

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September sampai dengan November 2017, selama 80 hari, 40 hari proses triploidisasi di ruang karantina Instalasi Budidaya Air Tawar (IBAT) Puntan Desa Sidomulyo, Kota Batu dan 40 hari karyotipe di Laboratorium Sentral Ilmu-ilmu Hayati – Universitas Brawijaya (LSIH-UB) Malang, Jawa Timur.

3.2 Alat dan Bahan

Tabel 1. Alat proses triploidisasi ikan mas (*Cyprinus carpio* Linn) ras Puntan

No.	Alat	Fungsi
1.	Spatula	Mengambil telur
2.	Mangkok persegi panjang	Wadah telur
3.	Spluit	Mengambil sperma
4.	Gelas ukur	Wadah pengenceran sperma
5.	Bulu ayam	Pengaduk pencampuran telur dan sperma
6.	Saringan	Wadah penetasan
7.	Aquarium 100 x 50 cm	Wadah inkubasi
8.	Bak fiber	Wadah air untuk fertilisasi
9.	Blower	Alat penghasil oksigen
10.	Heater	Penghangat suhu air
11.	Aerator set	Suplai oksigen
12.	Water bath	Kejut suhu
13.	Refraktometer	Pengukur salinitas
14.	Hapa/jarring	Wadah pematangan gonad indukan
15.	Kakaban	Tempat telur
16.	<i>Handtaly counter</i>	Menghitung jumlah telur dan benih
17.	Stopwath	Pengukur waktu kejut suhu dan fertilisasi
18.	Termometer	Pengukur suhu air

Tabel 2. Bahan yang digunakan pada proses triploidisasi

No.	Bahan	Fungsi
1.	Induk jantan 3 ekor	Penghasil sperma
2.	Induk betina 1 ekor	Penghasil telur
3.	<i>Sterile water</i>	Bahan fertilisasi
4.	<i>Sodium chloride</i>	Pengencer sperma
5.	Telur ayam	Mempercepat pematangan gonad
6.	Artemia	Pakan benih
7.	Kuning telur	Pakan benih
8.	Cacing sutera	Pakan benih

Tabel 3. Alat untuk menganalisis jumlah kromosom

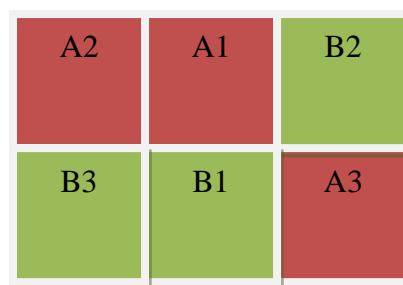
No.	Alat	Fungsi
1.	Timbangan	Menimbang bobot ikan sample dan bahan uji
2.	Mikroskop binokuler	Mengamati jumlah kromosom
3.	<i>Hot plate</i>	Pemanas suspense sel
4.	Kertas tissue	Menghilangkan larutan fiksatif pada jaringan dan membersihkan alat uji
5.	Gelas obyek	Sebagai preparat suspense sel
6.	Alat bedah (pinset atau gunting bedah)	Memotong, menggerakkan dan mengambil jaringan
7.	Pipet tetes	Mengambil suspense sel
8.	Gelas arloji	Wadah pembentukan suspense sel
9.	Camera	Pengambilan gambar
10.	Tabung ependorf	Wadah pengawet jaringan
11.	<i>Beaker glass</i>	Wadah bahan uji
12.	Botol bensin	Wadah aquades
13.	<i>Aluminium foil</i>	Membungkus dan menutup alat uji
14.	Gelas ukur	Mengukur bahan uji
15.	<i>Autoclave</i>	Sterilisasi suhu tinggi basah
16.	Oven	Sterilisasi suhu tinggi kering
17.	Erlenmeyer	Wadah larutan hipotonik dan larutan kolkisin
18.	Falcon	Wadah larutan larutan carnoy, asam asetat, dan giemsa
19.	Jarum <i>syringe</i>	Pengganti batu aerator agar aerasi lebih halus

