

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Agustus - September 2017 di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Basah Program Studi Budidaya Perikanan Universitas Muhammadiyah Gresik.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi : ikan nila yang didapat dari Instalansi Budidaya Air Payau Lamongan, isolat bakteri *S. agalactiae* N14G yang di dapat dari Balai Sempur Bogor, pakan pellet F 999, serbuk serbuk daun tanaman kayu manis (*C. burmanii*) yang diperoleh dari Malang dengan dosis yang berbeda (0%, 0.25%, 0.5%, 1%), telur bebek, EDTA, hayem, turk, aquades steril, alkohol 70% , HCL 0,1N

3.2.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: akuarium (60x35x30cm), blower, selang aerasi, batu aerasi, seser, selang sipon, spon, waring (mata jaring 2 mm), 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, petri disk, objekglass, *handcounter*, penggaris, kertas label, *haemocytometer*, *haemometer (Hb)*, mikrokapiler, tube 1,5 ml, rak tube, tisu dengan merek "TESSA", nampan dengan merek "LION STAR", gunting, spuit dengan merek "THERMOONE", *coldbox*, kritoseal, alat tulis, mikroskop dengan merek "OLYMPUS" dan perbesarn 400X, sentrifius, tabung reaksi.

3.3 Prosedur 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 ke dalam aquarium.

3.3.2 Pembuatan Serbuk Daun Tanaman 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 dikeringanginkan.
- Setelah kering, daun dihaluskan dengan blender.
- Setelah halus diayak dengan ukuran 2mm untuk mendapatkan serbuk, selanjutnya disimpan.

3.3.3 Konfirmasi Bakteri Uji

Isolat bakteri *S. agalactiae* tipe non-hemolitik terlebih dahulu diamati morfologi koloni, karakteristik biokimia dan sifat gram mengacu pada metode SNI 754.3 : 2009. Hal ini bertujuan untuk memastikan bahwa isolat tersebut merupakan spesies bakteri yang diperlukan untuk kegiatan penelitian. Karakteristik bakteri dilakukan untuk mengidentifikasi isolat bakteri yang digunakan melalui beberapa uji yang diterapkan meliputi pewarnaan gram, sifat biokimia, fisiologi bakteri dan identifikasi molekuler.

3.3.4 Penyediaan Bakteri Uji

Isolat bakteri *S. agalactiae* yang digunakan merupakan isolat bakteri *S. agalactiae* N14G berasal dari Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan - Bogor. Isolat stok bakteri *S. agalactiae* BHIA di agar miring diremajakan (*fasase*) dengan mengkultur isolat pada media agar miring yang dilakukan sebanyak 2 kali. Penyediaan inokulan *S. agalactiae* dilakukan dengan beberapa tahapan yaitu: 1. Mengkultur isolat bakteri dengan melakukan inokulasi biakan murni bakteri dari media agar miring BHIA ke dalam 10ml media cair TSB (*Tryptone Soya Broth*) kemudian diinkubasi pada suhu 29-30°C selama 24 jam. 2. Biakan yang

diinkubasi 24 jam tersebut, kemudian diambil 1 ml dan dimasukkan dalam 9 ml medium TSB baru, yang selanjutnya diinkubasi kembali pada suhu 29-30°C selama 24 jam setelah itu bakteri dipanen.

3.3.5 Pencampuran Pakan

Pakan berupa pellet terapung (F999) dengan kadar protein 38%. Pellet tersebut dicampur dengan serbuk daun tanaman kayu manis sesuai dengan dosis perlakuan dan diberi putih telur 2% sebagai binder. Menurut Safratilofa (2015), menyatakan bahwa untuk 1kg pakan, ekstrak serbuk daun tanaman 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.

3.3.6 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 ujiantang dengan infeksi bakteri *S. Agalactiae* dengan konsentrasi hasil uji N14G 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 F. R, 2012).

Tabel 2. Karakteristik bakteri *Streptococcus agalactiae*

No	Pengujian	Isolat N14G
1	Pewarnaan Gram	+
2	Bentuk dan penataan sel	Bulat berantai
3	Oksidatif /fermentative	Fermentative
4	Motilitas	-
	Oksidase	-
	Katalase	-
	Produksi asam dari D-Manitol	-
	Uji aktivitas hemolitik	-

Sumber: Sukenda (2014)

3.3.7 Penebaran Ikan Uji

Ikan yang digunakan adalah ikan nila sebanyak 10 ekor/akuarium dengan bobot 10 g/ekor yang dipelihara pada akuarium ukuran (60x35x30cm³) dengan volume air 20 liter. Benih ikan di peroleh dari IBAP (Instalasi Budidaya Air Payau Lamongan)

3.3.8 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 F. R, 2012).

3.4 Rancangan Penelitian

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 3 perlakuan yaitu 0,25%, 0,5% dan 1% dan 3 ulangan serta control. Didasarkan pada penelitian Safratilofa (2015), menyatakan bahwa penambahan tepung serbuk daun tanaman kayu manis 0,5% pada pakan dapat meningkatkan respon imunitas dan dapat mencegah dan mengendalikan penyakit *motile aeromonads septicaemia* pada ikan patin. Dosis perlakuan disajikan dalam tabel 3 sebagai berikut :

Tabel 3. Perlakuan pemberian pakan dengan penambahan ekstrak kayu manis

Perlakuan	Keterangan
K+	Pemberian pakan komersial dengan ujiantang
K-	Pemberian pakan komersil tanpa ujiantang
A	Pemberian pakan dan penambahan dosis 0.25% serbuk daun tanaman kayu manis dengan ujiantang.
B	Pemberian pakan dan penambahan dosis 0.5% serbuk daun tanaman kayu manis dengan ujiantang.
C	Pemberian pakan dan penambahan dosis 1% serbuk daun tanaman kayu manis dengan ujiantang.

