., S. A. Kaurova, V. K. Uteshev, N. V. Shishova, D. McGinnity, C. R. Figiel, N. Mansour, D. Agnew, M. Wu, E. N. Gakhova, B. Dzyuba and J. Cosan. 2015. Sperm motility of externally fertilizing fish and amphibians. *Theriogenology*. **83**: pp 1-13.

Burnard, D., Gozlan, R.E., Griffiths, S.W., 2008. The role of pheromones in freshwater fishes. *J. Fish Biol.* 73, 1–16.

Cabrera E, Robles V, and Herraes P. 2008. *Methods in Reproductive Aquaculture Marine and Freshwater Species*. CRC Press. Boca Raton. New York.

Carolsfeld, J., Sherwood, N. M., Kyle, A. L., Magnus, T. H., Pleasance, S., and Kreiberg, H. 1992. Characterization of a spawning pheromone from Pacific herring. In "Chemical Signals in Vertebrates" (Doty, R. L., and Müller-Schwarze, D., Eds.), Vol. 6, p. 271. Plenum Press, New York.

Cheng, C. Y. 2008. *Molecular mechanisms in spermatogenesis*. Landes Bioscience and Springer Science. pp 1-15.

Chivers, D. P.; Smith, R. J. F. 1998. Chemical alarm signaling in aquatic predator-prey systems: a review and prospectus. *Ecoscience* 5: 338-352.

Colombo, L., Marconato, A., Belvedere, P., Friso, S. 1980. Endocrinology of teleost reproduction: a testicular steroid pheromone in the black goby, *Gobius joso* L. *Ital. J. Zool.* 47, 355–364.

Condro. H.S, Mubarak.A.S and Sulmartiwi.L.. 2012. Pengaruh Penambahan Madu Pada Media Pengencer NaCl Fisiologis Dalam Proses Penyimpanan Sperma Terhadap Kualitas Sperma Ikan Komet (*Carassius auratus auratus*). *Journal of Marine and Coastal Science*, 1(1), 1 – 12, 2012.

DeFraipont, M.; Sorensen, P. W. 1993: Exposure to the pheromone 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one enhances the behavioural spawning success, spermproduction, and sperm motility of male goldfish. *Animal Behavior* 46: 245-256.

Devitsyna.G.V and A. B. Al Attar el Saied, "Cytoarchitectonics and Morphometry of the Olfactory Analyzer of Fish Micro- and Macrosmatics," *Vopr. Ikhtiol.* 28, 837–845 (1988).

Devlin, R. H. & Nagahama, Y, 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208, 191–364.

Djuwita, I. Boediono, A. Mohamad, K. 2000. *Bahan Kuliah Embriologi*. FKH.IPB. Bogor.

Døving, K. (1976). Evolutionary trends in olfaction. In "The Structure-Activity Relationships in Olfaction" (Benz, G., Ed.), pp. 149–159. IRL Press, London.

Døving, K. B.; Selset, R.; Thompson, G. 1980: Olfactory sensitivity to bile acids in salmonid fishes. *Acta Physiologica Scandinavia* 108: 123-131.

Dulka, J. G.; Stacey, N. E.; Sorensen, P. W.; Van Der Kraak, G. J. 1987: A sex steroid pheromone synchronizes male-female spawning readiness in goldfish. *Nature* 325: 251–253.

Elks, J., 2014. *The Dictionary of Drugs: Chemical Data: Chemical Data, Structures and Bibliographies*. Springer. pp. 86–. ISBN 978-1-4757-2085-3.





- Elvidge Chris K. and Grant E. Brown. 2012. Visual and Chemical Prey Cues as Complementary Predator Attractants in a Tropical Stream Fish Assemblage. *International Journal of Zoology* Volume 2012: 1-7
- Ernawati Y, 1999. Efisiensi Implantasi Analog LH-RH and 17 α -Metil Testosteron serta Pembekuan Semen dalam upaya Peningkatan Produksi Benih Ikan Jambal Siam (*Pangasius hypophthalmus*). Disertasi. Program Pascasarjana. IPB.
- Evans, H.M. 1940. Brain and Body of Fish. A Study of Brain Pattern in Relation to Hunting and Feeding in Fish. London: The Technical Press Ltd. 164 pp.
- Falahatkar, B., S. Poursaeid, H. E. Langroudi, I. Efatpanah, B. Meknatkhah and M. Rahmati. 2013. Spawning induction in Kutum, *Rutilus frisii kutum* (Kamensky), with different hormones: analysis of hormone profiles and induced spawning success. *Arch. Pol. Fish.* 21: pp 271-281.
- Fitri ADP. 2008. Respons Penglihatan dan Penciuman Ikan terhadap Umpan Terkait dengan Efektivitas Penangkapan [Disertasi]. Bogor: Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.
- Fraser, E. J.; Stacey, N. E. 2002: Isolation increases milt production in goldfish. *Journal of Experimental Zoology* 293: 511-524
- Fujaya, Y. 2002. Fisiologi Ikan. Proyek Peningkatan Penelitian Pendidikan Tinggi Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi. Departemen Pendidikan Nasional. Jakarta. Hal. 160-163.
- Fujaya Y. 2004. Fisiologi Ikan.: dasar pengembangan teknik perikanan. PT Rineka Cipta. Jakarta
- Garcia, C. E. de O, B. C. Araujo, P. H. Mello, A. de M. Narcizo, J. A. Rodrigues-Filho, A. T. Medrado, R. A. Zampieri, L. M. Floeter-Winter and R. G. Moreira. 2013. Involvement of pituitary gonadotropins, gonadal steroids and breeding season in sex change of protogynous dusky grouper, *Ephinephelus marginatus* (Teleostei: Serranidae), induced by a non-steroidal aromatase inhibitor. *General and Comparative Endocrinology.* 192: pp 170-180.
- Goetz, F.W., M. Rajan, A.K. Brendtson and P. Duman. 1987. The mechanism and hormonal regulation of ovulation: the role of prostaglandins in teleost. In: D.R. Idler, L.W. Crim and J.M. Walls (Eds.) *Proceeding of the third International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish.* St. John's Newfoundland, Canada, August 2-7, 1987. pp 235-238
- Gilbert, S. F. (1988). Cellular Politics: Just, Goldschmidt, and the attempts to reconcile embryology and genetics, In *The American Development of Biology* (ed. R. Rainger, K. Benson, J. Maienschein) University of Pennsylvania Press, Philadelphia. pp. 311-346.
- Ginsburg AS, 1963. Sperm-egg association and its relationship to the activation of the egg in salmonid fishes. *J Embr Exp Morpho* 11:13-33.
- Ginzburg. AS, 1972. Fertilization in fishes and the problem of Polyspermy. *Academy of Sciences of the USSR. Institute of Development Biology.* Israel Program for Scientific Translations. Jerusalem.
- Green. J, C Collins, EJ Kyzar, M Pham, A Roth, S Gaikwad, et al. 2010. Automated high-throughput neurophenotyping of zebrafish social behavior. *J Neurosci Methods* 2012;210:266–271.



