

III. METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan dalam dua tahap. Percobaan tahap pertama mengkaji keterkaitan asam lemak tak jenuh n-6 dan n-3 yang ditambahkan dalam pakan buatan dari sumber alami (minyak ikan dan minyak jagung) dengan kualitas telur dan larva ikan baung. Hasil percobaan tahap pertama ini digunakan sebagai acuan untuk mengkaji berapa banyak penambahan asam lemak n-6 dan n-3 serta perbandingannya dalam pakan buatan sehingga dapat meningkatkan kualitas telur ikan baung. Di samping itu dikaji juga seberapa besar asam lemak tak n-6 dan n-3 yang diserap oleh telur.

Percobaan tahap kedua adalah mengkaji keterkaitan kombinasi hormon E2 dan T4 pada berbagai dosis yang diimplantasi dan menggunakan pakan yang terbaik hasil percobaan tahap pertama dengan kualitas telur dan larva ikan baung. Percobaan tahap kedua ini merupakan percobaan untuk memperoleh dosis yang optimum untuk mempercepat pematangan gonad dan meningkatkan kualitas telur. Fenomena tersebut dapat diindikasikan antara lain pada lama waktu matang, fekunditas, derajat tetas telur dan derajat kelangsungan hidup larva.

Penelitian ini dilakukan di Instalasi Riset Perikanan Budidaya Air Tawar (BRPBAT) Cijeruk, Bogor, Jawa Barat. Penelitian ini dimulai sejak Februari 2005 sampai Februari 2006.

3.1 Percobaan Tahap Pertama

Percobaan tahap pertama merupakan percobaan untuk mengetahui dosis penambahan minyak ikan dan minyak jagung sebagai sumber asam lemak tak jenuh (n-6 dan n-3) pada pakan induk ikan baung dalam meningkatkan kualitas telur.

3.1.1 Rancangan Perlakuan

Pada percobaan tahap pertama digunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dengan jumlah ulangan sebanyak jumlah induk (7 induk betina). Sebagai perlakuan adalah penambahan asam lemak n-6 dan n-3 yang berbeda dalam pakan percobaan (Tabel 4).

3.1.2 Pakan uji

Pakan uji yang digunakan ada empat jenis pakan yang berbeda dalam kadar asam lemak n-6 dan n-3. Pakan dibuat dalam bentuk pelet (Lampiran 3) dengan komposisi pakan berdasarkan komposisi pakan buatan untuk ikan patin dengan kadar protein 37.81 - 38.09% dan rasio energi protein 8,5 - 9,0 kkal DE/g. Asam lemak tak jenuh n-3 ditambahkan dengan pemberian minyak ikan dan n-6 dengan penambahan minyak jagung. Komposisi pakan utama yang digunakan didasarkan pada komposisi pakan dari percobaan Mokoginta *et al.* (2000) yang digunakan untuk ikan patin.

Selanjutnya pakan tersebut dianalisis proksimat dan kadar asam lemaknya. Komposisi pakan dan proksimat pakan serta asam lemak pakan disajikan pada Tabel 4 dan 5. Pengukuran kadar protein pakan dilakukan dengan menggunakan metode Kjeldahl dan pengukuran kadar lemak dilakukan dengan metode Folch *et al.* (1975) (Takeuchi, 1988). Pengujian kadar asam lemak n-6 dan asam lemak n-3 pakan dilakukan dengan menggunakan Gas Liquid Chromatography (GLC).

Tabel 4. Komposisi pakan setiap perlakuan

Komponen pakan (%)	Perlakuan/As. lemak n-6;n-3 (%)			
	A(0.87;0.56)	B(1.66;0.78)	C(2.00;1.00)	D(2.23;1.82)
Tepung ikan	41.63	41.63	41.63	41.63
Tepung kedelai	18.90	18.90	18.90	18.90
Pollard	20.45	20.45	20.45	20.45
Vitamin mix ^a	1.60	1.60	1.60	1.60
Choline chloride	0.50	0.50	0.50	0.50
Mineral mix ^b	5.87	5.87	5.87	5.87
Carboxy methyl cellulose	3.00	3.00	3.00	3.00
Minyak kelapa	8.05	5.05	4.05	2.05
Minyak jagung	0.00	2.00	2.00	2.00
Minyak ikan	0.00	1.00	2.00	4.00

