

### 3. METODOLOGI

#### 3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan Laboratorium Reproduksi Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang, pada bulan Juli sampai September 2014.

#### 3.2. Alat dan Bahan Penelitian

##### 3.2.1. Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelas ukur, *aluminium foil*, baskom, bulu burung dara, *stopwatch*, spuit, akuarium, aerasi (pompa dan pipa), *heater*, termometer, *handtally counter*, mikroskop cahaya binokuler Olympus CH-13 dan kamera digital.

##### 3.2.2. Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan adalah induk betina ikan mas, induk jantan ikan mas, telur ikan mas, sperma ikan mas, etanol 7%, akuades, natrium fisiologis, dan ovaprim.

#### 3.3. Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen tujuan penelitian eksperimental adalah untuk menyelidiki kemungkinan saling hubungan sebab-akibat dengan cara mengenakan kepada satu atau lebih kelompok eksperimental satu atau lebih kondisi perlakuan dan membandingkan hasilnya dengan satu atau lebih kelompok kontrol yang tidak dikenai kondisi perlakuan (Suryabrata, 2006).

Menurut Narbuko dan Ahmadi (2007), tujuan dari metode eksperimen adalah untuk menyelidiki adanya kemungkinan hubungan sebab akibat dari satu atau lebih kelompok eksperimental setelah dikenakan satu perlakuan.

### 3.4. Rancangan Percobaan Penelitian

Rancangan penelitian lanjutan ini didasarkan pada penelitian Kurniawan (2010) yang mendapatkan hasil terbaik yaitu pada perendaman etanol 7% selama 3 menit dan pada kejutan suhu 40°C selama 15 detik. Namun pada penelitian lanjutan ini lama waktu kejutan suhu mengacu pada referensi ginogenesis yaitu selama 4 menit (Murtidjo, 2001). Rancangan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) yang terdiri dari 5 perlakuan, 1 kontrol negatif dan 1 kontrol positif dengan 3 kali ulangan untuk mengetahui perbedaan lama waktu perendaman telur ikan mas (*Cyprinus carpio*) pada etanol 7% dilanjutkan dengan pemberian kejutan panas 40°C selama 4 menit terhadap perkembangan embrio partenogenesis seperti berikut:

Kontrol - = telur yang dibiarkan saja tanpa perlakuan

Kontrol + = telur yang terfertilisasi oleh sperma

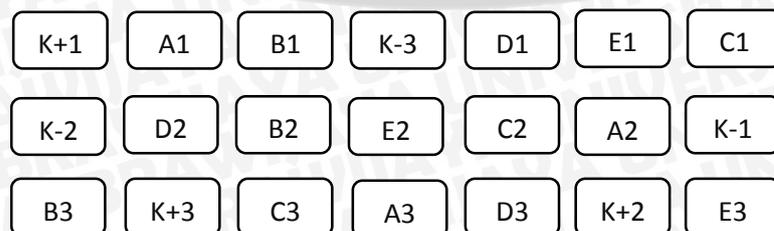
Perlakuan A = telur direndam etanol 7% selama 2 menit dan kejutan suhu 40°C selama 4 menit

Perlakuan B = telur direndam etanol 7% selama 2,5 menit dan kejutan suhu 40°C selama 4 menit

Perlakuan C = telur direndam etanol 7% selama 3 menit dan kejutan suhu 40°C selama 4 menit

Perlakuan D = telur direndam etanol 7% selama 3,5 menit dan kejutan suhu 40°C selama 4 menit

Perlakuan E = telur direndam etanol 7% selama 4 menit dan kejutan suhu 40°C selama 4 menit



Gambar 3. Denah (*lay out*) Rancangan Penelitian

### 3.5. Prosedur Penelitian

#### 3.5.1. Pemilihan Induk Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)

Induk ikan mas yang digunakan sudah dewasa (kira-kira berumur 1-2 tahun) atau setelah induk mencapai berat 1.5-2.0 kg, selain itu induk juga harus sudah matang gonad. Pemilihan induk juga harus memperhatikan kondisi fisiologis induk tersebut, induk harus dalam keadaan sehat (tidak menderita penyakit). Metode ini didukung dengan pernyataan Rustidja (1995), induk betina mencapai tingkat kematangan gonad (TKG) I pada umur 1,5-2 tahun dengan berat badan minimal 1 kg. Induk jantan mencapai TKG I pada umur 10-12 bulan dengan berat minimal 0,5 kg.

