

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian telah dilakukan 1 Oktober 2017 di Laboratorium Budidaya Perikanan program studi Budidaya Perikanan Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Gresik.

3.2 Alat dan bahan

3.2.1 Alat yang digunakan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: Akuarium (60x35x30cm), blower, selang aerasi, batu aerasi, seser, selang sipon, spon, waring (mata jaring 2mm), ember, timbangan dengan merek “SHIMAZU”, *thermometer* dan pH meter dengan merek “OHAUS” dengan akurasi ± 0.1 , spectrophotometer, Do meter, bakerglass, batang pengaduk, micropipet, plastik klip, objekglass, penggaris, kertas label, microkapiler, tube 1,5 ml, Rak tube, tisu dengan merek “TESSA”, nampan dengan merek “LION STAR”, gunting, S spuit dengan merek “THERMOONE”, coldbox, kritoseal, alat tulis, mikroskop dengan merek “OLYMPUS”

3.2.2 Bahan yang digunakan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi : ikan nila yang didapat dari Instalansi Budidaya Air Payau Lamongan, isolat bakteri *S. agalactiae* N-14-G yang di dapat dari Balai Sempur Bogor, pakan pellet F 999, serbuk daun kayu manis (*C. burmanii*) yang diperoleh dari Malang dengan dosis yang berbeda (0%, 0.25%, 0.5%, 1%), telur, EDTA, gimsa, aquades, alkohol 70% , stabilizer.

3.3 Tahap Penelitian

3.3.1 Persiapan Akuarium

Akuarium sebelum digunakan dibersihkan dengan sabun dan disterilkan dengan kaporit terlebih dahulu. Setelah bersih diisi dengan air bersih sebanyak 20 liter. Pada saat pengisian air ke dalam aquarium ujung slang diberi spons untuk mencegah kotoran masuk kedalam aquarium.

3.3.2 Pembuatan Serbuk Daun Tanaman Kayu Manis

Daun kayu manis yang diperoleh dari Malang berupa daun yang masih segar. Daun kayu manis yang telah dikeringkan pada udara terbuka (kering udara) tanpa terkena cahaya matahari langsung untuk menghindari kerusakan bahan aktif yang terdapat pada daun kayu manis. Pengerinan dilakukan sampai daun dapat dihaluskan dan diayak untuk mendapatkan serbuk daun kayu manis.

Pembuatan serbuk tanaman kayu manis sebagai berikut

- Daun dipisahkan dari tangkainya.
- Daun dicuci bersih dengan air mengalir.
- Daun yang sudah bersih ditiriskan dan dikering anginkan.
- Setelah kering, daun dihaluskan dengan blender.
- Setelah halus diayak dengan ukuran 2mm untuk mendapatkan serbuk, selanjutnya disimpan.

3.3.3 Pencampuran Pakan

Pakan berupa pellet terapung (F999) dengan kadar protein 38%. Pellet tersebut dicampur dengan ekstrak daun kayu manis sesuai dengan dosis perlakuan dan diberi putih telur 2% sebagai binder. Menurut Safratilofa (2015), menyatakan bahwa untuk 1kg pakan, ekstrak daun kayu manis 0,5% dan 1% masing-masing dilarutkan dengan aquades sebanyak 200ml, selanjutnya dicampurkan dengan putih telur sebanyak 20ml sebagai perekat dan diaduk menggunakan *mixer* hingga homogen. Setelah itu pakan dikering anginkan. Pencampuran pakan dilakukan setiap hari.

3.3.4 Infeksi Bakteri *Streptococcus agalactiae*

Ikan nila yang telah diberi pakan perlakuan selama 30 hari, pada hari ke-31 ikan di puasakan dan selanjutnya pada hari ke-32 ikan di uji tantang dengan infeksi bakteri *S. Agalactiae* dengan konsentrasi hasil uji N-14-G dengan cara diinjeksi. Infeksi dilakukan dengan menginjeksikan 0,1ml bakteri/ekor secara *intrapertoneal*. Ikan nila yang telah diinfeksi dipelihara selama 14 hari dan dilakukan pengamatan (Nurul, 2012).