- Hafez, E. S. E. 1987. *Reproduction in farm Animals* 5 th edition. Lea & Febrieger. Philadelphia. USA.
- Hafez, E. S. E. 1993. *Reproduction In Farm Animals*. 6th ed. Lea and Febiger, Philadelphia.
- Hajirezaee S, Rafiee GhR, Hushangi R. 2011. Comparative analysis of milt quality and steroid levels in blood and seminal fluid of Persian sturgeon males, *Acipense persicus* during final maturation induced by hormonal treatment. *Biologia*. 66:160–169.
- Hamdani. E.H, Alexander. G, and K. B. Døving, 2001. "Projection of Sensory Neurons with Microvilli to the Lateral Olfactory Tract Indicates their Participation in Feeding Behaviour in Crucian Carp," *Chem. Senses* 26, 1139–1144
- Hamdani. E. H and K. B. Døving, 2002. "The Alarm Reaction in Crucian Carp is Mediated by Olfactory Neurones. with Long Dendrites," *Chem. Senses*. 27, 395–398
- Hamdani. E. H and K. B. Døving, 2003. "Sensitivity and Selectivity of Neurons in the Medial Region of the Olfactory Bulb to Ssin Extract from Conspecifics in Crucian Carp, *Carassius carassius*," *Chem. Senses* 28, 181–189.
- Hansen. A, and T. E. Finger.,2000. "Phyletic Distribution of Crypt-Type Olfactory Receptor Neurons in Fishes," *Brain Behav. Evol.* 55, 100–110
- Hauser B, Deschner T, Boesch C.,2008. Development of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of 23 endogenous steroids in small quantities of primate urine. *J Chromatogr B* 2008;862:100–12.
- Harder.W. 1977. *Anatomy of Fishes*. Part I. text; Part II; Figures and Plates. Stuttgart : E.Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, 612 pp.;132 pp and 13 plates.
- Harvey, B.J., Hoar, W.S. 1979. *The Teory and Practice of Induced Breeding in Fish*. Ont. IDRC-TS 21e. Ottawa.
- Heerin S.V. 2002. Technology transfer—backyard hatcheries bring jobs, growth to Bali. *Global Aquaculture Advocate*, December 2002, 90–92.
- Heemstra P.C. and Randall J.E. 1993. *Groupers of the world*. FAO species catalogue, volume 16. Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome.
- Herrick J B and Self H L. 1962. *Evaluation of Fertility in the Bull and Boar*. Iowa State University Press. Ames. Iowa. USA.
- Hibiya T. 1982: *An Atlas of Fish Histology (Normal and Pathological Features)*. Kodansha Ltd., Tokyo.
- Hirschenhauser, K., Taborsky, M., Oliveira, T., Canario, A. V. and Oliveira, R. F. (2004). A test of the 'challenge hypothesis' in cichlid fish: simulated partner and territory intruder experiments. *Anim. Behav.* 68, 741-750.

- Hirschenhauser, K., Canario, A. V., Ros, A. F., Taborsky, M. and Oliveira, R. F. (2008). Social context may affect urinary excretion of 11-ketotestosterone in African cichlids. *Behavior* 145, 1367-1388.
- Hoar, W.S. 1983. Reproduction. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Donaldson, E.M. (eds) *Fish Physiology*. Academic Press, London, 1-72
- Hoar WS, Randall DJ. 1971. *Fish Physiology. Sensory system and Electric organs. Volume V*. England.
- Hubbard PC, Barata EN, Canario AV. 2002. Possible disruption of pheromonal communication by humic acid in the gold fish, *Carassius auratus*. *Aquat Toxicol* 60:169-183
- Huertas, M., Almeida, O. G., Canário, A. V. M. and Hubbard, P. C. (2014). Tilapia male urinary pheromone stimulates the female reproductive axis. *General and Comparative Endocrinology* 196, 106-111.
- Hurk, R., and Lambert, J. G. D. (1983). Ovarian steroid glucuronides function as sex pheromones for male zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Can. J. Zool.* 61, 2381-2387.
- Imre I, Brown GE, Bergstedt RA, McDonald R. 2010. Use of chemosensory cues as repellents for sea lamprey: potential directions for population management. *J. Gt. Lakes Res.* 36: 790-793
- Irvine, I. A. S.; Sorensen, P. W. 1993: Acute olfactory sensitivity of wild common carp, *Cyprinus carpio*, to goldfish sex pheromones is influenced by gonadal maturity. *Canadian Journal of Zoology* 71: 2199-2210.
- Indrawatie, D. 2010. Pengujian Umpan Buatan (Arginin Dan Leusin) Terhadap Ikan Kerapu Macan Pada Skala Laboratorium. Skripsi. Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor. 70 hal.
- Ismi S., Sutarmat T., NA Giri, Rimmer MA, Knuckey RMJ, Berding AC and Sugama K. 2013. Pengelolaan pendederan ikan kerapu: suatu panduan praktik terbaik. Monograf ACIAR No. 150a. Australia Centre for International Agricultural Research: Canberra. 44 hal.
- Jumper G.Y., Jr. and R. C. Baird, 1991. "Location by Olfaction: A Model and Application to the Mating Problem in the Deep-Sea Hatchetfish *Argyroteleus hemigymnus*," *Am. Nat.* 138, 1431-1458
- Johnston B. and Yeeting B. 2006. Economics and marketing of the live reef fish trade in Asia-Pacific. ACIAR Working Paper No. 60. Australian Centre for International Agricultural Research: Canberra
- Kagawa, H., G. Young, S. Adachi and Y. Nagahama. 1982. 17-estradiol production in amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) ovarian follicles: role of thecal and granulosa cells. *General and Comparative Endocrinology*, 47: 440-448
- Kasumyan. A. O. 2004. The Olfactory System in Fish: Structure, Function, and Role in Behavior. *Journal of Ichthyology*, Vol. 44, Suppl. 2, pp. S180-S223.



- Karimia M. R, Rahimib K, Saljoghic Z. S, Kharad H and Halimie M. 2015. Changes of seminal fluid sex steroids and milt quality indices during sequential striping of male Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii*, Brandt and Ratzeburg (1833). *Journal of Applied Animal Research*, Vol. 43, No. 3, 279–282
- Karlson, P, Luscher, M. 1959: 'Pheromones': a new term for a class of biologically active substances. *Nature* 183: 55-56.
- Kathleen M. Carter, Christa M. Woodley, Richard S. Brown. 2011. A review of tricaine methanesulfonate for anesthesia of fish. *Fish Biol Fisheries*, 21:51–59.
- Kasumyan, A. O.; Ponomarev, V. Y. 1987: Biochemical features of alarm pheromone in fish of the order Cypriniformes. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 23: 20-24.
- Kawabata, K. 1993: Induction of sexual behaviour in male fish (*Rhodeus ocellatus ocellatus*) by amino acids. *Amino Acids* 5: 323-327.
- Kawauchi, H., K. Suzuki, H. Itoh, P. Swanson, N. Naito, Y. Nagahama, M. Nozaki, Y. Nakai and S. Itoh. 1989. The duality of teleost gonadotropins. *Fish Physiologu and Biochemistry*, 7: 29-38
- Keller-Costa, T., Lopes, O.S., Lima, M., Hubbard, P.C., Iacovella, A., Canário, A.V.M., Almeida, O., Barata, E.N., 2012. Muscular hypertrophy of urinary bladders in dominant tilapia facilitates the control of aggression through urinary signals. *Behaviour* 149, 953–975.
- Kuhl H., 2005. "Pharmacology of estrogens and progestogens: influence of different routes of administration". *Climacteric*. 8 Suppl 1: 3–63.
- Kobayashi, M.; Aida, K.; Hanyu, I. 1988: Hormone changes during the ovulatory cycle in goldfish. *General and Comparative Endocrinology* 69: 301-307
- Kobayashi, M.; Sorensen, P. W.; Stacey, N. E. 2002: Hormonal and pheromonal control of spawning behaviour in the goldfish. *Fish Physiology and Biochemistry* 26: 71-84.
- Kruger JC, Smith GL, VanVuren JHJ, Ferreira JT, 1984, Some chemical and physical characteristics of the semen of *Cyprinus carpio* and *Oreochromis mossambicus*, *J Fish Biol* , 24, 263-72.
- Kucharczyk D, Targonska K, Hliwa P, Gomułka P, Kwiatkowski M, Krejszef S, Perkowski J. 2008. Reproductive parameters of common carp (*Cyprinus carpio* L) spawners during natural season and aout-of-season spawning. *Repr Biol* 8:285-289.
- Lee, W.K. & Yang, S.W. 2002. Relationship between ovarian development and serum levels of gonadal steroid hormones, and induction of oocyte maturation and ovulation in the cultured female Korean spotted sea bass *Lateolabrax maculatus* (Jeom-nong-eo). *Aquaculture*, 207: 169-183
- Liley, N. R. 1982: Chemical communication in fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 39: 22-35.