Tabel 4. Bahan untuk analisis jumlah kromosom

No.	Bahan	Fungsi
1.	Kolkisin	Merendam ikan sampel
2.	Methanol atau etanol	Bahan larutan carnoy sebagai fiksasi jaringan
3.	Kalium klorida	Bahan larutan hipotonik untuk merendam jaringan
4.	Asam asetat glacial	Bahan pembentuk suspense sel
5.	Giemsa	Mewarnai preparat
6.	Akuades	Membilas preparat

3.3 Rancangan Percobaan

Penelitian ini adalah penelitian deskriptif dengan 2 perlakuan dan setiap perlakuan masing-masing mempunyai 3 ulangan. Dengan demikian penelitian ini terdiri atas 6 satuan percobaan. Penempatan wadah-wadah percobaan dilakukan secara acak menggunakan table ulang acak. Perlakuan ini mengacu pada hasil penelitian sebelumnya dengan menggunakan suhu 40°C dengan awal kejutan 2 menit setelah pembuahan dapat menghasilkan ikan triploid terbaik dan lama kejutan yang berbeda-beda sangat berpengaruh terhadap keberhasilan triploid, *hatching rate*, *survival rate*, dan pertumbuhan ikan mas punted. Adapun tata letak wadah beserta dosis percobaan setelah pengacakan dilakukan sebagai berikut :



Gambar 1. Rancangan penelitian

Keterangan :

1. Perlakuan A : Lama kejutan suhu panas 1,5 menit
2. Perlakuan B : Lama kejutan suhu panas 2 menit

3.4 Prosedur Kerja

Prosedur penelitian pada proses triploidisasi pada ikan mas terbagi menjadi tiga tahapan yaitu persiapan, proses triploidisasi, dan penetasan atau pemeliharaan larva (IBAT, 2017).

3.4.1 Proses Triploidisasi

Ikan uji yang digunakan adalah indukan ikan mas (*Cyprinus carpio* L) yang siap dipijahkan dengan induk jantan 3 ekor dan induk betina 1 ekor dengan ukuran bobot jantan antara 0,6-0,75 kg, sedangkan induk betina antara 2-3 kg dimasukkan kedalam dalam hapa atau jaring yang telah terisi kakaban untuk proses pematangan gonad untuk diambil telur dan spermanya.

Indukan betina distripingdengan mengurut bagian perut ikan ke arah urogenital sampai keluar telur kemudian diletakkan dimangkok plastik persegi panjang. Indukan jantan juga distriping sampai keluar sperma, kemudian sperma diambil dengan spuit 1 ml kemudian ditetaskan digelas ukur dan ditambahkan dengan larutan *Sodium chloride* 0,9% sebanyak 9 ml kemudian dihomogenkan hingga tercampur. Telur diambil dari mangkok plastik dengan memakai spatula kemudian dicampur dengan menambah 1 ml suspensi sperma sambil diaduk dengan bulu ayam sampai tercampur merata dalam wadah mangkok plastik. Telur yang tercampur sperma ditebar pada saringan dalam bak fiber yang telah terisi air *sterile water* untuk dilakukan fertilisasi selama 2 menit. Cara penebaran dengan arah zig-zag dengan menggunakan bulu ayam. Dilakukan pemberian kejutan suhu panas pada menit ke-2 setelah fertilisasi dengan suhu 40°C selama 1,5 menit (perlakuan A), dan 2 menit (perlakuan B) dengan menggunakan water bath. Telur dalam saringan yang sudah dikejut suhu diletakkan dalam aquarium ukuran 100 x 50 x 50 cm untuk dilakukan proses penetasan telur.

Penetasan telur dilakukan dalam saringan yang diletakkan dalam aquarium ukuran 100 x 50 x 50 cm yang diisi air hingga ketinggian 20-30 cm yang dilengkapi dengan aerator sebagai penyuplai oksigen, heater sebagai penghangat suhu air, dan thermometer sebagai alat ukur suhu air. Kantung kuning telur habis terserap, larva diberi makan artemia salina, kuning telur, dan cacing sutera. Frekuensi pemberian pakan 4 kali sehari sampai umur 28 hari, dengan pagi dan siang diberi artemia sedangkan sore dan malam hari diberi pakan kuning telur.

