

### 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Materi Penelitian

##### 3.1.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Alat-alat Penelitian

No	Nama Alat	Kegunaan
1	Akuarium ukuran 110x50x50 cm <sup>3</sup>	Pemeliharaan induk ikan Rainbow Boesemani ( <i>M. boesemani</i> )
2	Akuarium ukuran 50x30x30 cm <sup>3</sup>	Wadah pemijahan induk ikan Rainbow Boesemani ( <i>M. boesemani</i> )
3	Bak fiber	Inkubasi telur
4	Tali raffia	Pembuatan substrat untuk melekatnya telur
5	Gelas ukur	Mengukur air untuk perendaman telur
6	Plastik ukuran 5 kg	Untuk wadah packing perendaman telur yang diberi perlakuan
7	Oven	Mengeringkan testis sapi
8	Pisau	Mengiris testis sapi
9	Loyang	Wadah testis sapi yang di oven
10	Aerator set	Suplai oksigen untuk pemeliharaan induk dan larva
11	Karet Gelang	Mengikat plastik untuk perendaman telur
12	Thermometer	Mengontrol suhu agar terus stabil
13	Seser	Memindahkan induk dari akuarium pemeliharaan ke akuarium pemijahan
14	Sectio set	Membedah larva
15	Sentrifuge	Sentrifugasi testis sapi
16	Falkon 15cc	Wadah ekstrak testis sapi
17	Blender	Menghaluskan testis sapi setelah di oven
18	Ayakan	Mengayak testis sapi yang sudah di blender
19	Kabel rol	Menghubungkan saluran listrik
20	Handphone	Dokumentasi kegiatan
21	Timbangan Analitik	Menimbang berat tepung testis sapi
22	Mikroskop	Mengamati gonad larva dan telur
23	Objek Glass	Objek larva yang akan diamati
24	Cover Glass	Menutup objek glass
25	Pipet Tetes	Mengambil larutan skala kecil
26	Selang Kecil	Menyifon akuarium
27	Kulkas	Menyimpan cacing darah
28	Nampan	Tempat menyimpan alat dan bahan
29	DO Meter	Mengukur kandungan oksigen terlarut
30	pH Meter	Mengukur kandungan pH
31	Tabung Oksigen	Suplai oksigen pada saat packing
32	Alat Tulis	Untuk menulis label perlakuan

### 3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Bahan Penelitian

No	Nama Bahan	Kegunaan
1	Ikan Rainbow Boesemani	Indukan yang akan dipijahkan
2	Testis sapi	Bahan utama pembuatan ekstrak testis sapi
3	Tissu	Membersihkan alat dan bahan yang telah digunakan
4	Cacing darah	Pakan indukan
5	Artemia	Pakan alami untuk larva ikan Rainbow Boesemani ( <i>M. boesemani</i> )
6	Telur ikan Rainbow Boesemani	Objek yang diamati embryogenesis dan diberi perlakuan perendaman ekstrak testis sapi
7	Alkohol 40%	Bahan pelarut dalam pembuatan ekstrak testis sapi
8	Aquades	Sebagai pengencer alkohol
9	Alumunium foil	Membungkus Loyang didalam oven
10	Larutan Asetokarmin	Pewarna untuk mengidentifikasi ginad larva ikan Rainbow Boesemani ( <i>M. boesemani</i> )
11	Kertas Label	Memberi label pada tiap perlakuan
12	Pellet	Pakan tambahan untuk ikan Rainbow Boesemani ( <i>M. boesemani</i> )
13	Air Tawar	Sebagai media hidup ikan Rainbow Boesemani ( <i>M. boesemani</i> )
14	Spons	Untuk mencuci alat
15	Sabun Cuci	Untuk mencuci alat
16	Ekstrak Testis Sapi	Bahan untuk pembuatan hormon methyl testosterone alami

### 3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian adalah cara berpikir dan menguraikan suatu metode yang sesuai dan tepat untuk menuntun peneliti dalam menjawab masalah yang dirumuskannya. Sehingga peneliti harus mampu menjelaskan unsur metode yang merupakan metode pengumpulan data dan analisis data. Penerapan metode penelitian harus memperhatikan alat, bahan dan model penelitian yang digunakan (Wibowo, 2011).