- Lin, Y-W.P., B.A. Rupnow, D.A. Price, R.M. Greenberg, and R.A. Wallace. 1992. Fundulus heteroclitus gonadotropin. III. Cloning and sequencing of gonadotropic hormone (GTH) I and II subunit using the polymerase chain reaction. *Molecular Cellular Biology*, 85 : 127-139
- Luan, G. H., M. Luin, R. Shapawi, C. F. Fui and S. Senoo. 2016. Egg development of backcrossed hybrid grouper between oggg (*Epinephelus coioides* x *Epinephelus lanceolatus*) and giant grouper (*Epinephelus lanceolatus*). *International Journal of Aquatic Science*. 7 (1): pp 13-18.
- Marchlewska-Koj A, Lepri JJ, M€uller-Schwarze D. 2001. Chemical signals in vertebrates, vol 9. Kluwer Academic/Plenum, New York
- Maruska, K. P. and Fernald, R. D. 2012. Contextual chemosensory urine signaling in an African cichlid fish. *The Journal of Experimental Biology* 215, 68-74
- Masitha, L., 2013. Peran Ikan Mas (*Cyprinus Carpio* L.) Betina Untuk Merangsang Pemijahan Ikan Tawes (*Barbonymus gonionotus* B.) Dalam Metode Cangkringan. Tesis. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. 38 hal
- Matsumura, K. 1995: Tetrodotoxin as a pheromone. *Nature* 378: 563-564.
- Mayunar., 1993. Perkembangan Pembentukan Ikan Kerapu Macan Di Indonesia. *Jurnal Oseana*, Volume XVIII, Nomor 3 : 95 – 108
- McLennan. D. A and M. J. Ryan.,1997. "Responses to Conspecific and Heterospecific Olfactory Cues in the Swordtail *Xiphophorus cortezi*," *Anim. Behav.* 54, 1077–1088
- McMurry, J. E., Fay, R. C. 2010. *General Chemistry, Atoms First*. Cornell University. Pearson Education Inc. 1056 p
- McGregor, P. K.; Peake, T. M. 2000: Communication networks: social environments for receiving and signaling behaviour. *Acta Ethologica* 2: 71-81.
- Miranda, A., Almeida, O. G., Hubbard, P. C., Barata, E. N. and Canário, A. V. M. (2005). Olfactory discrimination of female reproductive status by male tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Journal of Experimental Biology* 208, 2037-2043.
- Mittelmark, J. 2008. Induced Reproduction in Fish. http://www.Seagrant.umn.edu/aquaculture/induced_fish_reproduction [tanggal kunjung 5 Desember 2015].
- Moore, A.; Waring, C. P. 1996: Electrophysiological and endocrinological evidence that F-series prostaglandins function as priming pheromones in mature male Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. *Journal of Experimental Biology* 199: 2307- 2316.
- Motofei, I. G. 2011. "A dual physiological character for cerebral mechanisms of sexuality and cognition: common somatic peripheral afferents". *BJU International*. 108 (10): 1634–1639.
- Muhaimin., O. B. Liang, E. Ratnaningsih, E. Purwantini and D. S. Retnoningrum. 2005. Purifikasi protein fusi MBP-Mga *Streptococcus pyogenes* ekspresi



- heterolog di *Escherichia coli*. *Jurnal Matematika dan Sains*. 10(1): hlm 31-36.
- Nalbandov, AV. 1990. *Fisiologi Reproduksi Pada Mamalia Dan Unggas*. Keman S, Penerjemah. Jakarta : UI Press.
- Nagahama Y. 1987. 17, 20-Dihydroxy-4-pregnen-3-one: a teleost maturation-inducing hormone. *Development Growth and Differentiation*, 29: 1-12
- Nagrath. A, Malhotra.N and Shikha.S. 2012. *Progress in Obstetrics & Gynecology*. JP Medical Ltd. pp. 265-. ISBN 978-93-5025-779-1.
- Nikolsky. 1971. *The Ecology of Fishes*. London. Academic Press.
- Ogawa. T, J.M. Aréchaga, M.R. Avarbock, R.L. Brinster. 1997. Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules *Int. J. Dev. Biol.*, 41 (1997), pp. 111–122
- Oliveira, R. F., Almada, V. and Canario, A. V. (1996). Social modulation of sex steroid concentrations in the urine of male cichlid fish *Oreochromis mossambicus*. *Horm. Behav.* 30, 2-12.
- Olsen. K. H and N. R. Liley., 1993. "The Significance of Olfaction and Social Cues in Milt Availability, Sexual Hormone Status, and Spawning Behavior of Male Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)," *Gen. Comp. Endocrinol.* 89, 107–118
- Ownby, C. 1999. *Spermatogenesis*. <http://www.cvmarkstate.edu>
- Pandian, T. J. And S. G. Sheela. 1995. Review : Hormonal Induction of Sex Reversal In Fish. *Aquaculture* 138: 1-22.
- Pears R.J., Choat J.H., Mapstone B.D. and Begg G.A. 2007. Reproductive biology of a large, aggregation-spawning serranid, *Epinephelus fuscoguttatus* (Forsskål): management implications. *Journal of Fish Biology* 71, 795–817.
- Pergiwa, S.G. 2003. *Gambaran Morfologi Tahapan Spermatogenesis Pada Kucing Lokal Felis catus*. Skripsi. Bogor : FKH. IPB.
- Peter, R.E. and K.L. Yu. 1997. Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basic and applied aspects. *Rev. Fish. Biol. Fisher.* 7:173-197
- Pelissero, C., J.L. Foucher, B. Bennetau, J. Donogues, G. Fluoriot and J.P. Sumpter. 1991. In vitro estrogenic activities of phyoestrogen on liver vitellogenin synthesis in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). In: A.P. Scott, J.P. Sumpter, D.E. Kime, and M.S. Rolfe (eds.). *Proceeding of the fourth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*. Noewich, UK. 7-12 Juli 1991, Fish Fish Symp91, Sheffield pp 247-249
- Peyon, P., S. Baloche and E. Burzawa-Gerard. 1992. Induction of vitellogenin synthesis by 17-estradiol and testosterone in silver eel hepatocytes maintained in primary culture. In: *Abstract, Second International Symposium on Fish Endocrinology*, Saint Malo, June 1-4, 1992, p. P58
- Pfeiffer, W.; Riegelbauer, G.; Meier, G.; Scheibler, B. 1985: Effect of hypoxanthine-3(N)-oxide and hypoxanthine-1(N)-oxide on central nervous excitation of