a. Per kilogram: Vit. A 200.000 IU; vit D₃ 1.000.000 IU; Vit E 40.2 IU; vit K₃ 8 g; vit. C 100 g; vit B₁ 5 g; vit. B₂ 5 g; vit B₃ 5 g; vit B₁₂ 0.01 g; Ca pantothenat 11 g; niacin 20 g; biotin 0.06 g; folic acid 1.5 g; choline 230 g.

b. Per kilogram: Ca 210 g; P 168 g; Mg 13 g; Na 30 g; S 12 g; Zn 1.25 g; Cu 0.2 g; Mn 0.3 g; Fe 6.7 g; I 0.15 g; Co 0.1 g; Se 8 mg (Takeuchi, 1988).

Tabel 5. Komposisi proksimat dan asam lemak n-6 dan n-3 pakan percobaan (% bobot kering)

	Perlakuan/As. lemak n-6;n-3 (%)			
	A(0.87;0.56)	B(1.66;0.78)	C(2.00;1.00)	D(2.23;1.82)

Komposisi proksimat:				
Protein	37.89	38.09	37.94	37.81
Lemak	14.29	12.29	13.44	14.08
Serat kasar	3.47	3.16	4.00	3.80
Abu	15.52	15.83	16.05	15.43
Asam lemak:				
Σ Al. n-6	0.87	1.66	2.00	2.23
Σ Al. n-3	0.56	0.78	1.00	1.82
EPA	0.15	0.21	0.28	0.52
DHA	0.33	0.46	0.59	1.02
Rasio Al. n-6/n-3	2.27	3.50	2.88	1.94

3.1.3 Ikan uji

Induk betina dan jantan ikan baung masing-masing sebanyak 28 ekor yang digunakan dalam percobaan ini diperoleh dari hasil pembesaran di Instalasi Riset Budidaya Air Tawar, Cijeruk selama 1,5 tahun dengan bobot tubuh 290-327g. Induk yang digunakan masih dara atau belum pernah memijah. Ikan uji betina ditebar dengan kepadatan 7 ekor pada setiap jaring (2x2x2m) sedangkan untuk jantan disatukan dalam kolam berukuran 10x5m.

3.1.4 Pemeliharaan Induk dan Penetasan Telur

Induk-induk ikan baung diaklimatisasi terhadap lingkungan percobaan selama 4 minggu. Pakan diberikan secara *at satiation* dua kali dalam sehari pada pagi dan sore hari. Monitoring dilakukan terhadap kondisi kesehatan dan respon terhadap pakan. Setelah itu pakan percobaan mulai diberikan.

Wadah pemeliharaan menggunakan jaring apung berukuran 2x2x2m sebanyak 4 buah. Induk-induk diberi pakan uji sesuai dengan perlakuan masing-masing sampai induk matang gonad. Dua minggu sekali jaring dibersihkan bersamaan dengan sampling pengecekan perkembangan gonad. Pengukuran bobot induk dilakukan satu bulan sekali. Air yang digunakan dalam percobaan ini berasal dari air sungai dengan suhu berkisar antara 23-29°C, oksigen 5.22-6.93 ppm, pH 6.16-6.97 dan NH₃ 0.060-0.095 ppm.

Evaluasi gonad dari ikan uji yang dipilih secara acak dilakukan secara mikroskopis dengan membedah satu ekor induk ikan dari tiap-tiap perlakuan. Evaluasi gonad ini dilakukan pada awal dan akhir percobaan. Gonad diambil dan ditimbang kemudian dilakukan pembuatan preparat histologi (Lampiran 2).

Pengambilan contoh telur dilakukan dengan menggunakan metode kanulasi pada semua induk. Contoh telur diambil minimal 100 butir per ekor kemudian difiksasi dalam larutan Bouin dan formaldehida 4%. Diameter telur diukur dengan menggunakan mikroskop yang dilengkapi mikrometer okuler dengan pembesaran 40x dan 100x. Induk yang matang gonad ditentukan dengan persentase diameter telur ≥ 0.9 mm sebanyak 60-70%. Selain itu dilihat juga keadaan perut dari induk, dipilih induk yang perutnya lebih besar dan lembek.

