

3. METODE PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan Penelitian

3.1.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *heater aquarium* 75 watt, akuarium pemijahan ukuran 50 x 30 x 30 cm, akuarium pemeliharaan induk berukuran 120 x 50 x 50 cm, akuarium pemeliharaan larva berukuran 120 x 40 x 15 cm, thermometer akuarium, pH meter, DO meter, pipet tetes, mikroskop, kamera, aerator set, nampan, timbangan analitik, toples, kulkas, alat tulis, rak akuarium, seser, substrat penempelan telur ikan, sectio set, hand tally counter, hot plate, cawan petri, beaker glas, pompa air, kabel roll dan objek glass.

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain indukan ikan rainbow praecox (*M. praecox*) yang didapatkan dari petani ikan di kota Tangerang Selatan, pakan alami berupa artemia, cacing darah beku, telur ikan rainbow, kertas label, asam asetat, KCl, etanol absolut, giemsa, kholkisin, akuades, pellet dan es batu.

3.2 Media Penelitian

Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah akuarium yang berukuran 50 x 30 x 30 cm yang berisi air tawar berjumlah lima buah untuk pemijahan indukan ikan rainbow dan tiga buah akuarium berukuran 120 x 50 x 50 cm untuk tempat pemeliharaan indukan. Kemudian dibutuhkan toples ukuran 15 liter untuk inkubasi telur yang sudah diberikan perlakuan kejutan suhu dingin. Toples ukuran 4 liter yang digunakan untuk pemberian perlakuan kejutan suhu dingin diberi thermometer agar dapat menyesuaikan suhu dingin yang diinginkan, sedangkan akuarium untuk pembesaran larva berukuran 120 x 40 x 15 cm dengan

masing-masing tempat adalah 20 x 10 x 15 cm. Air yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari sumur dan ditampung pada tandon air yang ada di Laboratorium Budidaya divisi Reproduksi Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang. Sedangkan untuk pengecekan jumlah kromosom ikan yang diberi perlakuan, dilakukan di Laboratorium Unit Pelaksana Teknis Budidaya Ikan Air Tawar Sumber Pasir Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Malang.

3.3 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini yaitu metode deskriptif dan eksperimen. Budiarto (2002), menyebutkan bahwa penelitian deskriptif merupakan penelitian pendahuluan dari penelitian yang lebih lanjut yaitu studi analitik atau studi eksperimen karena dari penelitian deskriptif akan dihasilkan hipotesis. Hartanto (2003), menjelaskan bahwa dasar penelitian eksperimen adalah menguji hubungan satu sebab (*cause*) dan akibat (*effect*). Sistem yang digunakan dalam pengujian yaitu tertutup dengan kondisi terkontrol. Rancangan penelitian ini berguna untuk mendapatkan informasi yang relevan.

3.4 Rancangan Percobaan Penelitian

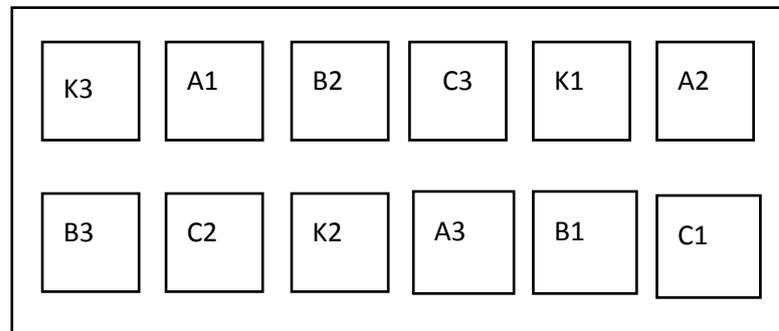
Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Menurut Novianti *et al.* (2014), Rancangan Acak Lengkap (RAL) merupakan rancangan penelitian yang paling sederhana dengan bahan yang homogen dan perlakuan terbatas. Keuntungan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yaitu denah untuk perancangan percobaan lebih mudah, analisis statistik terhadap subjek percobaan sangat sederhana, fleksibel dalam penggunaan jumlah perlakuan dan jumlah ulangan, kehilangan informasi relatif sedikit dalam hal data hilang dibandingkan dengan rancangan lain (Christina *et al.*, 2016).

