

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain:

- Akuarium
- Mikroskop
- Pipet tetes
- Objek glass
- Plate
- Handtally counter
- Beaker glass
- Selang
- Gelas ukur 100ml
- Sesor
- Kamera
- Alat tulis
- Timbangan digital
- Cawan petri
- DO meter
- pH meter

3.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- Induk jantan ikan zebra
(*D. rerio*)
- Induk betina ikan zebra
(*D. rerio*)
- Trashbag
- Kertas label
- Tisu
- Sterofoam
- Air tawar steril
- MSG (*Monosodium glutamate*)
- Plastik
- *Methyline Blue*

3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah metode eksperimen. Menurut Waluya (2007), metode eksperimen adalah suatu metode penelitian untuk mengadakan kegiatan percobaan guna mendapatkan suatu hasil.

Hasil tersebut menunjukkan hubungan sebab akibat antarvariabel. Tujuan eksperimen adalah untuk mengetahui sebab dan akibat dari objek yang diteliti.

3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan percobaan pada penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Menurut Sastrosupadi (2000), Rancangan Acak Lengkap digunakan untuk percobaan yang mempunyai media atau tempat percobaan yang seragam atau homogen, sehingga RAL banyak digunakan untuk percobaan laboratorium, rumah kaca, dan peternakan. Karena media homogen maka media atau tempat percobaan tidak memberikan pengaruh pada respon yang diamati.

Penelitian ini dilakukan untuk memperoleh waktu yang terbaik untuk embrio ikan zebra (*D. rerio*) berkembang dengan pemberian MSG (*Monosodium Glutamate*). Sehingga dalam penelitian ini digunakan perlakuan waktu sebagai berikut:

Perlakuan A : Paparan embrio dengan MSG selama 36 jam

Perlakuan B : Paparan embrio dengan MSG selama 72 jam

Perlakuan C : Paparan embrio dengan MSG selama 108 jam

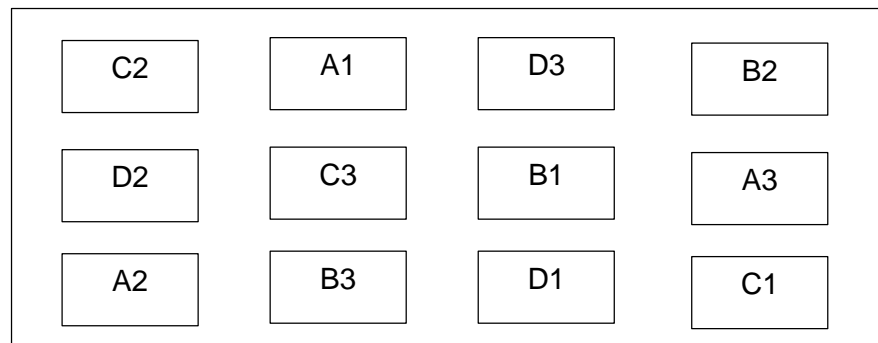
Perlakuan D : Paparan embrio dengan MSG selama 144 jam

Tabel 1. Rancangan Perlakuan pengaruh paparan MSG (*Monosodium Glutamate*) dengan waktu yang berbeda pada ikan zebra (*D. rerio*)

Perlakuan	Ulangan		
	1	2	3
A	√	√	√
B	√	√	√
C	√	√	√
D	√	√	√

Denah penelitian pengaruh pemberian MSG (*Monosodium Glutamate*) dengan waktu yang berbeda pada ikan zebra (*D. rerio*) dilakukan menggunakan

metode acak yang dapat dilihat pada **Gambar 3**.



Gambar 3. Denah Perlakuan Pengaruh Paparan MSG (*Monosodium Glutamate*) Menggunakan Metode Acak

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Persiapan Wadah

Persiapan tempat merupakan langkah awal untuk memulai sesuatu penelitian. Adapun langkah yang harus dilakukan dalam kegiatan tersebut adalah:

- Mempersiapkan akuarium bersih sebagai tempat pemijahan induk ikan zebra (*D. rerio*)
- Saringan kayu dimasukkan ke dalam akuarium yang sudah beirisi air, agar telur yang keluar langsung jatuh ke dasar dan tidak dimakan oleh indukan
- Substrat dipersiapkan untuk merangsang induk untuk memijah, yaitu berupa plastik yang menyerupai bentuk tumbuhan air yang diikat dengan tali rafia sebagai pemberat
- Akuarium diisi air bersih hingga ketinggian ± 30 cm atau $\frac{3}{4}$ dari volume akuarium.
- Aerasi dipasang pada akuarium pemijahan sebagai penyuplai oksigen
- Induk ikan zebra (*D. rerio*) jantan dan betina hasil seleksi yang telah matang gonad dimasukkan kedalam akuarium dengan perbandingan 2:1
- Bungkus akuarium dengan plastik hitam, tunggu sampai ikan menghasilkan telur untuk diambil dan diamati