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

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

Dimana :

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

3.5 Parameter Penelitian

3.5.1 Parameter Utama

3.5.1.1 Kadar Hematokrit

Kadar hematokrit diperiksa menurut Goldenfarb, *et al.* (1971) yaitu dengan menggunakan tabung micro hematokrit yang berupa pipa kapiler berlapis heparin. Darah dihisap dengan menggunakan pipa hematokrit dengan sistem kapiler. Setelah kira-kira mencapai kurang lebih $\frac{3}{4}$ bagian pipa, ditutup dengan bahan penutup (*critoseal*). Pipa kapiler yang berisi darah kemudian di pusingkan dengan kecepatan putaran 1500 rpm selama 5 menit. Pengukuran dilakukan dengan membandingkan bagian darah yang mengendap (a) dengan seluruh bagian darah yang ada dalam tabung mikrohematokrit (b). kadar hematokrit dinyatakan sebagai % volume pada sel darah yang dihitung dengan cara

$$He = \frac{a}{b} \times 100\%$$

3.5.1.2 Kadar Hemoglobin

Kadar hemoglobin diukur menurut metode sahli (Collier, 1944) yaitu dengan menguisi tabung sahnometer dengan larutan HCI 0,1 N sampai garis skala paling bawah, kemudian ditempatkan diantara dua tabung dengan warna standar. Darah ikan dari tabung eppendorf diambil dengan pipet sahli sebanyak 0,02 ml dan dimasukkan dengan tabung sahli dan didiamkan selama 3 menit, sebelum ujung pipet di bersihkan terlebih dahulu. Kemudian ditambahkan akuades dengan pipet tetes sedikit demi sedikit dan diaduk sampai berubah warna tepat sama dengan warna

standar. Kadar hemoglobin dinyatakan dalam g% yang berarti banyaknya hemoglobin dalam gram per 100 ml darah.

3.5.1.3 Total Eritrosit

Cara menghitung total eritrosit dalam darah (Syawal *et al.* 2008). Jumlah eritrosit dihitung berdasarkan metode Oti & Avoaja (2005), dengan cara : sampel darah dihisap dengan pipet berskala sampai 0.5 selanjutnya hayem dihisap sampai skala 101, kedua bahan dalam pipet digoyahkan atau dianyunkan membentuk angka 8 selama 3-5 menit agar bercampur homogen. Tetesan pertama dibuang, tetesan berikutnya diteteskan ke dalam haemositometer dan ditutup dengan kaca penutup. Penghitungan dilakukan pada 5 kotak kecil haemosiometer dan jumlahnya dihitung dengan rumus :

$$\text{jumlah eritrosit} = \left(\frac{A}{N}\right) \times \left(\frac{1}{V}\right) \times fp$$

Keterangan:

A = Jumlah sel eritrosi terhitung

N = Jumlah kotak hemositometer yang diamati

V = Volume kotak hemositometer yang diamati

Fp = Faktor pengenceran

3.5.1.4 Total Leukosit

Pemeriksaan total leukosit juga bertujuan untuk melihat status kesehatan ikan (Syawal, *et al.* 2008). Total leukosit dihitung dengan metode Oti & Avoaja (2005). Sampel darah dihisap dengan pipet berskala sampai 0,5 dilanjutkan dengan menghisap larutan turk's sampai skala 11, dan dihomogenkan. Larutan yang dihasilkan dimasukkan ke dalam hemositometer dan ditiup dengan kaca penutup. Penghitungan dilakukan pada 5 kotak besar hemositometer dan jumlahnya dihitung dengan rumus:

$$\text{Jumlah leukosit} = \left(\frac{A}{N}\right) \times \left(\frac{1}{V}\right) \times fp$$

Keterangan:

A = Jumlah sel leukosit terhitung

N = Jumlah kotak hemositometer yang diamati

V = Volume kotak hemositometer yang diamati

Fp = Faktor pengenceran

3.5.2 Parameter Penunjang

3.5.2.1 Kualitas Air

Parameter kualitas air yang diukur adalah suhu, oksigen terlarut (DO), pH, pada setiap harinya dan TAN diukur pada awal dan akhir pemeliharaan. Satuan dan alat pengukuran disajikan pada Tabel 4 sebagai berikut ini :

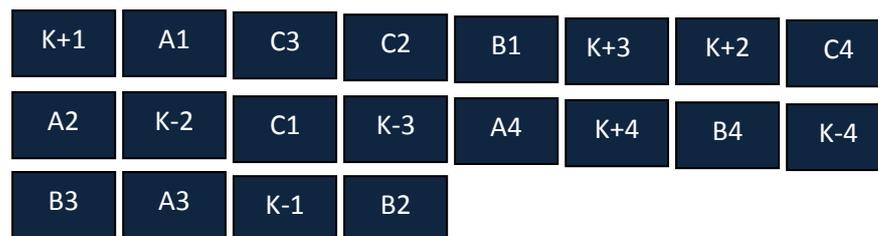
Tabel 4. Kualitas Air

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

3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini yang meliputi jumlah hematokrit, hemoglobin, total leukosit, dan total eritrosit yang akan dianalisa ANOVA dengan menggunakan program Microsoft exel 2007, Minitab 16 lebih lanjut akan dilakukan uji lanjut Duncan dengan selang kepercayaan 95%

3.7 Denah Penelitian



Gambar 5: Layout Unit Percobaan

Keterangan:

K+,K-,A,B,C = Perlakuan

1,2,3,4 = Ulangan