Alasan yang menjadi dasar dari penelitian ini adalah penulis ingin melakukan rekayasa genetik dengan perlakuan triploidisasi menggunakan pemberian kejutan suhu dingin terhadap telur ikan rainbow praecox beberapa saat setelah terjadi pembuahan. Pada penelitian ini kejutan suhu dingin dilakukan setelah pembuahan alami, karena ikan rainbow praecox tidak bisa untuk distripping. Pemberian kejutan suhu dingin dilakukan dengan dasar sebelum terbentuknya kutub anima pada telur, sehingga dapat disimpulkan badan polar belum meninggalkan sel telur yang baru saja dibuahi, sedangkan untuk pemilihan suhu kejutan 3, 4 dan 5⁰C karena pada suhu 4⁰C terjadi denaturasi protein pada telur yang akan mengakibatkan lapisan korion telur akan sedikit mengeras dan terjadi kegagalan peloncatan badan polar II. Pada suhu 4⁰C juga dapat mempengaruhi pembelahan sel pada telur ikan yang diakibatkan rusaknya protein-protein pada sitoplasma telur. Suhu 3 dan 5⁰C dipilih karena suhu tersebut satu derajat di atas dan di bawah suhu yang dapat mendenaturasi protein. Lama kejutan suhu yang dipilih adalah selama 90 detik, hal ini diambil dari hasil penelitian pendahuluan. Pada lama waktu ini didapati hasil daya tetas telur yang paling tinggi jika dibandingkan dengan lama kejutan suhu selama 120 dan 150 detik, sehingga lama kejutan suhu selama 90 detik dipilih untuk meningkatkan telur yang menetas dengan tujuan untuk meningkatkan ketelitian dengan adanya telur yang berhasil menetas lebih banyak.

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian pengaruh pemberian kejutan suhu dingin berbeda terhadap usaha triploidisasi ikan rainbow praecox (*M. praecox*) terdiri dari empat perlakuan dan dari setiap perlakuan ditempatkan secara acak yang dapat dilihat pada Gambar 2. Dari masing-masing perlakuan diberi ulangan sebanyak tiga kali, yaitu:

- K : Perlakuan kontrol, yaitu penetasan telur ikan secara normal (biasa)
- A : Perlakuan kejutan suhu dingin 3⁰C pada telur terfertilisasi selama 90 detik

- B : Perlakuan kejutan suhu dingin 4°C pada telur terfertilisasi selama 90 detik
- C : Perlakuan kejutan suhu dingin 5°C pada telur terfertilisasi selama 90 detik