Larva ikan berumur 28 hari diberi pakan kuning telur pada pagi dan siang hari sedangkan sore hari diberi pakan cacing sutera sampai seterusnya. Artemia diberikan 2 jam setelah pemberian pakan kuning telur dan cacing sutera sebagai nutrisi.

3.4.2 Preparasi Alat, Bahan dan Pembuatan Reagen untuk Analisis

Jumlah Kromosom Teknik Jaringan Padat

Pada penelitian ini, untuk mengetahui terbentuknya ikan triploid dilakukan perhitungan jumlah kromosom secara manual, yaitu dihitung menggunakan *handtaly counter*. Uji analisis kromosom teknik jaringan padat pada penelitian ini menggunakan metode atau prosedur yang pernah dilakukan pada penelitian Carman dan Maulana (2016).

Preparasi alat dan bahan pertama kali dengan mencuci botol bensin dan beaker glass masing-masing 3 buah yang telah direndam thypon dan bayclin selama satu malam. Botol yang sudah dicuci dioven selama 2-3 jam sampai tidak ada air yang menempel. Mensterilkan alat-alat uji lab seperti gunting, pinset, dan gelas arloji dengan dibungkus menggunakan aluminium foil terlebih dahulu. Botol yang sudah dioven diisi aquades 2 liter untuk disterilkan. Memasukkan botol yang berisi aquades kedalam *autoclave* selama 2 jam lebih 30 menit beserta beaker glass, gunting, dan pinset yang telah dibungkus aluminium foil agar suhu panas tetap terkontrol. Alat yang sudah di sterilisasi menggunakan *autoclave* dioven sampai kering kecuali botol yang terisi aquades.

Pembuatan reagen dengan membuat larutan kolkisin 0,007% w/v dengan mengambil air sumur 1 liter, kemudian menimbang bubuk kolkisin 0,074 mg dengan timbangan analitik, kemudian melarutkannya kedalam 1 liter air. Mengaduk keduanya dengan *hot plate* hingga larutan kolkisin larut semua. Larutan kolkisin 1 liter dibagi menjadi 4 sesuai jumlah perlakuan yang akan diuji, masing-masing 250 ml menggunakan wadah *beaker glass*. Membuat larutan hipotonik 0,075 M (1 liter) dengan menimbang 5,6 g KCl menggunakan timbangan analitik, kemudian melarutkannya kedalam 1 liter akuades, dan diaduk menggunakan *hot plate* pula. Membuat larutan carnoy dengan mencampurkan asam asetat glacial dan methanol dengan perbandingan 1:3 yaitu asam asetat 12,5 ml dan methanol 37,5 ml dengan cara menuangkannya kedalam gelas ukur sesuai

kebutuhan, kemudian menuangkannya ke dalam falcon untuk di beri label. Membuat larutan alkohol 70% dengan mencampurkan etanol absolute, dengan akuades dengan perbandingan 7:3 (1 liter larutan alkohol 70% = 700 ml etanol absolute + 300 ml akuades). Membuat larutan giemsa 20% dengan mencampurkan giemsa dan akuades dengan perbandingan 2:8 (100 ml larutan giemsa 20% = 20 ml giemsa + 80 ml akuades) dengan cara menuangkannya kedalam falcon kemudian diberi label. Langkah terakhir membuat larutan asam asetat 50% dengan mencampurkan asam asetat glacial dan akuades dengan perbandingan volume 1:1 yaitu asam asetat glacial 25 ml dengan aquades steril 25 ml yang dituangkan dalam gelas ukur sesuai kebutuhan, kemudian menuangkan larutan tersebut kedalam falcon untuk diberi label.