- the black tetra *Gymnocorymbus ternetzi* (Characidae, Ostariophysi, Pisces) indicated by dorsal light response. *Journal of Chemical Ecology* 11: 507-523.
- Pitcher, T.J. 1995. The impact of pelagic fish behaviour on fisheries. *Scientia Marina* 59, 295–306.
- Poling, K. R.; Fraser, E. J.; Sorensen, P. W. 2001: The three steroidal components of the goldfish preovulatory pheromone signal evoke different behaviours in males. *Comparative Biochemistry and Physiology B*129: 645-651.
- Polkinghorne, C. A.; Olson, J. M.; Gallaher, D. G.; Sorensen, P. W. 2001: Larval sea lamprey release two unique bile acids to the water at a rate sufficient to produce detectable riverine pheromonal plumes. *Fish Physiology and Biochemistry* 24: 15-30
- Prasetyaningtias, W.E. 2001. Studi Histokimia Lektin Pada Distribusi Glikokonjugat Di Epitel Tubuli Seminiferi Testis Babi Rusa *Babyrousa babyrousa*. Skripsi. Bogor : FKH. IPB.
- Prasetyaningtias, W.E. 2006. Transplantasi Testis Muda Sebagai Upaya Preservasi Gonad In Vivo. Laporan Penelitian Dosen Muda Institut Pertanian Bogor. IPB.
- Purbayanto, A, M. Riato and A.D.P Fitri. 2010. Fisiologi dan Tingkahlaku Ikan pada Perikanan Tangkap. IPB Press. Indonesia. 2010. p 208
- Putri, D. I. L, A. Tumulyadi dan Sukandar. 2013. Tingkah laku pemijahan pembesaran ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) di balai budidaya air payau situbondo. *PSPK Student Journal*. 1(1): pp 11-15. Universitas Brawijaya.
- Pyatkina. G. A., 1976. Receptor Cells of Different Types and the Quantitative Relations between them in the olfactory Organ of Larvae and Adult Sturgeons, *Tsitologiya* 18, 1444–1449
- Razak A. 2006. Adaptasi Ekologi Mata Ikan Kepe-Kepe (*Chaetodontidae*) dan Responsnya terhadap Racun Potas (KCN) [Disertasi]. Bogor: Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Redding, J.M. and Patino, R. 1993. Reproductive Physiology. In D.H. Evans (Eds). *The physiology of Fishes*. Marine Science Series. CRC Press. London, pp. 503-534
- Reddy D.S. 2010. "Neurosteroids: endogenous role in the human brain and therapeutic potentials". *Prog. Brain Res. Progress in Brain Research*. 186: 113–37.
- Rimmer M.A., McBride S. and Williams K.C. 2004. Advances in grouper aquaculture. ACIAR Monograph No. 110. Australian Centre for International Agricultural Research: Canberra.
- Rosenthal GG, Fitzsimmons JN, Woods KU, Gerlach G, Fisher HS (2011) Tactical Release of a Sexually-Selected Pheromone in a Swordtail Fish. *PLoS ONE* 6(2): e16994.

- Rustidja, 2000. Pemijahan Buatan Ikan-ikan Daerah Tropis. Bahtera Press. Malang. hal 46-178.
- Salisbury G W and Van Demark. 1961. Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle. University of Illinois. W. H. Freeman & Company. San Francisco and London.
- Sato. K and N. Suzuki, 2001. Whole-Cell Response Characteristics of Ciliated and Microvillous Olfactory Receptor Neurons to Amino Acids, Pheromone Candidates and Urine in Rainbow Trout, Chem. Senses Flavor. 26, 1145–1156.
- Schutze, S. 2015. Dna stability of stallion sperm: factors affecting chromatin integrity in individual stallions. *Thesis*. University of Veterinary Medicine Hannover. 83 pp.
- Scott, A. P.; Sorensen, P. W. 1994: Time course of release of pheromonally active steroids and their conjugates by ovulatory goldfish. *General and Comparative Endocrinology* 96: 309-323.
- Sejati DB. 2008. Respons Penciuman Ikan Kerapu Macan (*Ephinephelus fuscoguttatus*) terhadap umpan Pengujian Skala laboratorium [Skripsi]. Bogor: Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.
- Selset, R.; Døving, K. B. 1980: Behaviour of anadromous char (*Salmo alpinus* L.) towards odorants produced by their own population. *Acta Physiologica Scandinavica* 108: 113-122.
- Setyono, B. 2009. Pengaruh perbedaan konsentrasi bahan pada pengencer sperma ikan "skim kuning telur" terhadap laju fertilisasi, laju penetasan dan sintasan ikan mas (*Cyprinus carpio* L.). *GAMMA*. 5(1): hlm 01-12.
- Sherwood, N.M. and I.R. Coe, 1991. Neuropeptides and their genes in fish. In: A.P. Scott, J.P. Sumpter, D.E. Kime, and M.S. Rolfe (eds.). *Proceeding of the fourth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*. Noewich, UK. 7-12 Juli 1991, Fish Symposium, Sheffield pp 38-40.
- Siar S.V., Johnston W.L. and Sim S.Y. 2002. Study on economics and socioeconomics of small-scale marine fish hatcheries and nurseries, with special reference to grouper systems in Bali, Indonesia. Report prepared under Asia–Pacific Economic Cooperation (APEC) Project FWG 01/2001: 'Collaborative APEC Grouper Research and Development Network'. Asia– Pacific Marine Finfish Aquaculture Network Publication 2/2002. Network of Aquaculture Centres in Asia–Pacific: Bangkok, Thailand.
- Smith, R. J. F. 1992: Alarm signals in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 2: 33-63.
- Smith, R. J. F. 1999: What good is smelly stuff in the skin? Cross function and cross taxa effects in fish "alarm substances". In: Johnston, R. E.; Müller-Schwarze, D.; Sorensen, P. W. ed. *Advances in chemical signals in*



vertebrates. New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers. Pp. 475–488.

Sorensen, P. W.; Scott, A. P.; Stacey, N. E.; Bowdin, L. 1995a: Sulfated $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one functions as a potent and specific olfactory stimulant with pheromonal actions in the goldfish. *General and Comparative Endocrinology* 100: 128-142.

Sorensen, P. W.; Brash, A. R.; Goetz, F. W.; Kellner, R. G.; Bowdin, L.; Vrieze, L. A. 1995b: Origins and functions of F prostaglandins as hormones and pheromones in the goldfish. ed. *Proceedings of the Fourth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*. Austin Texas, FishSymp 95. Pp. 252-254.