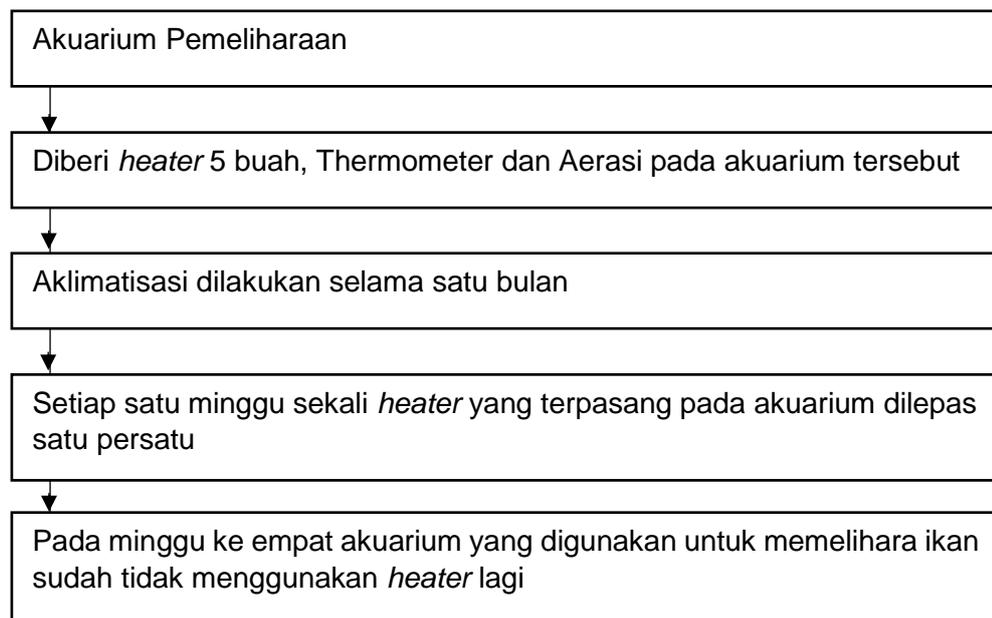


Gambar 1. Denah Percobaan

Keterangan : (K-C) Perlakuan, (1-3) = Ulangan

3.5 Prosedur Penelitian

a. Aklimatisasi Indukan Rainbow Praecox

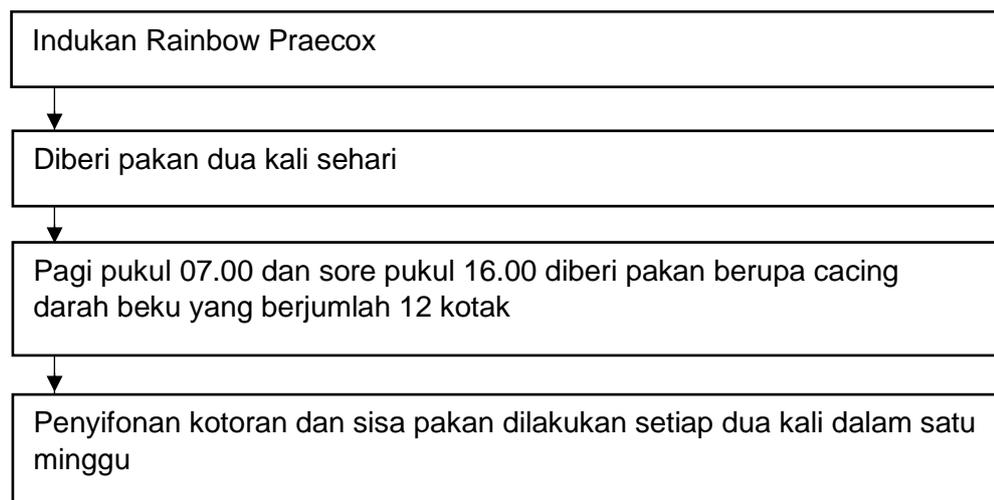


Gambar 2. Diagram Alur Aklimatisasi Indukan Rainbow Praecox

- Aklimatisasi yang dilakukan pertama adalah menyiapkan wadah pemeliharaan berupa akuarium dengan dimensi 120 x 50 x 50 cm. Penggunaan akuarium yang relatif besar dengan tujuan agar fluktuasi suhu yang tinggi dapat dihindari karena banyaknya jumlah volume air.

- Akuarium untuk indukan rainbow praecox tersebut kemudian dibersihkan dan diisi air dengan ketinggian 40 cm.
- Akuarium yang telah berisi air, selanjutnya diberi filter air untuk menjaga kebersihan akuarium dan memberi gerakan air agar mempermudah terjadinya difusi oksigen dan diberi *heater aquarium* 75 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.

b. Pemeliharaan Induk Rainbow Praecox

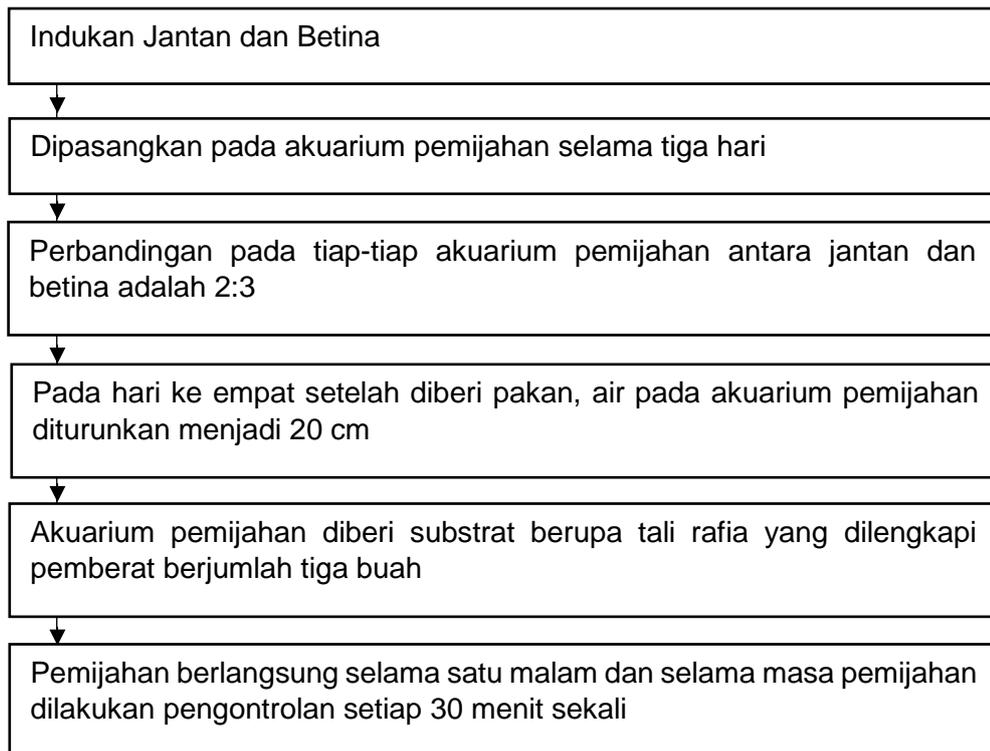


Gambar 3. Diagram Alur Pemeliharaan Indukan Rainbow Praecox

- Pemeliharaan induk ikan rainbow meliputi pemberian pakan dua kali sehari. Induk ikan pelangi pertama kali diberi pakan pada pukul 07.00 dan pemberian pakan pada induk ikan rainbow selanjutnya dilakukan pada pukul 16.00 WIB.
- Pakan yang digunakan dalam pemeliharaan induk adalah pakan berupa cacing darah. Induk ikan rainbow praecox diberikan pakan sehari dua kali pada pagi jam 07.00 dan sore hari pukul 16.00 WIB.