Setelah 98 hari pemeliharaan, pada beberapa perlakuan sudah diperoleh induk matang gonad. Pemijahan dilakukan dengan cara pemijahan buatan yakni dengan menyuntikkan ovaprim pada dosis 0,9 ml/kg induk betina dan 0.5 ml/kg induk jantan. Penyuntikan dilakukan dua kali, penyuntikan pertama $\frac{1}{4}$ bagian dan penyuntikan kedua $\frac{3}{4}$ bagian yang dilakukan setelah 6-7 jam dari suntikan pertama. 12-14 jam setelah penyuntikan kedua, induk siap untuk dipijahkan. Untuk induk jantan penyuntikan dilakukan sekali. Setelah induk betina menunjukkan tanda-tanda akan ovulasi, sperma terlebih dahulu disiapkan dengan mengurut bagian perut induk jantan dan sperma yang keluar ditampung dalam spuit kemudian diencerkan dengan larutan fisiologis dan disimpan pada suhu 10°C. Telur dikeluarkan dengan cara pengurutan bagian perut, selanjutnya dilakukan pembuahan buatan.

Telur hasil ovulasi induk betina ditetaskan dalam akuarium kaca masing-masing berukuran 15x15x15cm dilengkapi dengan pipa-pipa aerasi. Air diberi biru metilen dengan dosis 0,05 cc/l untuk mencegah timbulnya jamur. Telur hasil ovulasi dari satu induk diambil sebanyak 100-150 butir diletakkan pada lempengan kaca 10x10cm dan ditempatkan pada satu akuarium. Suhu penetasan berkisar antara 28 – 29 °C dan telur menetas setelah 22 – 24 jam.

Akuarium tempat penetasan telur juga digunakan untuk pemeliharaan larva. Larva yang baru menetas diambil sebanyak 100 ekor kemudian dipelihara selama 2 hari (48

jam) lalu dihitung jumlah larva yang hidup. Data ini digunakan untuk memperoleh derajat kelangsungan hidup larva umur 2 hari.

Pengukuran kadar asam lemak pakan dilakukan di awal percobaan, sementara pengukuran kadar asam lemak hati dilakukan di akhir percobaan. Setelah telur diovulasikan dihitung fekunditasnya dengan menggunakan metode sampling berat. Kurang lebih 20% dari seluruh telur yang diovulasikan dari setiap induk betina yang tidak dibuahi dan dibuahi dianalisis kadar asam lemaknya dengan metode Gas Liquid Chromatografi (GLC). Fosfolipid (FL) dan lipid netral (NL) dengan metode yang digunakan oleh Takeuchi (1988). Sisa telur yang dibuahi dipindahkan ke akuarium untuk ditetaskan dan dilakukan pengamatan perkembangan larva. Dari sejumlah larva yang dihasilkan dipisahkan larva yang normal dan yang abnormal dan dihitung jumlahnya untuk memperoleh nilai persentase larva abnormal. Sebanyak 1000 ekor larva yang baru ditetaskan umur 0 jam dan 500 ekor larva umur 24 jam diambil untuk analisis kadar asam lemaknya.

3.1.5 Analisis Data

Peubah yang diamati untuk perkembangan kematangan gonad dan respon ovulasi adalah:

1. Diameter telur : seratus butir telur diukur diameternya dengan menggunakan mikroskop yang dilengkapi mikrometer okuler dengan pembesaran 40 dan 100 kali kemudian dibuat sebaran diameter telur.
2. Perkembangan gonad : perkembangan gonad diamati dengan membuat preparat histologis ovarium dari setiap perlakuan sebanyak satu ekor dan diambil di awal dan akhir penelitian.
3. Fekunditas : fekunditas atau jumlah total telur ditentukan dengan mengukur bobot keseluruhan telur hasil ovulasi tiap induk kemudian diambil 1 g sebanyak tiga kali dan dihitung jumlah telur dalam 1g telur dan dirata-ratakan kemudian dikalikan dengan bobot keseluruhan telur lalu dibagi dengan bobot tubuh induk.
4. Derajat tetas telur

