

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Ikan medaka adalah salah satu spesies model penting di antara kelompok teleostei. Ikan kecil ini tersebar luas di berbagai wilayah Asia dan hidup di habitat air tawar, air payau, maupun air asin. Ikan medaka telah dimanfaatkan secara luas dalam studi eksperimental biologi vertebrata (Yusof et al., 2014). Genus *Oryzias*, yang mencakup medaka, mendiami perairan air tawar dan payau mulai dari India hingga Asia Tenggara, melintasi wilayah Wallacea hingga ke Timor, Sulawesi, Luzon dan Jepang. Spesies ini memiliki karakteristik unik di antara ikan *teleostei* yang biasa digunakan dalam laboratorium (Iwamatsu, 2004).

Ikan *Oryzias* atau dikenal di Jepang dengan nama medaka merupakan hewan uji yang digunakan dalam studi toksikologi dan ekotoksikologi. Penggunaan embrio ikan ini dalam penelitian uji toksikologi sudah sering digunakan secara umum karena memiliki toleransi yang cukup tinggi terhadap kondisi suatu perairan sehingga dapat dijadikan sebagai *sentinel organism* dalam suatu lingkungan perairan (Dahrudin, 2012). Keunggulan ikan ini adalah ukurannya yang kecil, sehingga *Oryzias* tidak memerlukan ruangan yang luas, media air yang banyak dan tentunya sistem percobaan akan menghasilkan limbah yang lebih sedikit, serta mudah dan murah untuk dilakukan (Yaqin et al., 2021). Selain pada ikan dewasa, embrio ikan *Oryzias* juga dapat dijadikan sebagai hewan uji karena embrionya yang transparan sehingga mudah untuk diamati (Ibrahim et al., 2020). Salah satu genus ikan *Oryzias* yang sering dijadikan sebagai hewan uji adalah *Oryzias javanicus* atau lebih dikenal dengan ikan medaka jawa.

Oryzias javanicus merupakan ikan tropis kecil yang memiliki habitat di perairan muara, ekosistem air tawar dan laut di Indonesia (Ibrahim et al., 2020). Ikan ini bereproduksi dengan tipe *egg depositer* yaitu betina menempelkan telur pada substrat setelah proses pembuahan (Herjayanto et al., 2020). Namun, terdapat fenomena betina membawa telur pada bagian genitalnya beberapa saat sebelum ditempelkan pada substrat (Puspitasari & Suratno, 2017). Secara makroskopis telur terlihat bening, telur memiliki diameter 1,07-1,11 mm ($1,08 \pm 0,02$ mm). Telur memiliki filamen panjang yang membuat telur-telur saling menempel (*attaching filament*). Pada seluruh permukaan korion terdapat fili yang tidak menempel (*non-attaching filament*). Fili ini memiliki panjang 0,08–0,19 mm ($0,14 \pm 0,03$ mm) (Herjayanto et al., 2022). Selain itu, ketersediaan embrio per harinya dalam jumlah yang besar, serta interaksi antara jaringan-jaringan dan organ dapat terlihat dengan jelas pada saat melakukan pengamatan menggunakan mikroskop sesuai dengan tujuan penelitian (Merino et al., 2020).

Penggunaan *Oryzias javanicus* dalam uji ekotoksikologi pada penelitian ini masih sangat kurang digunakan oleh peneliti. Oleh karena itu, embrio *Oryzias javanicus* sangat cocok digunakan pada penelitian ini karena toleransi tinggi terhadap perubahan lingkungan. Hal ini membuatnya menjadi kandidat yang ideal

untuk menguji tingkat ketahanan embrio pada kondisi perubahan lingkungan yang tidak sesuai. Menurut penelitian sebelumnya, ikan medaka Jawa merupakan model yang cocok untuk studi genetika, toksikologi dan ekologi karena ukuran kecil, siklus hidup pendek dan daya tahan tinggi terhadap kondisi stres lingkungan (Iwamatsu, 2004). *Oryzias* sp. memiliki kemampuan untuk dapat bertahan dalam kondisi hipoksia (kekurangan oksigen) dan pengasaman laut, membuatnya sangat relevan dalam mengkaji dampak perubahan lingkungan terhadap ekosistem laut (Lee et al., 2020).