#### 3.5.2. Persiapan Kolam Pemijahan

Kolam yang akan digunakan untuk kolam pemijahan induk ikan mas harus bersih terlebih dahulu dan diisi dengan air bersih. Kolam tersebut juga dijaga kondisi sirkulasi airnya untuk menjaga kualitas air.

#### 3.5.3. *Stripping* Sel Telur dan Sperma Induk Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)

Induk betina yang sudah matang gonad disuntik dengan ovaprim dengan dosis 0,5 ml per kilogram berat badan ikan. Penyuntikan dilakukan di bagian punggung pada kedua sisi kanan dan kiri di sebelah sirip dorsal. Pemijahan ikan dilakukan dengan cara memasangkan induk ikan mas jantan dan betina di dalam kolam pemijahan ikan. Selanjutnya ikan mas akan melakukan perkawinan secara alami dan biasanya baru berlangsung pada malam hari (tengah malam) dengan selang waktu 11-18 jam setelah dipasangkan. Setelah nampak tanda-tanda ikan mas mulai memijah, induk ikan mas betina dan jantan ditangkap dan dilakukan pengurutan (*stripping*) untuk mendapatkan telur dan sperma ikan mas. Telur-telur yang diperoleh ditampung di baskom dan sperma ditampung dalam baskom serta ditutup dengan kertas aluminium untuk menghindari kontak dengan udara dan sinar secara langsung yang dapat menyebabkan kematian sperma.

#### 3.5.4. Pembuatan Larutan Aktivator Etanol 7%

Pembuatan larutan stok etanol 7% dilakukan dengan memasukkan akuades sebanyak 93 ml ke dalam botol kemudian ditutup rapat. Setelah itu mengambil etanol absolut sebanyak 7ml dengan menggunakan spuit, lalu menyuntikkan ke dalam botol yang sudah berisi akuades dan dihomogenkan. Teknik ini bertujuan untuk menghindari penguapan etanol, sehingga konsentrasi etanol dalam 100ml tepat 7%. Menurut Nainggolan (2012), etanol diartikan sebagai cairan yang mudah terbakar, mudah menguap, alkohol yang sering digunakan dalam kehidupan sehari-hari, etanol juga tidak berwarna.

#### 3.5.5. Fertilisasi (Kontrol)

Aktivasi telur secara alami dilakukan dengan mencampurkan antara telur dan sperma ikan mas. Sperma ikan mas terlebih dahulu diencerkan dengan natrium fisiologis dengan perbandingan 1:9 (1ml sperma ikan mas ditambah 9ml natrium fisiologis) kemudian dihomogenkan. Telur ikan mas hasil *stripping* diambil sebagian dan diletakkan dalam baskom pengumpul telur yang berbeda. Sperma yang telah diencerkan dengan natrium fisiologis kemudian dimasukkan dalam baskom pengumpul telur sambil diaduk dengan menggunakan bulu burung dara untuk memaksimalkan pencampuran telur dengan sperma ikan mas. Telur kemudian ditebar di inkubator dengan menggunakan bulu burung dara kemudian diinkubasi dalam akuarium yang telah disiapkan.

#### 3.5.6. Aktivasi Telur Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) dengan Etanol 7% dan Pemberian Kejutan Panas

Aktivasi sel telur ikan mas secara buatan dilakukan dengan cara merendam telur dalam etanol 7%. Etanol 7% dituang dalam akuarium berukuran 20x20x30cm kemudian telur hasil *stripping* ditebar dalam saringan teh dengan menggunakan bulu burung dara. Telur ikan direndam dalam etanol 7% selama 2; 2,5;3; 3,5 dan 4 menit. Selanjutnya diberi kejutan panas dengan direndam air panas selama 4 menit pada suhu 40°C.

