

III. BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Instalasi Riset Perikanan Budidaya Air Tawar (BRPBAT), Depok, Jawa Barat. Penelitian ini dimulai sejak Juni sampai Desember 2005.

Bahan dan Alat

Pakan uji

Selama penelitian, jenis pakan yang digunakan adalah pakan dalam bentuk pelet dengan komposisi berdasarkan komposisi pakan buatan untuk induk ikan lele (Khoironi, 2002), kemudian ditambahkan vitamin C yang berupa *ascorbyl phosphate magnesium* (Showa Denko Jepang) dengan bobot molekul 379,61 serta kandungan asam askorbat 46%. Komposisi pakan uji dan proksimat pakan dapat dilihat pada Tabel 2 dan 3.

Hewan Uji

Dalam percobaan ini hewan uji yang akan digunakan adalah induk ikan lele dumbo (*C. gariepinus*) dari hasil pembesaran petani ikan yang ada di Dermaga Bogor. Induk ikan adalah hasil pemijahan dari satu induk dan berumur 6 bulan. Jumlah ikan yang digunakan adalah 216 ekor induk ikan lele betina pada tingkat kematangan gonad II dan 216 ekor ikan jantan. Masing-masing perlakuan mempunyai 18 ekor ikan. Ukuran panjang dan bobot ikan uji masing-masing 25–32 cm dan 250–328 gram.

Hormon implantasi

Hormon yang digunakan adalah estradiol-17 β (Sigma Chemical Company) dan bubuk kolesterol (5-cholesten-3 β -ol), cocoa butter, alkohol 98%, 2-phenoxyethanol dan betadine (prosedur selengkapnya pada Lampiran 03).

Wadah

Ikan dipelihara dalam 12 buah jaring terapung yang diletakkan di dalam kolam dengan ukuran panjang, lebar, dan kedalaman masing-masing 3.0 meter, 2.0 meter, dan 2.0 meter. Pada permukaan atas wadah diberi jaring penutup

untuk mencegah agar ikan uji tidak melompat ke luar wadah (Gambar 2). Untuk pemijahan digunakan akuarium sebanyak 40 buah dengan ukuran 60 X 50 X 50 cm yang dilengkapi dengan pipa-pipa aerasi. Akuarium tersebut juga akan digunakan untuk proses inkubasi, penetasan telur, dan pemeliharaan larva.



Gambar 2. Wadah penelitian yang terbuat dari bambu dengan 12 jaring apung dengan ukuran 3 X 2 X 2 m yang di atasnya ditutupi dengan jaring

Tabel 1. Komposisi bahan pakan dengan penambahan *ascorbyl phosphate magnesium* (APM) 0, 600, 1200, dan 1800 mg/kg pakan

Bahan Pakan (%)	Persentase <i>Ascorbyl Phosphate Magnesium</i> (APM)			
	0	600	1200	1800
Tepung ikan	23.28	23.28	23.28	23.28
Tepung kedelai	28.08	28.08	28.08	28.08
Pollard	36.29	36.29	36.29	36.29
Minyak ikan	1.37	1.37	1.37	1.37
Minyak jagung	1.37	1.37	1.37	1.37
Cholin Chlorida	0.50	0.50	0.50	0.50
Mineral ^a	5.00	5.00	5.00	5.00
Vitamin mix (tanpa vitamin C)	0.61	0.61	0.61	0.61
CMC	2.00	2.00	2.00	2.00
Selulosa	1.50	1.44	1.38	1.32
APM	0.00	0.06	0.12	0.18

Tabel 2. Komposisi proksimat pakan dengan perlakuan penambahan *ascorbyl phosphate magnesium* (APM) 0, 600, 1200, dan 1800 mg/kg pakan.