Metode yang digunakan adalah metode eksperimen, karena bertujuan untuk mengetahui pengaruh perendaman telur pada ekstrak testis sapi terhadap maskulinisasi ikan Rainbow Boesemani (*M. boesemani*) dalam lingkungan

terkontrol. Menurut Wibisono (2013), menyatakan bahwa penelitian dengan menggunakan metode eksperimen adalah suatu penelitian yang dilakukan sengaja memberikan suatu perlakuan terhadap objek penelitian kemudian diteliti bagaimana akibat dari perlakuan yang diberikan. Pada metode ini memungkinkan peneliti untuk dimudahkan untuk mendapat data yang sesuai dengan yang dibutuhkan karena peneliti dapat mengontrol variabel-variabel yang relevan.

### 3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Menurut Novianti *et al.* (2014), RAL merupakan rancangan penelitian yang paling sederhana dengan bahan yang homogen dan perlakuan terbatas. Keuntungan menggunakan RAL yaitu denah perancangan lebih mudah, analisis statistik terhadap subjek percobaan sangat sederhana, fleksibel dalam penggunaan jumlah perlakuan dan jumlah ulangan, apabila terjadi kehilangan informasi, kemungkinan relatif sedikit dalam hal data hilang dibandingkan dengan rancangan lainnya. Penggunaan rancangan acak lengkap (RAL) akan tepat bila bahan percobaan homogen atau relatif homogen dan jumlah perlakuannya terbatas.

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari 4 perlakuan dan 3 kali ulangan. Empat perlakuan perendaman telur menggunakan ekstrak testis sapi diamati pengaruhnya terhadap maskulinisasi ikan Rainbow Boesemani (*M. boesemani*). Masing - masing perlakuan diberi ulangan sebanyak tiga kali dan ditempatkan secara acak seperti denah penelitian seperti Gambar 5 di bawah ini:

<b>C1</b>	<b>B3</b>	<b>A3</b>	<b>D3</b>
<b>A2</b>	<b>D1</b>	<b>C2</b>	<b>B1</b>
<b>B2</b>	<b>A1</b>	<b>C3</b>	<b>D2</b>

Gambar 5. Denah Penempatan Akuarium Penelitian

## Denah Penempatan Akuarium Penelitian

Keterangan:

A : Kontrol

B : Perlakuan perendaman larva dengan waktu 4 jam

C : Perlakuan perendaman larva dengan waktu 8 jam

D : Perlakuan perendaman larva dengan waktu 12 jam

1, 2, 3 : Ulangan

### 3.4 Prosedur Penelitian

#### 3.4.1 Aklimatisasi Indukan Rainbow Boesemani (*M. boesemani*)

Aklimatisasi yang dilakukan pertama adalah menyiapkan wadah pemeliharaan berupa akuarium dengan dimensi ukuran 100 x 50 x 60 cm. Penggunaan akuarium yang relatif besar dengan tujuan agar fluktuasi suhu yang tinggi dapat dihindari karena banyaknya jumlah volume air. Akuarium tersebut kemudian dibersihkan terlebih dahulu dengan air tawar bersih setelah bersih baru diisi air dengan ketinggian 40 cm. Akuarium yang telah berisi air, selanjutnya diberi filter air untuk menjaga kebersihan akuarium agar tidak cepat keruh dan memberi gerakan air agar mempermudah terjadinya difusi oksigen dan diberi *heater aquarium* 50 watt sebanyak lima buah dan di atur suhunya 30°C. Satu dari lima *heater* yang telah dipasang setiap tiga hari sekali dilepas, sehingga pada hari ke 15 akuarium tidak menggunakan *heater* sama sekali. Hal ini bertujuan agar ikan dapat menyesuaikan diri dengan lingkungan baru.

#### 3.4.2 Pemeliharaan Ikan Rainbow Boesemani (*M. boesemani*)

Pemeliharaan induk ikan pelangi meliputi pemberian pakan dua kali sehari. Pakan yang digunakan dalam pemeliharaan induk adalah pakan berupa cacing darah. Pakan diberikan pada pukul 08.00 WIB dan 15.00 WIB. Pakan diberikan secara rutin agar ikan tersebut mampu menghasilkan telur yang maksimal. Pakan

cacing darah sendiri untuk memicu agar ikan tersebut bisa matang gonad lebih cepat. Penyifonan atau pembersihan akuarium dari lumut, feses dan kotoran lain dilakukan setiap tiga hari sekali atau dilakukan dua kali dalam satu minggu, pembersihan menggunakan selah berukuran 0.5 dim dan metode yang digunakan adalah metode *running water*. Selain itu, pembersihan akuarium juga dilakukan dengan membersihkan kotoran yang menempel pada akuarium dengan cara menggosok dengan spons sampai kotoran tersebut bersih dan tidak lagi menempel pada akuarium. Air dibuang menggunakan selang sambil diisi air dengan metode *running*.

