

III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah dua buah ember plastik berdiameter 30 cm untuk aklimatisasi induk jantan dan betina, 10 buah ember plastik berdiameter 30 cm untuk tempat perkawinan induk, 20 buah baskom plastik berdiameter 15 cm untuk pemeliharaan larva, perlengkapan aerasi, thermometer, DO meter, Ph Meter, seser, kamera digital, timbangan digital, toples, rotary evaporator, messorator, blender, sprayer, mikroskop, pipet tetes, gelas objek, cover glass, sechtio set.

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan adalah ikan guppi sebanyak 30 ekor jantan dan 60 ekor betina, cacing sutera (*Tubifex* sp), air tawar, tanaman air jenis apu-apu (*Pistia stratiotes*) untuk merangsang induk cepat memijah serta sebagai tempat bersembunyiya benih ikan, serta pakan komersial merek Hi-Pro-Vit dengan komposisi sebagai berikut :

Tabel 2. Komposisi kandungan pelet Hi-Pro-Vit

No	Kandungan	Kadar (%)
1	Protein	31-33
2	Lemak	3-5
3	Serat Kasar	4-6
4	Kadar Air	11-13
5	Kadar Abu	10-13

Sedangkan bahan yang digunakan dalam ekstraksi tanaman pegagan adalah kertas saring, etanol 70%, akuades, serbuk tanaman pegagan, ekstrak triterpenoid total tanaman pegagan (*Centella asiatica* L.). Bahan yang digunakan dalam pengamatan gonad ikan adalah Asetokarmin dan akuades.

3.2 Metode Penelitian dan Rancangan Penelitian

3.2.1 Metode Penelitian

Metode yang digunakan adalah metode eksperimen yaitu mengadakan kegiatan percobaan untuk melihat suatu hasil atau hubungan kausal antara variabel dengan teknik pengumpulan data yang dilakukan secara observasi langsung atau mengadakan pengamatan secara langsung terhadap gejala-gejala subjek yang diselidiki, baik pengamatan itu dilakukan di dalam situasi sebenarnya ataupun dilakukan dengan situasi buatan yang khusus untuk penelitian tersebut (Nazir, 1988).

Tujuan penelitian eksperimen adalah untuk menyelidiki kemungkinan hubungan sebab akibat dengan cara memberikan perlakuan-perlakuan tertentu pada beberapa kelompok dan memberikan kontrol sebagai pembanding (Surachmad, 1989).

3.2.2 Rancangan Penelitian

Rancangan percobaan yang digunakan yaitu rancangan acak lengkap (RAL) yaitu rancangan yang biasa digunakan pada skala laboratorium ataupun faktor yang lain selain perlakuan bias diatur dan dikendalikan sehingga faktor tersebut dapat bersifat homogen. Menurut Nazir (1988), RAL merupakan rancangan paling sederhana dimana dalam rancangan ini terdapat kontrol sehingga sumber keragaman yang diamati hanya perlakuan dan galat (kesalahan). RAL umumnya hanya cocok digunakan dalam kondisi lingkungan, alat, bahan dan metode yang homogen. Model umum RAL adalah :

$$y = \mu + t + \epsilon$$

Keterangan :

y = Nilai pengamatan

t = Pengaruh perlakuan

μ = Nilai rata-rata harapan

ϵ = Galat/kesalahan percobaan

Berdasarkan uji *lethal dosis* yang telah dilakukan pada penelitian pendahuluan, Didapatkan nilai LD50 yaitu sebesar 197,69 gr/Kg pakan. Kemudian dilakukan uji lethal dosis tahap 2 dengan memperkecil rentang dosis untuk mendapatkan dosis maksimal ekstrak tanpa mengakibatkan kematian ikan. Uji lethal dosis tahap 2 menggunakan dosis 100,125,150,175, 200 gr ekstrak/Kg pakan. Dari data uji lethal dosis tahap 2 didapatkan bahwa ikan guppi mulai mengalami kematian pada dosis 175 gram ekstrak / Kg pakan. Oleh karena itu perlakuan dosis ekstrak tanaman pegagan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 100, 125, 150 gram/ Kg pakan serta perlakuan kontrol sebagai pembanding. Rincian dosis perlakuan sebagai berikut :