Salah satu persoalan dalam menerapkan uji ekotoksikologi adalah melakukan suatu program inter kalibrasi antar laboratorium. Inter kalibrasi bertujuan untuk melakukan pengecekan embrio dari satu tempat ke tempat lainnya dengan melihat hasil uji yang diperoleh apakah memiliki kesamaan antar laboratorium. Dalam melakukan inter kalibrasi pada uji ekotoksikologi dibutuhkan proses transportasi embrio, namun proses transportasi embrio dari satu tempat ke tempat lainnya yang menjadi masalah dalam melakukan inter kalibrasi (Yaqin et al., 2021). Oleh karena itu, dibutuhkan transportasi yang paling mudah, murah dan efisien dalam melakukan inter kalibrasi. Salah satu transportasi yang mendukung untuk dilakukan yaitu transportasi yang tidak menggunakan air atau transportasi kering. Transportasi kering bisa dilakukan dengan cara menginkubasi telur tanpa perlakuan menggunakan air. Meskipun penggunaan air yang sedikit pada uji ekotoksikologi, namun bisa saja menjadi kendala dalam melakukan penelitian tersebut, seperti terdapat resiko pencemaran air dari bahan organik (Subagja & Slembrouck, 2015).

Transportasi kering pada embrio bertujuan untuk meminimalkan penggunaan media cair dengan tetap mempertahankan tingkat kelangsungan hidup embrio. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Diwan et al., (2010) menyatakan bahwa embrio ikan dapat bertahan dalam kondisi semi-kering dengan perlakuan tertentu, seperti suhu terkendali dan penggunaan media pelindung. Studi lain oleh Yusof et al., (2014) menyoroti keunggulan *Oryzias* sebagai model dalam penelitian transportasi embrio karena daya tahannya terhadap berbagai kondisi lingkungan.

Beberapa penelitian telah melakukan transportasi kering pada embrio *Oryzias*. Yaqin K et al., (2021) telah melakukan penelitian pada embrio *Oryzias wolasi* yang digunakan sebagai model percobaan untuk melihat apakah embrio *Oryzias* dapat dilakukan transportasi dalam keadaan kering untuk inter kalibrasi antar laboratorium ekotoksikologi. Pada penelitian tersebut dilakukan perbandingan proses penetasan telur antara yang dipelihara pada media *Embryo Rearing Medium* (ERM) sebagai media basah dan media kering (tanpa direndam dalam air). Hasil penelitian menunjukkan bahwa telur *Oryzias wolasi* yang dipelihara pada media kering mempunyai masa inkubasi yang tidak berbeda nyata dengan yang dipelihara di ERM. Selain itu, pemeliharaan embrio di media kering memiliki panjang total penetasan yang lebih panjang dibandingkan embrio yang dipelihara di media ERM. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa embrio *Oryzias wolasi* mempunyai korion tebal dan keras yang membuat telur tidak mudah pecah dan juga tahan terhadap

kekeringan tingkat tinggi sehingga dapat dilakukan transportasi dalam keadaan kering untuk berbagai penelitian khususnya pada penelitian ekotoksikologi.

Berdasarkan hal tersebut, maka timbul pertanyaan mengenai apakah transportasi kering dapat dilakukan pada embrio *Oryzias javanicus* seperti halnya yang telah dilakukan pada embrio *Oryzias wolasi*. Untuk itu, diperlukan penelitian terkait inkubasi kering pada embrio *Oryzias javanicus* karena transportasi kering dilakukan pada saat masa inkubasi telur.

1.2 Tujuan dan Kegunaan

Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk menganalisis potensi apakah embrio *Oryzias javanicus* dapat diinkubasi dalam kondisi kering. Kegunaan dari penelitian ini yaitu memberikan informasi tentang apakah embrio *Oryzias javanicus* dapat diinkubasi dalam kondisi kering untuk melakukan inter kalibrasi antar laboratorium pada uji ekotoksikologi.

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei sampai Agustus 2024. Pengambilan sampel ikan *Oryzias javanicus* dilakukan di Dermaga Kera-Kera, Makassar, Sulawesi Selatan. Uji laboratorium dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Hewan Air, Departemen Perikanan, Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan, Universitas Hasanuddin.