#### **3.4.3 Pemijahan Ikan Rainbow Boesemani (*M. boesemani*)**

Pemijahan dilakukan di dalam akuarium yang memiliki dimensi 50 x 30 x 30 cm yang diisi air dengan ketinggian 20 cm. Akuarium pemijahan dilengkapi dengan aerator yang menjamin adanya oksigen terlarut dalam air. Sebelum dipijahkan, ikan jantan dan betina dipasangkan selama tiga hari tanpa memberikan substrat untuk penempelan telur. Pemijahan dilakukan selama tiga malam dengan perbandingan antara jantan dan betina adalah 2:3. Setelah ikan dipasangkan selama tiga hari, kemudian ketinggian air dalam akuarium diturunkan menjadi 20 cm. Akuarium yang telah dikurangi ketinggian airnya kemudian di beri substrat berupa tali rafia di dalamnya berjumlah lima buah pada pukul 16.00 WIB. Ikan diawasi terus sepanjang malam untuk pengambilan telur yang baru saja dibuahi untuk selanjutnya diberikan perlakuan perendaman telur menggunakan ekstrak testis sapi.

Telur yang baru saja dikeluarkan oleh induk betina dan dibuahi oleh sperma induk jantan secepatnya untuk dikeluarkan dari akuarium pemijahan untuk selanjutnya diberikan perlakuan perendaman telur. Substrat yang berisi telur tersebut dimasukkan kedalam plastik packing yang sudah terisi oleh air tawar dan

diberi dengan ekstrak testis sapi kemudian diberi oksigen setelah itu diikat dengan karet gelang. Pemijahan ikan ini akan berakhir pada siang hari, jadi pada pukul 05.00 WIB substrat akan diangkat dan air kembali diisi dengan ketinggian 30 cm kembali.

#### **3.4.4 Pengamatan Embriogenesis Telur ikan Rainbow Boesemani (*M. boesemani*)**

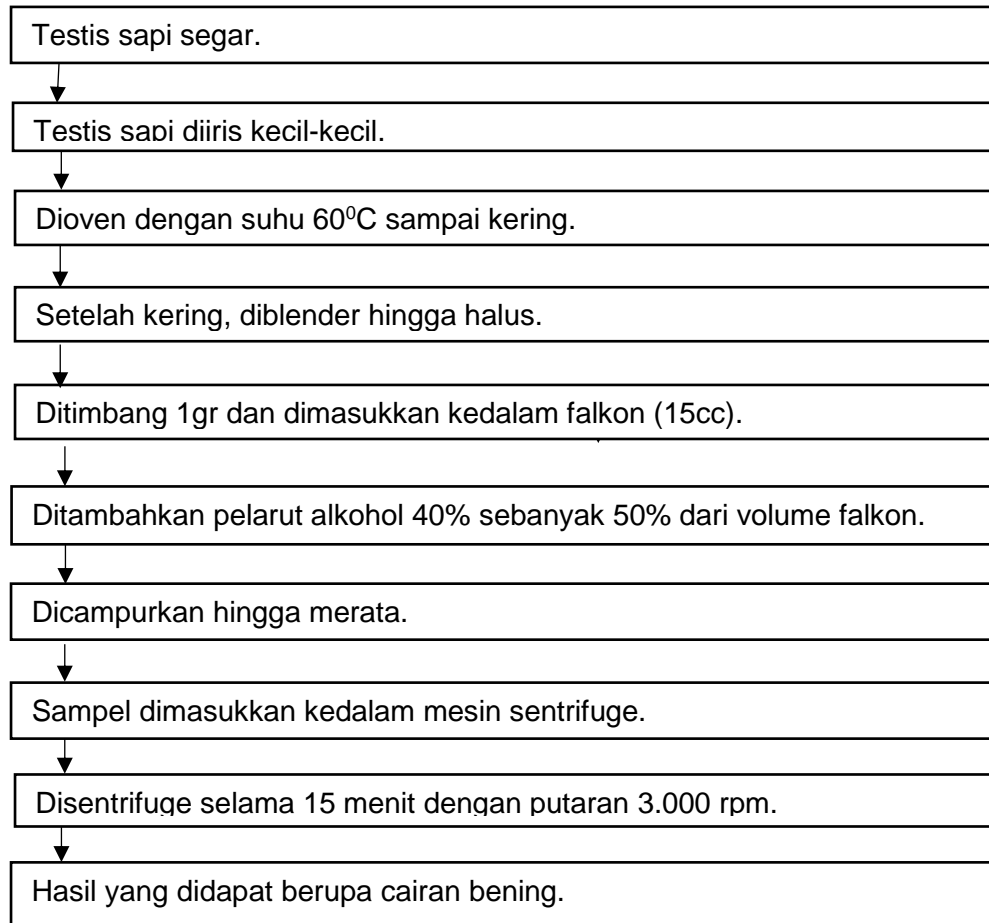
Pengamatan embriogenesis telur ikan dilakukan dari pertama telur diangkat sampai telur menetas. Pengamatan dilakukan pada setiap perlakuan yang dilakukan pada ikan (kontrol, 4 jam, 8 jam dan 12 jam). Pengamatan dilakukan dengan objek glass cekung di bawah mikroskop dengan perbesaran 40 dan 100 kali. Pengamatan dilakukan berdasarkan studi literatur untuk memastikan perkembangan telur yang sedang berlangsung sesuai dengan literatur yang sudah tersedia. Hasil dari pengamatan embriogenesis berguna untuk menentukan kapan dilakukan pemberian ekstrak testis sapi untuk perendaman telur ikan Rainbow.

