

Morfologi, fisiologi, preservasi sel sperma ikan betok, *Anabas testudineus* Bloch 1792 dan ketahanannya terhadap kejut listrik

[Morphology, physiology, preservation of climbing perch *Anabas testudineus* Bloch 1792 sperm and the endurance to electric shock]

Fajar Maulana¹, Alimuddin², M. Zairin Junior²

¹Program Studi Ilmu Akuakultur, SPs IPB
Jln. Agatis Kampus IPB Dramaga Bogor 16680

²Departemen Budi Daya Perairan, FPIK-IPB
Jln. Agatis Kampus IPB Dramaga Bogor 16680

Diterima: 6 Juli 2014; Disetujui: 30 September 2014

Abstrak

Kualitas sperma yang baik dan dalam keadaan tak aktif selama proses elektroporasi sangat menentukan keberhasilan transgenesis. Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi karakter morfologis dan fisiologis sel sperma, serta mengevaluasi efek voltase dan jumlah kejut listrik berbeda terhadap motilitas dan viabilitas sperma ikan betok. Pengamatan karakter morfologi dilakukan pada mikroskop dengan pembesaran 400x, karakter fisiologi dengan berbagai parameter yakni tingkat osmolaritas, volume, pH, kepadatan dan total sperma. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sperma ikan betok terdiri atas tiga bagian, yakni kepala yang berbentuk oval, bagian tengah, dan ekor sperma. Viabilitas sperma ikan betok dalam air adalah selama 116 ± 34 detik. Induksi ovaprim dapat meningkatkan volume sperma, pH, kepadatan dan total sperma ($p < 0,05$). Tingkat osmolaritas tubuh dan testis ikan betok ($390-405 \text{ mOsmol kg}^{-1}$). Penyimpanan sperma yang diencerkan dengan larutan NaCl 1,3% hanya dapat bertahan maksimum selama 60 menit pada suhu ruang (26°C) dan suhu dingin (4°C), sedangkan tanpa pengenceran dapat bertahan selama 360 menit. Derajat pematangan dan kelangsungan hidup larva hingga 10 hari pascatetas menggunakan sperma dari testes cacah sama dengan pemijahan semi alami. Elektroporasi sperma ikan betok dengan pengencer larutan NaCl 1,3% berhasil dilakukan menggunakan lama kejut 0,5 milidetik, dan jeda antar kejut 0,1 detik. Peningkatan voltase dan jumlah kejut yang diberikan saling berinteraksi menurunkan motilitas dan viabilitas sperma ($p < 0,05$). Metode kejut listrik tersebut berpotensi digunakan untuk menghasilkan ikan betok transgenik dengan metode elektroporasi.

Kata penting: elektroporasi, fisiologis, ikan betok, morfologi, sperma

Abstract

Good sperm quality and inactive condition during the electroporation process determines the success of transgenesis. The study aims to observe the morphology and physiology of sperm, and evaluate the effects of different voltage and number of electric shocks on motility and viability of climbing perch sperm. Observation of morphological characters by microscope with a magnification of 400X, physiological character with various parameters, such as the level of osmolarity, volume, pH, density and total of sperm. The climbing perch sperm consisted of three parts, namely the ovoid head, middle, and tail. Sperm viability in the water was 116 ± 34 seconds. Sperm quantity, volume of semen, pH, and sperm density were increased after ovaprim injection ($p < 0.05$). Osmolarity levels of body and testes of climbing perch ranged at $390-405 \text{ mOsmol kg}^{-1}$. Sperm diluted in 13 g L^{-1} NaCl solution could be kept for a maximum of 60 minutes at room temperature (26°C) and cold temperature (4°C), while without NaCl solution could be 360 minutes. Fertilization and hatching rates of eggs fertilized by sperm from the minced testes, and larval survival up to 10 days post-hatching were similar with semi-natural spawning. Electroporation of climbing perch sperm diluted in 13 g/L NaCl solution was successfully performed using a program with a long shock of 0.5 milliseconds and the interval shock of 0.1 seconds. Increasing the voltage and number of shock decreased motility and viability of sperm ($p < 0.05$). Those electric shock parameters can potentially be used to generate climbing perch transgenic by electroporation method.

Keywords: electroporation, physiology, climbing perch, morphology, sperm

Pendahuluan

Ikan betok (*Anabas testudineus* Bloch 1924) merupakan ikan asli perairan Indonesia yang memiliki potensi untuk dikembangkan.

Ikan ini termasuk ke dalam jenis ikan ekonomis tinggi di daerah Kalimantan, khususnya Kalimantan Selatan dan Kalimantan Tengah.

Dalam rangka pemenuhan permintaan dari produksi budi daya ikan betok, metode pembenihannya telah berhasil dikembangkan (Widodo

✉ Penulis korespondensi
Alamat surel: maulanafajarbdpipb@gmail.com

et al. 2007). Namun demikian, kendala berikutnya yang perlu dipecahkan adalah pertumbuhan ikan betok relatif lambat. Berbagai metode dapat diterapkan untuk menghasilkan induk dan benih dengan pertumbuhan lebih cepat, di antaranya transgenesis. Prasyarat transgenesis adalah penguasaan metode pemijahan buatan yang terkontrol, teknik preservasi sperma yang baik, serta pengetahuan terkait sel gamet ikan uji.

Transgenesis memiliki kelebihan dibandingkan dengan metode lainnya, di antaranya adalah waktu yang diperlukan untuk mencapai efek perbaikan genetik yang diinginkan adalah lebih cepat (Yaskowiak *et al.* 2006), dan tingkat perbaikan kualitas genetik lebih tinggi daripada metode pemuliaan lainnya. Telur ikan betok relatif kecil sehingga metode mikroinjeksi agak sulit diterapkan. Alternatifnya adalah metode elektroporasi pada sperma, kemudian sperma tersebut digunakan untuk membuahi telur (Inoue *et al.* 1990 dan Lu *et al.* 2002). Faktor utama penentu keberhasilan transgenesis ke sel sperma adalah keberhasilan mempertahankan sperma dalam keadaan tak aktif, dan mampu membuahi telur. Sperma ikan betok dapat dikeluarkan dari tubuh induk jantan melalui pengaliran (*stripping*), tetapi dalam praktiknya sperma yang dikeluarkan pada proses pengaliran telah aktif dikarenakan keluarnya cairan urin bersamaan dengan sperma. Penggunaan larutan fisiologis yang sesuai akan mendukung keberhasilan transgenesis pada ikan betok. Oleh karena itu, kesesuaian antara larutan bufer DNA dan larutan fisiologis ikan merupakan suatu parameter yang harus diketahui terlebih dahulu sebelum melakukan elektroporasi.