Tabel 2. Karakteristik bakteri *Streptococcus agalactiae*

No	Pengujian	Isolat N14G
1	Pewarnaan Gram	+
2	Bentuk dan penataan sel	Bulat berantai
3	Oksidasi /fermentative	Fermentative
4	Motilitas	-
5	Oksidase	-
6	Katalase	-
7	Produksi asam dari D-manitol	-
8	Uji aktivitas hemolitik	Non-hemolitik

Sumber : Sukenda (2014)

3.3.5 Penebaran Ikan Uji

Ikan yang digunakan adalah ikan nila sebanyak 10 ekor/akuarium dengan bobot 10 g/ekor yang dipelihara pada akuarium ukuran (60x35x30 cm^3) dengan volume air 20 liter. Benih ikan di peroleh dari IBAP (Instalasi Budidaya Air Payau Lamongan)

3.3.6 Pemberian Pakan

Pemberian pakan dilakukan sebanyak 3 kali sehari pada pukul 08.00 , 12.00, 16.00 WIB. Pemberian pakan perlakuan dilakukan selama 30 hari secara *semi ad station* sebelum ujiantang, setelah ujiantang ikan uji diberi pakan komersial dan dilakukan pengamatan selama 14 hari (Nurul, 2012).

3.4 Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (**RAL**) yang terdiri dari 3 perlakuan 4 ulangan serta control sehingga menghasilkan 20unit percobaan dan masing-masing unit percobaan diisi 10 ekor ikan.

Model statistik RAL yang digunakan berdasarkan Steel &Torrie (1993).

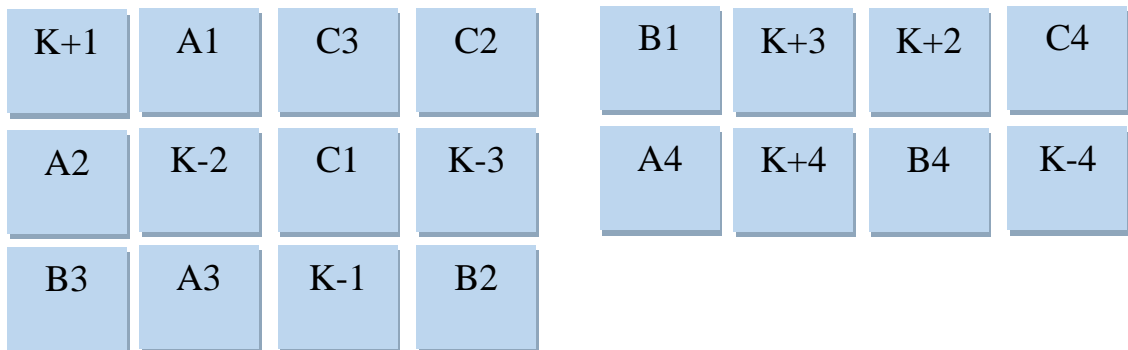
Dimana :
$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

- Y_{ij} = Data respon yang diamati pada perlakuan ke-i dan ulangan ke-j
- μ = Nilai tengah
- τ_i = Pengaruh perlakuan ke-i
- ε_{ij} = Galat percobaan pada perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

Tabel 3.Perlakuan pemberian pakan dengan penambahan ekstrak daun kayu manis

Perlakuan	Keterangan
K+	Pemberian pakan komersial dengan uji tantang
K-	Pemberian pakan komersial tanpa uji tantang
A	Pemberian pakan dan penambahan dosis 0,25% serbuk daun tanaman kayu manis
B	Pemberian pakan dan penambahan dosis 0,5% serbuk daun tanaman kayu manis
C	Pemberian pakan dan penambahan dosis 1% serbuk daun tanaman kayu manis