- Dilakukan pengamatan saat kegiatan pemijahan indukan sampai telur dan sperma di keluarkan, seketika itu telur yang dikeluarkan langsung dipindahkan ke dalam *plate* untuk perlakuan MSG dengan waktu yang berbeda.
- Setelah 10 jam induk sudah mengeluarkan telur, pemanenan telur akan dilakukan dengan cara mengangkat substrat secara perlahan dan menyifon telur-telur yang berada didasar akuarium.
- Telur yang telah dipanen kemudian dihitung jumlahnya
- Telur disampel sebanyak 240 butir untuk diamati perkembangan embrio, fluktuasi konsumsi oksigen, detak jantung, *Hatching Rate*
- Siapkan 12 *plate* yang digunakan sebagai wadah perendaman perlakuan MSG yang berbeda untuk pengamatan embriologi serta detak jantung dengan menggunakan 3 butir telur disetiap perlakuan. Sedangkan untuk fluktuasi konsumsi oksigen dan *Hatching Rate* 20 butir telur yang diletakkan di dalam plastik.
- Telur diamati perkembangannya dibawah mikroskop dengan perbesaran 40x.
- Pengamatan pada fase pembelahan dilakukan setiap interval 1 jam sekali
- Pada setiap pengamatan dilakukan dokumentasi berupa foto dan video menggunakan kamera.
- Foto yang diperoleh dari setiap pengamatan selanjutnya dianalisa.

3.4.2 Pemilihan Induk Ikan Zebra (*D. rerio*) yang Matang Gonad

Ciri-ciri ikan zebra (*D. rerio*) jantan pergerakan gesit, warna lebih cerah, badan ramping dan mengeluarkan sperma. Sedangkan pada ikan zebra (*D. rerio*) betina bentuk tubuh yang lebih besar, perut membuncit dan sedikit lembek, lubang urogenital berwarna kemerahan dan mengeluarkan telur. Pergerakan ikan zebra (*D. rerio*) induk betina lebih sedikit lamban dibandingkan induk jantan.

3.4.3 Proses Pemijahan

Proses pemijahan ikan zebra (*D. rerio*) dilakukan secara masal karena ikan zebra (*D. rerio*) memiliki sifat memilih pasangan sendiri apabila dipijahkan secara langsung. Pemijahan ikan zebra (*D. rerio*) dilakukan secara alami dan dilakukan pada tempat yang relatif kecil seperti akuarium. Induk ikan zebra (*D. rerio*) dimasukkan ke dalam akuarium pemijahan dengan perbandingan 2:1. Pemijahan ikan zebra (*D. rerio*) berlangsung dari sore ke malam menuju dini hari atau menjelang subuh. Biasanya dicirikan dengan induk jantan yang akan mengejar induk betina yang kemudian menempel serta menggesekkan tubuhnya secara perlahan pada tubuh induk betina untuk merangsang telur yang akan dibuahi oleh induk jantan sehingga induk betina mengeluarkan embrio dari perutnya

3.4.4 Pembuatan Larutan MSG

Paparan MSG diberikan dalam bentuk perendaman. Bubuk MSG disiapkan terlebih dahulu kemudian ditimbang menggunakan timbangan digital dengan ketelitian 10^{-4} sebanyak 750 mg. Selanjutnya MSG yang telah ditimbang dimasukkan pada gelas ukur 1000 ml dan dimasukkan ke dalam cawan petri sebanyak 12.

3.4.5 Pembuahan

Telur ikan zebra (*D. rerio*) yang telah dibuahi induk jantan harus segera dipindahkan ke dalam *plate* yang sudah disiapkan dengan perlakuan MSG (*Monosodium Glutamate*) yang sudah ditentukan. Setelah dipindahkan ke dalam *plate*, dilakukan pengamatan perkembangan sel telur yang dibuahi pada mikroskop dan untuk mendapatkan gambaran dari telur yang baru saja dibuahi maka telur dari akuarium pemijahan langsung dilakukan pengamatan pada mikroskop sampai telur menetas.