Komposisi Proksimat	Persentase <i>Ascorbyl Phosphate Magnesium</i> (APM)			
	0	600	1200	1800
Protein	36.42	36.12	35.98	36.67
Lemak	7.47	7.89	7.24	7.95
Karbohidrat	36.56	36.47	36.12	36.98
Abu	10.34	10.65	9.87	10.80
Serat kasar	8.56	8.90	8.24	8.95
DE (kkal/g pakan)	308.65	308.90	309.46	309.96
Vit. C (mg/kg pakan)	9.56	204.76	386.90	564.82

Metode Penelitian

Perlakuan

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah model eksperimental dengan menggunakan Rancangan Faktorial 4 X 3 sehingga terdapat 12 interaksi perlakuan. Faktor pertama adalah 4 dosis *ascorbyl phosphate magnesium* yang berbeda dalam pakan ikan, yaitu 0, 600, 1200, dan 1800 mg/kg pakan. Faktor kedua adalah dosis hormon estradiol-17 β yang berbeda, yaitu 0, 250, dan 500 μ g/kg bobot tubuh. Secara rinci rancangan perlakuan tersebut dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Perlakuan berbagai kombinasi dosis *ascorbyl phosphate magnesium* (APM) dan implantasi estradiol-17 β (E2)

Dosis APM (mg/kg pakan)	Dosis estradiol-17 β (μ g/kg bobot tubuh)		
	0	250	500
0	0.00 : 0.00 (A)	0.00 : 250 (B)	0.00 : 500 (C)
600	600 : 0.00 (D)	600 : 250 (E)	600 : 500 (F)
1200	1200 : 0.00 (G)	1200 : 250 (H)	1200 : 500 (I)
1800	1800 : 0.00 (J)	1800 : 250 (K)	1800 : 500 (L)

Parameter yang dievaluasi

Adapun peubah yang diamati adalah sebagai berikut

1. Diameter telur, yang diukur sebanyak 100 butir dengan menggunakan mikroskop yang dilengkapi dengan mikrometer okuler.
2. Pengamatan perkembangan gonad, yang dilakukan dengan membuat preparat histologis ovarium dan diambil di awal, tengah, dan akhir penelitian.
3. Perhitungan fekunditas relatif, yang dilakukan, yaitu dengan mengambil 1 gr telur hasil ovulasi kemudian dihitung jumlah telurnya. Pengambilan dilakukan sebanyak tiga kali dan dirata-ratakan.
4. Daya tetas telur

$$DT = \frac{a}{F} \times 100$$

dengan : DT : Daya tetas telur
 a : Jumlah telur yang menetas
 F : jumlah total telur yang ditetaskan

5. Indeks Gonad Somatik (IGS)

$$IGS (\%) = \frac{\text{Bobot ovarium}}{\text{Bobot tubuh}} \times 100$$

6. Perhitungan ketahanan hidup larva dilakukan dengan memelihara 100 ekor larva yang baru menetas di akuarium dengan tidak diberi makanan. Larva diamati setiap hari, mortalitasnya dicatat. Perhitungan lama waktu (hari) dihentikan jika larva yang hidup tinggal 20%.

7. Analisis proksimat pakan, telur, dan larva, yang dilakukan mengikuti protokol yang dikemukakan Takeuchi (1988).
8. Analisis fosfolipida pada telur menggunakan kromatografi gas (Takeuchi 1988)
9. Analisis kandungan vitamin C pada ovarium, telur dan larva mengikuti prosedur yang dikemukakan oleh Schuep *et al.* (1994).
10. Analisis hidroksiprolin dan prolin pada ovarium dan larva menggunakan spektrofotometer (Apriyantono *et al.* 1989).
11. Analisis estradiol-17 β pada plasma darah ikan dengan teknik radioimunoassai

Pelaksanaan Penelitian

Pematangan gonad

Sebelum induk ikan dimasukkan ke dalam jaring, dilakukan pemeriksaan jaring apung dari kebocoran. Penempatan jaring apung berdasarkan perlakuan dilakukan secara acak. Jaring apung ditempatkan di kolam dengan air yang mengalir dengan pergantian air sebanyak 100 sampai 200% dalam sehari. Pembersihan sisa-sisa makanan dan kotoran di dasar jaring apung dilakukan setiap hari. Sebelum dilakukan percobaan, ikan uji diaklimatisasi selama 1 minggu. Selama periode aklimatisasi, ikan diberi pakan dari perlakuan kontrol sebanyak 2 % bobot tubuh perhari.

