

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu Dan Tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juli 2011 sampai September 2011 bertempat di Balai Benih Ikan Sentral (BBIS) Probolinggo, Lampung Timur dan analisis sampel darah dilakukan pada bulan September 2011 bertempat di Balai Penelitian Ternak (BALITNAK) Ciawi, Jawa Barat.

B. Alat Dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah kolam dengan ukuran $30 \times 15 \times 1 \text{ m}^3$ untuk pemeliharaan induk, hapa dengan ukuran $1 \times 1 \times 1 \text{ m}^3$, alat suntik, tabung polietilen, mikroskop olympus cx 21, kamera digital Canon, sprayer, timbangan digital dengan tingkat ketelitian 0,01 gr, gelas ukur, penggaris, dan alat ukur kualitas air (termometer dengan tingkat ketelitian $0,1^{\circ}\text{C}$, DO meter dengan tingkat 0,1 mg/l, dan pH meter dengan tingkat ketelitian 0,1).

Bahan yang digunakan adalah ikan lele betina dengan ukuran 300 gr sebanyak 45 ekor, Ekstrak Testis Sapi (ETS), alkohol 70%, larutan formalin 40%, larutan EDTA, minyak cengkeh, antibiotik, dan pakan komersial.

C. Prosedur Penelitian

1. Persiapan

Pada tahap persiapan dilakukan beberapa kegiatan yang meliputi persiapan kolam dan pemeliharaan induk. Persiapan kolam dilakukan dengan menguras kolam berukuran 5x4x1m³. Kolam dikeringkan selama 3 hari, selanjutnya pada hari keempat kolam diisi dengan air sampai ketinggian sekitar 80 cm dan dibiarkan sampai hari ke-7. Selanjutnya untuk pemeliharaan induk dilakukan dalam wadah terpisah antara induk jantan dan induk betina. Masa adaptasi ikan dilakukan selama 7 hari yang diberi pakan berupa pellet. Pemberian pakan induk selama pemeliharaan dilakukan sebanyak dua kali sehari secara *ad libitum* (sampai ikan kenyang). Setelah 7 hari masa adaptasi, ikan lele diseleksi dan ditempatkan di dalam happa berukuran 1x1x1 m³ sesuai dengan perlakuan yang ditentukan.

2. Perlakuan

Perlakuan pada penelitian ini adalah pemberian ETS yang sudah dicampur pada pakan dengan dosis 0; 1; 2; 3 dan 4 mg/kg pakan dan pengelompokan dengan lama pemberian ETS yaitu selama 10 hari dan 30 hari.

Tabel 1. Perlakuan pemberian ETS pada berbagai dosis yang diberikan pada pakan ikan dan lama pemberiannya.

Pengelompokan pemberian ETS	Dosis hormon Ekstrak Testis Sapi (mg/kg pakan)				
	0	1	2	3	4
10 hari (A)	0	1	2	3	4
30 hari (C)	0	1	2	3	4

Perlakuan di atas diterapkan pada hapa, dapat dilihat pada tabel 2 :

Tabel 2. Desain penempatan hapa

Kelompok	Perlakuan				
A	1	4	2	0	3
B	2	0	3	4	1

3. Pelaksanaan Penelitian

Adapun tahapan pelaksanaan penelitian yaitu :

1. Tahap awal penelitian dilakukan dengan menyiapkan kolam untuk pemeliharaan induk dengan ukuran $30 \times 15 \times 1 \text{ m}^3$. Kemudian melapisi dengan terpal. Kolam diisi air hingga ketinggian 80cm dan dibiarkan selama 7hari. Selanjutnya dilakukan pemasangan happa dengan ukuran $1 \times 1 \times 1 \text{ m}^3$ sesuai pengacakan yang telah dilakukan. Induk ikan selanjutnya ditimbang dan diletakkan pada masing-masing hapa sebanyak 3 ekor. Masa adaptasi ikan dilakukan selama 7 hari dengan pemberian pakan komersial. Pemberian makan induk selama pemeliharaan dilakukan sebanyak dua kali sehari secara *ad libitum* (sampai ikan kenyang).
2. Pembuatan pakan yang mengandung ETS dilakukan dengan melarutkan ETS sesuai dosis pada larutan alkohol 70% sebanyak 50 ml. Larutan ETS selanjutnya dimasukkan ke dalam sprayer dan disemprotkan secara merata pada pakan yang telah disiapkan berupa pakan terapung. Pakan dikeringanginkan selama 24 jam agar alkohol menguap.
3. Induk lele diambil seluruhnya kemudian dimasukkan kedalam 10 happa dengan ukuran $1 \times 1 \times 1 \text{ m}^3$ masing-masing berisi 3 ekor.