- 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*.

c. Pemijahan Ikan Rainbow Praecox

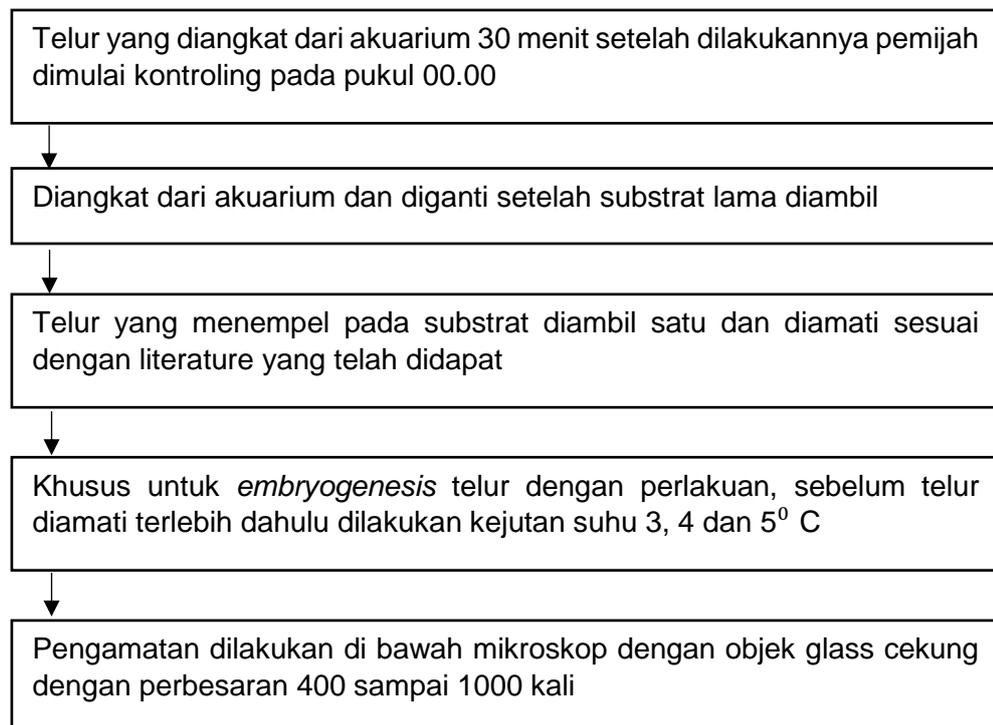


Gambar 4. Diagram Alur Pemijahan Induk Ikan Rainbow Praecox

- Pemijahan ikan rainbow praecox dilakukan di dalam akuarium yang memiliki ukuran 50 x 30 x 30 cm yang diisi air dengan ketinggian 40 cm.
- Akuarium pemijahan dilengkapi dengan airator yang menjamin adanya oksigen terlarut dalam air.
- Sebelum dipijahkan, ikan jantan dan betina dipasangkan selama tiga hari.
- 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 digunakan dalam pemijahan ikan rainbow praecox 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 kejutan suhu.
- Telur yang baru saja dikeluarkan oleh induk betina dan dibuahi oleh sperma induk jantan secepatnya dikeluarkan dari perairan untuk selanjutnya diberikan perlakuan suhu.
- Pemijahan ikan ini akan berakhir pada siang hari, jadi pada pukul 05.00 WIB substrat akan diangkat dan air kembali diisi dengan ketinggian 40 cm kembali.

