

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Kegiatan penelitian ini dilaksanakan di laboratorium program studi perikanan Universitas Muhammadiyah Gresik. Yang terletak di Jl. Sumatra 101, Kecamatan Kebomas Kabupaten Gresik selama bulan 2 Februari 2017.

3.2 Peralatan dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah akuarium 15 buah untuk pengamatan ikan, ember 4 buah untuk penelitian pendahuluan, DO meter, dan *thermometer* dengan merek "OUHAUS" dan akurasi $\pm 0,1$ pH, timbangan digital dengan merek "SHIMAZU", jarring ikan, pisau/cutter, erlenmayer, gelas ukur, pipet, suntik, *mikroskop* merek "YAZUMI", *hemocytometer*, aerasi, selang, *blower*.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini di antaranya, ikan lele 135 ekor, bakteri *Aeromonas hydrophila*, pakan ikan komersil, ekstrak *metanol* buah majapahit (*Crescentia cujete*), aquades, larutan hayem, dan larutan trucks.

3.3 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini yaitu metode eksperimental, yaitu mengadakan pengamatan percobaan untuk melihat suatu hasil yang ditunjukkan kearah penemuan fakta dan sebab akibat (Surachman W, 1995). Pengumpulan data yang diperoleh berupa data-data primer dan data-data sekunder.

Data primer diperoleh melalui teknik pengambilan data dengan cara observasi/pengamatan langsung di lapangan, (dengan mengadakan pencatatan pada observasi itu). Menurut Narbuto dan Ahmadi (2004), data primer yang digunakan melalui (pengamatan) observasi, yaitu melakukan pengamatan atau penelitian langsung ke lokasi penelitian, untuk mendapatkan gambaran yang jelas tentang pengaruh penggunaan ekstrak buah majapahit (*Crescentia cujete*) dengan dosis yang berbeda, dalam mengendalikan penyakit bercak merah oleh bakteri *Aeromonas hydrophila* pada budidaya ikan lele (*Clarias batrachus*).

Data sekunder berasal dari studi literatur berupa jurnal, penelitian, bulletin penelitian, materi seminar, buku-buku perikanan dan majalah-majalah, serta dokumentasi untuk melengkapi data yang diperoleh selama penelitian, serta sebagian bahan perbandingan hasil penelitian yang sebelumnya yang terkait dengan penggunaan ekstrak buah majapahit (*Crescentia cujete*) dengan dosis yang berbeda dalam mengurangi aktivitas bakteri *Aeromonas hydrophila*, pada budidaya ikan lele (*Clarias batrachus*) telah dilakukan. Studi pustaka dilakukan agar memperoleh bahan acuan yang mendukung dan melengkapi data primer.

3.4 Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). Perlakuan yang digunakan sebanyak 3 (tiga) perlakuan dengan 4 kali ulangan. Ekstrak segar buah majapahit (*Crescentia cujete*) di campurkan langsung pada pakan ikan yang akan dilakukan percobaan dimana sudah di infeksi dengan bakteri *Aeromonas hydrophila* dengan perlakuan dilakukan selama 9 hari, kemudian dilakukan sampling ikan untuk pengambilan darahnya untuk dibuat preparat dalam pengamatan diferensial *leukosit*. Pemeriksaan darah dapat membantu dalam proses diagnosa, penguji efek zat beracun pada ikan, dan mengevaluasi tekanan situasi. Kondisi darah ikan merupakan faktor penting. Sehingga sampling pengambilan darah banyak digunakan sebagai penilaian status kesehatan ikan (Amrullah, 2004).

Perlakuan yang diberikan pada penelitian ini adalah pemberian ekstrak buah majapahit (*Crescentia cujete*) sebagai bahan alami, yang diberikan untuk mengurangi aktivitas bakteri *Aeromonas hydrophila* pada budidaya ikan jawa (*Clarias batrachus*), didasarkan atas penelitian terdahulu dengan perlakuan 75 ppm, bisa dilihat pada gambar 5 denah penelitian dibawah ini :

Perlakuan Pemberian ekstrak buah majapahit:

Perlakuan A : Pemberian ekstrak buah majapahit dosis (65 ppm) ditambah bakteri *Aeromonas hydrophila*.