#### **3.4.5 Pembuatan Ekstrak Testis Sapi**

Testis sapi yang digunakan adalah testis sapi yang masih segar. Testis sapi didapatkan dari rumah pemotongan hewan daerah Gadang, Kabupaten Malang. Hal pertama yang harus dilakukan setelah tersedia testis sapi yaitu mencuci testis sapi sampai bersih menggunakan air tawar bersih. Kemudian setelah testis sapi bersih, testis sapi diiris kecil-kecil menggunakan pisau. Irisan testis tersebut diletakkan diatas Loyang, kemudian dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 60°C, ditunggu hingga kering. Setelah kering, testis sapi diblender hingga halus menjadi bubuk. Setelah diblender, bubuk testis sapi tersebut diayak menggunakan saringan the yang kecil agar testis sapi yang digunakan benar-benar yang halus. Selanjutnya, ditambahkan pelarut berupa alkohol 40% sebanyak 50% dari total volume *falkon* yang akan digunakan. Bubuk testis dengan alkohol 40% dicampurkan hingga merata di dalam *falkon* kemudian disentrifuge

selama 15 menit dengan putaran 3.000 rpm. Setelah itu mendapatkan hasil ekstrak testis sapi berupa cairan yang terpisah dalam *falkon*.

Pembuatan ekstrak testis sapi pada penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 6.



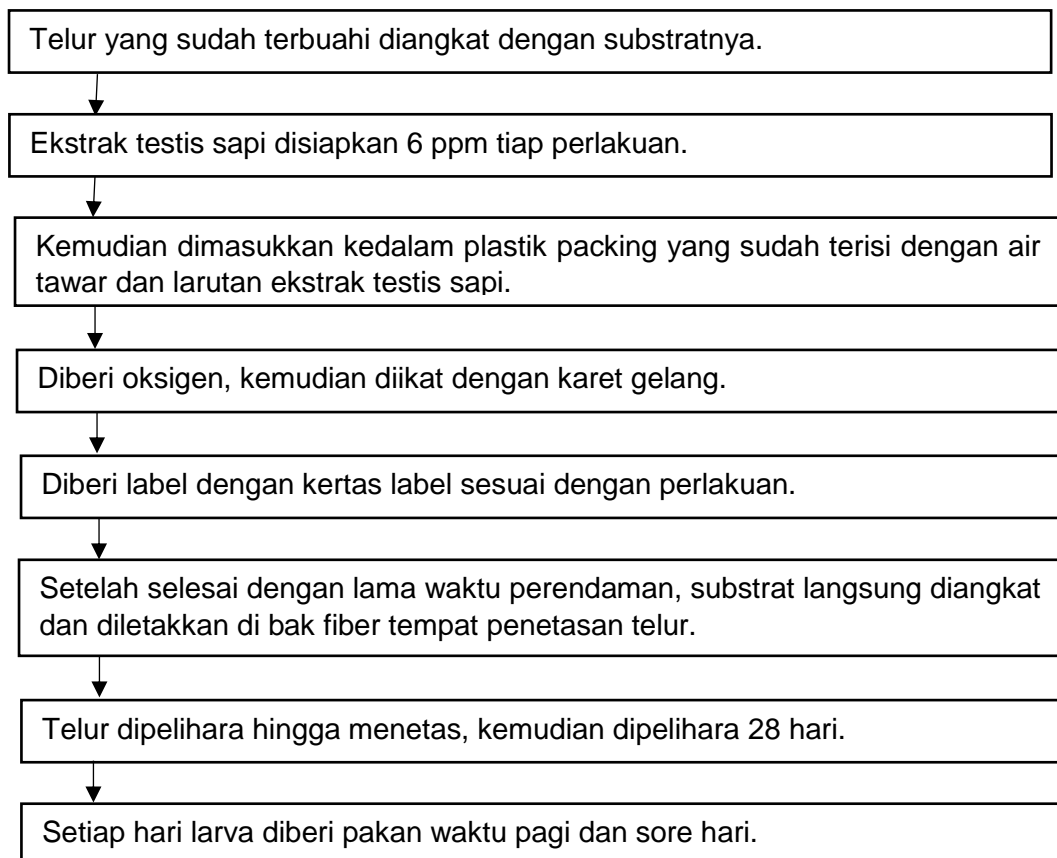
Gambar 6. Diagram Alur Pembuatan Ekstrak Testis Sapi