Ikan uji yang digunakan dalam penelitian ini ditandai secara individu dengan menggunakan tasi (tagging) yang berwarna dan bernomor yang diselipkan pada sirip punggung. Setiap perlakuan menggunakan satu wadah dan tiap wadah diisi 18 ekor induk ikan betina. Selama penelitian, ikan yang dipelihara diberi pakan buatan 2 kali sehari *at satiation* pada pagi dan sore hari. Bobot pakan yang diberikan pada ikan setiap perlakuan dicatat. Pengukuran parameter kualitas air untuk suhu dilakukan setiap hari pagi dan sore hari. Kandungan oksigen dan pH diukur sekali seminggu, sedangkan kandungan karbondioksida dan amonia diukur tiga kali, yaitu pada awal, tengah, dan akhir penelitian. Hasil parameter kualitas air selama penelitian disajikan dalam Tabel 4.

Tabel 4. Parameter fisika kimia air selama percobaan

Parameter	Kisaran
Suhu	27.5 – 31 °C
PH	6.56 – 7.0
Oksigen Terlarut (O ₂)	2.95 – 5.83 mg/l
Karbondioksida (CO ₂)	3.55 – 7.78 mg/l
Amoniak	0.02 – 0.49 mg/l

Data kualitas air pada Tabel 4 menunjukkan bahwa semua parameter yang diukur masih berada pada batas toleransi kehidupan ikan lele (*Clarias gariepinus*), baik dalam budi daya pembesaran maupun dalam pembenihan sehingga keadaan perairan tersebut masih mendukung sebagai tempat ikan uji dipelihara.

Penyuntikan hormon dilakukan dengan menggunakan alat khusus yang disebut implanter, dengan cara menusuk bagian punggung kanan ikan dengan pisau kecil. Setelah itu alat implan yang mengandung hormon ditusukkan ke dalam punggung dan hormon diimplan ke dalam tubuh ikan.

Pengamatan perkembangan gonad dilakukan setiap dua minggu. Setiap pemeriksaan induk, selalu dimulai dengan pembiusan ikan dengan menggunakan MS 222 dosis 75 mg/l kemudian dilanjutkan dengan penimbangan induk. Evaluasi gonad ikan uji yang terpilih secara acak dilakukan secara mikroskopis dengan membedah satu ekor induk ikan dari tiap-tiap perlakuan, diambil gonadnya kemudian ditimbang dan difiksasi dengan larutan Bouin selama 24 jam, selanjutnya dimasukkan ke dalam larutan alkohol 70%. Evaluasi gonad ini dilakukan pada awal, tengah, dan akhir penelitian. Gonad diambil dan ditimbang kemudian dilakukan pengamatan histologis (prosedur Lampiran 4). Di samping itu sebagian gonad ini diambil untuk analisis vitamin C, hidroksiprolin, dan prolisin.

Contoh darah diambil sebanyak 1.5 ml dengan menggunakan spuit 2.5 ml yang berheparin. Contoh darah diambil dari bagian punggung kemudian dimasukkan ke dalam tabung polietilen 1.5 ml dan diputar selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm dan suhu

20⁰C. Selanjutnya, plasma darah dimasukkan ke dalam tabung polietilen dan disimpan pada suhu -20⁰C. Pengukuran hormon dilakukan dengan radioimunoassai.

Kandungan estradiol-17 β dalam plasma dianalisis dengan menggunakan kit radioimunoassai fase padat. Pengukuran dilakukan secara kuantitatif dengan menggunakan zat radioaktif ¹²⁵I. Selain itu, diukur kandungan fosfolipida di darah.

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 dengan mikrometer okuler dengan pembesaran 40x dan 100x. Pengamatan posisi inti telur dilakukan dengan meneteskan secara merata larutan sera (alkohol 99% : formaldehida 40% : asam asetat 100% = 6 : 3 : 1) pada sampel telur. Kemudian diamati dengan mikroskop yang dilengkapi dengan mikrometer okuler. Induk yang matang gonad ditentukan dengan persentase diameter telur yang $\geq 1,0$ mm sebanyak 70 %, selain itu, dilihat induk ikan yang perutnya lebih besar dan lembek.