$$\text{Derajat tetas telur} = \frac{n}{F} \times 100$$

dengan n = Jumlah telur yang menetas

F = Jumlah total telur yang ditetaskan

5. Lama Waktu Matang

$$\text{Lama waktu matang} = \text{TNKT } 60 - 80 \% - T_0$$

TNKT 60 – 80 % = waktu saat mencapai nilai kematangan telur = 60 – 80 %
(diameter telur ≥ 0.9 mm); T_0 = waktu pengamatan TKG awal

6. Gonad somatik indeks (GSI)

$$\text{GSI} = \frac{\text{Bobot ovarium}}{\text{Bobot tubuh}} \times 100$$

7. Hepatosomatik Indeks (HSI)

$$\text{HSI} = \frac{\text{Bobot hati}}{\text{Bobot tubuh}} \times 100$$

Data lama waktu matang, fekunditas, diameter telur, derajat tetas telur, derajat kelangsungan hidup larva, dan persentase larva abnormal yang diperoleh dianalisis dengan uji F. Jika terdapat perbedaan antara perlakuan maka dilakukan uji Duncan (Steel dan Torrie, 1981). Data kadar asam lemak n-6 dan n-3 (hati, telur dan larva), kadar FL dan NL, GSI dan HSI dianalisis secara deskriptif dan ditampilkan dalam bentuk tabel dan gambar.

3.2 Percobaan Tahap Kedua

Percobaan tahap kedua merupakan percobaan lanjutan. Pakan terbaik yang diperoleh pada percobaan tahap pertama digunakan pada tahap kedua; dan percobaan tahap kedua ini bertujuan untuk mengetahui dosis kombinasi hormon E2 dan T4 yang optimal dalam meningkatkan kualitas telur.

3.2.1 Rancangan Perlakuan

Metode yang digunakan dalam percobaan tahap kedua adalah model eksperimental dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). Percobaan tahap kedua terdiri atas 5 perlakuan dan 3 ulangan. Kelima perlakuan dibedakan atas dosis kombinasi hormon E2 dan T4 yang diimplant. Perlakuan dosis kombinasi hormon tersebut adalah :

Perlakuan A : 0 μg E2 + 0 mg T4 per kg induk (kontrol/pelet kolesterol)

Perlakuan B : 600 μg E2 + 0 mg T4 per kg induk

Perlakuan C : 400 μg E2 + 10 mg T4 per kg induk

Perlakuan D : 200 μg E2 + 50 mg T4 per kg induk

Perlakuan E : 0 μg E2 + 100 mg T4 per kg induk

3.2.2 Pakan uji

Pakan uji yang digunakan adalah pakan terbaik yang diperoleh pada percobaan tahap pertama yakni pakan perlakuan B (n-6 1.56%; n-3 0.78%).

3.2.3 Ikan uji

Induk betina dan jantan ikan baung sebanyak masing-masing 35 ekor digunakan dalam percobaan tahap kedua. Induk diperoleh dari hasil pembesaran di Instalasi Riset Budidaya Air Tawar Cijeruk selama 2 tahun dengan bobot tubuh 393-433g. Induk yang digunakan masih dara atau belum pernah dipijahkan. Ikan uji ditebar dengan kepadatan 7 ekor per jaring.

3.2.4 Implantasi hormon

Hormon yang digunakan adalah E2 dan T4 buatan Sigma Chemical Company, USA; dan bubuk kolesterol (5-cholesten-3 β -ol) buatan Argent Laboratories Inc, cocoa butter, alcohol 50%, 2-phenoxyethanol dan betadin (Lampiran 3).

3.2.5 Pemeliharaan Induk dan Penetasan Telur

Induk ikan baung sebanyak 35 ekor betina dan 35 ekor jantan diaklimatisasi selama 4 minggu. Selama periode aklimatisasi ikan diberi pakan terbaik yang diperoleh pada percobaan tahap pertama. Pakan diberikan secara *at satiation* dua kali dalam sehari pada

pagi dan sore hari. Pemantauan dilakukan terhadap kondisi kesehatan dan respon terhadap pakan.