Ikan yang digunakan adalah ikan nila sebanyak 10 ekor/akuarium dengan bobot 10 g/ekor yang dipelihara pada akuarium ukuran (60x35x30cm³) dengan volume air 20liter. Unit percobaan ditempatkan secara acak dan *layout* percobaan pada Gambar berikut:



Gambar 1.Layout Percobaan

Keterangan:

K+ = Pemberian pakan komersial dengan uji tantang

K- = Pemberian pakan komersial tanpa uji tantang

A = Pemberian pakan dan penambahan dosis 0,25% serbuk daun tanaman kayu manis dengan uji tantang *Streptococcus agalactiae*

B = Pemberian pakan dan penambahan dosis 0,5% serbuk daun tanaman kayu manis dengan uji tantang *Streptococcus agalactiae*

C = Pemberian pakan dan penambahan dosis 1% serbuk daun tanaman kayu manis dengan uji tantang *Streptococcus agalactiae*

3.5 Parameter Utama Penelitian

3.5.1 Diferensial Leukosit

Pengamatan dilakukan untuk menentukan persentase tiap jenis leukosit yang ada di dalam darah (Mones 2008). Pengamatan ini menggunakan metode Theml *et al.* (2004) dilakukan dengan mengamati preparat ulas darah yang diwarnai dengan pewarna Giemsa di bawah mikroskop. Pembuatan preparat ulas darah dilakukan dengan menempatkan setetes darah pada gelas obyek, dibuat preparat ulas dan dibiarkan kering udara kemudian diwarnai. Terlebih dahulu dilakukan fiksasi dengan merendam preparat yang telah kering ke dalam metanol selama 5 menit, kemudian dikeringkan dalam udara, setelah itu dimasukkan ke dalam larutan Giemsa 10% selama 30 menit. Setelah diwarnai, preparat dikeringkan dan siap untuk diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000 X. Pengamatan dan penghitungan masing-masing jenis sel dilakukan hingga jumlah semua jenis sel mencapai 100, dan hasilnya dinyatakan dalam % .

3.5.2 Aktivitas Fagositosis

Perhitungan aktivitas fagositosis mengacu pada metode Anderson dan Siwicki (1993). Darah dimasukkan sebanyak 0,1 ml ke dalam tabung ependorf dan dicampurkan secara merata dengan 25 µl bakteri *Staphylococcus sp* (10^7 sel/ml). Selanjutnya diinkubasi selama 20 menit. Sebanyak 5 µl diteteskan pada gelas objek dan dibuat preparat ulas. Proses fiksasi dengan menggunakan metanol dilakukan selama 5 – 10 menit. Kemudian, hasil fiksasi direndam dalam larutan pewarna giemsa selama 15 – 20 menit. Aktivitas fagositosis diukur berdasarkan persentase sel-sel fagosit yang menunjukkan proses fagositosis dari 100 sel fagositik yang teramati. Indeks fagositik dihitung dengan rumus :

$$\text{Aktivitas fagositik} = \frac{\text{Jumlah sel fagosit yang melakukan fagositosis}}{\text{Jumlah sel fagosit}} \times 100\%$$

3.6 Kualitas Air

Parameter kualitas air yang diukur adalah suhu, oksigen terlarut (DO), pH, pada setiap harinya. Satuan dan alat pengukuran disajikan pada Tabel berikut ini :

Tabel 4.Kualitas air

Parameter	Satuan	Alat Ukur
Suhu	°C	Thermometer
Oksigen terlarut	Mg/L	DO meter
Ph	-	pH meter

3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini yang meliputi diferensial leukosit, Aktivitas fagositosis dan kualitas air dianalisa menggunakan program Minitab 16 lebih lanjut akan dilakukan uji lanjut Duncan dengan selang kepercayaan 95%.