Motilitas sperma pascaeletroporasi dipengaruhi oleh kuat medan listrik, panjang kejutan, jumlah kejutan, dan kekuatan ionik bufer (Symonds *et al.* 1994). Berdasarkan penelitian Cheng *et al.* (2002), motilitas sperma ikan ayu

(*Plecoglossus altivelis*) menurun hingga 50% pada 120 detik setelah diberi kejutan dengan voltase 9 kV. Symonds *et al.* (1994) juga mengemukakan bahwa aktivitas sperma ikan *chinook salmon* (*Oncorhynchus tshawytscha*) menurun dari 82% menjadi 2% setelah sperma dielektroporasi dengan voltase yang meningkat dimulai dari 625 V cm⁻¹ sampai 1000 V cm⁻¹. Dengan demikian voltase yang sesuai untuk sperma ikan yang akan dibuat menjadi transgenik perlu diketahui agar pembuahan dan persentase ikan transgenik yang dihasilkan menjadi tinggi. Dalam rangka pembuatan ikan betok transgenik, pada penelitian ini dilakukan eksplorasi karakter morfologis dan fisiologis sel sperma ikan betok, serta penentuan parameter elektroporasi yang mendukung motilitas, viabilitas, dan fertilitas sperma pada telur.

Bahan dan metode

Pengamatan morfologis sperma

Parameter morfologi sperma yang diukur meliputi panjang dan lebar kepala, panjang bagian tengah dan ekor sperma. Sampel sperma dikoleksi dari empat ekor ikan betok jantan (panjang 10±2 cm; bobot tubuh 20±5 gram). Sperma dikoleksi dengan cara melakukan pengaliran pada bagian perut ikan, kemudian sperma diencerkan menggunakan larutan eosin 0,2% sebanyak 10 kali pengenceran. Parameter morfologis diukur dengan bantuan mikroskop Olympus CX31 tersambung dengan kamera Sony (*Color Video Camera*), dan komputer yang dilengkapi dengan perangkat lunak OptiLab *image raster* versi 1.3.2. Pengamatan dilakukan pada pembesaran 400 dan 1000 kali.

Pengukuran osmolaritas

Pengukuran tingkat osmolaritas tubuh ikan betok dilakukan pada bagian tubuh ikan total dan gonad dengan cara: ikan uji yang diguna-

kan dicacah sampai halus, lalu diambil hasil cacahan sebanyak 1 gram kemudian dicampur dengan larutan Na-sitrat (3,8%) sebanyak 3 ml (Marlina 2011). Campuran tersebut diambil sebanyak 1,5 ml, dimasukkan ke dalam tabung mikro, dan disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 6000 rpm. Supernatan yang terbentuk diambil sebanyak 1 ml, diencerkan dengan akuabides sebanyak 15 ml, lalu nilai osmolaritas hasil pengenceran diukur menggunakan *Osmometer* tipe Osmotat 030, Gonotec (Germany). Nilai osmolaritas tubuh dan gonad dihitung menggunakan rumus:

$$V1 \times N1 = V2 \times N2$$

Keterangan: V1= volume larutan daging dengan Natrium Sitrat 3,8% (ml), N1= konsentrasi cairan tubuh ikan yang dinyatakan dalam DHL (mS cm^{-1}), V2= volume larutan campuran supernatant dengan akuabides (ml), N2= konsentrasi cairan tubuh/gonad ikan serta pelarut antikoagulan dan akuabides yang dinyatakan dalam Osmolaritas (mOsmol kg^{-1}).

Pengukuran volume dan pH semen, spermatokrit, dan jumlah sperma

Sperma dikoleksi dengan pengalinan induk jantan, dikumpulkan di dalam tabung mikro berukuran 200 μL . Volume semen diukur menggunakan pipet mikro. Penentuan volume semen pada ikan betok tanpa perlakuan penyuntikan hormon *ovaprim* dilakukan secara kumulatif dengan mengumpulkan cairan sperma dari 3-4 ekor ikan dengan total 16 ekor, sedangkan pada ikan yang telah diinjeksi hormon dilakukan untuk setiap ekor ikan uji lainnya sebanyak 16 ekor. Metode pengukuran spermatokrit dan kepadatan sperma merujuk pada metode Tvedt (2001). Pengukuran nilai pH cairan sperma, dilakukan menggunakan kertas uji pH (Darmstadt, Germany). Sebanyak 10 μL cairan sperma hasil koleksi dipaparkan ke atas kertas pH tersebut, selanjutnya kertas pH disandingkan pada gambar pH indikator.

Penentuan larutan fisiologis, lama waktu dan suhu penyimpanan

Penentuan larutan fisiologis (NaCl) yang sesuai untuk sperma ikan betok dilakukan dengan mengamati motilitasnya. Konsentrasi larutan NaCl, lama waktu dan suhu penyimpanan yang diuji disajikan pada Tabel 1. Perangsangan spermiasi ikan jantan yang telah matang gonad dilakukan menggunakan *ovaprim* (Ovaprim, Syntex USA) dengan dosis $0,5 \text{ ml kg}^{-1}$ bobot ikan pada bagian intramuskuler (Widodo *et al.* 2007). Tindakan ini dilakukan dengan tujuan penyeragaman pematangan sel gamet ikan. Proses induksi dilakukan 10-12 jam sebelum ikan dibedah untuk koleksi sel gamet. Gamet dibagi ke masing-masing tabung mikro dan ditambahkan larutan fisiologis. Setelah 3 hingga 5 detik, dilakukan pengujian tingkat motilitas sperma di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali. Guna memastikan bahwa sperma belum aktif, maka sperma dicampur dengan air untuk mengaktifkannya. Penilaian motilitas sperma didasarkan pada banyaknya sperma yang aktif bergerak maju (progresif) dengan penilaian mengikuti metode Guest *et al.* (1976).

Pengujian pemijahan ikan betok dengan metode berbeda

Pemijahan ikan betok dilakukan menggunakan tiga metode berbeda, yaitu pemijahan semi-alami, pemijahan buatan dengan pengalinan induk, dan metode pemijahan buatan menggunakan sperma hasil preservasi. Setiap metode pemijahan tersebut dicobakan menggunakan tiga set induk ikan betok. Satu set adalah 1 ekor betina : 3 ekor jantan.

Sebanyak 500 butir embrio hasil pemijahan ikan betok pada masing-masing metode dikoleksi, dan ditempatkan pada wadah plastik bervolume 0,5 L. Pengamatan derajat pembuahan

Tabel 1. Perlakuan dalam pengujian fisiologis sel sperma ikan betok

Konsentrasi larutan fisiologis (NaCl, %)	Lama penyimpanan (menit)	Suhu penyimpanan
0; 0,9; 1,0; 1,1; dan 1,2	0, 3, 5, 10, 15, 30, 60, 120, 180, 360, 720, dan 1440	Suhu kamar (26 °C), suhu dingin (4 °C)

dilakukan setelah 12 jam pascapembuahan. Pengamatan derajat penetasan dilakukan setelah 30 jam pascapembuahan. Larva yang berhasil menetas kemudian dipindahkan ke dalam akuarium berisi air 10 L, dan dipelihara selama 10 hari. Derajat kelangsungan hidup dihitung pada hari terakhir pemeliharaan.