d. Pengamatan Embriogenesis Telur Ikan Rainbow

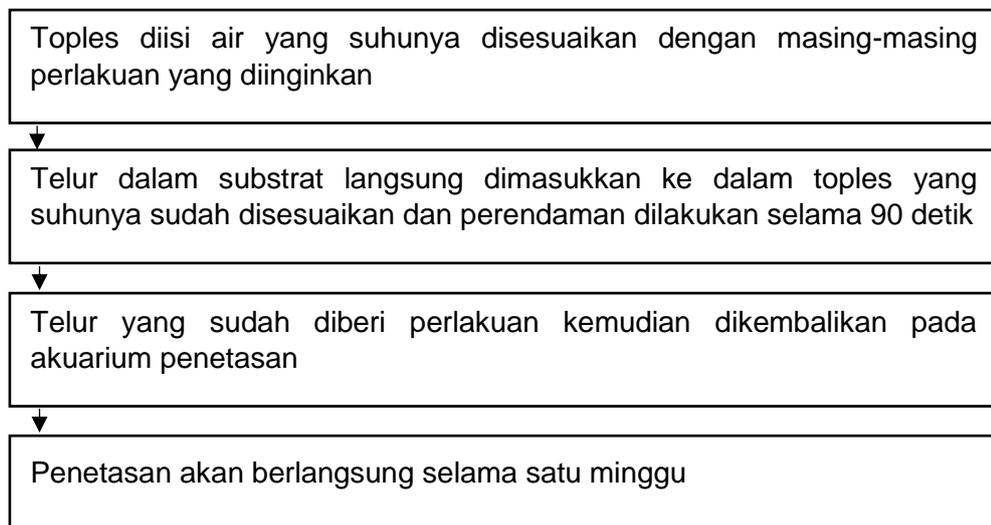


Gambar 5. Diagram Alur Pengamatan Embriogenesis Telur Ikan Rainbow Praecox

- Pengamatan embriogenesis telur ikan rainbow praecox dilakukan dari pertama telur diangkat sampai telur menetas.

- Pengamatan dilakukan dengan objek glass cekung di bawah mikroskop dengan perbesaran 400 dan 1000 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 kejutan suhu yang tepat untuk membuat usaha triploidisasi ikan ini berhasil.

e. Pemberian Perlakuan Kejut Suhu Terhadap Telur yang Baru Dibuahi

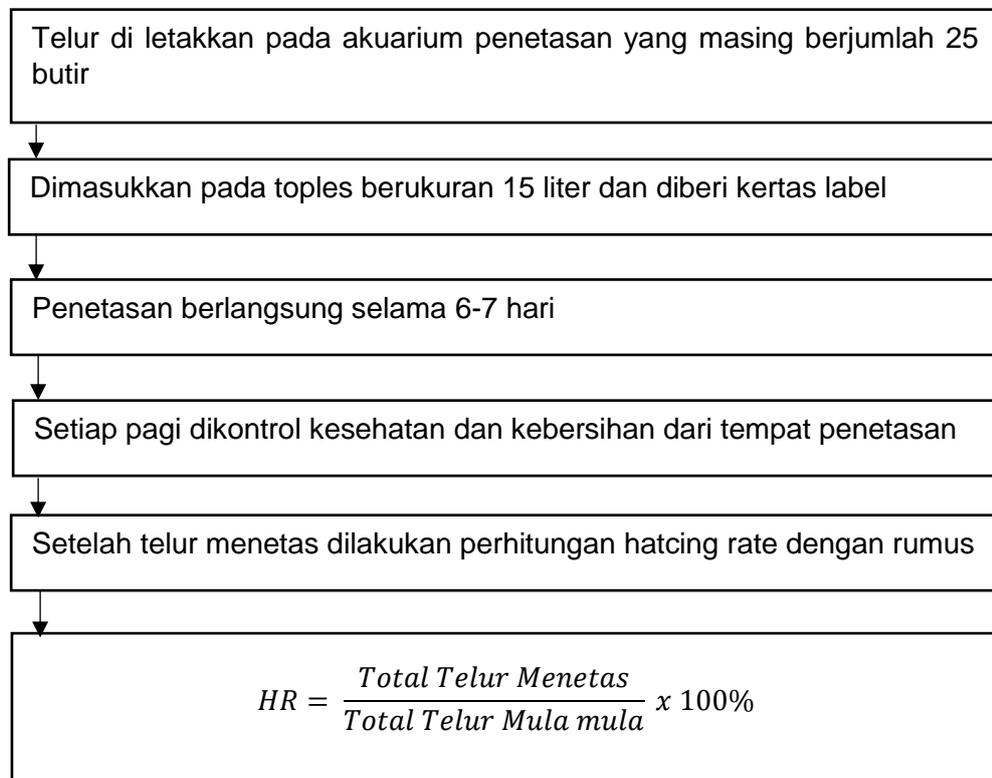


Gambar 6. Diagram Alur Pemberian Kejutan Suhu Dingin

- Pemberian kejutan suhu dilakukan menggunakan toples yang diberi es yang dilengkapi dengan termometer untuk dapat melihat suhu agar sesuai dengan perlakuan yang diinginkan.
- Perendaman dilakukan dengan cara mengambil substrat yang telah berisi telur dan direndam beserta substratnya.
- Kejutan suhu yang digunakan untuk perendaman telur yang baru dibuahi adalah 3, 4 dan 5° C dan dilakukan selama 90 detik.
- Setelah perendaman selesai, telur yang telah diberi perlakuan dikembalikan ke dalam akuarium penetasan dengan suhu air yang normal.