Perlakuan B : Pemberian ekstrak buah majapahit dosis (75 ppm) ditambah bakteri *Aeromonas hydrophila*.

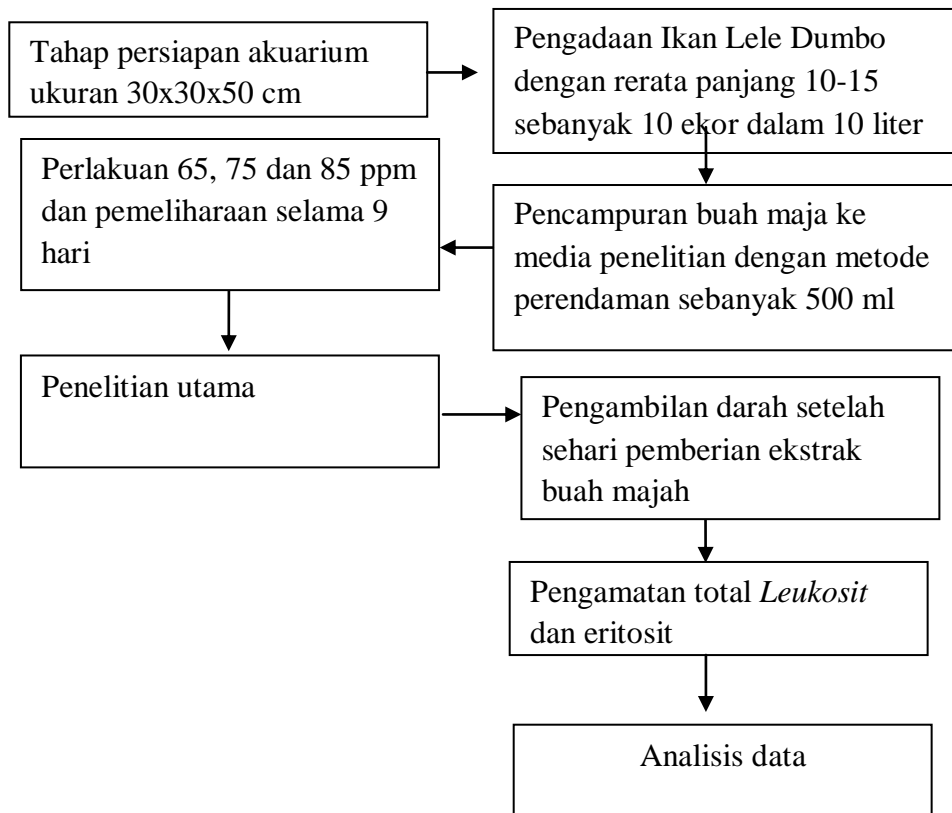
Perlakuan C : Pemberian ekstrak buah majapahit dosis (85 ppm) ditambah bakteri *Aeromonas hydrophila*.

Perlakuan K+ : Pemberian penyakit *Aeromonas hydrophila* tanpa pemberian buah majapahit

Perlakuan K- : Perlakuan yang tanpa diberi *Aeromonas hydrophila* dan tanpa pemberian ekstrak buah majapahit

3.5 Tahapan Penelitian

Skema tahap penelitian dapat dilihat pada gambar berikut :

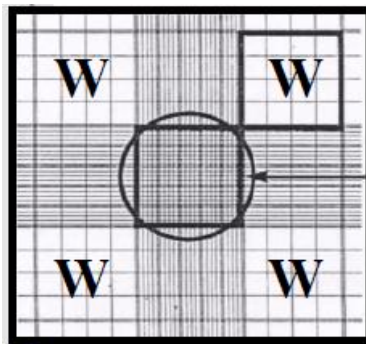


Gambar 4. Skema Tahap Penelitian

3.6 Parameter Utama

3.6.1 Penghitungan Total Sel Darah Putih (*Leukosit*)

Penghitungan total sel darah putih dihitung dengan menggunakan *haemocytometer*. Pertama, darah di hisap dengan pipet sampai skala 0,5. Selanjutnya di tambakan larutan *Turk's* sampai skala 11. Pipet digoyangkan membentuk angka 8 selama 3 – 5 menit. Tetesan pertama pada pipet dibuang, lalu tetesan selanjutnya diteteskan dalam *haemocytometer*. Selanjutnya di lakukan penghitungan pada 16 kotak besar dengan pesebaran 400 kali (Syawal et al,2008).