Saat pemeriksaan kematangan telur, induk yang telurnya segera dipindahkan ke akuarium untuk persiapan pelaksanaan pemijahan buatan. Pemijahan buatan dilakukan dengan penyuntikan ovaprim dengan dosis 0.9 ml/kg. Penyuntikan secara intramuskular dilakukan 2 kali, untuk penyuntikan pertama $\frac{1}{3}$ bagian dan untuk penyuntikan kedua $\frac{2}{3}$ bagian dilakukan setelah 6 -7 jam. Kemudian telur dikeluarkan dengan cara pengurutan. Telur-telur hasil pengurutan ditampung di baskom kecil, kemudian diberi larutan garam faali sekitar 2.0 ml dan larutan fertilisasi sekitar 2.0 ml, kemudian dimasukkan sperma dan dicampur dengan menggunakan bulu ayam sekitar 1 menit setelah itu dimasukkan air untuk mengaktifkan sperma supaya terjadi pembuahan. Pembuahan akan terjadi saat itu juga, kemudian telur-telur tersebut dipindahkan ke potongan kaca yang telah disiapkan, kemudian potongan kaca tersebut dimasukkan ke dalam akuarium untuk inkubasi.

Untuk mendapatkan sperma, induk jantannya dimatikan, lalu gonadnya diambil dan dihancurkan dalam larutan garam faali 5.0 ml. Induk jantan yang digunakan untuk membuahi telur-telur induk betina berasal dari induk jantan yang dipelihara di jaring apung .

Telur yang diovulasikan dihitung dengan menggunakan metode sampling berat. Untuk menentukan fekunditas relatif, yaitu dengan mengambil telur dan ditimbang 1 gram telur kemudian dihitung jumlah telurnya. Perlakuan ini dilakukan sebanyak 3 kali dan jumlah total telurnya dibagi tiga. Sebelum dan sesudah telur dikeluarkan induk ditimbang untuk mendapatkan bobot induk yang kemudian akan dibandingkan dengan bobot telur. Sebanyak 20% dari total telur yang diovulasikan dipakai untuk penetasan dan 20% lagi digunakan untuk analisis vitamin C, fosfolipida, dan kandungan proksimat telur.

Penetasan telur

Sebelum dilakukan pengeluaran telur dari induk betina, terlebih dahulu disiapkan akuarium yang berukuran 60 X 50 X 40 cm yang diisi air setinggi 20 cm. Di dasar bak tersebut diletakkan kaca berukuran 20 X 40 cm (kolektor telur) secara berurutan sehingga sebagian besar dasar akuarium tertutup oleh kaca. Air yang digunakan sama seperti pada pemeliharaan induk. Sebelum wadah dipakai, wadah dicuci dan diisi air, kemudian dilarutkan metilen biru dengan konsentrasi 0.2 ppm.

. Telur-telur yang dibuahi, diinkubasi dalam akuarium. Telur yang telah diinkubasi dibiarkan sampai menetas. Selama inkubasi, perkembangan embrio diamati di bawah mikroskop sampai menjadi larva. Telur yang menetas dan yang tidak menetas dihitung. Selanjutnya dianalisis protein, lemak, dan vitamin C untuk telur yang baru menetas dan larva 2 hari. Dari sejumlah larva yang dihasilkan dihitung jumlah larva yang normal dan yang tidak normal.

Pemeliharaan larva

Pemeliharaan larva dimulai dengan mempersiapkan wadah akuarium yang berukuran 60 X 50 X 40 cm kemudian diisi air setinggi 40 cm dan diberi aerasi kemudian dimasukkan 100 ekor larva hasil penetasan dari masing-masing perlakuan.

Ketahanan larva dilakukan dengan cara memelihara larva yang baru menetas dalam akuarium. Jumlah larva yang dipelihara untuk masing-masing perlakuan sebanyak 100 ekor tanpa diberi makan. Data yang diamati adalah berapa lama (hari) larva dapat bertahan hidup. Larva diamati setiap hari, mortalitasnya dicatat. Penghitungan larva yang mati diakhiri, jika larva yang hidup tinggal 20% (Kamler 1992).

Analisis data

Data lama waktu matang, fekunditas, IGS, diameter telur, derajat tetas telur, ketahanan hidup larva dan larva abnormal dilakukan analisis sidik ragam dengan uji respon polinomial ortogonal pada tingkat kepercayaan 99% dan 95% (Gomez KA & Gomez AA 1995). Data profil hormon estradiol-17 β , kandungan vitamin C, lemak, fosfolipid, protein, dan rasio hidroksiprolin/prolin dari ovarium telur, larva 0, dan larva 2 hari ditampilkan secara deskriptif dalam bentuk tabel dan gambar.