#### 3.4.6 Pemberian Perlakuan Perendaman Telur Menggunakan Ekstrak Testis Sapi

Telur yang telah dihasilkan dari proses pemijahan, langsung diambil dari akuarium beserta substrat yang digunakan berupa tali rafia. Telur yang telah diambil, kemudian substrat yang berisi telur tersebut langsung dimasukkan ke dalam plastik *packing* yang telah diberi ekstrak testis sapi yang sudah disesuaikan dosis ekstraknya pada tiap perlakuan. Perlakuan yang diberikan antara lain :

- 40 telur diberi perlakuan perendaman ekstrak testis dengan dosis 6 ppm (mg/l) setelah fertilisasi berlangsung selama 4 jam.
- 40 telur diberi perlakuan perendaman ekstrak testis dengan dosis 6 ppm (mg/l) setelah fertilisasi berlangsung selama 8 jam.
- 40 telur diberi perlakuan perendaman ekstrak testis dengan dosis 6 ppm (mg/l) setelah fertilisasi berlangsung selama 12 jam.
- 40 telur dengan perlakuan kontrol tidak diberi perlakuan tetapi tetap dipacking dan diberi oksigen.

Kemudian plastik packing tersebut diberi oksigen, kemudian plastik packing tersebut diikat dengan karet gelang. Plastik packing tersenut diberi kertas label dan diberi tulisan sesuai dengan perlakuan yang dilakukan. Kemudian, telur yang telah diberi perlakuan perendaman ekstrak testis sapi diangkat apabila sudah mencapai jam yang ditentukan tiap perlakuan dan dipindahkan ke bak fiber inkubasi telur kemudian dipelihara hingga telur menetas. Pemberian perlakuan perendaman telur pada penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 7.