3.5 Parameter Uji

3.5.1 Parameter Utama

a. Perkembangan Embrio

Parameter utama yang diukur yaitu perkembangan embrio dari telur ikan zebra (*D. rerio*) sampai dengan menetas. Pengamatan dilakukan selama 1 jam sekali setelah fertilisasi yang diamati antara lain: morula, blastula, gastrula, neurula hingga organogenesis dengan menggunakan mikroskop dan dilakukan juga pencatatan perbedaan waktu perkembangan fase embrio untuk menentukan kecepatan perkembangan embrio pada paparan MSG (*Monosodium Glutamate*). Kemudian diambil foto perkembangan embrionya sampai dengan telur menetas sebagai data utama.

b. Hatching Rate (HR)

Penelitian pengamatan embrio tidak lepas dari parameter penetasan embrio. Telur dapat dikatakan menetas ketika selaput *chorion* telur pecah dan larva bergerak aktif, Perhitungan keberhasilan penetasan telur ikan zebra pada masing-masing perlakuan waktu dapat dihitung dengan menggunakan rumus sesuai pernyataan Setyono (2008), yaitu:

$$\text{Daya tetas (\%)} = \frac{\text{Jumlah telur yang menetas}}{\text{Jumlah telur yang ditebar}} \times 100\%$$

c. Fluktuasi Konsumsi Oksigen Terlarut dalam Media

Parameter selanjutnya yaitu fluktuasi konsumsi oksigen yang dibutuhkan embrio untuk berkembang dalam media. Wadah yang digunakan adalah plastik kecil untuk tempat embrio ikan zebra. Selanjutnya embrio ikan zebra dimasukkan pada setiap plastik perlakuan dan plastik ditutup. Sebelum plastik ditutup dipastikan terlebih dahulu bahwa tidak adanya oksigen yang masuk ke dalam plastik. Kemudian plastik ditutup dengan mengikat ujung plastik menggunakan karet gelang. Oksigen terlarut diukur kembali jika sudah melewati masing-masing perlakuan waktu dan diulang sebanyak 3 kali setiap perlakuan.

Hal ini untuk mengetahui data konsumsi oksigen selama masa perkembangan. Menurut Santoso (2006), pengamatan laju respirasi dilakukan dengan membandingkan konsentrasi oksigen terlarut di awal sampai di akhir eksperimen.

d. Detak Jantung Embrio

Pengamatan *heart beat* atau denyut jantung embrio ikan zebra dihitung pada 72 *hpf* menggunakan mikroskop binokuler dengan perbesaran objektif 40x. Frekuensi denyut jantung dihitung selama 15 detik pada 10 embrio setiap perlakuan dan diulang sebanyak tiga kali (Devi *et al.*, 2014). Pada saat perhitungan denyut jantung embrio yang akan diamati diambil dari *plate* perkembangan embrio yang telah dipapar MSG dan dihitung denyut jantungnya selama 1 menit dengan menggunakan *handtally counter*.

3.5.2 Parameter Penunjang

Parameter penunjang dalam penelitian ini adalah pengamatan kualitas air yang meliputi suhu, pH dan *Dissolved Oxygen* (Oksigen terlarut). Pengukuran kualitas air dilakukan sebanyak dua kali sehari, yaitu pada pagi pukul 07.00 dan sore hari pukul 15.00.

3.6 Analisis Data

Teknik pengambilan data dilakukan dengan cara observasi langsung yaitu pengamatan secara langsung terhadap subjek yang diamati. Dilanjutkan dengan menganalisa grafik dan tabel waktu fase perkembangan embrio telur ikan zebra dari setiap perlakuan paparan MSG yang diberikan. Berdasarkan analisa grafik tersebut maka akan diketahui telur manakah yang mengalami perlambatan perkembangan berdasarkan perlakuan paparan MSG yang berbeda. Dari setiap fase perkembangan (fase pembelahan-menetas) akan dianalisis. Semua analisis dihitung dan diuji secara statistik dengan

menggunakan *analysis of variance* (ANOVA) sesuai dengan rancangan yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) pada tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) dengan menggunakan 4 perlakuan dan 3 kali ulangan pada masing – masing perlakuan. Apabila dari data sidik ragam diketahui bahwa perlakuan menunjukkan pengaruh nyata atau berbeda sangat nyata (F hitung > F tabel) maka untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) menggunakan aplikasi SPSS 18.