- A : Ekstrak triterpenoid 100 gram/kilogram pakan
- B : Ekstrak triterpenoid 125 gram/kilogram pakan
- C : Ekstrak triterpenoid 150 gram/kilogram pakan
- K : kontrol tanpa pemberian ekstrak

Pemberian pakan dengan campuran ekstrak dilakukan setelah terjadi proses pembuahan yaitu setelah satu minggu masa perkawinan. Penelitian ini menggunakan lima (5) kali ulangan dan diacak sesuai denah berikut :

A1	B2	K1	A5	C1	B3	A3	K3	A4	C5
B1	A2	K4	K2	C2	C3	B5	B4	C4	K5

Keterangan :

A,B,C = Perlakuan K = Kontrol 1,2,3,4,5 = Ulangan

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Persiapan Wadah Pemeliharaan

Sebagai wadah pemeliharaan larva pada penelitian ini adalah baskom plastik sebanyak 20 buah berukuran diameter 15 cm, sedangkan untuk tempat perkawinan induk adalah ember plastik sebanyak 10 buah dengan ukuran diameter 30 cm. Sebelum digunakan, ember plastik dicuci terlebih dahulu hingga

bersih menggunakan sabun cuci, kemudian dikeringkan dibawah sinar matahari. Setelah kering, ember diisi dengan air sebanyak 50% dari total volume ember atau sebanyak 10 liter. Kebutuhan oksigen disuplai dengan memberikan aerasi kedalam masing-masing ember. Ketika air sudah mulai stabil, dilakukan pengukuran kualitas air untuk menyesuaikan dengan parameter kualitas air yang dibutuhkan oleh ikan.

3.3.2 Persiapan ikan Guppy (*Poecilia reticulata*)

Persiapan induk ikan guppy (*Poecilia reticulata*) yaitu dilakukan aklimatisasi induk selama sehari semalam untuk adaptasi ikan terhadap lingkungan yang baru. Induk ikan guppy didapatkan dari koleksi pribadi yang telah lama diadaptasikan dengan suhu dan cuaca di Malang. Jumlah induk ikan guppy jantan yang digunakan yaitu 30 ekor sedangkan induk ikan guppy betina berjumlah 60 ekor. Calon induk guppy dipilih berdasarkan kriteria berikut :

- Induk harus sudah matang gonad dengan umur antara 4 – 7 bulan
- Panjang total induk jantan 2,5-4,0 cm, induk betina 3,0-5,0 cm
- Induk betina dipilih yang sudah matang gonad (bunting) namun belum pernah mijah. Ditandai dengan bentuk badan bulat dengan bagian perut membuncit berisi telur, induk betina belum pernah dikawinkan.
- Bentuk dan organ tubuh normal (tidak ada cacat fisik)
- Secara visual harus sehat yang diketahui dari respon terhadap pakan yang diberikan, gerakan aktif dan lincah serta warna tubuh dan sirip tidak pucat
- Keragaman dan corak warna induk harus cukup banyak dengan bentuk sirip ekor yang indah

Setelah diadaptasikan selama satu hari satu malam, induk ikan dimasukan kedalam ember perkawinan dengan perbandingan jantan dan betina 1:2 yang terbagi menjadi 10 ember perkawinan. Dalam ember diberi tanaman air jenis apu-apu untuk merangsang induk ikan cepat memijah. Pemberian pakan dilakukan 2 kali sehari menggunakan pakan komersil dengan kadar protein 31-

32%. Perkawinan dilakukan selama satu minggu, induk ikan jantan kemudian dipisahkan dan induk betina dipindah kedalam ember perlakuan yang telah dipersiapkan sebelumnya.