3.4.3 Perendaman dengan kolkisin dan pengawetan jaringan

Langkah pertama merendam ikan perlakuan A1 (7 ekor), A3 (4 ekor), B1 (5 ekor), dan B2 (11 ekor) masing-masing kedalam larutan kolkisin 0,007% w/v selama 8-10 jam yaitu mulai pukul 02.03 WIB – 12.00 WIB. Selama perendaman, ikan dibiarkan berenang dalam wadah dengan aerasi halus yang dibuat dengan memasang jarum syringe diujung selang aerasi. Menurut Kusuma (2017) fungsi dari larutan ini adalah untuk menghambat terbentuknya benang spindel pada sel sehingga sel dihambat untuk melakukan pembelahan. Memotong kecil-kecil sirip ikan uji dari masing-masing perlakuan, kemudian potongan sirip tersebut dimasukkan dalam tabung ependorf untuk direndam larutan hipotonik (KCl 0,075 M) selama 60 menit pada suhu ruang. Mengganti larutan hipotonik dengan yang baru setiap 30 menit selama waktu perendaman dengan volume 20 kali volume jaringan. KCl berfungsi sebagai larutan hipotonik yaitu membuat sel membesar dan letak kromosom akan menyebar, sehingga mudah untuk diamati. Mengganti larutan hipotonik dengan larutan carnoy, kemudian sirip difiksasi dengan larutan carnoy selama 60 menit. Larutan carnoy diganti dengan yang baru setiap 30 menit. Larutan carnoy berfungsi untuk mematikan sel tanpa merusak strukturnya, selain itu juga untuk menaikkan daya pewarnaan karena adanya bahan kasar yang merupakan penyusun larutan fiksatif (Kusuma, 2017).

3.4.4 Pembuatan Preparat dan Tahap Pewarnaan

Mengambil sirip yang telah difiksasi menggunakan pinset dengan menyentuhkan sirip tersebut pada kertas tissue untuk menghilangkan larutan fiksatif. Meletakkan jaringan sirip tersebut di atas gelas obyek cekung atau gelas arloji kemudian ditambahkan 3-4 tetes asam asetat 50%, setelah itu jaringan digerak-gerakkan dengan menggunakan pisau bedah secara hati-hati hingga terbentuk suspensi sel (larutan menjadi keruh). Merendam gelas obyek yang akan digunakan sebagai preparat didalam alkohol 70% minimal selama 2 jam sebelum diletakkan di atas *hot plate*. Mengambil suspensi sel yang terbentuk dengan menggunakan pipet tetes lalu ditetaskan diatas gelas obyek yang sudah ditempatkan diatas *hot plate* dengan suhu 50 °C, dan dihisap kembali dengan cepat setelah terbentuk lingkaran (*ring*) dengan diameter 1-1,5 cm. Menunggu ring tersebut sampai kering setelah itu diangkat dan siap untuk diwarnai dengan larutan giemsa 20%. Masing-masing gelas obyek atau preparat ditetesi 3 lingkaran atau ring. Menurut Kusuma (2017) fungsi dari proses ini adalah untuk mengeringkan sel di atas preparat agar tidak rusak pada proses berikutnya.

Tahap terakhir adalah pewarnaan larutan giemsa 20% yaitu mewarnai preparat yang telah berisi lingkaran (*ring*) dengan larutan giemsa 20% dengan cara memberikan larutan sebanyak 3-5 tetes lalu disebarakan merata hingga menutupi ring dengan menggunakan pipet tetes plastik. Pewarnaan dilakukan selama 20-30 menit pada suhu kamar. Selesai waktu pewarnaan, selanjutnya membilas preparat dengan menggunakan akuades lalu dibiarkan kering udara. Preparat yang sudah kering ditutup dengan *cover glass* agar ring tidak rusak terkena debu atau kotoran yang mampu merusak daripada ring tersebut. Preparat yang sudah ditutup *cover glass* diamati dibawah mikroskop binokuler dengan pembesaran 1000 kali untuk menghitung jumlah kromosom.