Evaluasi viabilitas sel sperma pascakejut listrik

Pemberian kejut listrik terhadap sel sperma ikan betok dilakukan dalam dua tahap. Tahap pertama adalah penentuan batas voltase maksimum yang diberikan pada sperma, dan tahap kedua adalah penentuan jumlah kejut listrik yang optimal. Kejut listrik dilakukan menggunakan elektroporator *Gene Pulser II* (Biorad, USA) dengan tipe kejut *square wave*. Tipe kejut *square wave* diketahui memberikan efek lebih baik dan lebih efisien bila dibandingkan dengan tipe *exponential*; tingkat efektivitas transfernya mencapai 3-10 kali lebih tinggi dibandingkan dengan tipe *exponential* (Takahashi *et al.* 1991). Program pengujian kejut listrik disajikan pada Tabel 2.

Viabilitas sperma hasil elektroporasi diamati dengan metode pewarnaan *eosin* 0,2% (Hafez 1987). Satu tetes sperma diteteskan dengan menggunakan mikropipet di atas gelas obyek dan ditambahkan pewarna *eosin* 0,2% dengan perbandingan 1:1, kemudian kedua larutan tersebut dicampurkan secara merata. Penilaian

viabilitas sperma didasarkan pada perbedaan kriteria kepala sperma yang bewarna transparan dan aktif bergerak (hidup), sedangkan sperma yang mati akan bewarna merah muda buram dan tidak bergerak serta mengembang.

Parameter uji dan analisis statistik

Parameter yang diamati meliputi panjang kepala, lebar kepala, panjang bagian tengah, panjang ekor, panjang total sperma, pH cairan sperma, motilitas sperma (MS), viabilitas sperma (VS), derajat pembuahan (DP), derajat penetasan (DT), dan tingkat kelangsungan hidup larva (Khl). Data dianalisis menggunakan statistik non-parametrik dengan membandingkan nilai rata-rata pada parameter morfologi sperma, MR, dan nilai osmolaritas tubuh ikan diolah dengan bantuan program Microsoft Excel 2013. Parameter volume sperma, spermatokrit, kepadatan sperma, jumlah total sperma, DP, DT, Khl, dan VS hasil elektroporasi dianalisis menggunakan analisis sidik ragam (ANOVA), dan jika terdapat pengaruh nyata dilanjutkan dengan uji Duncan dengan bantuan program SPSS versi 17.0.

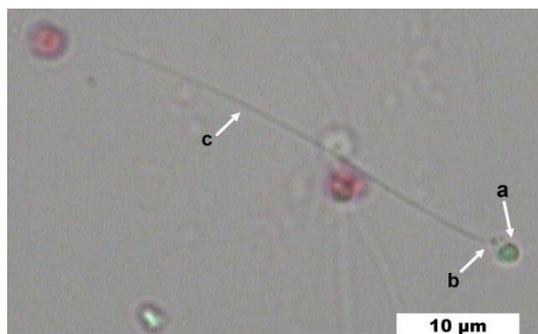
Hasil

Morfologi dan durasi viabilitas sperma

Sperma ikan betok terdiri atas tiga bagian utama, yaitu kepala berbentuk oval, bagian tengah, dan bagian ekor (Gambar 1). Panjang total,

Tabel 2. Program pengujian kejut listrik terhadap sperma ikan betok

Voltase Kejut (V)	Jumlah kejut	Lama kejut (milidetik)	Jeda waktu kejut (detik)
0	1, 3, dan 5	0,5	0,1
50	1, 3, dan 5	0,5	0,1
125	1, 3, dan 5	0,5	0,1
250	1, 3, dan 5	0,5	0,1
500	1, 3, dan 5	0,5	0,1



Gambar 1. Sperma ikan betok (a. kepala sperma, b. bagian tengah, c. ekor sperma)

panjang kepala, panjang bagian tengah, dan panjang ekor sperma berturut-turut $35,54 \pm 4,66$; $1,83 \pm 0,20$; $0,93 \pm 0,23$; $33,05 \pm 1,40$ μm . Lebar kepala sebesar $1,48 \pm 0,21$ μm . Total estimasi durasi pergerakan sperma adalah 116 ± 34 detik.

Efek induksi hormon

Penyuntikan induk jantan ikan betok dengan hormon *ovaprim* memberikan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) pada semua parameter uji (Tabel 3). Pada ukuran induk yang sama, induksi *ovaprim* meningkatkan volume semen ikan sekitar 11 kali lipat, dan kepadatan sperma sekitar 58% daripada yang tidak diinduksi.

Larutan fisiologis NaCl untuk ikan betok

Konsentrasi dan motilitas sperma sebelum dan pascapengaktifan ditunjukkan pada Tabel 4. Konsentrasi NaCl 1,3% adalah yang terbaik sebagai media pelarut dalam proses penyimpanan sperma, sedangkan konsentrasi NaCl yang lebih

rendah menyebabkan sperma aktif bergerak. Oleh karena itu dapat dikatakan bahwa larutan NaCl 1,3% yang digunakan bersifat isotonis terhadap cairan sperma ikan betok. Osmolaritas larutan NaCl 1,3% adalah $407 \text{ mOsmol kg}^{-1}$. Nilai tersebut relatif sama dengan osmolaritas tubuh ikan betok, berkisar $390\text{--}405 \text{ mOsmol kg}^{-1}$. Nilai osmolaritas gonad relatif sama dengan osmolaritas tubuh, sebesar $390 \text{ mOsmol kg}^{-1}$.

Motilitas sperma pascasimpan pada suhu ruang dan suhu dingin

Seperti ditunjukkan pada Tabel 5, preservasi sperma menggunakan NaCl 1,3% dapat mempertahankan kualitas sperma pada kondisi maksimal (skala 5) dalam waktu 60 menit, baik pada suhu dingin maupun suhu ruang. Penyimpanan pada suhu dingin mengakibatkan penurunan kualitas sperma yang lebih cepat bila dibandingkan dengan suhu ruang, sedangkan sperma yang disimpan tanpa pengencer dapat bertahan hingga 360 menit pascakoleksi.

Derajat pembuahan, derajat penetasan, dan kelangsungan hidup larva

Derajat pembuahan, derajat penetasan, dan kelangsungan hidup larva ikan betok disajikan pada Gambar 2. Derajat pembuahan telur menggunakan sperma dari testis cacah untuk pemijahan buatan adalah sama dengan pemijahan semi alami ($p > 0,05$), sedangkan yang menggunakan sperma dari pengaliran lebih rendah. Daya t

Tabel 3. Bobot induk dan karakteristik fisiologis cairan sperma ikan betok jantan

Parameter	Non-induksi	Induksi hormonal
Bobot induk (gram)	$19,76 \pm 7,06^a$	$20,00 \pm 6,66^a$
Volume semen (μL)	$9,33 \pm 2,21^b$	$102,78 \pm 22,78^a$
pH sperma	7-8 ^a	9-10 ^b
Spermatokrit (%)	$53,42 \pm 12,17^a$	$46,45 \pm 11,84^b$
Kepadatan sperma ($\times 10^9 \text{ mL}^{-1}$)	$16,95 \pm 9,71^b$	$26,78 \pm 9,91^a$

Keterangan: Induksi hormonal menggunakan *ovaprim* $0,5 \text{ mL kg}^{-1}$ induk. Huruf tika atas berbeda pada lajur yang sama menunjukkan nilai yang berbeda nyata ($p < 0,05$).