Telur di erami didalam tubuh induk selama kurang lebih 2-4 minggu tergantung pada tingkat kematangan gonad induk saat terjadi pemijahan, kondisi lingkungan serta kecukupan pakan. Induk diberi pakan yang telah disiapkan sesuai jenis perlakuan. Setelah induk melahirkan benih ikan, benih kemudian dipelihara selama kurang lebih dua bulan sampai bisa dibedakan antara yang berkelamin jantan dan betina.

3.3.3 Persiapan dan Pembuatan Pakan

Ekstrak triterpenoid tanaman pegagan (*Centella asiatica L.*) diperoleh dengan cara pengisolasian (ekstraksi) menggunakan Etanol 70% yang berfungsi untuk melarutkan kandungan bahan aktif triterpenoid pada tanaman pegagan (*Centella asiatica L.*). Etanol digunakan sebagai pelarut dikarenakan sifat etanol yang semi polar sehingga mudah melarutkan senyawa non polar maupun polar. Selain itu juga dikarenakan etanol memiliki titik didih yang rendah sehingga mudah menguap jika dipanaskan.

Serbuk tanaman pegagan didapatkan dari Balai Meteria Medica Batu yang memang secara khusus menjual berbagai jenis tanaman obat untuk keperluan pengobatan. Selanjutnya serbuk tanaman pegagan tersebut disaring menggunakan ayakan hingga didapatkan ukuran yang seragam. Kemudian serbuk direndam dalam etanol 70% selama dua hari. Perbandingan antara bahan dan pelarut yang digunakan adalah 1 : 5 yaitu 1 bahan dan 5 pelarut. Proses perendaman dilakukan menggunakan wadah toples. Serbuk tanaman pegagan direndam selama kurang lebih 3 hari. Setelah 3 hari, hasil rendaman tersebut disaring pertama dengan saringan teh kemudian disaring dengan kertas saring pada mesin messorator untuk mendapatkan filtratnya. Filtrat tersebut

dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* sampai pelarut menguap. Untuk memaksimalkan penguapan etanol, ekstrak dioven pada suhu 40°C selama 3 hari hingga diperoleh ekstrak yang pekat.

Hasil uji fitokimia menggunakan proses ekstraksi dan pelarut yang sama menurut (Herlina, 2010), menunjukkan bahwa kandungan ekstrak tanaman pegagan (*Centella asiatica*) terbanyak yaitu adalah senyawa triterpenoid. Hal ini bisa dilihat pada tabel 3 uji fitokimia berikut :

Tabel 3 : Hasil uji fitokimia ekstrak pegagan (Herlina, 2010)

No	Metabolit Sekunder	Hasil
1	Triterpenoid	++
2	Steroid	-
3	Alkaloid	-
4	Flavonoid	-
5	Saponin	+

Pembuatan pakan dengan campuran ekstrak dilakukan dengan cara menimbang ekstrak tanaman pegagan (*Centella asiatica* L.) dengan menggunakan timbangan digital sesuai dengan dosis yang digunakan pada masing-masing perlakuan. Ekstrak triterpenoid yang telah ditimbang kemudian dimasukkan kedalam sprayer (semprotan) dan dilarutkan dengan akuades. Kemudian ekstrak dihomogenkan dengan cara mengocoknya. Ekstrak yang telah dihomogenkan kemudian disemprotkan secara merata pada pakan yang telah ditimbang sesuai kebutuhan. Pakan yang sudah tercampur kemudian dikering anginkan sampai akuades menguap dan terbentuklah pakan dengan campuran ekstrak yang kering. Pakan dapat disimpan di dalam lemari pendingin dan dapat

langsung digunakan. Untuk diagram alir proses ekstraksi dan pembuatan pakan dapat dilihat pada lampiran 2.