- Jika telur yang telah diberi kejutan suhu berhasil menetas, selanjutnya larva ikan rainbow praecox bisa dipelihara sampai menjadi dewasa.

f. Penetasan Telur

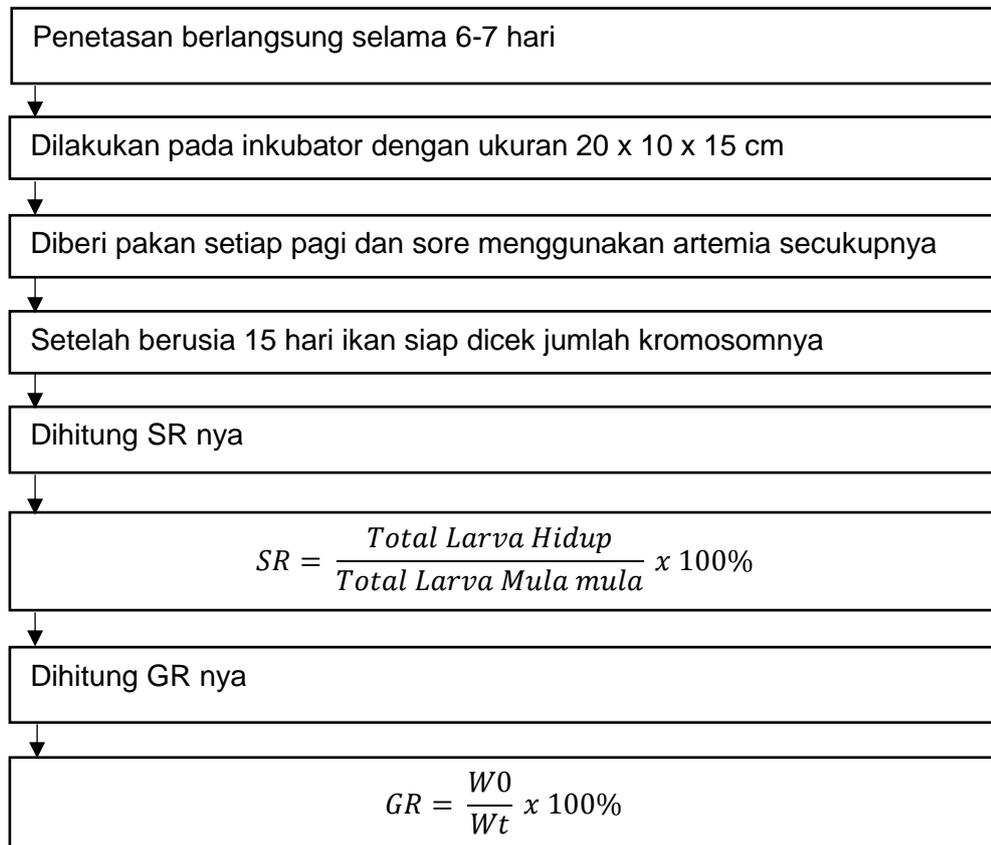


Gambar 7. Diagram Alur Penetasan Telur Ikan Rainbow Praecox

- Penetasan telur ikan rainbow praecox selama enam hari terhitung dari hari pertama kali telur dibuahi.
- Selama masa penetasan telur setiap hari perkembangan telur diamati dan dihitung telur yang mati.
- Penetasan telur dilakukan di akuarium yang berbeda dari akuarium pemijahan jadi telur yang dihasilkan induk kemudian dipindahkan dari wadah pemijahan dan induk tetap dibiarkan dalam akuarium pemijahan.
- Tempat penetasan telur ikan rainbow praecox yang digunakan adalah toples berukuran 15 liter.
- Setiap wadah penetasan telur ikan rainbow praecox diberi telur yang berjumlah 25 butir telur.

- Selama masa penetasan telur setiap harinya diamati, untuk menghitung jumlah telur yang sehat dan mati, serta untuk menentukan jumlah *hatching rate* telur yang didapat.