Tabel 4. Konsentrasi larutan NaCl dan motilitas sperma sebelum dan pascapengaktifan dengan air

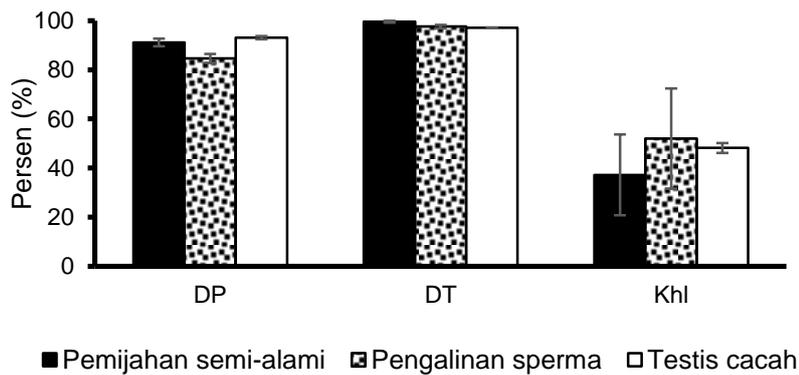
Konsentrasi larutan NaCl (%)	Motilitas sebelum pengaktifan	Kondisi osmotik	Motilitas pascapengaktifan
-	0 (Tidak aktif)	-	5 (Aktif bergerak)
0	5 (Aktif bergerak)	Hipo-osmotik	5 (Aktif bergerak)
0,9	3 (Banyak bergerak)	Hipo-osmotik	5 (Aktif bergerak)
1,0	3 (Banyak bergerak)	Hipo-osmotik	5 (Aktif bergerak)
1,1	1 (Bergetar sedikit)	Hipo-osmotik	5 (Aktif bergerak)
1,2	1 (Bergetar sedikit)	Hipo-osmotik	5 (Aktif bergerak)
1,3	0 (Diam)	Iso-osmotik	5 (Aktif bergerak)
1,4	0 (Diam)	Hiper-osmotik	4 (Banyak bergerak)
1,5	0 (Diam)	Hiper-osmotik	3 (Banyak bergerak)

Keterangan: Motilitas sebelum pengaktifan menunjukkan aktivitas sperma pascacampur larutan NaCl; Motilitas pascapengaktifan menunjukkan motilitas sperma pascacampur dengan air. Penilaian berdasarkan Guest *et al.* (1976).

Tabel 5. Motilitas sperma pascasimpan pada suhu ruang dan suhu dingin, dengan pengencer larutan NaCl 1,3%

Penyimpanan	Waktu (menit)													
	0	3	5	10	15	30	45	60	120	150	180	240	360	720
Suhu ruang 26 °C	5	5	5	5	5	5	5	5	4	1	0,5	0,5	0,5	0
Suhu 4 °C	5	5	5	5	5	5	5	5	4	3	1	0,5	0	0
Kontrol	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	0

Keterangan: Kontrol merupakan sperma tanpa pengenceran yang ditempatkan pada suhu ruang 26°C.



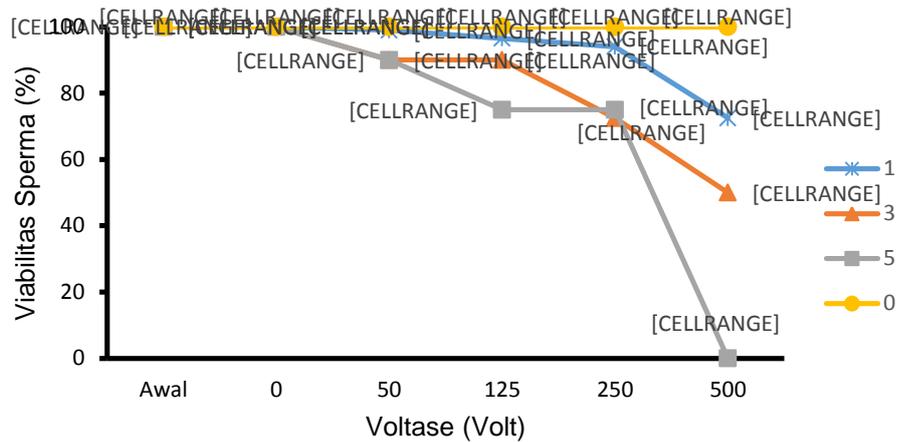
Gambar 2. Derajat pembuahan (DP), derajat penetasan (DT), dan kelangsungan hidup larva pada 10 hari pascatetas (Khl) ikan betok menggunakan berbagai sperma dengan cara koleksi berbeda.

etas telur dan kelangsungan hidup larva hingga 10 hari pascatetas adalah sama pada semua perlakuan.

Viabilitas sperma pascakejut listrik

Viabilitas sperma ikan betok pascakejut listrik disajikan pada Gambar 3. Hasil penelitian menunjukkan bahwa viabilitas sperma menurun

sering dengan meningkatnya voltase dan jumlah kejut listrik yang diberikan. Selain itu, terdapat interaksi antara faktor voltase dan jumlah kejut terhadap viabilitas sperm, semakin tinggi voltase dan jumlah kejut maka semakin rendah tingkat viabilitas sperm ($p < 0,05$). Viabilitas sperm perlakuan 50 volt dan jumlah kejut 1 kali adalah sama dengan kontrol.



Gambar 3. Viabilitas sperma ikan betok setelah diberi kejutan listrik dengan voltase dan jumlah kejutan berbeda. Angka 1, 3, dan 5 menunjukkan jumlah kejutan listrik yang diberikan, kontrol merupakan sperma tanpa kejutan listrik.

Pembahasan

Morfologi dan fisiologi

Pada penelitian ini diketahui bahwa morfologi sperma ikan betok sama halnya dengan sperma ikan pada umumnya, yakni terdiri atas kepala, bagian tengah, dan ekor (Mattei 1991), tetapi berbeda bila dibandingkan dengan kerabatnya pada subordo Anabantoidei yaitu ikan gurami (*Osphronemus gouramy*) yang hanya memiliki kepala dan ekor sperma (Hardita 2010). Kepala sperma ikan betok berbentuk oval (Gambar 2), hal ini berbeda serta berukuran lebih kecil dibandingkan dengan sperma ikan gurami yang berbentuk bulat berdiameter $4,8 \pm 1,53 \mu\text{m}$ (Hardita 2010). Ukuran dan bentuk kepala sperma ikan betok mirip dengan sperma ikan *European perch* (*Perca fluviatilis*) yang berukuran panjang kepala $1,87 \mu\text{m}$ dan lebar kepala $1,78 \mu\text{m}$ (Lahnsteiner & Patzner 1995), ikan *Barbus barbuda* (Teleostei: Cyprinidae) berukuran panjang kepala sperma $1,80 \pm 0,06 \mu\text{m}$ (Alavi *et al.* 2008), ikan *Atlantic halibut* (*Hippoglossus hippoglossus*) dengan panjang kepala $1,43 \pm 0,01 \mu\text{m}$ dan lebar kepala $1,55 \pm 0,01 \mu\text{m}$ (Alavi *et al.* 2011).