Sorensen, P. W.; Caprio, J. 1998: Chemoreception in fish. Chapter 15. In: Evans, R. E. ed. *The physiology of fishes*, 2nd ed. Florida, CRC Press

Sorensen, P. W.; Christensen, T. A.; Stacey, N. E. 1998 Discrimination of pheromonal cues in fish: emerging parallels with insects. *Current Opinion in Neurobiology* 8: 458-467

Sorensen, P. W.; Hara, T. J.; Stacey, N. E.; Dulka, J. G. 1990: Extreme olfactory specificity of the male goldfish to the preovulatory steroidal pheromone $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one. *Journal of Comparative Physiology A* 166: 373-383

Sorensen, P. W.; Hara, T. J.; Stacey, N. E.; Goetz, F. W. 1988: F prostaglandins function as potent olfactory stimulants that comprise the postovulatory female sex pheromone in goldfish. *Biology of Reproduction* 39: 1039-1050.

Sorensen, P.W., Pinillos, M., Scott, A.P. 2005. Sexually mature male goldfish release large quantities of androstenedione into the water where it functions as a pheromone. *General and Comparative Endocrinology* 140, pp. 164–175

Sorensen, P. W.; Scott, A. P.; Kihlslinger, R. L. 2000: How common hormonal metabolites function as relatively specific pheromonal signals in the goldfish. ed. *Proceedings of the Sixth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*. Bergen, Institute of Marine Research and University of Bergen. Pp. 125-128.

Sorensen, P. W.; Scott, A. P. 1994: The evolution of hormonal sex pheromones in teleost fish: poor correlation between the pattern of steroid release by goldfish and olfactory sensitivity suggests that these cues evolved as a result of chemical spying rather than signal specialization. *Acta Physiologica Scandinavica* 152: 191-205.

Sorensen, P. W., Stacey, N. E. 1999: Evolution and specialization of fish hormonal pheromones. ed. *Advances in chemical signals in vertebrates*. New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers. Pp. 15–47.





- Sorensen, P. W.; Wyatt, J. 2001: Pheromones. ed. The Corsini Encyclopedia of Psychology and Behavioral Science, 3rd ed. New York, Wiley. Pp. 1193-1195.
- Sorensen, P. W.; Vrieze, L. A.; Fine, J. 2003: A multicomponent migratory pheromone in the sea lamprey. *Fish Biochemistry and Physiology*: 253-257.
- Sorensen, P. W.; Pinillos, M.; Scott, A. P. 2004: Sexually mature male goldfish release large quantities of androstenedione to the water where it functions as a pheromone. *General and Comparative Endocrinology* (in press).
- Sorensen, P. W. and N. E. Stacey. 2004. Brief review of fish pheromones and discussion of their possible uses in the control of non-indigenous teleost fishes. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*. 38: pp 399-417.
- Stacey, N. E., and Hourston, A. H. 1982. Spawning and feeding behavior of captive Pacific herring, *Clupea harengus pallasii*. *Can. J. Fish. Aquatic Sci.* 39, 489-498.
- Stacey, N. E.; Cardwell, J. R. 1995: Hormones as sex pheromones in fish: widespread distribution amongst freshwater species. ed. Proceedings of the Fourth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. Austin Texas, FishSymp 95. Pp. 244-248.
- Stacey, N. E.; Fraser, E. J.; Sorensen, P. W.; Van Der Kraak, G. J. 2001: Milt production in goldfish: regulation by multiple social stimuli. *Comparative Biochemistry and Physiology C130*: 467-476.
- Stacey, N. E.; Sorensen, P. W. 2002: Fish hormonal pheromones. ed. *Hormones, Brain, and Behavior*, Vol. 2. New York, Academic Press. Pp. 375-435.
- Stacey, N. E. 2003. Hormones, pheromones, and reproductive behavior. *Fish Physiol. Biochem.* 28, 229-235.
- Stacey, N. E.; Sorensen, P. W.; Van Der Kraak, G. J.; Dulka, J. G. 1989: Direct evidence that $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one functions as a goldfish primer pheromone: preovulatory release is closely associated with male endocrine responses. *General and Comparative Endocrinology* 75: 62-70.
- Stacey, N.E; Wisenden.B.D.; Sorensen. P.W. 2010. Chemical Communication in Fish. *CHEMICAL ECOLOGY. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*.
- Stoss J.1983. Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. In: Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM (eds) *Fish physiology 1X B*. Academic Press, New York, pp 305-350.
- Stowerd and Logan. 2010. Olfactory mechanisms of stereotyped behavior: on the scent of specialized circuits. *Current Opinion in Neurobiology* 20:1-7

- Stru" ssmann, C. A. & Nakamura, M. (2002). Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Fish Physiology and Biochemistry* 26, 13–29.
- Sugama K., Rimmer M.A., Ismi S., Koesharyani I., Suwiryak., Giri N.A. and Alava V.R. 2013. Pengelolaan pembenihan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*): suatu panduan praktik terbaik. Monograf ACIAR No. 149a. Australian Centre for International Agricultural Research: Canberra. 66 hal
- Sumpter, J.P., C.R. Tyler, and H. Kawauchi. 1991. Action of GTH I and GTH II on ovarian steroidogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. In: A.P. Scott, J.P. Sumpter, D.E. Kime, and M.S. Rolfe (eds.). *Proceeding of the fourth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*. Noewich, UK. 7-12 Juli 1991, *Fish Fish Symp91*, Sheffield pp 27
- Suzuki, K., Y. Nagahama and H. Kawauchi. 1988. Steroidogenic activities of two distinct gonadotropins. *General and Comparative Endocrinology*, 71: 452-548
- Swanson, P., K. Suzuki, H. Kawauchi, and W.W. Dickhoff. 1991. Isolation and characterization of two coho salmon gonadotropin, GTH I and GTH II. *Biology of Reproduction*, 44: 29-38
- Swanson, P. 2008. Endocrine Regulation of Reproduction. http://www.northwestfisherysciencecenter.noaa.gov/research/divisions/reutd/phys_endo/endocrine.cfm [tanggal kunjung 5 Desember 2015].
- Tang, M. U. and Affandi, R. 2002. *Biologi Reproduksi Ikan*. Unri Press, Riau.
- Thommesen, G. "Morphology, Distribution and Specificity of Olfactory Receptor Cells in Salmonid Fishes," *Acta Physiol. Scand.* 117, 241–249 (1983).
- Tian, Y., J. Jiang, N. Wang, W. Qi, J. Zhai, B. Li, Y. Liang, Y. Chen, C. Yang and S. Chen. 2015. Sperm of the giant grouper: cryopreservation, physiological and morphological analysis and application in hybridizations with red-spotted grouper. *Journal of Reproduction and Development*. 61 (4): pp 333-339.
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76(9): 4350-4354.
- Toelihere M.R. 1981. *Inseminasi Buatan pada Ternak*. Penerbit Angkasa. Bandung.
- Tremblay and Van Der Kraak, 1998. Use of a Series of Homologous in vitro and in vivo Assays to Evaluate The Endocrine Modulating Action of β -Sitosterol in Rainbow Trout. *Aquat. Toxicol.* 43, 149-162.
- Tyler, C.R., J.P. Sumpter, H. Kawauchi, and P. Swanson. 1991. Involvement of gonadotropin in the uptake of vitellogenin into vitellogenic oocytes of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology*, 84: 291-299.
- Unal G, Karakisi H, Elp M. 2005. Ovarian follicle ultrastructure and changes in levels of ovarian steroids during oogenesis in *Chalcalburnus tarichi* Pallas, Turk *J Vet Anim Sci* 29:645-653