Keterangan :

W= kotak besar untuk menghitung *Leukosit* (sel darah putih) sel darah merah dihitung pada 4 kotak besar (W) *Haemocytometer*

$$W_{\text{total SDP}} = W_1 + W_2 + W_3 + W_4$$

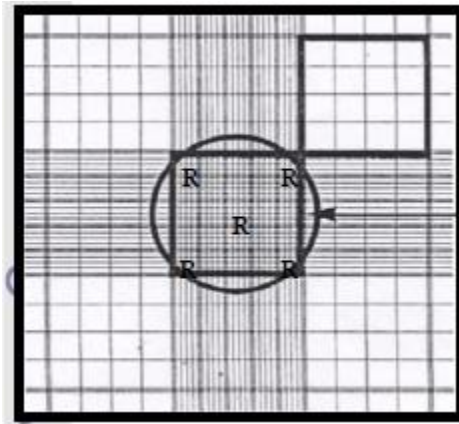
Rumus Total SDP:

$$\begin{aligned} \sum \text{SDP} &= \text{Jumlah sel terhitung} \times \frac{1}{\text{volume kotak besar}} \times \text{faktor pengenceran} \\ &= \frac{W_1 + W_2 + W_3 + W_4}{4} \times 50 \times 22 \\ &= \dots \text{ sel/mm}^3 \end{aligned}$$

3.6.2 Penghitungan Total Sel Darah Merah (*Eritrosit*)

Penghitungan total sel darah merah di hitung dengan menggunakan *haemocytometer*. Pertama darah dihisap dengan pipet sampai dengan skala 0,5. Selanjutnya, di tambakan dengan larutan *Hayem* sampai skala 101. Pipet digoyangkan membentuk angka 8 selama 3 – 5 menit. Tetesan pertama pada pipet dibuang, lalu tetesan selanjutnya diteteskan dalam

haemocytometer. Selanjutnya, dilakukan perhitungan pada 5 kotak kecil dengan pembesaran 400 kali (Syawal et al,2008).



Keterangan:

R= kotak besar untuk menghitung eritrosit (sel darah merah) sel darah merah di hitung 10 kotak besar (R) *haemocytometer*

$$R_{\text{total SDM}} = R_1 + R_2 + R_3 + \dots + R_{10}$$

$$\begin{aligned} \Sigma \text{SDM} &= \text{Jumlah sel terhitung} \times \frac{1}{\text{volume kotak kecil}} \times \text{faktor pengenceran} \\ &= \frac{R_1 + R_2 + \dots + R_9 + R_{10}}{10} \times \frac{1}{0,2 \times 0,2 \times 0,1 \text{ mm}^3} \times 200 \\ &= \dots \text{ sel/mm}^3 \end{aligned}$$

3.7 Parameter Penunjang

Parameter penunjang dalam penelitian ini berupa pengukuran kualitas air. Adapun parameter kualitas air yang diamati adalah suhu, oksigen terlarut (DO), dan pH. Pengukuran dilakukan sehari sekali selama penelitian berlangsung.

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Penyediaan Bakteri Uji

Bakteri *Aeromonas hydrophila*, yang berasal dari Laboratorium Universitas Airlangga Surabaya. pengadaan penumbuhan menggunakan

media bakteri dibeli dalam bentuk cair di media TBS dengan konsentrasi 10^7 CFU/ml sebanyak 500ml.