Penebaran telur diusahakan secara merata dan tidak bertumpuk untuk mempermudah pengamatan dan agar aktivasi berjalan optimal. Proses aktivasi telur secara alami (fertilisasi) digunakan sebagai pembanding keberhasilan aktivasi telur secara buatan dengan menggunakan etanol dan pemberian kejutan panas. Menurut pendapat Rustidja (1995), pemberian kejutan suhu pada telur yang telah dibuahi pada kisaran  $\pm 5$  menit setelah pembuahan. Ditambahkan oleh Murtidjo (2001), kejutan suhu selama 4 menit mampu menahan keluarnya polar bodi.

### 3.5.7. Inkubasi Sel Telur

Sel telur diinkubasi pada akuarium ukuran 70x50x50cm dengan menggunakan air sumur sebagai media inkubasi. Kondisi akuarium harus diperhatikan untuk menunjang proses perkembangan sel telur tersebut. Pada akuarium ditambahkan pemanas (*heater*) untuk menjaga suhu air 20-22°C selain itu pada akuarium ditambahkan aerator atau pompa untuk mencukupi kebutuhan oksigen telur. Serta pergantian air secara berkala sebanyak 10% setiap 6 jam sekali selama inkubasi untuk mengurangi senyawa beracun selama perkembangan telur dan menghindari terjadinya fluktuasi suhu. Menurut Djariah (2001), perkembangan telur ikan juga memerlukan lingkungan (media) yang suhunya optimal (20-22°C) dan relatif stabil. Konsistensi oksigen terlarut sekitar 5-6 ppm. Ditambahkan oleh Woynarovich dan Horvarth (1980), air yang bersih dan bebas plankton merupakan persyaratan dasar pada *hatchery*. Air yang terpolusi akan menyebabkan berbagai macam masalah, seperti kemungkinan adanya serangan dari hewan-hewan planktonik khususnya cyclopid copepoda. Selama perkembangannya, telur mengeluarkan beberapa senyawa berbahaya seperti CO<sub>2</sub> dan NH<sub>3</sub>. Senyawa-senyawa tersebut apabila terakumulasi dapat menjadi racun bagi telur itu sendiri.

### 3.5.8. Pengamatan

Pengamatan telur dilakukan pada setiap perlakuan, dimulai saat 10 menit setelah aktivasi dan kemudian pengamatan dilanjutkan setiap 1 jam sampai perkembangan embrio terakhir, yaitu sampai fase perkembangan yang paling maksimal. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop cahaya. Telur yang teraktivasi akan tampak berwarna hijau jernih, zona perivitelin meluas dan tampak adanya pergerakan sitoplasma menuju kutub anima, sedangkan telur yang tidak teraktivasi akan berwarna putih. Telur yang berkembang menjadi embrio ditandai dengan adanya bentukan menonjol pada bagian kutub anima. Telur yang berhasil teraktivasi dan melanjutkan perkembangan embrionya serta menetas dihitung pada setiap perlakuan. Menurut Murtidjo (2001), setelah 8 jam dari proses pembuahan, kita akan menemukan telur berwarna putih yang menunjukkan bahwa telur ikan tersebut mati atau tidak dibuahi.

### 3.5.9. Analisa Data

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) 3 kali ulangan. Perlakuan yang diuji adalah perendaman etanol 7% dengan variasi lama perendaman 2; 2,5;3; 3,5 dan 4 menit dan dilanjutkan dengan pemberian kejutan panas 40°C selama 4 menit. Parameter yang diamati adalah aktivasi dan perkembangan telur pada setiap perlakuan. Data yang didapat dikonversi dalam satuan persentase (%) dan dianalisis secara kuantitatif dan kualitatif. Analisis kualitatif dilakukan secara deskriptif. Sedangkan analisis kuantitatif dilakukan dengan menggunakan metode RAL.

Rumus perhitungan persentase telur yang teraktivasi:

$$\text{Persentase telur teraktivasi} = \frac{\sum \text{telur teraktivasi}}{\sum \text{telur ditebar}} \times 100\%$$

Rumus perhitungan persentase telur yang berkembang:

$$\text{Persentase telur berkembang} = \frac{\sum \text{telur berkembang}}{\sum \text{telur ditebar}} \times 100\%$$