Panjang bagian tengah ($0,93 \pm 0,23 \mu\text{m}$) dan ekor ($33,05 \pm 1,40 \mu\text{m}$) sperma ikan betok mendekati ukuran panjang bagian tengah ikan

European perch sebesar $0,87 \mu\text{m}$ dan panjang ekor $30-35 \mu\text{m}$. Ukuran panjang total sperma ikan *European perch* sebesar $30,4-32,4 \mu\text{m}$ (Lahnsteiner & Patzner 1995) juga hampir sama dengan panjang total sperma ikan betok ($35,54 \pm 4,66 \mu\text{m}$). Ukuran panjang bagian tengah dan ekor sperma ikan betok juga mendekati ukuran sperma ikan *Northern pike* (*Esox lucius*) yang berukuran berturut-turut $1,04 \pm 0,32 \mu\text{m}$ dan $30,12 \pm 4,08 \mu\text{m}$ (Alavi *et al.* 2009). Panjang ekor sperma ikan betok lebih pendek daripada ikan gurami ($42,8 \pm 5,60 \mu\text{m}$).

Bagian tengah dan bagian ekor sperma merupakan bagian yang mengatur kecepatan dan lama waktu pergerakan sperma. Total estimasi durasi pergerakan sperma ikan betok pada penelitian ini adalah selama 116 ± 34 detik, lebih lama daripada sperma ikan gurami ($103,67 \pm 2,52$ detik), dan sperma ikan *Northern pike* (90 detik). Perbedaan lama waktu pergerakan sperma diduga terkait dengan perbedaan jumlah mitokondria dan panjang ekor. Hal tersebut sejalan dengan pernyataan Baccetti *et al.* (1984) bahwa lama waktu pergerakan sperma dapat dikaitkan dengan panjang ekor serta jumlah mitokondria yang berada pada bagian tengah sperma. Jumlah mitokondria ikan ordo *Perciformes* dari jenis famili *Ana-*

bantoidei sebanyak dua buah (Mattei 1991). Dengan ukuran sperma yang hampir sama, sperma ikan betok dan ikan gurami memiliki lama waktu pergerakan yang lebih panjang bila dibandingkan dengan sperma ikan *Northern pike*. Jumlah mitokondria ikan *Northern pike* adalah satu buah (Alavi *et al.* 2009).

Volume cairan sperma ikan betok pada penelitian diketahui meningkat secara signifikan ($p < 0,05$) akibat induksi *ovaprim* yang diberikan. Hal yang sama telah dilaporkan oleh Kowalski *et al.* (2012) pada ikan *European smelt (Osmerus eperlanu)* bahwa volume semen dan kepadatan sel sperma meningkat sangat drastis pascainduksi *ovaprim*, yaitu sebesar 13 kali lipat. Penyuntikan induk ikan gurami menggunakan *ovaprim* dengan dosis $0,7 \text{ mL kg}^{-1}$ bobot induk juga terbukti meningkatkan volume sperma dari $0,013 \pm 0,01 \text{ mL kg}^{-1}$ menjadi $0,184 \pm 0,13 \text{ mL kg}^{-1}$ bobot tubuh, atau meningkat sebesar 14 kali lipat (Hardita 2010). Induksi *ovaprim* pada ikan mas yang dipelihara pada wadah terkontrol serta di alam bebas memberikan peningkatan sebesar 12 kali lipat dan 10 kali lipat terhadap perlakuan kontrol (Seifi *et al.* 2011). Peningkatan volume semen tersebut merupakan efek induksi spermiogenesis. Hal tersebut sejalan dengan pernyataan Nagahama (1994) bahwa hormon gonadotropin akan merangsang sintesis testosteron dan 11-ketotestosteron yang mengakibatkan spermatogenesis dan spermiogenesis. Selain itu, Sukumasavin (2007) mengemukakan bahwa $17\alpha\text{-}20\beta\text{-dihidroprogesteron}$ yang berasal dari rangsangan LH, menyebabkan sperma dihidrasi oleh larutan seminal yang menghasilkan larutan sperma yang disebut cairan semen, sehingga volume semen meningkat.

Peningkatan pH yang terjadi pada penelitian ini adalah sebesar 2 satuan. pH cairan sper-

ma ikan tanpa induksi sebesar 7-8, dan meningkat menjadi 9-10 pascainduksi. Peningkatan pH diduga terjadi akibat perubahan pengaturan hormon di dalam testis. Hasil yang sama juga dilaporkan oleh Alavi & Cosson (2005) bahwa pH sperma ikan salmon meningkat dari 7,5 menjadi 8,0 saat disalurkan dari testis menuju saluran sperma yang diakibatkan oleh pengaruh hormonal. Peningkatan pH yang signifikan ($p < 0,01$) juga terjadi pada ikan mas pascainduksi dengan *ovaprim* dan ekstrak pituitari (Seifi *et al.* 2011).

Induksi *ovaprim* pada induk ikan betok tidak mengubah nilai spermatokrit (Tabel 3). Hal yang sama juga ditemukan pada ikan gurami pascainduksi *ovaprim* (Hardita 2010) dan ikan *Atlantic halibut (Hippoglossus hippoglossus)* yang diberi perlakuan implantasi GnRH(a) Ova-plant (Tvedt *et al.* 2001). Nilai spermatokrit ikan gurami (6%) lebih rendah bila dibandingkan dengan nilai spermatokrit ikan betok. Hal yang sebaliknya terjadi pada ikan *Brycon amazonicus* yang menunjukkan penurunan nilai spermatokrit pascainduksi ekstrak pituitari ikan mas dan hormon sintesis (GnRH-a) (Pardo-Carrasco *et al.* 2006). Perbedaan tersebut diduga terkait dengan perbedaan respons ikan terhadap hormon yang diberikan.

Tingkat kepadatan dan jumlah total sperma ikan betok meningkat 1,6 dan 1,8 kali lipat dibandingkan dengan ikan tanpa induksi *ovaprim*. Peningkatan kepadatan dan jumlah total sperma juga terjadi pada ikan gurami akibat induksi *ovaprim* yang diberikan, yaitu sebesar 1,2 kali lipat (Hardita 2010). Hal serupa juga telah dilaporkan pada ikan *Greenback flounder (Rhombosolea tapirina)* (Lim *et al.* 2004), ikan *European sea bass (Dicentrarchus labrax)* (Schiaivone *et al.* 2006) dan ikan bawal air tawar *Colossoma macropomum* (Maria *et al.* 2010).