3.5 Parameter yang Diamati

Pengamatan yang dilakukan dalam penelitian ini adalah keberhasilan triploid (IP), *hatching rate* (HR), *Survival Rate* (SR), serta parameter pendukung yaitu bobot mutlak, laju pertumbuhan spesifik, dan panjang mutlak.

3.5.1 Keberhasilan Triploidisasi

Tingkat keberhasilan triploidisasi merupakan persentase jumlah anak ikan yang triploid dari jumlah ikan yang diamati untuk masing-masing perlakuan. Menurut Nurasni (2012) tingkat keberhasilan triploid dapat dihitung seperti dibawah ini.

$$IP = \frac{\text{jumlah ikan triploid}}{\text{jumlah ikan sample}} \times 100\%$$

Keterangan :

IP : tingkat keberhasilan ikan triploid (%)

3.5.2 Hatching Rate

Derajat penetasan adalah persentase telur yang berhasil menetas menjadi larva dan telur yang gagal menetas menjadi larva ditandai dengan warna putih keruh atau rusak. *Hatching rate* dihitung dengan menggunakan rumus effendie, (2002) di bawah ini.

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

Keterangan :

HR : Daya tetas telur (%)

3.5.3 Survival Rate

Pengamatan dilakukan dengan melihat dan menghitung ikan yang hidup pada setiap unit perlakuan. Nilai *survival rate* dihitung dengan rumus (Zonneveld, dkk., 1991).

$$SR = \frac{N1}{N0} \times 100\%$$

Keterangan:

SR : Tingkat kelangsungan hidup (%)

N1 : Jumlah padat tebar akhir

N0 : Jumlah padat tebar awal

3.5.4 Parameter Pendukung

Parameter pendukung yang diamati adalah parameter pertumbuhan yang meliputi bobot mutlak (g), laju pertumbuhan spesifik (%/hari), dan panjang mutlak (mm) yang dilakukan pengukuran setiap seminggu sekali menggunakan timbangan analitik dan kertas ukur mm.

Bobot Mutlak (g)

Pengukuran berat ikan menggunakan timbangan analitik, penambahan berat dihitung dengan rumus Effendie (1997), yaitu:

$$W_m = W_t - W_0$$

Keterangan :

W_m : Pertumbuhan bobot mutlak ikan (g)

W_t : Berat ikan pada waktu ke-t (g)

W_0 : Berat ikan pada waktu ke-0 (g)

Laju Pertumbuhan Spesifik (%)

Mengetahui perhitungan laju pertumbuhan spesifik digunakan rumus yang dikemukakan oleh Mukti dkk (2001), sebagai berikut :

$$SGR = \frac{\ln W_t - \ln W_0}{t} \times 100\%$$

Keterangan :

SGR : Laju pertumbuhan spesifik (%/hari)

W_t : Bobot rata-rata ikan diakhir pemeliharaan (g)

W_0 : Bobot rata-rata ikan diawal pemeliharaan (g)

t : Lama waktu pemeliharaan (hari)

Panjang Mutlak (mm)

Pertumbuhan panjang mutlak digunakan untuk menghitung penambahan panjang ikan selama pemeliharaan, dengan menggunakan rumus Jaya (2013), sebagai berikut :

$$L = L_t - L_0$$

Keterangan :

L : pertumbuhan panjang mutlak (mm)

L_t : Panjang total ikan pada akhir pemeliharaan (mm)

L_0 : Panjang total ikan pada awal pemeliharaan (mm)

3.6 Analisis data

Hasil perhitungan data dianalisis menggunakan bantuan program *Microsoft Excel* 2010 untuk tabulasi data dan penyajian grafik. Untuk mengetahui pengaruh dan korelasi antara perlakuan dan parameter pengamatan (keberhasilan triploid, *hatching rate*, *survival rate*, bobot mutlak, laju pertumbuhan spesifik, dan panjang mutlak) masing-masing parameter dianalisis dengan menggunakan uji *T-test* dan korelasi dengan selang kepercayaan 95% dengan menggunakan SPSS versi 16 (Steel dan Torrie, 1993).