2.2 Alat dan Bahan

Alat yang akan digunakan pada penelitian ini akuarium berukuran 70 cm x 40 cm x 40 cm sebagai wadah untuk pemeliharaan ikan. Aerator digunakan sebagai penyuplai oksigen pada akuarium. *Siphon cleaner* digunakan untuk membersihkan akuarium. Serok digunakan untuk mengambil ikan dari akuarium. Cawan petri sebagai wadah untuk memisahkan embrio ikan. Pipet tetes digunakan untuk mengambil sampel embrio dan larutan yang akan digunakan. *Mikroplate* 24 lubang sebagai wadah untuk menyimpan sampel embrio yang akan diteliti. Botol sampel kaca sebagai tempat air media pemeliharaan. Label sebagai penanda untuk media pemeliharaan. *Object glass* sebagai tempat pengamatan sampel embrio. *Deck glass* digunakan untuk menutup objek yang telah diletakkan di *object glass*. Mikroskop trinokuler digunakan untuk mengamati sampel embrio. Kamera *optilab* digunakan untuk menampilkan objek yang sedang diamati di bawah lensa objektif ke layar monitor laptop. Inkubator sebagai alat untuk menginkubasi embrio. Laptop digunakan untuk menangkap dan menyimpan gambar hasil pengamatan. Alat tulis menulis untuk mencatat hasil pengamatan

Bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini yaitu induk ikan *Oryzias javanicus* sebagai penyedia embrio dalam telur. Telur ikan *Oryzias javanicus* sebagai objek pengamatan yang diteliti. Alkohol 70% digunakan untuk mensterilkan tempat objek pengamatan. Kertas tisu digunakan untuk membersihkan tempat objek pengamatan. Pakan buatan Fengli 0 dan pakan alami *Artemia* sp digunakan untuk makanan ikan. Kertas digunakan untuk mengeringkan embrio *Oryzias javanicus* dan *Embryo Rearing Medium* (ERM) sebagai media pemeliharaan embrio ikan.

2.3 Prosedur Penelitian

2.3.1 Persiapan Induk *Oryzias javanicus*

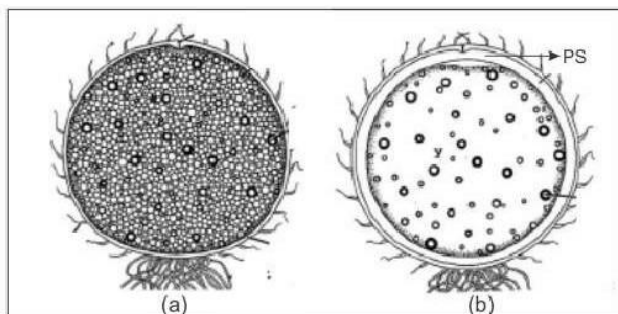
Oryzias javanicus yang sudah tersedia di laboratorium, diambil kemudian dipelihara di dalam akuarium ukuran 70 cm x 40 cm x 40 cm yang telah dipasang pompa air dan aerator. Kemudian ikan diinkubasi hingga menghasilkan telur. Selama proses inkubasi, pemberian pakan akan diberikan secukupnya yaitu 5% dari bobot tubuhnya. Pakan Fengli 0 diberikan dengan frekuensi dua kali sehari pada pukul

08.00 dan 16.00. *Nauplii artemia* akan diberikan sekali sehari pada pukul 12.00, untuk mendapatkan pasokan makanan yang cukup dan mudah menghasilkan produksi telur yang baik. Pembersihan akan dilakukan ketika terdapat sisa pakan di dasar akuarium. Pembersihan dilakukan dengan cara membuang airnya menggunakan *siphon cleaner* sehingga menyisakan air sebanyak $\frac{1}{4}$ air dalam akuarium, lalu akuarium kembali diisi dengan air.

2.3.2 Pembuahan Embrio *Oryzias javanicus*

Pembuahan pada induk ikan *Oryzias javanicus* terjadi secara alami di dalam akuarium. Induk betina yang telah bertelur dikeluarkan dari akuarium menggunakan serok dan telur yang menyatu dengan benang diambil dengan hati-hati dan langsung dipindahkan ke cawan petri yang telah terisi larutan ERM. Telur akan membentuk kelompok yang menyerupai buah anggur yang terhubung oleh filamen-filamen (*attached fillaments*). Cara yang dilakukan untuk memisahkan telur dari filamen-filamennya yaitu memutar telur-telur menggunakan jari telunjuk secara perlahan sampai terpisah satu sama lain (Yaqin, 2021).