4. Pemberian Pakan

Ikan diberi pakan yang mengandung ETS sesuai dosis yaitu 0; 1; 2; 3; 4 mg/kg pakan dan pengelompokkan lama pemberian pakan yaitu 10 hari dan 30 hari. Frekuensi pemberian pakan dilakukan 2 kali sehari yaitu pada pukul 07.00 dan 17.00. Pakan yang diberikan sebanyak 5% dari bobot ikan.

5. Pengamatan Kualitas Air

Pengamatan suhu air dilakukan setiap hari pada pagi siang dan sore hari. Pengamatan untuk pH dan oksigen terlarut dilakukan setiap seminggu sekali. Penambahan air dilakukan setiap minggu sekali untuk menjaga volume air kolam tetap stabil.

6. Pengamatan untuk melihat respon ikan uji terhadap perlakuan diamati pada hari ke-15 dan 30 dengan mengambil sampel darah. Untuk pengamatan kualitas air yang meliputi suhu perairan dilakukan setiap hari dan untuk pH dan DO dilakukan setiap 7 hari sekali.

7. Ikan yang akan diambil darahnya dipingsankan terlebih dahulu menggunakan minyak cengkeh dengan dosis 0,3 ml/liter air. Ikan yang telah pingsan selanjutnya diambil darahnya menggunakan alat suntik yang telah dilapisi dengan larutan EDTA untuk mencegah penggumpalan darah. Darah diambil sebanyak 1-1,5 ml pada bagian pangkal sirip ekor. Darah selanjutnya ditampung pada tabung polietilen. Darah yang telah terkumpul selanjutnya disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 2-4 menit untuk memisahkan antara sel darah dengan plasma darah. Plasma darah (*supernatan*) yang diperoleh selanjutnya ditampung kembali dalam tabung polietilen untuk diuji kandungan testosteronnya. Plasma darah disimpan dalam *freezer* -20°C untuk

mencegah plasma darah mengalami kerusakan (Zanuy *et al*, 1999). Uji kadar hormon testosteron dilakukan di Balai Penelitian Ternak (BALITNAK) Ciawi, Jawa Barat. Uji kadar hormon testosteron dilakukan dengan metode Radioimmunoassay (RIA).

8. Analisis kematangan gonad dilakukan untuk mengetahui tingkat kematangan gonad pada ikan lele yang diberi perlakuan. Dilakukan perhitungan terhadap keadaan gonad dalam keadaan previtelogenesis, vitelogenesis dan matang. Kemudian dilakukan uji proporsi untuk membandingkan proporsi previtelogenesis, vitelogenesis dan matang digunakan uji dua proporsi. Rumus yang digunakan adalah sebagai berikut (Walpole, 1995) :

Wilayah kritik untuk $\hat{P}_1 \neq \hat{P}_2$ adalah $-t_{\alpha/2} > Z > t_{\alpha/2}$

$$\hat{P}_1 = \frac{x_1}{n_1}$$

$$\hat{P}_2 = \frac{x_2}{n_2}$$

$$\hat{P} = \frac{x_1 + x_2}{n_1 + n_2}$$

$$q = 1 - \hat{P}$$

$$Z = \frac{\hat{P}_1 - \hat{P}_2}{\sqrt{\hat{P} q \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}$$

Keterangan :

- X1 : Jumlah tingkat kematangan gonad (Previtelogenesis, vitelogenesis, dan matang) pada kontrol
- X2 : Jumlah tingkat kematangan gonad (Previtelogenesis, vitelogenesis, dan matang) pada dosis 1, 2, 3, 4 mg/kg
- n1 : Jumlah anggota (Previtelogenesis, vitelogenesis, dan matang) pada kontrol
- n2 : Jumlah anggota (Previtelogenesis, vitelogenesis, dan matang) pada dosis 1, 2, 3, 4 mg/kg
- \hat{P}_1 : Proporsi keberhasilan kontrol

\hat{P}_2 : Proporsi keberhasilan dosis 1, 2, 3, 4 mg/kg
 \hat{P} : Dugaan gabungan proporsi kontrol
z : Uji dua proporsi
 $t_{\alpha/2}$: Nilai tabel t