3.8.2 Uji Toksisitas

Uji toksisitas dilakukan untuk mendapatkan informasi atau data tentang toksisitas suatu bahan (kimia) pada ikan lele (*Clarias batrachus*). Secara umum uji toksisitas dapat dikelompokkan menjadi uji toksisitas jangka pendek/akut, dan uji toksisitas jangka panjang. Uji toksisitas akut dimaksudkan untuk mendapatkan informasi tentang gejala keracunan, penyebab kematian, urutan proses kematian dan rentang dosis yang mematikan hewan uji (*Lethal dose* atau disingkat LD_{50}) suatu bahan. Uji toksisitas akut merupakan efek yang merugikan yang timbul segera sesudah pemberian suatu bahan sebagai dosis tunggal, atau berulang yang diberikan dalam 24 jam. Uji toksisitas pada penelitian ini dilakukan dengan memasukan ekstrak buah majapahit dengan dosis 55 ppm, 65 ppm, 75 ppm dan 85 ppm ke dalam 4 ember dengan kepadatan ikan sebanyak 10 ekor / 5 liter Selanjutnya di hitung jumlah ikan yang mati di setiap perlakuan.

3.8.3 Persiapan ikan uji

Ikan lele (*Clarias batrachus*). yang digunakan berasal dari pembudidaya Gunung Sari Surabaya. Ikan lele yang digunakan berjumlah 192 ekor, berukuran panjang 10-15 cm dengan bobot rata-rata antara 12-15 gram per ekor. Setelah itu 182 ekor ikan akan di bagi menjadi 2 tahap penelitian yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian utama.

3.8.4 Uji Tantang Secara *In Vivo*

Uji *in vivo* pada penelitian ini dilakukan dengan 3 perlakuan 4 kali ulangan. Ikan lele di lakukan uji tantang dengan di infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* secara perendaman sebanyak 500 ml/l, kepadatan bakteri yang digunakan yaitu 10^7 CFU/mL selama 2x24 jam sampai terlihat gejala klinis ikan kemudian di lakukan perendaman menggunakan ekstrak buah majapahit dengan perendaman ekstrak 1 kali dengan lama waktu selama 9 hari, dosis di berikan berbeda pada setiap perlakuan pengamatan yang di lakukan selama 9 hari dengan mengamati *Leukosit* dan *eritrosit*

dari ikan uji pada setiap hari untuk mengetahui kemampuan ekstrak buah majapahit dalam menyembuhkan infeksi.

3.8.5 Pencampuran Ekstrak Buah Majapahit

Pencampuran ekstrak buah majapahit dilakukan dengan mencampurkan kedalam air dengan perbandingan 1 gram/ 3 liter air. Setelah melihat ciri-ciri adanya indikasi terinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*.

3.8.6 Pengambilan sampel darah

Pengambilan darah dilakukan melalui *vena caudalis* yang berada di bawah tulang belakang. Dengan menggunakan jarum suntik dengan ukuran 1 ml yang didalamnya sudah diberi EDTA 1 banding 10 untuk mencegah pembekuan darah. Pengambilan dan penyimpanan darah ke dalam tabung dilakukan secara perlahan-lahan untuk mengurangi resiko kerusakan sel darah. Pengambilan darah dilakukan setelah ikan diinfeksi, pada hari ke 1, 3, 5, 7 dan 9 . Sampel darah diambil dari tiap-tiap akuarium sebanyak 1 ekor.

3.9 Analisis Data

Data yang diambil dalam penelitian ini adalah daya hambat ekstrak daun majapahit (*Crescentia cujete*) terhadap pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila*. Berdasarkan data dalam penelitian ini menggunakan 3 perlakuan dan 4 ulangan maka secara keseluruhan akan didapat 12 unit percobaan. Hal ini sesuai menurut pendapat Marzuki (2002). Hasil pengamatan kemudian dilakukan analisis dengan menggunakan *analisis of variant*, dengan tabel distribusi F atau uji F yaitu membandingkan nilai F hitung dengan F tabel. Untuk melihat perbedaan antar perlakuan akan diuji lanjut dengan menggunakan uji Duncan.