Wadah pemeliharaan menggunakan jaring apung berukuran 2x2x2m sebanyak 5 buah. Induk diberi pakan yang terbaik dari percobaan tahap pertama. Pakan diberikan sampai induk-induk matang gonad. Induk yang matang gonad mulai diperoleh pada hari ke-28 pemeliharaan.

Dua minggu sekali jaring dibersihkan bersamaan dengan sampling pengecekan perkembangan gonad dan pengambilan sampel darah. Pengukuran bobot induk dilakukan satu bulan sekali. Air yang digunakan dalam percobaan tahap kedua ini sama dengan yang digunakan pada percobaan tahap pertama. Namun suhu air pada percobaan tahap kedua relatif lebih rendah 21-27°C, oksigen 5.14-6.60 ppm, pH 6.90-7 dan NH₃ 0.060-0.070 ppm. Evaluasi gonad dari ikan uji yang dipilih secara acak kemudian dilakukan secara mikroskopis dengan membedah satu ekor induk ikan dari tiap-tiap perlakuan. Evaluasi gonad ini dilakukan pada awal dan akhir percobaan. Gonad diambil dan ditimbang, kemudian dibuat preparat histologinya (Lampiran 2).

Penyuntikan hormon dilakukan dengan menggunakan alat khusus yang disebut “implanter”. Caranya dengan menusuk bagian punggung kanan ikan dengan pisau kecil. Setelah itu alat implant yang berisi hormon ditusukkan ke punggung, dan hormon disuntikkan ke dalam tubuh ikan.

Contoh darah diambil setiap 14 hari sebanyak 1,5 ml dengan menggunakan spuit 2,5 ml yang berheparin. Contoh darah diambil pada bagian pangkal ekor kemudian dimasukkan ke dalam tabung polietilen 1,5 ml dan diputar selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm dan suhu 5°C. Selanjutnya plasma darah diambil dan dimasukkan ke dalam tabung polietilene dan disimpan pada suhu -20°C. Kadar hormon E2 plasma diukur dengan menggunakan kit radioimmunoassay fase padat (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles CA). Pengukuran dilakukan secara kuantitatif dengan menggunakan zat radioaktif ¹²⁵I (Lampiran 4).

Pengambilan contoh telur pada semua induk dilakukan dengan menggunakan metode kanulasi. Contoh telur diambil minimal 100 butir per ekor kemudian difiksasi dalam larutan Bouin dan formaldehid 4%. Diameter telur diukur dengan menggunakan mikroskop yang dilengkapi dengan mikrometer okuler dengan pembesaran 40x dan 100x.

Induk yang matang gonad ditentukan dengan persentase diameter telur ≥ 0.9 mm telah mencapai 60-70%. Selain itu dilihat juga keadaan perut dari induk, yaitu dengan memilih induk yang perutnya lebih besar dan lembek. Induk matang gonad dipijahkan dengan cara pemijahan buatan yakni dengan menyuntikkan ovaprim pada dosis 0,9 ml/kg untuk induk betina dan 0,5 ml/kg untuk induk jantan. Penyuntikan dilakukan dua kali, penyuntikan pertama $\frac{1}{4}$ bagian dan penyuntikan kedua $\frac{3}{4}$ bagian dilakukan setelah 6-7 jam setelah suntikan pertama. Untuk induk jantan penyuntikan dilakukan sekali. Setelah induk betina menunjukkan tanda-tanda akan ovulasi, sperma terlebih dahulu disiapkan dengan mengurut bagian perut induk jantan dan sperma yang keluar ditampung dalam spuit kemudian diencerkan dengan larutan fisiologis dan disimpan pada suhu 10°C. Kemudian telur dikeluarkan dengan cara pengurutan bagian perut selanjutnya dilakukan pembuahan buatan.

