

3. METODOLOGI

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat

Alat yang digunakan dalam pelaksanaan penelitian ini antara lain:

- Akuarium
- Mikroskop
- Pipet tetes
- Objek glass
- Plate
- Hantally counter
- Beaker glass
- Gelas ukur 1000 ml
- Sesor
- Kamera
- Alat tulis
- Spatula
- Timbangan digital
- Selang

3.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam pelaksanaan penelitian ini antara lain

- Induk jantan ikan Zebra
(*Danio rerio*)
- Induk betina ikan Zebra
(*Danio rerio*)
- Trashback
- Tisu
- Steroform
- Air tawar steril
- MSG (*Monosodium glutamate*)
L-glutamate Monosodium Hydrate 99%
SIGMA
- Kertas label

3.2 Metode Penelitian

Menurut Priyono (2008), metodologi Penelitian merupakan ilmu yang mempelajari cara-cara melakukan pengamatan dengan pemikiran yang tepat secara terpadu melalui tahapan-tahapan yang disusun secara ilmiah untuk mencari, menyusun serta menganalisis dan menyimpulkan data-data sehingga dapat dipergunakan untuk menemukan, mengembangkan dan menguji

kebenaran sesuatu pengetahuan. Penelitian eksperimen dapat dilakukan di dalam alam terbuka dan juga di ruang tertutup. Dalam penelitian eksperimen, kondisi yang ada dimanipulasi oleh peneliti sesuai dengan kebutuhan peneliti. Dalam kondisi yang telah dimanipulas ini.

Metode dalam penelitian ini menggunakan metode eksperimental dan juga deskriptif. Menurut Rantung (2014), metode analisis deskriptif adalah metode yang digunakan dengan cara menganalisis dan menguraikan untuk menggambarkan keadaan objek yang diteliti yang menjadi pusat perhatian dalam penelitian. Metode analisis deskriptif secara hakekatnya adalah data yang telah terkumpul itu kemudian diseleksi, dikelompokan, dilakukan pengkajian, interpretasi dan disimpulkan untuk menjawab permasalahan yang ada.

3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan percobaan yang digunakan pada penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Sastrosupadi (2000), menyatakan bahwa RAL 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 dan model untuk RAL adalah sebagai berikut :

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij}$$

Keterangan:

- Y_{ij} = respon atau nilai pengamatan dari perlakuan ke-I dan ulangan ke-j
- μ = nilai tengah umum
- T_i = pengaruh perlakuan taraf ke-i
- ϵ_{ij} = pengaruh galat percobaan dari perlakuan ke-I dan ulangan ke-j

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian MSG pada setiap tahapan perkembangan ikan zebra (*D. rerio*). Sebelum melakukan penelitian inti, telah dilakukan dua kali pra penelitian untuk menentukan dosis terbaik. Pada pra penelitian telah dilakukan penentuan LC50 dari dosis 0 ppm sampai 1.000 ppm untuk mengetahui mortalitas embrio samapai batas 50% karena paparan MAG. Embrio mengalami kematian lebih dari 50% pada dosis 750 ppm sehingga dalam penelitian ini digunakan perlakuan MSG dengan dosis sebagai berikut:

Perlakuan K : Paparan embrio dengan dosis MSG 0 ppm

Perlakuan A : Paparan embrio dengan dosis MSG 250 ppm

Perlakuan B : Paparan embrio dengan dosis MSG 500 ppm

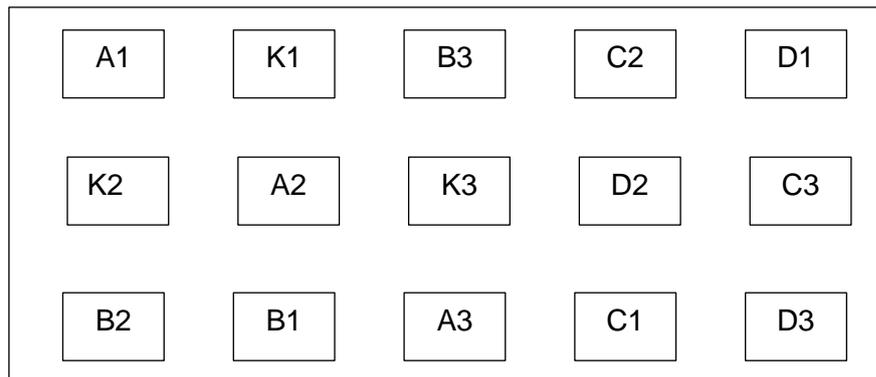
Perlakuan C : Paparan embrio dengan dosis MSG 750 ppm

Perlakuan D : Paparan embrio dengan dosis MSG 1.000 ppm

Tabel 1. Rancangan Perlakuan pengaruh paparan MSG dengan dosis yang berbeda pada perendaman telur ikan zebra (*D. rerio*).