- Van der Kraak, G., K. Suzuki, R.E. Peter, H. Itoh, and H. Kawachi. 1992. Properties of common carp gonadotropin I and gonadotropin II. *General and Comparative Endocrinology*, 85:217-229
- Verma, D. K., P. Routray, C. Dash, S. Dasgupta and J. K. Jena. 2009. Physical and biochemical characteristics of semen and ultrastructure of spermatozoa in six carp species. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 9: pp 67-76.
- Wallace, R.A. and P.c. Begovac. 1985. Phosvitin in *Fundulus* oocytes and eggs. *Journal of Biological Chemistry*, 260: 11268-11274
- Wallace, R.A. and K. Shelman. 1990. Ultrastructural aspect of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. *Journal of Electron Microscopic Techniques*, 16: 175-201
- Wijayanti, G. E. and S. B. I. Simanjutak. 2006. Viabilitas sperma ikan nilam (*Osteochilus hasselti* C.V.) setelah penyimpanan jangka pendek dalam larutan ringer. *Jurnal Perikanan*. 8(2): pp 207-214
- Wijayanti, G. E. Soeminto, and S. B. I. Simanjutak. 2009. Profil hormon reproduksi and gametogenesis pada gurame (*Osphronemus gouramy lac*) betina. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 8(1): 93-105
- Wisenden, B. D., Vollbrecht, K. A. & Brown, J. L. (2004). Is there a fish alarm cue? Affirming evidence from a wild study. *Animal Behaviour* 67, 59–67.
- Wisenden, B. D. 2003: Chemically mediated strategies to counter predation. In: Collin, S. P.; Marshall, N.J. ed. *Sensory assessment of the aquatic environment*. New York, Springer-Verlag. Pp. 236-252.
- Winans S.C. and Bassler B.L. (Eds) (2008) *Chemical Communication Among Bacteria*. American Society for Microbiology, Washington DC.
- Woynarovich E, Horvath L. 1980. The artificial propagation of warm-water finfishes. A manual for extension. *FAO Fisheries Technical Paper No. 201*. Rome. Food and Agriculture Organization of the United Nation
- Yalkowsky S. H, Yan He and Parijat J. 2016. *Handbook of Aqueous Solubility Data*, Second Edition. CRC Press. pp. 1209–. ISBN 978-1-4398-0246-5.
- Yamamoto. M, 1982. "Comparative Morphology of Fish Olfactory Organ in Teleosts," in *Chemoreception in Fishes*, Ed. by T. J. Hara (Elsevier, Amsterdam, 1982), pp. 39–59.
- Yamazaki. F., 1990. The role of urine in sex discrimination in the goldfish *Carassius auratus*. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.* 41(4), 155-161.
- Yambe, H., S. Kitamura, M. Kamio, M. Yamada, S. Matsunaga, N. Fusetani and F. Yamazaki. 2006. L-Kynurenine, an amino identified as a sex pheromone in the urine of ovulated female masu salmon. *PNAS*. 104 (28): 15370-15374.
- Yaron, Z. 1995. Endocrinology control of gametogenesis and spawning induction in the carp. *Aquaculture*, 129: 49-73





- Yoshikuni, M. and Y. Nagahama. 1991. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. Bull. Inst. Zool. Acad. Sin. Monogr., 16: 139-172
- Yun.S.S, Scott. A. P, Siefkes. M.J and Lia. W.,2002. Development and application of an ELISA for a sexpheromone released by the male sea lamprey (*Petromyzon marinus L.*) *General and Comparative Endocrinology* 129 (2002) 163–170
- Zaki MI, Negm RK, El-Agamy A, Awad GS. 2005. Ovarian follicular ultrastructure of the oocytes of Boops boops with special reference to the vitelline envelope development and micropylar apparatus. *Egyptian J Aquatic Res* 31:326-356
- Zeiske. E, Theisen. B, and H. Breucker, 1992. "Structure, Development and Evolutionary Aspects of the Peripheral Olfactory System," in *Fish Chemoreception*, Ed. By T. J. Hara (Chapman and Hall, London, 1992), pp. 13– 39.
- Zeiske. A, Kasumyan. A, P. Bartsch, and A. Hansen. 2003 "Early Development of the Olfactory Organ in Sturgeons of the Genus *Acipenser*: A Comparative and Electron Microscopic Study," *J. Morphol. and Embryol.* 206, 357–372
- Zhang, C.; Brown, S. B.; Hara, T. J. 2001: Biochemical and physiological evidence that bile acids produced and released by lake char (*Salvelinus namaycush*) function as chemical signals. *Journal of Comparative Physiology B*171: 161-171.
- Zheng, W.; Strobeck, C.; Stacey, N. E. 1997: The steroid pheromone 4-pregnen-17 α ,20 β -diol-3-one increases fertility and paternity in goldfish. *Journal of Experimental Biology* 200: 2833-2840.
- Zwiener, C. and F. H. Frimmel. 2004. Lc-ms analysis in the aquatic environment and in water treatment a critical review. Part I: Instrumentation and general aspects of analysis and detection. *Anal Biochemical Chem.* 851-861.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Data Hasil Pengamatan Konsentrasi Hormon Ikan Kerapu Macan

Konsentrasi hormon estradiol-17 β (pg/ml) dalam darah ikan kerapu macan betina pada perlakuan pemberian urin jantan

No	Perlakuan Pemberian Urin Jantan							
	Sebelum				Sesudah			
	A	B	C	Kontrol	A	B	C	Kontrol
1	85,080	148,892	122,576	97,031	183,298	225,552	232,025	130,433
2	98,871	95,745	92,698	99,864	152,071	197,906	215,540	122,509
3	100,770	108,792	119,755	105,683	169,276	205,922	224,465	137,887
4	110,256	86,565	87,071	75,877	201,280	198,842	158,077	100,555

Konsentrasi hormon testosteron (pg/ml) dalam darah ikan kerapu macan betina pada perlakuan pemberian urin jantan

No	Perlakuan Pemberian Urin Jantan							
	Sebelum				Sesudah			
	A	B	C	Kontrol	A	B	C	Kontrol
1	0,342	0,421	0,278	0,328	0,438	0,487	0,671	0,482
2	0,290	0,255	0,473	0,411	0,629	0,629	0,549	0,420
3	0,502	0,322	0,439	0,390	0,579	0,388	0,521	0,568
4	0,394	0,521	0,348	0,266	0,547	0,582	0,388	0,622

Konsentrasi hormon estradiol-17 β (pg/ml) dalam ikan kerapu macan betina pada perlakuan pemberian sperma

No	Perlakuan Pemberian Sperma Jantan							
	Sebelum				Sesudah			
	A	B	C	Kontrol	A	B	C	Kontrol
1	96,010	97,822	97,524	99,088	234,020	210,544	218,649	145,520
2	88,564	92,795	96,842	95,844	147,570	184,955	197,520	118,464
3	97,230	98,244	99,015	95,248	187,526	196,887	235,298	114,369
4	92,250	95,535	97,695	89,885	192,420	184,865	232,522	118,822

Konsentrasi hormon testosteron (pg/ml) dalam darah ikan kerapu macan betina pada perlakuan pemberian sperma