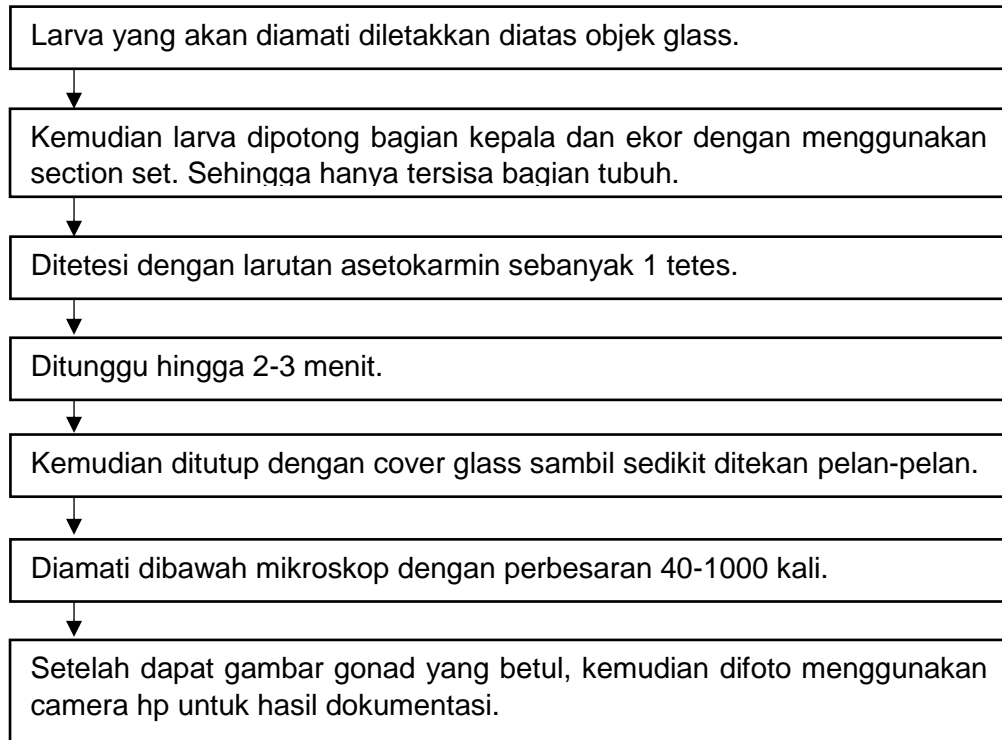


Gambar 7. Diagram Alur Pemberian Perlakuan Perendaman Telur



### 3.4.7 Uji Gonad

Uji gonad pada ikan Rainbow Boesemani (*M. boesemani*) pada penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Uji Gonad Ikan

Larva yang akan dilihat gonadnya pertama yaitu diambil menggunakan seser dari tempat pemeliharaan yaitu bak fiber. Kemudian setelah larva sudah terangkat semua ditauh di akuarium kecil diberi air sedikit. Setelah itu larva tersebut ditimbang untuk mengetahui bobot akhir larva untuk mendapatkan hasil *growth rate*, ditimbang menggunakan timbangan analitik. Setelah ditimbang, siapkan alat dan bahan untuk uji gonad. Pertama yaitu larva dipotong bagian kepala dan ekornya sehingga tersisa bagian tubuhnya. Kemudian bagian tubuhnya diletakkan pada objek glass, setelah itu ditetesi larutan pewarna asetokarmin menggunakan spuit sebanyak 1 tetes, lalu ditutup dengan cover glass sambil sedikit ditekan dengan tujuan agar bagian tubuh ikan tersebut mudah diamati. Kemudian ditunggu selama 2 – 3 menit. Setelah itu diamati

dibawah mikroskop binokuler dengan perbesaran 40 – 1000 kali. Hasilnya difoto dengan menggunakan kamera hp untuk hasil dokumentasi.

### 3.5 Parameter Uji

#### 3.5.1 Parameter Utama

Parameter utama yang diamati dalam penelitian ini adalah persentase kelamin jantan, HR (*Hatching Rate*) dan SR (*Survival Rate*) pada ikan Rainbow Boesemani (*M. boesemani*) hasil dari perendaman telur dengan menggunakan hormone methyl testosterone alami ekstrak testis sapi. Perhitungan daya tetas dilakukan dengan menggunakan rumus menurut Effendie (1997), yaitu:

$$HR (\%) = \frac{\text{jumlah telur yang menetas}}{\text{jumlah total telur}} \times 100\%$$

Perhitungan tingkat kelulushidupan larva menggunakan pengamatan secara langsung kemudian dicatat hasilnya dan dihitung menggunakan rumus menurut Huisman (1987), yaitu:

$$SR (\%) = \frac{\text{jumlah ikan pada akhir pemeliharaan}}{\text{jumlah ikan pada awal pemeliharaan}} \times 100\%$$

#### 3.5.2 Parameter Penunjang

Pada penelitian ini terdapat empat parameter penunjang yang diamati yaitu pengamatan terhadap kualitas air media budidaya meliputi suhu, pH, dan DO. Parameter lainnya yang diamati adalah perhitungan GR (*Growth Rate*). Pengukuran suhu dilakukan menggunakan Thermometer, pengukuran pH menggunakan pH meter, dan pengukuran DO menggunakan DO meter.

### 3.6 Analisis Data

Data yang didapat dari penelitian ini telah dianalisa pengaruhnya pada masing-masing perlakuan dengan menggunakan analisis keragaman atau uji F. Apabila nilai F hitung berbeda nyata atau sangat nyata, maka analisa akan dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) untuk menentukan perlakuan yang memberikan respon terbaik dengan derajat kepercayaan 5% dan 1%. Untuk mengetahui hubungan antarperlakuan dan hasil, maka digunakan analisa regresi uji polynomial orthogonal.