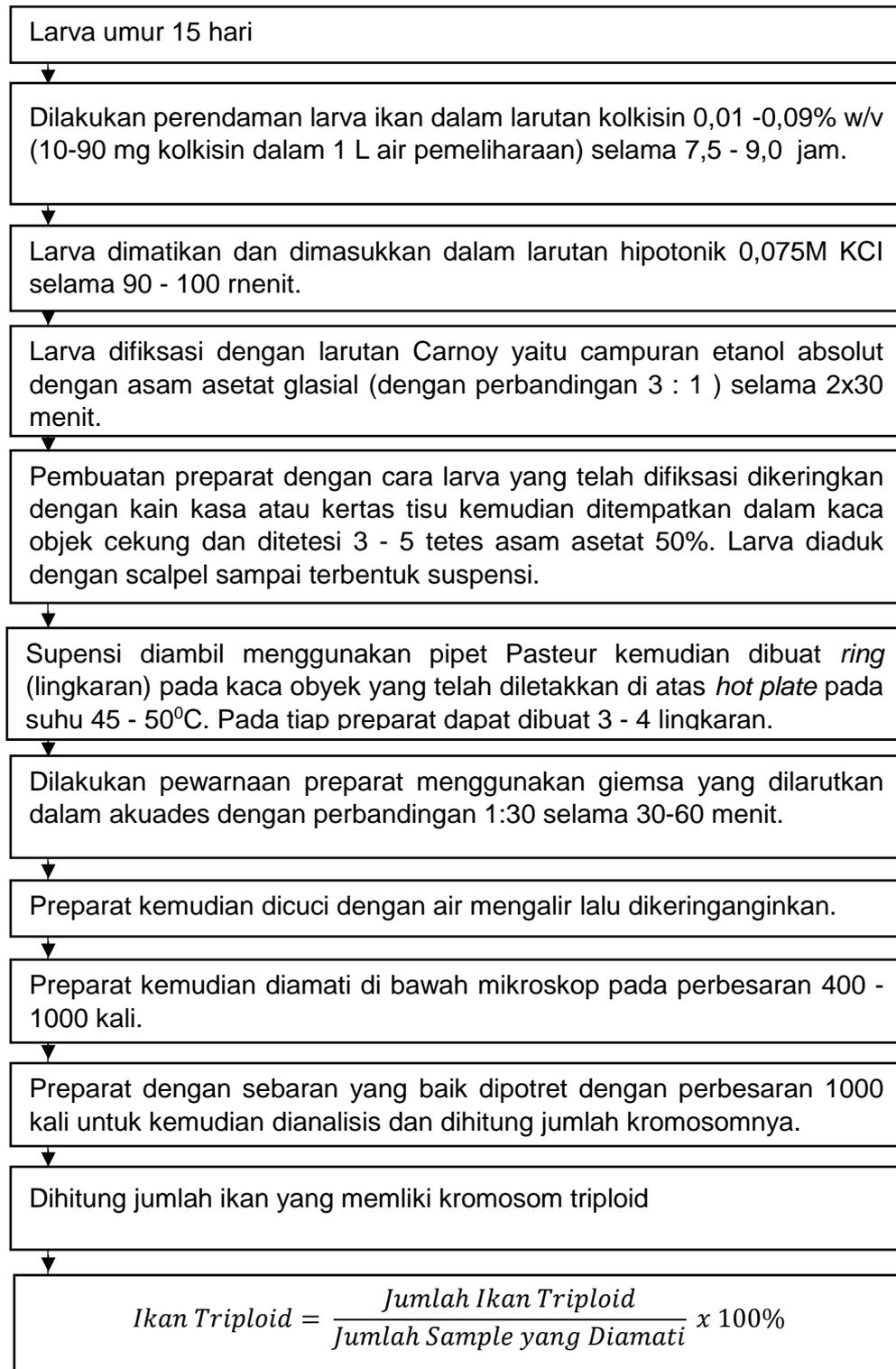
g. Pemeliharaan Larva



Gambar 8. Diagram Alur Pemeliharaan Larva Ikan Rainbow Praecox

- Pemeliharaan larva dilakukan menggunakan inkubator yang memiliki resirkulasi air dengan ukuran tempat adalah 20 x 10 x 15 cm.
- Bak pemeliharaan dilengkapi dengan thermometer akuarium yang berfungsi sebagai pengontrol suhu.
- Diberi pakan setiap pagi dan sore menggunakan artemia sebanyak 50 ml.
- Pemeliharaan larva ikan rainbow praecox selama 15 hari dan siap untuk diamati jumlah kromosomnya.
- Sebelum larva ikan rainbow praecox dilakukan uji kromosom ikan terlebih dulu dihitung *survival rate* dan *growth rate*.

h. Uji Jumlah Kromosom



Gambar 9. Diagram Alur Pembuatan Preparat Pada Uji Jumlah Kromosom

- Larva yang telah diamati morfometri dan juga ciri-ciri fisiknya selanjutnya akan dilakukan uji jumlah kromosom di bawah mikroskop.