3.3.4 Pemeliharaan Larva dan Pengambilan Data

Larva ikan guppy yang baru lahir sampai umur 2 bulan. Selama pemeliharaan awal, larva diberi pakan berupa cacing sutra (*Tubifex sp*) yang telah dicacah halus. Setelah larva berumur satu minggu, pemberian pakan dilakukan 2 kali sehari yaitu pada pagi dan sore hari secara adlibitum (sekenyang-kenyangnya) dengan menggunakan pakan berupa pelet yang telah dihaluskan dan cacing sutra (*Tubifex sp*).

Pengukuran kualitas air dilakukan yaitu pada saat pemijahan induk sampai dengan pemeliharaan larva. Parameter yang diukur yaitu : suhu, pH dan DO. Pergantian air dilakukan 3 hari sekali dengan melakukan penyiponan yaitu sebanyak 10-20% volume air untuk meminimalisir penumpukan sisah kotoran dan sisa pakan yang tidak termakan sehingga kualitas air tetap terjaga.

3.3.5 Metode Identifikasi Kelamin

Metode identifikasi kelamin dilakukan dengan 2 cara yaitu dengan pengamatan visual morfologi ikan dan menggunakan pengamatan gonad dengan pewarnaan asetokarmin kemudian diamati dibawah mikroskop. Pengamatan gonad metode asetokarmin dilakukan dengan cara memotong bagian tubuh ikan batas sirip ventral sampai anal. Hal ini dilakukan agar pengambilan gonad ikan dapat dilakukan dengan mudah. Selanjutnya isi perut diangkat sehingga gonad dapat terlihat. Gonad muda umumnya berwarna putih kelabu dan seperti lamak.

Gonad yang telah diangkat kemudian diletakkan pada gelas obyek dan diberi larutan asetokarmin sebanyak 1 tetes. Selanjutnya gonad dicincang dengan pisau skapel sampai halus. Preparat ditutup menggunakan cover glass dan diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 4x10x10 kali.

3.4 Parameter Uji

3.4.1 Parameter Utama

a. Persentase Ikan Guppi Berkelamin Jantan

Perhitungan jumlah persentase jenis kelamin jantan dilakukan untuk mengetahui tingkat keberhasilan penggunaan ekstrak triterpenoid dalam maskulinisasi ikan guppi. Perhitungan persentase ikan berjenis kelamin jantan menurut Zairin (2002), menggunakan rumus :

$$\text{Jantan (\%)} = \frac{\text{Jumlah individu berkelamin jantan}}{\text{Jumlah individu total}} \times 100\%$$

b. Survival Rate (SR) Ikan Guppi

Survival Rate (SR) adalah perbandingan jumlah ikan yang hidup dengan jumlah ikan pada awal pemeliharaan. *Survival Rate* (SR) atau kelulushidupan menurut Zairin (2002), dapat dihitung menggunakan rumus ;

$$\text{Kelulushidupan (\%)} = \frac{\text{Jumlah ikan yang hidup}}{\text{Jumlah ikan awal pemeliharaan}} \times 100\%$$

3.4.2 Parameter Panunjang

Parameter penunjang dalam penelitian ini adalah hasil identifikasi jenis kelamin ikan guppi secara morfologi, histologi gonad serta parameter kualitas air. Parameter kualitas air selama penelitian meliputi suhu, Do dan pH. Dilakukan pada saat perkawinan induk sampai dengan melahirkan serta pemeliharaan larva dengan menggunakan thermometer, DO meter dan pH meter yang dilaksanakan pada pagi hari sebelum pemberian makan.

3.5 Pengujian Hasil

Untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap respon parameter yang diukur dengan uji keragaman atau uji F. Apabila Uji F berbeda nyata atau sangat

nyata, maka dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) untuk menentukan perlakuan yang memberikan respon terbaik pada taraf 0,05 (derajat kepercayaan 95%). Uji polinomial orthogonal digunakan untuk menentukan jumlah dosis ekstrak terbaik yang dapat disarankan dalam sex reversal ikan guppy (*Poecilia reticulata*) menggunakan ekstrak triterpenoid tanaman pegagan (*Centella asiatica* L.).