Larutan fisiologis ikan betok

Osmolaritas semen ikan betok lebih tinggi dibandingkan dengan osmolaritas ikan air tawar pada umumnya, seperti ikan mas koki *Carassius auratus* (317 ± 11 mOsmol kg^{-1}), ikan mas ($254 \pm 16,7$ mOsmol kg^{-1}) (Morisawa 1985), ikan *Tinca tinca* (230 ± 82 mOsmol kg^{-1}) (Psenicka *et al.* 2006), ikan *Northern pike* ($283,88 \pm 33,05$ mOsmol kg^{-1}) (Alavi *et al.* 2009), dan ikan mujair (*Oreochromis mossambicus*) yang diaklimatisasi pada air laut (351 mOsmol kg^{-1}) (Linhart *et al.* 1999). Nilai osmolaritas pada penelitian ini mendekati nilai osmolaritas ikan air laut seperti ikan *European sea bass* (400 mOsmol kg^{-1}), dan ikan *Atlantic cod* (*Gadus morhua*) (414 ± 30 mOsmol kg^{-1}) (Litvak & Trippel 1998). Tingkat osmolaritas tubuh dan gonad ikan betok yang tinggi diakibatkan oleh kandungan dan komposisi biokimiawi di dalam cairan sperma. Hal ini sejalan dengan Billard *et al.* (1995) dan Alavi *et al.* (2007). Secara umum komposisi ion-ion di dalam semen meliputi Na^+ , Ca^{2+} , K^+ , Cl^- dan lainnya, dengan tingkat osmolaritas sebesar 300 - 350 mOsmol kg^{-1} (Perez *et al.* 2003, Asturiano *et al.* 2004, dan Morisawa 2001, 2008).

Tingkat osmolaritas yang tepat untuk mempertahankan sperma ikan betok dalam keadaan diam seperti di dalam gonad adalah pada larutan fisiologis NaCl 1,3% atau setara pada tingkat osmolaritas 407 mOsmol/kg (Tabel 4). Tingkat osmolaritas tersebut mendekati tingkat osmolaritas tubuh dan gonad ikan betok, sehingga sperma terbukti dapat dipertahankan dalam keadaan diam atau tidak aktif. Hal ini seperti yang diungkapkan oleh Cosson (2004) bahwa sperma ikan pada umumnya bersifat tidak aktif atau diam saat berada di dalam testis dan cairan sperma pada banyak spesies. Penggunaan larutan fisiologis dengan konsentrasi NaCl lebih rendah dari 1,3% menyebabkan sperma masih aktif dan bergerak.

Hal ini menunjukkan bahwa larutan tersebut bersifat hipo-osmotik terhadap cairan sperma dan merangsang sperma untuk aktif dan bergerak.

Penggunaan larutan fisiologis dengan konsentrasi yang lebih tinggi, yaitu: 1,4 dan 1,5% bersifat hiper-osmotik dapat mempertahankan sperma dalam keadaan diam atau tidak aktif. Namun demikian, konsentrasi NaCl tersebut berdampak pada penurunan tingkat motilitas sperma ikan betok (Tabel 4). Hal ini dapat diakibatkan oleh rusaknya sperma ikan betok karena paparan sperma pada larutan NaCl yang melebihi tingkat osmolaritas tubuh. Dampaknya adalah sperma terangsang untuk mengembang atau terjadi pembengkakan, gangguan ini terjadi pada membran plasma diakibatkan oleh perubahan osmotik yang sangat tinggi. Tingkat osmolaritas pada kadar NaCl 1,4% (425 mOsmol kg^{-1}) dan 1,5% (445 mOsmol kg^{-1}) lebih tinggi daripada osmolaritas tubuh dan gonad ikan betok. Hal yang sama juga ditemukan pada sperma ikan air tawar lainnya. Sperma bergerak dalam waktu singkat atau bahkan mati saat terpapar larutan dengan osmolaritas melebihi 450 mOsmol kg^{-1} (Cosson 2004). Alasan lain adalah karena ion Na^+ dan Cl^- yang bersifat toksik pada sperma, sehingga berakibat pada sistem biologis sperma. Salinitas merupakan salah satu parameter kimia-awi air yang keberadaannya dapat bersifat mematikan jika nilainya berada di luar batas toleransi (*masking factor*) (Affandi & Tang 2002).

Penelitian ini menunjukkan bahwa penggunaan larutan fisiologis NaCl 1,3% sebagai pelarut proses preservasi sperma ikan betok berhasil mempertahankan sperma pada kualitas skor 5 (Guest *et al.* 1976) dengan maksimal selama waktu penyimpanan 60 menit, baik yang dilakukan pada suhu dingin 4°C maupun suhu ruang 26°C . Durasi penyimpanan sperma ikan betok yang singkat dapat diakibatkan oleh berbagai

faktor, di antaranya adalah ketidakcocokan media pelarut sebagai media penyimpanan sperma, yaitu terkait aspek pH dan tingkat osmolaritasnya (Bobe & Labbe 2010), perbandingan jumlah pelarut dan sperma, dan suhu inkubasi yang optimum. Berbeda dengan hasil pada penelitian ini, penyimpanan sperma dalam suhu dingin telah sukses dilakukan pada kebanyakan jenis ikan, bahkan sperma dapat disimpan selama 2-3 minggu menggunakan metode sederhana (Kang *et al.* 2004). Namun demikian, Labbe *et al.* (1997) menyatakan berapapun suhu penetasan embrio, penanganan sperma pada suhu 0-4°C lebih tepat digunakan untuk menurunkan laju metabolisme sel sperma, karena kebanyakan sperma ikan tidak terlalu sensitif terhadap suhu, sehingga tidak akan mengakibatkan kerusakan yang berbahaya. Sementara itu, penyimpanan sperma tanpa pelarut yang dilakukan pada penelitian ini dapat mempertahankan sperma ikan betok dengan kualitas yang sama pada suhu ruang hingga 360 menit. Hal ini sudah cukup lama untuk mendukung pemijahan buatan pada ikan betok.

Pengaruh metode pembuahan

Nilai DP telur pada perlakuan pangalinan sperma lebih rendah daripada perlakuan lainnya (Gambar 2). Nilai DP yang rendah tersebut diakibatkan oleh menurunnya kualitas sperma (tingkat motilitasnya) sebelum mencapai telur, sehingga jumlah telur yang berhasil dibuahi menjadi rendah. Motilitas yang menurun adalah akibat pengaktifan sperma oleh cairan urin yang keluar bersamaan dengan sperma, sehingga kemampuan jelajah dan waktu hidup sperma menurun. Hal ini sesuai dengan pernyataan Trippel (2003) bahwa kemampuan fertilisasi induk jantan terhadap telur sangat dipengaruhi oleh kualitas sperma.

Nilai kelangsungan hidup yang didapat dalam penelitian ini (37,21-51,96%) lebih tinggi

dibandingkan hasil penelitian Sembiring (2011) sebesar 28,47% pada umur pengamatan 13 hari. Tingkat kelangsungan hidup yang rendah pada penelitian ini dapat diakibatkan oleh faktor eksternal, yaitu ketersediaan pakan yang berkualitas bagi larva untuk perkembangan organ tubuh yang masih sederhana menuju kesempurnaan (Effendi 2004), dan kualitas air berupa suhu, salinitas, kandungan oksigen, pH, cahaya, kadar karbondioksida, dan amonia (Lagler *et al.* 1977).