No	Perlakuan Pemberian Sperma Jantan							
	Sebelum				Sesudah			
	A	B	C	Kontrol	A	B	C	Kontrol
1	0,428	0,385	0,354	0,366	0,625	0,458	0,630	0,431
2	0,388	0,324	0,420	0,472	0,433	0,610	0,524	0,454
3	0,498	0,450	0,454	0,386	0,556	0,458	0,568	0,490
4	0,365	0,496	0,480	0,324	0,470	0,530	0,680	0,523

Lampiran 2. Analisa Hormon Estradiol-17 β Setelah Pemberian Urin

Perlakuan	Ulangan				Total	Rata-rata	St. Dev
	1	2	3	4			
Kontrol	33.402	22.645	32.204	24.678	112.929	28.23225	5.365046
1 ml	98.218	53.2	68.506	91.024	310.948	77.737	20.68245
2 ml	76.66	102.161	97.13	112.277	388.228	97.057	14.98602
3 ml	109.449	122.842	104.71	71.006	408.007	102.0018	22.04426
Total					1220.112		

Perhitungan

$$\begin{aligned} \bullet \text{ FK} &= G^2/n \\ &= 12.20,112^2/4 \times 4 \\ &= 93.042,08 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \bullet \text{ JK}_{\text{total}} &= (k_1)^2 + (a_1)^2 + \dots + (c_4)^2 - \text{FK} \\ &= (33,402)^2 + (98,218)^2 + \dots + (71,006)^2 - 93.042,08 \\ &= 17.117,23 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \bullet \text{ JK}_{\text{perlakuan}} &= (\Sigma A)^2 + (\Sigma B)^2 + (\Sigma C) + (\Sigma D)^2/4 - \text{FK} \\ &= ((112,929)^2 + (310,948)^2 + (388,228)^2 + (408,007)^2) / 4 - \\ &\quad 93.042,08 \\ &= 13.616 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \bullet \text{ JK}_{\text{acak}} &= \text{JK}_{\text{total}} - \text{JK}_{\text{perlakuan}} \\ &= 17.117,23 - 13.616 \\ &= 3.501,23 \end{aligned}$$

ANOVA

SK	db	JK	KT	Fhitung	F5%	F1%
Perlakuan	3	13616.00	4538.67	15.56	3.49	5.95
Acak	12	3501.23	291.7695	Ket : **		
Total	15	17117.23				

Kesimpulan F hitung > dari F1% artinya berbeda sangat nyata

Sehingga perlu dilakukan uji lanjut atau BNT (Beda Nyata Terkecil)



Perhitungan uji BNT:

- $SED = \sqrt{\frac{2 \cdot KT_{acak}}{n}}$
 $= \sqrt{\frac{2 \times 291,7695}{4}}$
 $= 12,078$
- $BNT\ 5\% = t\ \text{tabel}\ 5\% \times SED$
 $= 2,179 \times 12,078$
 $= 26,318$
- $BNT\ 1\% = t\ \text{tabel}\ 1\% \times SED$
 $= 3,055 \times 12,078$
 $= 36,899$

Uji BNT

Perlakuan	n	Rerata	28.23	77.74	97.06	102.00	Notasi
K	3	28.23	0	0	0	0	a
A	3	77.74	49.50	0	0	0	b
B	3	97.06	68.82	19.32	0	0	b
C	3	102.00	73.77	24.26	4.94	0	b

Kesimpulan : Urutan Perlakuan Terbaik yaitu C = B = A → K

Tabel polinomial orthogonal

Perlakuan	Data	Pembanding		
		linier	kuadratik	kubik
0 ml	112.93	-3	1	-1
1 ml	310.95	-1	-1	3
2 ml	388.23	1	-1	-3
3 ml	408.01	3	1	1
Q = $\sum C_i x_i T_i$		962.51	(178.24)	63.24
Kr = $(\sum C_i^2) x r$		80	16	80
JK = Q^2 / Kr		11580.415	1985.594	49.988
JK reg total				13615.997

Tabel sidik ragam regresi

	SK	db	JK	KT	F hit	F5%	F1%
Perlakuan	3	3	13615.997				
linier	1	1	11580.415	11580.415	**36.38	4.84	9.65
kuadratik	1	1	1985.594	1985.594	*6.24	4.84	9.65
kubik	1	1	49.988	49.988	0.16	4.84	9.65
Acak	11	11	3,501.23	318.294			
Total	14	14					

Karena regresi linier dan kuadratik berbeda nyata, maka dihitung R² masing-masing regresi tersebut

$$\begin{aligned} R^2 \text{ Linier} &= \text{JK Linier} / (\text{JK Linier} + \text{JK Acak}) \\ &= 11580,415 / (11580,415 + 3.501,23) \\ &= 0,677 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} R^2 \text{ Kuadratik} &= \text{JK Kuadratik} / (\text{JK Kuadratik} + \text{JK Acak}) \\ &= 1985,594 / (1985,594 + 3.501,23) \\ &= 0,36 \end{aligned}$$

Karena reg. linier lebih besar dibandingkan reg.kuadratik, maka reg.linier lebih sesuai untuk kurva respon = 0,677

Mencari persamaan regresi linier

x	y	xy	x ²
0	33.402	0	0
0	22.645	0	0
0	32.204	0	0
0	24.678	0	0
1	98.218	98.218	1
1	53.200	53.200	1
1	68.506	68.506	1
1	91.024	91.024	1
2	76.660	153.320	4
2	102.161	204.322	4
2	97.130	194.260	4
2	112.277	224.554	4
3	109.449	328.347	9
3	122.842	368.526	9
3	104.710	314.130	9
3	71.006	213.018	9
24	1.220.112	2.311.425	56
1.5	76.257		

$$b_1 = (\sum xy - (\sum x \sum y / n)) / (\sum x^2 - ((\sum x)^2 / n)) = 24.063$$

$$b_0 = \text{rerata } y - (b_1 \cdot \text{rerata } x) = 40.163$$

Persamaan linier $y = b_0 + b_1 x$

$$y = 24.063 + 40.163x$$

x	y
0	24.063
1	64.226
2	104.389
3	144.552

Lampiran 3. Analisa Hormon Estradiol-17 β Setelah Pemberian Sperma

Perlakuan	Ulangan				Total	Rata-rata	St. Dev
	1	2	3	4			
Kontrol	46.432	22.62	19.121	28.937	117.11	29.278	12.1363
2 ml	138.01	59.006	90.296	100.17	387.482	96.871	32.55912
4 ml	112.722	92.16	98.643	89.33	392.855	98.214	10.42821
6 ml	121.125	100.678	136.283	134.827	492.913	123.228	16.51156
Total					1390.36		

Perhitungan

- $$FK = G^2/n$$

$$= 1390,36^2/4 \times 4$$

$$= 120.818,81$$
- $$JK_{total} = (k1)^2 + (a1)^2 + \dots + (c4)^2 - FK$$

$$= (46,432)^2 + (138,01)^2 + \dots + (134,827)^2 - 120.818,81$$

$$= 24.236,32$$
- $$JK_{perlakuan} = (\Sigma A)^2 + (\Sigma B)^2 + (\Sigma C) + (\Sigma D)^2/4 - FK$$

$$= ((117,11)^2 + (387,482)^2 + (392,855)^2 + (492,913)^2) / 4 - 120.818,81$$

$$= 19.470,02$$
- $$JK_{acak} = JK_{total} - JK_{perlakuan}$$

$$= 24.236,32 - 19.470,02$$

$$= 4.766,30$$

ANOVA

SK	db	JK	KT	Fhitung	F5%	F1%
Perlakuan	3	19470.02	6490.01	16.34	3.49	5.95
Acak	12	4766.30	397.1914	Ket : **		
Total	15	24236.32				