Telur yang telah dipisahkan dari benang kemudian akan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 40x untuk menyeleksi telur yang akan digunakan dilengkapi dengan kamera optilab yang telah terhubung dengan laptop untuk mempermudah dalam pengambilan dan menyimpan gambar tiap waktu perkembangannya. Perkembangan embrio ini (Gambar 1) mengacu kepada penelitian Gonzales-doncel et al. (2005) yang telah melakukan pengamatan mengenai embriogenesis pada ikan *O. latipes*. Telur yang terpilih untuk awal pengamatan yaitu telur yang telah terbuahi dan memasuki fase 17. Pada fase 17 merupakan fase neurula awal yang perkembangannya terjadi setelah 24 jam telur dikeluarkan oleh induknya. Fase ini termasuk bagian dari tahap-tahap awal perkembangan embrio yang mendasari pembentukan organ dan struktur tubuh pada hewan.



Gambar 1. Perbedaan perkembangan telur ikan *Oryzias latipes* (a) belum terbuahi, (b) sudah terbuahi; PS (Perivitelline Space) (Iwamatsu, 2011).

2.3.3 Rancangan Percobaan

Penelitian ini akan dilakukan menggunakan dua perlakuan (media pemeliharaan) dengan 12 kali pengulangan. Pada perlakuan A yaitu perlakuan dengan menggunakan media air atau *Embryo Rearing Medium* (ERM) dan perlakuan B yaitu perlakuan kering tanpa pemberian media air. Media ERM yang biasa digunakan memiliki komponen 10,0 g NaCl, 0,3 g KCl, 0,4 g CaCl, 2 ml H₂O, 1,63 g MgSO₄ yang dicampur dengan 1 ml NaHCO₃ (0,25 g/20 ml H₂O) (Padilla et al., 2015).

Selanjutnya, media pemeliharaan yang akan digunakan akan dimasukkan ke dalam *microplate* 24-well dengan menggunakan pipet tetes. 12 lubang dari *microplate* diisi dengan media pemeliharaan ERM sebanyak 2 ml pada perlakuan A. Kemudian 12 lubang dari *microplate* tanpa diisi dengan air. Setelah itu, masing-masing *microplate* dimasukkan dengan satu telur yang terbuahi (telah melewati tahap seleksi telur). Jumlah telur yang akan digunakan untuk masing-masing perlakuan adalah sebanyak 12 butir telur. Total keseluruhan telur yang diamati yaitu 24 butir telur yang diperoleh dari pemijahan induk betina di dalam akuarium. Pada perlakuan B yaitu percobaan inkubasi kering yang dimulai dari fase 17 dan telur diterima pada media kering. Kemudian untuk pengamatannya, embrio yang kering tersebut diberi sedikit air setiap kali ingin diamati perkembangannya selama kurang lebih 30 menit, setelah itu dimasukkan kembali dengan kondisi yang telah dikeringkan menggunakan kapas. Adapun perkembangan embrio diamati setiap 24 jam.

2.4 Parameter Penelitian

Pengamatan embrio dan perkembangan embrio akan dilakukan dengan cara mengambil sampel menggunakan pipet tetes dan ditempatkan di tengah *object glass* serta objek tersebut ditutup dengan *deck glass*. Setelah itu, objek glass diletakkan di bawah mikroskop dengan perbesaran 40x. Gambar setiap fase perkembangan embrio kemudian dicatat dan didokumentasikan dengan menggunakan aplikasi *Optilab* di laptop yang telah terhubung dengan mikroskop yang akan digunakan. Perkembangan embrio diidentifikasi dengan mengacu pada penelitian Gonzales-doncel et al., (2005) yang telah melakukan pengamatan embriogenesis pada ikan *Oryzias latipes*.

Pengukuran parameter yaitu waktu inkubasi, perkembangan somit, diameter telur, volume kuning telur, laju penyerapan kuning telur, denyut jantung, gerakan rahang dan panjang larva awal menetas, serta kelangsungan hidup embrio dan larva akan dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 40x, dan untuk panjang larva menggunakan mikroskop dengan perbesaran 20x. Embrio dan larva didokumentasikan dengan menggunakan aplikasi *Optilab*. Semua embrio dan larva akan diukur dengan menggunakan aplikasi *Image Raster* 3.0.

2.4.1 Waktu inkubasi

Waktu inkubasi dihitung dengan cara mengamati embrio setiap hari mulai dari hari pertama yaitu fase 17 hingga terjadinya penetasan. Lama pengamatan tergantung

pada setiap fase yang diamati, dan saat penetasan telah terjadi waktunya dicatat sebagai waktu inkubasi.

2.4.2 Jumlah Somit

Jumlah somit akan dihitung secara langsung dari gambar yang diambil menggunakan mikroskop.