Pengaruh kejutan listrik

Viabilitas sperma tertinggi didapat pada perlakuan kontrol, selanjutnya menurun dengan meningkatnya voltase dan jumlah kejutan, serta voltase dan jumlah kejutan yang diberikan saling berinteraksi menurunkan tingkat motilitas dan viabilitas sperma ($p < 0,05$). Hal tersebut serupa dengan pernyataan Sin *et al.* (2000) yang menyatakan bahwa motilitas sperma ikan merupakan ukuran kelangsungan hidup sperma akibat elektroporasi, semakin tinggi tegangan dan lama waktu paparan kejutan akan menurunkan motilitas sperma. Pada penelitian ini perlakuan voltase 50 volt dan jumlah kejutan satu kali tidak memberikan perbedaan yang signifikan terhadap perlakuan kontrol pada parameter motilitas dengan nilai skor 5 dan viabilitas sperma sebesar $99,00 \pm 0,00\%$.

Keberhasilan fertilisasi telur oleh sperma pascakejut sangat dipengaruhi oleh kemampuan motilitas sperma tersebut. Terdapat korelasi positif terkait kemampuan DNA asing masuk dan berintegrasi dengan inti sperma dengan kualitas semen dan tingkat motilitas sperma. Untuk itu diperlukan progresivitas sperma paling tidak 80% dan tidak boleh lebih kecil dari 65% (Lavi-trano *et al.* 2006). Selain itu sperma dalam kondisi motil akan lebih mampu mengikat DNA asing yang ditransfer hingga mencapai 30% dari

keseluruhan sperma (Sin *et al.* 2000). Dengan demikian, perlakuan voltase dan jumlah kejut yang didapat pada penelitian ini berpeluang untuk digunakan dalam memproduksi ikan betok transgenik. Setidaknya ada dua parameter penting yang harus optimal dalam teknik transgenesis melalui mediasi sperma agar lebih efisien, yaitu keberhasilan proses preservasi sperma, kualitas sperma yang baik serta keberhasilan proses pembuahan telur oleh sperma. Proses ini sangat dipengaruhi oleh viabilitas dan motilitas sperma yang tinggi.

Simpulan

Penelitian ini telah berhasil mengidentifikasi karakter morfologi dan fisiologi sperma ikan betok. Sperma ikan betok terdiri atas tiga bagian utama dengan ukuran panjang total, panjang kepala, panjang bagian tengah, dan panjang ekor adalah berturut-turut $35,54 \pm 4,66 \mu\text{m}$; $1,83 \pm 0,20 \mu\text{m}$; $0,93 \pm 0,23 \mu\text{m}$; dan $33,05 \pm 1,40 \mu\text{m}$, sedangkan lebar kepala sebesar $1,48 \pm 0,21 \mu\text{m}$. Lama gerak sperma dalam air adalah 116 ± 34 detik. Tingkat osmolaritas tubuh dan testis ikan betok berkisar antara 390-405 mOsmol kg^{-1} , setara dengan osmolaritas larutan NaCl 1,3% (407 mOsmol kg^{-1}). Larutan fisiologis NaCl 1,3% efektif dalam preservasi sperma jangka pendek (maks 60 menit) pada suhu ruang dan suhu dingin, sedangkan penyimpanan yang dilakukan tanpa pengenceran dapat bertahan selama 360 menit pada suhu ruang. Viabilitas dan motilitas sperma ikan betok sangat dipengaruhi oleh voltase, dan jumlah kejut listrik yang diberikan, kedua faktor saling berinteraksi. Voltase 50 volt dan jumlah kejut satu kali berpotensi digunakan sebagai metode kejut listrik terhadap sperma ikan betok untuk memperoleh ikan transgenik melalui metode elektroporasi.

Daftar pustaka

- Affandi R, Tang UM. 2002. *Fisiologi hewan air*. Unri Pers, Pekanbaru, Riau. 213 hlm.
- Alavi SMH, Butts IAE, Hatf A, Mommens M, Trippel EA, Litvak MK, Babiak I. 2011. Sperm morphology, ATP content, and analysis of motility in Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*. *Canadian Journal of Zoology*, 89(3):219-228.
- Alavi SMH, Cosson J. 2005. Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: A review. *Cell Biology International*, 29(2): 101-110.
- Alavi SMH, Linhart O, Coward K, Rodina M. 2007. Fish spermatology: implications for aquaculture management. In: Alavi SMH, Cosson JJ, Coward K, Rafiee G, (ed.). *Fish spermatology*. Alpha Science Ltd. Oxford. pp. 397-460.
- Alavi SMH, Psenicka M, Policar T, Linhart O. 2008. Morphology and fine structure of *Barbus barbus* Teleostei: Cyprinidae spermatozoa. *Journal of Applied Ichthyology*, 24(4):378-381.
- Alavi SMH, Rodina M, Viveiros ATM, Cosson J, Gela D, Boryshpolets S, Linhart O. 2009. Effects of osmolality on sperm morphology, motility and flagellar wave parameter in Northern pike *Esox lucius* L. *Theriogenology*, 72(1):32-43.
- Asturiano JF, Pérez L, Garzón DL, Marco-Jiménez F, Peñaranda DS, Vicente JS, Jover M. 2004. Physio-chemical characteristics of seminal plasma and development of media and methods for the cryopreservation of European eel sperm. *Fish Physiology and Biochemistry*, 30(3-4):283-293.
- Baccetti B, Burrini AG, Callaini G, Gibertini G, Mazzini M, Zerunian S. 1984. Fish germinal cells. I. Comparative spermatology of seven cyprinid species. *Gamete Research*, 10(4):373-396.
- Billard R, Cosson J, Crim LW, Suquet M. 1995. Sperm physiology and quality. In: Bromage NR, Roberts RJ, (ed.). *Brood stock management and egg and larval quality*. Blackwell Science, Amsterdam. pp. 25-52.
- Bobe J, Labbe C. 2008. Chilled storage of sperm and eggs. In: Cabrita E, Robles V, Herraez P (editors). *Methods in reproductive aquaculture: Marine and freshwater species*.