- Persiapan Jaringan dengan cara sejumlah larva ikan berumur 10-30 hari direndam dalam larutan kolkisin 0,07-0,09% w/v (70 -90 mg kolkisin dalam 1 L air pemeliharaan) selama 7,5-9,0 jam.
- Larva kemudian dimatikan dan dimasukkan dalam larutan hipotonik 0,075M KCl selama 90-100 menit.
- Larva kemudian difiksasi dengan larutan Carnoy yaitu campuran etanol absolut dengan asam asetat glasial (dengan perbandingan 3:1) selama 2x30 menit.
- Pembuatan Preparat yaitu dengan cara larva yang telah difiksasi dikeringkan dengan kain kasa atau kertas tisu kemudian ditempatkan dalam kaca objek cekung dan ditetesi 3 – 5 tetes asam asetat 50%. Larva diaduk dengan scalpel sampai terbentuk suspensi.
- Suspensi diambil menggunakan pipet Pasteur kemudian dibuat ring (lingkaran) pada kaca obyek yang telah diletakkan di atas *hot plate* pada suhu 45 – 50°C.
- Pembuatan lingkaran dilakukan dengan cara mengeluarkan suspensi, lalu dihisap kembali.
- Pada tiap preparat dapat dibuat 3 – 4 lingkaran dan setiap sampel suspensi dapat dibuat 4 – 5 buah preparat.
- Pewarnaan preparat menggunakan giemsa yang dilarutkan dalam aquades dengan perbandingan 1:30, selama 30-60 menit.
- Preparat kemudian dicuci dengan air mengalir lalu dikeringanginkan. Hasilnya diamati di bawah mikroskop pada perbesaran 400-1000 kali.
- Preparat dengan sebaran yang baik dipotret dengan perbesaran 1000 kali untuk kemudian dihitung jumlah kromosomnya dan dicatat untuk mendapatkan hasil serta dapat ditarik kesimpulan.

3.6 Parameter Uji

3.6.1 Parameter Utama

Parameter utama yang diamati dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

A. Embriogenesis telur ikan rainbow praecox (*M. praecox*)

Pengamatan perkembangan embrio ikan pelangi diperlukan untuk mengetahui kapan sebaiknya dilakukan kejutan suhu. Menurut Nurasni (2012), untuk membentuk individu triploid kejutan yang pas adalah ketika telur mengalami perkembangan meiosis dua yaitu sebelum keluarnya badan polar kedua dari dalam sel telur yang telah terbuahi.

B. Jumlah ikan yang memiliki jumlah kromosom triploid (persentase)

Induksi ikan triploid ditentukan dengan jumlah kromosom yang berasal dari 5 individu secara acak (*random*) per perlakuan. Nurasni (2012), menyatakan bahwa induksi ploidisasi dapat dihitug dengan rumus sebagai berikut:

- $$\text{Ikan Triploid} = \frac{\text{Jumlah Ikan Triploid}}{\text{Jumlah Sample yang Diamati}} \times 100\%$$

C. Hatching rate telur dari masing-masing perlakuan

Untuk mengukur daya tetas telur ikan dilakukan dengan menghitung jumlah telur ikan yang menetas dibagi jumlah total telur ikan yang dibuahi dikalikan seratus persen. Murni *et al.* (2015), menyatakan bahwa perhitungan penetesan telur ikan dapat dilakukan dengan menggunakan rumus:

- $$HR = \frac{\text{Jumlah Telur yang Menetas}}{\text{Total Telur Perlakuan}} \times 100 \%$$

D. Survival rate ikan dari masing-masing perlakuan

Survival rate atau sintasan menurut Mambrasar *et al.* (2015), menyatakan bahwa untuk menghitung sintasan hidup larva dengan mencatat jumlah larva yang mampu bertahan hidup selama masa pemeliharaan. Perhitungan sintasan hidup larva dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

- $$SR = \frac{\text{Jumlah Larva yang Hidup}}{\text{Jumlah Larva Mula-mula}} \times 100 \%$$

E. **Grow rate** Ikan dari masing-masing perlakuan

Growth rate atau laju pertumbuhan dapat dihitung dengan cara menghitung selisih dari bobot awal larva dengan bobot akhir larva yang dipelihara selama beberapa hari. Selisih seperti ini dapat diketahui dari hasil pengurangan antara W_t atau berat akhir larva dengan W_0 atau berat awal larva pada awal masa pemeliharaan (Afrianto dan Liviawaty, 2005).

- $$GR = \frac{W_0}{W_t}$$

3.6.2 **Parameter Penunjang**

Penelitian yang akan dilakukan peneliti terdapat tiga parameter penunjang yang diamati. Selama penelitian berlangsung dilakukan pengamatan terhadap kualitas air media budidaya meliputi suhu, pH dan DO. Pengukuran suhu menggunakan Thermometer, pengukuran pH menggunakan pH meter dan pengukuran DO menggunakan DO meter.

3.7 **Analisis Data**

Data yang diperoleh dari hasil penelitian dianalisis secara statistik dengan menggunakan analisis keragaman (ANOVA). Rancangan percobaan yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL). Dilakukan uji BNT dengan selang kepercayaan 95% untuk menguji apakah terdapat pengaruh antar perlakuan yang diberikan. Jika terdapat pengaruh yang berbeda nyata, maka dilanjutkan uji Ortogonal untuk mengetahui perlakuan yang memberikan hasil tertinggi dan terendah. Data kualitas air dianalisis secara deskriptif dengan menampilkan tabel dan gambar. Analisis data dilakukan dengan bantuan program SPSS 16.0 dan Ms.Exel 2013.