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

Denah penelitian pengaruh paparan MSG terhadap perkembangan embrio ikan zebra (*D. rerio*) dilakukan menggunakan metode rancangan acak lengkap dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Denah Rancangan Acak Lengkap

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 berukuran 60 x 30 cm³ sebagai tempat pemijahan induk Ikan Zebra (*D. rerio*).
- Saringan kayu di masukkan ke dalam akuarium, 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
- Akuarium diisi air hingga ketinggian \pm 30 cm atau $\frac{3}{4}$ dari volume akuarium.
- Induk Ikan Zebra (*D. rerio*) jantan dan betina hasil seleksi yang telah matang gonad dimasukkan kedalam akuarium dengan perbandingan 5:3.
- Diamati kegiatan pemijahan indukan zebra danio sampai telur dan sperma di keluarkan, seketika itu telur yang dikeluarkan langsung dipindahkan kedalam plate untuk perlakuan MSG media inkubasi yang berbeda.
- Pemanenan telur dilakukan dengan cara mengangkat substrat secara perlahan dan menyifon telur-telur yang berada didasar akuarium.

Penyifonan dilakukan secara hati-hati agar telur tidak ikut terbang

- Telur yang telah dipanen kemudian dihitung jumlahnya.
- Telur disampel sebanyak 300 butir yang sebelumnya telah diseleksi mana yang anfertill mana yang fertil untuk diberi perlakuan dosis MSG yang berbeda, diletakkan dalam plate untuk diamati perkembangan embrio, *Hatching rate* dan denyut jantung serta fluktuasi konsumsi DO
- Siapkan 30 plate yang digunakan sebagai wadah perendaman perlakuan MSG yang berbeda untuk pengamatan embriologinya dengan menggunakan 1 butir telur disetiap perlakuan. Sedangkan untuk *HR*, denyut jantung dan fluktuasi konsumsi DO menggunakan 20 butir telur disetiap perlakuan.
- Telur diamati perkembangannya dibawah mikroskop dengan perbesaran 40x.
- Pengamatan pada fase pembelahan dilakukan setiap interval 15 menit sekali pada fase pembelahan, lalu selanjutnya dua jam sekali ketika memasuki fase blastula
- Pada setiap pengamatan dilakukan dokumentasi berupa foto menggunakan kamera.

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

Induk Ikan Zebra (*D. rerio*) yang telah matang gonad memiliki ciri - ciri morfologi yang berbeda antara jantan dan betina. Ikan Zebra (*D. rerio*) jantan memiliki ciri – ciri morfologi yaitu badan lebih ramping memanjang dibandingkan betina, perut tidak membuncit, warna lebih cerah dibandingkan betina, lubang urogenital berwarna pucat dan mengeluarkan sperma serta pergerakannya gesit. Sedangkan pada Ikan Zebra (*D. rerio*) betina dicirikan dengan bentuk tubuh yang lebih besar, perut membuncit dan sedikit lembek, lubang urogenital berwarna kemerahan dan mengeluarkan telur.

3.4.3 Proses Pemijahan

Induk Ikan Zebra (*D. rerio*) dimasukkan kedalam akuarium pemijahan dengan perbandingan 5:3 yang dilengkapi dengan pengatur waktu lampu menyala (14 jam terang; 10 jam gelap). Temperatur air akuarium pemeliharaan dipertahankan pada $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ dengan menggunakan pemanas (heater) agar proses pemijahan bisa berjalan dengan baik (Alimuddin *et al.*, 2007).

Sebelum dipijahkan, induk harus dipuasakan agar telur tidak tercampur dengan kotoran. Akuarium terlebih dahulu diberi substrat dan *undergravel* sebagai pembatas telur dan induk agar telur tidak dimakan. 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 dan menempel kemudian menggesekkan tubuhnya secara perlahan pada tubuh induk betina untuk merangsang mengeluarkan telur yang akan dibuahi oleh induk jantan.