- CRC Press, Taylor and Francis Group, London (UK). pp. 219-235.
- Cheng CA, Lu KL, Lau EL, Yang TY, Lee CY, Wu JL, Chang CY. 2002. Growth promotion in ayu (*Plecoglossus altivelis*) by gene transfer of the rainbow trout growth hormone gene. *Zoological Studies*, 41(3):303-310.
- Cosson J. 2004. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. *Aquaculture International*, 12(1):69-85.
- Effendi I. 2004. *Pengantar akuakultur*. Penebar Swadaya, Jakarta. 192 hlm.
- Guest WC, Avault JW, Rousel JA. 1976. Spermatogeny study of chanel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Transactions of the American Fisheries Society*, 105(5):463-468.
- Hafez ESE. 1987. Semen evaluation. In Hafez ESE (Ed.). *Reproduction in farm animals*, Lea and Febiger. Philadelphia. pp. 287-297.
- Hardita AG. 2010. Evaluasi kualitas dan kuantitas sperma ikan gurame *Osphronemus gouramy* dengan penyuntikan ovaprim pada tingkatan dosis yang berbeda. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 56 hlm.
- Inoue K, Yamashita S, Hata J, Kabeno S, Asada S, Nagahisa E, Fujita T. 1990 Electroporation as a new technoloque for producing transgenic fish. *Cell Differentiation and Development*, 29(2):123-128.
- Kang KH, Shao MY, Kho KH, Zhag ZF. 2004. Short-term storage and cryopreservation of *Urechis unicinctus* (Echlua: Urechidae) sperm. *Aquaculture Research*, 35(13):1195-1201.
- Kowalski RK, Hliwa P, Cejko BI, Krol J, Stabinski R, Ciereszko A. 2012. Quality and quantity of smelt (*Osmerus eperlanus* L.) sperm in relation to time after hormonal stimulation. *Society for Biology of Reproduction*, 12(2): 231-246.
- Labbe C, Crowe LM, Crowe JH. 1997. Stability of the lipid component of trout sperm plasma membrane during freeze-thawing. *Cryobiology*, 34(2): 176-182.
- Lahnsteiner F, Patzner RA. 2007. Sperm morphology and ultrastructure in fish. In: Alavi SMH, Cosson J, Coward K, Rafiee G (Editors). *Fish spermatology*. Alpha Science International Ltd, Oxford. pp. 1-61.
- Lim HK, Pankhurst NW, Fitzgibbon QP. 2004. Effects of slow release gonadotropin releasing hormone analog on milt characteristics and plasma levels of gonadal steroids in greenback flounder *Rhombosolea tapirina*. *Aquaculture*, 240(1-4):505-516.
- Linhart O, Walford J, Sivaloganathan B, Lam TJ. 1998. Effects of osmolarity and ions on the motility of stripped and testicular sperm of freshwater- and sea-water-acclimated tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Fish Biology*, 55(6):1344-1358.
- Litvak MK, Trippel EA. 1998. Sperm motility patterns of Atlantic cod (*Gadus morhua*) in relation to salinity: effects of ovarian and egg presence. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 55(8):1871-1877.
- Lavitrano M, Marcho B, Maria GC, Roberto G, Stefano M, Alessia. 2006. Sperm mediated gene transfer. *Reproduction, fertility and development*, 18(1-2):19-23.
- Lu JK, Fu BH, Wu JL, Chen TT. 2002. Production of transgenic silver sea bream (*Sparus sarba*) by different gene transfer methods. *Marine Biotechnology*, 4(3):328-337.
- Maria AN, Azevedo HC, Santos JP, Carneiro PCF. 2012. *Hormonal induction and semen characteristics of tambaqui Colossoma macropomum*. *Zygote*, 20(1):39-43
- Marlina E. 2011. Optimasi osmolaritas media dan hubungannya dengan respons fisiologis benih ikan baung (*Hemibagrus nemurus*). *Tesis*. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 108 hlm.
- Mattei X. 1991. Spermatozoon ultrastructure and its systematic implication in fishes. *Canadian Journal of Zoology*, 69(12):3038-3055.
- Morisawa M. 1985. Initiation mechanism of sperm motility at spawning in teleosts. *Zoological Science*, 2:605-615.
- Morisawa M. 2008. Adaptation and strategy for fertilization in the sperm of teleost fish. *Journal of Applied Ichthyology*, 24(4):362-370.
- Morisawa S. 2001. Ultrastructural studies of late-stage spermatids and mature spermatozoa of the pufferfish, *Takifugu niphobles* (Tetraodontiformes) and the effects of osmolality on spermatozoan structure. *Tissue & Cell*, 33(1):78-85.
- Nagahama Y. 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *International Journal of Developmental Biology*, 38(2):217-229.
- Pardo-Carrasco SC, Zaniboni-Filho E, Arias-Castellanos J, Suarez-Mahecha H, Atencio-Garcia VJ, Cruz-Casallas PE. 2006. Evaluation of milt quality of the yamu *Brycon*

- amazonicus* under hormonal induction. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19(2):134-139.
- Pérez, L, Asturiano JF, Martínez S, Tomás A, Olivares L, Mocé E, Lavara R, Vicente JS, Jover M. 2003. Ionic composition and physio-chemical parameters of the European eel (*Anguilla anguilla*) seminal plasma. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28(1): 221-222.
- Psenicka M, Rodina M, Nebesarova J, Linhart O. 2006. Ultrastructure of spermatozoa of tech *Tinca tinca* observed by means of scanning and transmission electron microscopy. *Theorogenology*, 66(5):1355-1363.
- Schiavonea R, Zillia L, Vilellaa S, Fauvelb C. 2006. Human chorionic gonadotropin induces spermatogenesis and spermiation in 1-year-old European sea bass *Dicentrarchus labrax*: Assessment of sperm quality. *Aquaculture*, 255(1-4):522-531.
- Seifi T, Imanpoor MR, Golpour A. 2011. The effect of different hormonal treatment on semen quality parameter in cultured and wild carp. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 11(4):595-602.
- Sembiring APV. 2011. Pertumbuhan dan kelangsungan hidup larva ikan betok (*Anabas testudineus*) pada pH 4, 5, 6, dan 7. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 39 hlm.
- Sin FYT, Walker SP, Symonds JE, Mukherjee UK, Khoo JGI, Sin IL. 2000. Electroporation of salmon sperm for gene transfer: efficiency, reliability, and fate of transgene. *Molecular Reproduction and Development*, 56(52):285-288.
- Sukumasavin N. 2007. Fish reproduction. *Advanced Freshwater Aquaculture: Fish Reproduction*, 5(4):132-159.
- Symonds JE, Walker SP, Sin FYT. 1994. Development of mass gene transfer method in chinook salmon: optimization of gene transfer by electroporated sperm. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3: 104-111.
- Takahashi M, Furukawa T, Saitoh H, Aoki A, Koike T, Moriyama Y, Shibata A. 1991. Gene transfer into human leukemia cell lines by electroporation: Experience with exponentially decaying and square wave pulse. *Leukimia Research*, 15(6):507-513.
- Trippel EA. 2003. Estimation of male reproductive success of marine fishes. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, 33:81-113.
- Tvedt HB, Benfey TJ, Martin-Robichaud DJ, Power J. 2001. The relationship between sperm density, spermocrit, sperm motility and fertilization success in halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. *Aquaculture*, 194(1-2):192-200.
- Widodo P, Bunasir, Fauzan G, Syafrudin. 2007. *Kaji terap pembesaran ikan papuyu (Anabas testudineus Bloch) dengan pemberian kombinasi pakan pelet dan keong mas dalam jaring tancap di perairan rawa*. Balai Budidaya Air Tawar Mandiangin. Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya. Departemen Kelautan dan Perikanan. Banjarmasin. 26 hlm.
- Yaskowiak ES, Shears MA, Agarwal-Mawal A, Fletcher GL. 2006. Characterization and multi-generational stability of the growth hormone transgene (EO-1 α) responsible for enhanced growth rates in Atlantic Salmon. *Transgenic Research*, 15(4):465-480.