Kesimpulan F hitung > dari F1% artinya berbeda sangat nyata

Sehingga perlu dilakukan uji lanjut atau BNT (Beda Nyata Terkecil)

Perhitungan uji BNT :

- $$SED = \sqrt{\frac{2 \cdot KT_{acak}}{\mu}}$$

$$= \sqrt{\frac{2 \times 397,192}{4}}$$

$$= 14,092$$



- $BNT\ 5\% = t\ tabel\ 5\% \times SED$
 $= 2,179 \times 14,092$
 $= 30,707$

- $BNT\ 1\% = t\ tabel\ 1\% \times SED$
 $= 3,055 \times 14,092$
 $= 43,051$

Uji BNT

Perlakuan	Rerata	29.28	96.87	98.21	123.23	Notasi
K	29.28	0	0	0	0	a
A	96.87	67.59**	0	0	0	b
B	98.21	68.94**	1.34 ^{ns}	0	0	b
C	123.23	93.95**	26.36 ^{ns}	25.01 ^{ns}	0	b

Kesimpulan : Urutan Perlakuan Terbaik yaitu C = B = A → K

Tabel polinomial orthogonal

Perlakuan	Data	Pembanding		
		linier	kuadrat	kubik
0 ml	117.11	-3	1	-1
2 ml	387.482	-1	-1	3
4 ml	392.855	1	-1	-3
6 ml	492.913	3	1	1
Q= $\sum C_i x T_i$		1,132.78	(170.31)	359.68
Kr= $(\sum C_i^2) x r$		80	16	80
JK= Q^2 / Kr		16039.938	1812.929	1617.157
JK reg total				19470.024

SK	db	JK	KT	F hit	F5%	F1%
Perlakuan	3	19470.02				
Liner	1	16039.94	16039.94	37.02**	4.84	9.65
Kuadrat	1	1812.93	1812.93	4.18 ^{ns}	4.84	9.65
Kubik	1	1617.16	1617.16	3.73 ^{ns}	4.84	9.65
Acak	11	4766.30	433.30			
Total	14					

Karena hanya regresi linier yang berbeda nyata, maka dihitung R2 regresi tersebut

$$R^2\ Linier = JK\ Linier / (JK\ Linier + JK\ Acak)$$

$$= 16.039,94 / (16.039,94 + 4.766,30)$$

$$= 0,662$$



Mencari persamaan regresi linier

x	y	xy	x ²
0	46.43	0	0
0	22.62	0	0
0	19.12	0	0
0	28.94	0	0
2	138.01	276.02	4
2	59.01	118.01	4
2	90.30	180.59	4
2	100.17	200.34	4
4	112.72	450.89	16
4	92.16	368.64	16
4	98.64	394.57	16
4	89.33	357.32	16
6	121.13	726.75	36
6	100.68	604.07	36
6	136.28	817.70	36
6	134.83	808.96	36
48	1,390.36	5303.862	224
3	86.90		

$$b_1 = (\sum xy - (\sum x \sum y / n)) / (\sum x^2 - ((\sum x)^2 / n)) = 14.159775$$

$$b_0 = \text{rerata } y - (b_1 \cdot \text{rerata } x) = 44.418175$$

$$\text{Persamaan linier } y = b_0 + b_1x \quad y = 141.60 + 444.18x$$

x	y
0	141.6
2	1029.96
4	1918.32
6	2806.68

Lampiran 4. Analisa Hormon Testosteron Setelah Pemberian Urin

Perlakuan	Ulangan				Total	Rata-rata	St. Dev
	1	2	3	4			
Kontrol	0.154	0.009	0.176	0.356	0.695	0.174	0.142
1 ml	0.096	0.339	0.077	0.153	0.665	0.166	0.120
2 ml	0.066	0.374	0.066	0.061	0.567	0.142	0.155
3 ml	0.393	0.112	0.082	0.04	0.627	0.157	0.160
Total					2.554		

Perhitungan

- $$FK = G^2/n$$

$$= 2,544^2/4 \times 4$$

$$= 0,40768$$
- $$JK_{total} = (k_1)^2 + (a_1)^2 + \dots + (c_4)^2 - FK$$

$$= (0,154)^2 + (0,096)^2 + \dots + (0,040)^2 - 0,40768$$

$$= 0,25493$$
- $$JK_{perlakuan} = (\Sigma A)^2 + (\Sigma B)^2 + (\Sigma C) + (\Sigma D)^2/4 - FK$$

$$= ((0,695)^2 + (0,665)^2 + (0,576)^2 + (0,591)^2) / 4 - 0,40768$$

$$= 0,00228$$
- $$JK_{acak} = JK_{total} - JK_{perlakuan}$$

$$= 0,25493 - 0,00228$$

$$= 0,25264$$

ANOVA

SK	db	JK	KT	Fhitung	F5%	F1%
Perlakuan	3	0.00228	0.00076	0.03617	3.49	5.95
Acak	12	0.25264	0.02105	Ket : ns		
Total	15	0.25493				

Kesimpulan F hitung < dari F1% artinya tidak berbeda nyata

Sehingga tidak perlu dilakukan uji lanjut atau BNT (Beda Nyata Terkecil)

Lampiran 5. Analisa Hormon Testosteron Setelah Pemberian Sperma

Perlakuan	Ulangan				Total	Rata-rata	St. Dev
	1	2	3	4			
Kontrol	0.065	0.018	0.104	0.199	0.386	0.097	0.076848
2 ml	0.197	0.045	0.058	0.105	0.405	0.101	0.06884
4 ml	0.245	0.2	0.118	0.034	0.597	0.149	0.0931
6 ml	0.276	0.104	0.114	0.2	0.694	0.174	0.080786
	Total				2.082		

Perhitungan

- $FK = G^2/n$
 $= 2,082^2/4 \times 4$
 $= 0,27092$
- $JK_{total} = (k_1)^2 + (a_1)^2 + \dots + (c_4)^2 - FK$
 $= (0,065)^2 + (0,018)^2 + \dots + (0,200)^2 - 0,27092$
 $= 0,09436$
- $JK_{perlakuan} = (\Sigma A)^2 + (\Sigma B)^2 + (\Sigma C) + (\Sigma D)^2/4 - FK$
 $= ((0,386)^2 + (0,405)^2 + (0,597)^2 + (0,694)^2) / 4 - 0,27092$
 $= 0,01685$
- $JK_{acak} = JK_{total} - JK_{perlakuan}$
 $= 0,09436 - 0,01685$
 $= 0,07752$

ANOVA

SK	db	JK	KT	Fhitung	F5%	F1%
Perlakuan	3	0.01685	0.00562	0.87	3.49	5.95
Acak	12	0.07752	0.00646	Ket : ns		
Total	15	0.09436				

Kesimpulan F hitung < dari F1% artinya tidak berbeda nyata
 Sehingga tidak perlu dilakukan uji lanjut atau BNT (Beda Nyata Terkecil)

Foto kegiatan penelitian