Telur hasil ovulasi induk betina ditetaskan dalam akuarium kaca masing-masing 15x15x15cm dilengkapi dengan pipa-pipa aerasi. Air diberi biru metilen dengan dosis 0,05 cc/l untuk mencegah timbulnya jamur. Telur hasil ovulasi dari satu induk diletakkan pada lempengan kaca 10x10cm sebanyak 100-150 butir dan ditempatkan pada satu akuarium. Suhu penetasan berkisar antara 28 - 29°C dan telur menetas setelah 22 – 24 jam.

Akuarium tempat penetasan telur juga digunakan untuk pemeliharaan larva. Larva yang baru menetas diambil sebanyak 100 ekor kemudian dipelihara selama 2 hari (48 jam), lalu dihitung jumlah larva yang hidup. Data ini digunakan untuk memperoleh derajat kelangsungan hidup larva umur 2 hari.

Pengukuran kadar asam lemak hati dilakukan di akhir percobaan. Setelah itu telur diovolusi dan dihitung fekunditasnya dengan menggunakan metode sampling berat. Kurang lebih 20% dari seluruh telur yang diovolasikan dari setiap induk betina dianalisis kadar asam lemaknya dengan metode chromatografi. FL dan NL dengan metode yang digunakan oleh Takeuchi (1988) (Lampiran 5). Sisa telur yang dibuahi dipindahkan ke akuarium untuk di tetaskan dan selanjutnya dilakukan pengamatan perkembangan larva. Dari sejumlah larva yang dihasilkan, dipisahkan larva yang normal dan yang abnormal dan dihitung jumlahnya untuk memperoleh nilai persentase larva abnormal. Sebanyak

1000 ekor larva yang baru ditetaskan umur 0 jam dan 500 ekor larva umur 24 jam diambil untuk analisis kadar asam lemaknya.

3.2.6 Analisis Data

Peubah yang diamati untuk perkembangan kematangan gonad dan respon ovulasi adalah:

1. Diameter telur: seratus butir telur diukur diameternya dengan menggunakan mikroskop yang dilengkapi dengan mikrometer okuler dengan pembesaran 40 dan 100 kali kemudian dibuat sebaran diameter telur.
2. Perkembangan gonad: perkembangan gonad diamati dengan membuat preparat histologis ovarium dari setiap perlakuan sebanyak satu ekor dan diambil di awal dan akhir penelitian.
3. Fekunditas: fekunditas atau jumlah total telur ditentukan dengan mengukur bobot keseluruhan telur hasil ovulasi tiap induk kemudian diambil 1 g sebanyak tiga kali dan dihitung jumlah telur dalam 1g telur dan dirata-ratakan kemudian dikalikan dengan bobot keseluruhan telur kemudian dibagi dengan bobot tubuh induk.

4. Derajat tetas telur

$$\text{Derajat tetas telur} = \frac{n}{F} \times 100$$

dengan n = Jumlah telur yang menetas

F = Jumlah total telur yang ditetaskan

5. Lama Waktu Matang

Lama waktu matang = TNKT 60 – 80 % - T₀

TNKT 60 – 80 % = waktu saat mencapai nilai kematangan telur = 60 – 80 %

(diameter telur ≥ 0.9 mm); T₀ = waktu pengamatan TKG awal

6. Gonad somatik indeks (GSI)

$$\text{GSI} = \frac{\text{Bobot ovarium}}{\text{Bobot tubuh}} \times 100$$

7. Hepatosomatik Indeks (HSI)

$$\text{HSI} = \frac{\text{Bobot hati}}{\text{Bobot tubuh}} \times 100$$

Data kadar E2 plasma, lama waktu matang, fekunditas, diameter telur, derajat tetas telur, derajat kelangsungan hidup larva dan persentase larva abnormal yang diperoleh dianalisis dengan uji F. Jika terdapat perbedaan antara perlakuan maka dilakukan uji Duncan (Steel dan Torrie, 1981). Analisis kontras polinomial ortogonal diaplikasikan untuk melihat respon setiap variabel terhadap dosis E2 dan T4 yang diimplan. Data kadar asam lemak n-6 dan n-3 (hati, telur dan larva), kadar FL telur, NL telur, GSI, dan HSI dianalisis secara deskriptif dan ditampilkan dalam bentuk tabel dan gambar.