2.4.3 Diameter Telur

Diameter telur akan diukur dengan cara menarik garis secara vertikal dan horizontal. Diameter telur diperoleh dengan menggunakan rumus yang digunakan oleh Rodriguez et al., (1995) sebagai berikut:

$$Ds = \sqrt{Dh \times Dv}$$

Keterangan : Ds = Diameter telur sesungguhnya (mm)
 Dh = Diameter telur horizontal (mm)
 Dv = Diameter telur vertikal (mm)

2.4.4 Volume Kuning Telur

Volume kuning telur awal dan volume kuning telur yang tersisa pada waktu tertentu dihitung dengan menggunakan rumus yang digunakan oleh Blaxter & Hempel, (1963) sebagai berikut:

$$VK = \frac{\pi}{6} \times LH^2$$

Keterangan : VK = Diameter Volume Kuning Telur (mm³)
 L = Diameter Panjang Kuning Telur (mm)
 h = Diameter Tinggi Kuning telur (mm)

2.4.5 Laju Penyerapan Kuning Telur

Laju penyerapan kuning telur merupakan penyusutan terserapnya kuning telur pada tubuh larva ikan sebagai cadangan makanan (endogeneous feeding) mulai dari menetas hingga kuning telur hampir habis (Hariyandi et al., 2020). Data volume kuning telur yang didapatkan selanjutnya digunakan dalam penghitungan laju penyerapan kuning telur dengan rumus yang digunakan oleh (Heming, 1988) sebagai berikut :

$$YS_{AR} = \frac{V_0 - V_t}{T_t - T_0}$$

Keterangan : YS_{AR} = Laju Penyerapan saat t jam (mm³/jam)
 V_t = Volume Akhir (mm³)
 V_0 = Volume Awal (mm³)
 T_t = Waktu akhir (jam)
 T_0 = Waktu awal

2.4.6 Detak Jantung

Detak jantung embrio *Oryzias javanicus* akan diukur menggunakan aplikasi *Binisi Celebensis Beat* (BCeB). Detak jantung diukur dengan mencatat waktu yang dibutuhkan untuk mencapai 30 detak. Waktu untuk mencapai 30 detak tiap embrio ikan dikonversi menjadi jumlah detak jantung per menit (Chen et al., 2022). Ukuran jantung akan diamati menggunakan mikroskop binokuler. Hasil kemudian akan didokumentasikan menggunakan aplikasi *Optilab*. Ukuran jantung akan diukur menggunakan aplikasi *Image Raster* 3.0.

2.4.7 Gerakan Rahang

Gerakan rahang embrio *O. javanicus* akan dihitung secara manual selama 1 menit di fase 36 dengan menggunakan pengamatan di bawah mikroskop perbesaran 40x dan 100x melalui aplikasi *optilab* dengan mencatat jumlah banyaknya setiap gerakan rahang dalam 1 menit.

2.4.8 Kelangsungan hidup embrio

Kelangsungan hidup embrio dapat dihitung menggunakan rumus yang digunakan oleh Zhang et al., (2023) sebagai berikut:

$$SR = \frac{Nt}{No} \times 100\%$$

Keterangan: SR = *Survival Rate*

Nt = Jumlah embrio yang hidup setelah menetas

No = Jumlah embrio yang dibuahi sebelum menetas

Embrio yang hidup dicirikan dengan embrio yang telah memiliki jantung yang berdetak dan terlihat bergerak di dalam telur. Sebaliknya, embrio yang mati jantungnya akan terlihat tidak berdetak.

2.5 Analisis Data

Analisis data yang akan digunakan pada penelitian ini yaitu sebagai berikut:

2.5.1 Analisis data statistik

Analisis statistik akan dilakukan dengan *software Graphpad Prism* 8 dengan menggunakan Uji Student t untuk menganalisis perbandingan jumlah somit, diameter telur, volume kuning telur, laju penyerapan kuning telur, gerakan rahang, detak jantung, kelangsungan hidup (survival rate) dan waktu inkubasi embrio *Oryzias javanicus*.

2.5.2 Analisis data deskriptif

Analisis deskriptif dilakukan dengan mengamati setiap fase perkembangan embrio. Analisis data deskriptif yaitu menganalisis data dengan mendeskripsikan data yang telah didapatkan dalam bentuk tabel dan gambar. Analisis secara deskriptif dalam

bentuk tabel dan gambar untuk menjelaskan jumlah somit, diameter telur, volume kuning telur, laju penyerapan kuning telur, gerakan rahang, detak jantung, kelangsungan hidup (survival rate) dan waktu inkubasi embrio *Oryzias javanicus*.