3.4.4 Pembuatan Larutan MSG

Sebelum penelitian dilakukan pra penelitian untuk menentukan dosis MSG. Paparan MSG diberikan dalam bentuk perendaman selama waktu perkembangan embrio sampai menetas. Bubuk MSG disiapkan terlebih dahulu kemudian ditimbang menggunakan timbangan analitik dengan ketelitian 10^{-4} sesuai perlakuan yakni mulai dari 250 mg, 500 mg, 750 mg dan 1.000 mg. sebanyak tiga kali. Selanjutnya MSG yang telah ditimbang dilarutkan pada air steril sebanyak 1 Liter. Campuran tersebut kemudian dimasukkan pada masing-masing plate yang telah dilabeli sebagai media inkubasi embrio ikan zebra (*D. rerio*) dan juga yang telah ditata sesuai denah penelitian.

3.4.5 Pembuahan

Telur Ikan Zebra (*D. rerio*) yang telah dibuahi induk jantan harus segera dipindahkan ke dalam plate media inkubasi yang telah disiapkan

dengan perlakuan MSG yang sudah di tentukan. Sebelum itu harus sudah dipilih telur yang baik dan telah terbuahi dengan ciri-ciri telur terbuahi menampilkan warna transparan serta terlihat inti telurnya untuk mendapatkan hasil yang diharapkan. Setelah dipindahkan ke dalam plate, dilakukan pengamatan perkembangan embrio menggunakan mikroskop.

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 menetas. Pengamatan perkembangan embriogenesis dilakukan selama 15 menit sekali setelah fertilisasi. Perkembangan embrio yang diamati antara lain: fase pembelahan (Cleavage-morula), blastula, gastrula, priode segmentasi yang di dalamnya terdapat tahapan neurula hingga organogenesis dengan menggunakan mikroskop dan dilakukan juga pencatatan waktu perkembangan embrio untuk menentukan perkembangan embrio pada setiap fase di perlakuan MSG yang berbeda. Kemudian diambil foto perkembangan embrionya sampai dengan telurnya menetas sebagai data utama.

b. Hatching Rate (HR)

Menurut Zairin *et al.*(2005). Penelitian pengamatan perkembangan embrio tidak lepas dari parameter penetasan embrio atau seberapa banyak telur yang menetas. Derajat penetasan adalah presentase banyaknya embrio yang menetas dari jumlah telur yang dibuahi. Perhitungan *Hatching rate* atau daya tetas digunakan rumus sebagai berikut:

$$HR = \frac{\text{Jumlah embrio menetas}}{\text{jumlah telur fertil}} \times 100\%$$

c. Denyut Jantung

Pengamatan *heart beat* atau denyut jantung embrio ikan zebra dihitung pada 72 hpf menggunakan handtally counter serta mikroskop binokuler dengan perbesaran objektif 40x. Denyut jantung dapat diamati dengan jelas karena sifat dari embrio ikan zebra bersifat transparan sehingga mudah untuk diamati. Frekuensi denyut jantung dihitung selama satu menit pada 10 embrio setiap perlakuan dan diulang sebanyak tiga kali ulangan (Pramulawati *et al.*, 2014).

d. Fluktuasi Konsumsi Oksigen Terlarut

Mengetahui fluktuasi konsumsi DO di media pemeliharaan dilakukan dengan cara dimasukkan 20 telur yang telah dibuahi ke dalam plastik kemudian mengukur terlebih dahulu DO awal (DO_0) media inkubasi yang berada di dalam plastik bening, setelah itu ikat sampai tidak ada ruang kosong untuk menghindari terjadinya difusi udara. Simpan plastik yang berisi telur sampai tiga hari kemudian ukur kembali DO akhir (DO_t). Menurut Santoso (2006), pengamatan laju respirasi dilakukan dengan membandingkan konsentrasi oksigen terlarut di awal sampai di akhir eksperimen.

3.5.2 Parameter Penunjang

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

3.6 Analisa Data

Teknik pengambilan data dilakukan dengan cara observasi langsung yaitu dengan cara mengadakan 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 dengan cara perendaman. Berdasarkan analisa grafik tersebut maka akan diketahui telur manakah yang mengalami perlambatan perkembangan berdasarkan perlakuan paparan MSG yang berbeda. 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 5 perlakuan dan 3 kali ulangan pada masing – masing perlakuan. Apabila dari data sidik ragam diketahui bahwa perlakuan menunjukkan pengaruh nyata atau berbeda sangat nyata ($F_{\text{hitung}} > F_{\text{tabel}}$) maka untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT), kemudian dilanjutkan dengan uji *polinomial orthogenal* hingga kuartik agar mengetahui kurva persamaan R^2 yang didapat sehingga diketahui jenis kurva yang didapatkan.