

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. Yang kami rencanakan pada bulan Desember 2016 sampai dengan 2 Februari 2017.

3.2. Peralatan dan Bahan

3.2.1 Peralatan

Peralatan yang digunakan dalam pelaksanaan penelitian ini dapat dilihat pada tabel 2 sebagai berikut:

Tabel 2. Alat yang digunakan dalam pelaksanaan penelitian

No	Alat	Jumlah	Fungsi
1	Aquarium	15	Tempat untuk mengamati ikan.
2	Blue Tip	3	Alat untuk memindahkan cairan yang bervolume kecil.
3	Mikropipet	3	Alat untuk mengambil larutan.
4	Alat suntik	3	Alat untuk mengambil sampel darah dari ikan.
5	Blower	2	Alat untuk mensuplay kebutuhan oksigen.
6	Selang	15	Sebagai penghubung antara blower
7	Batu Airasi	15	Penambahan udara/oksigen dalam air
8	Hand Net Fishing	3	Alat untuk menyortir ikan
9	Talenan	1	Alas untuk membedah ikan.
10	Sectio Set.	2	Alat lengkap untuk membedah.
11	Preparat	2	Untuk meletakkan objek yang akan dimikroskop.
12	Cover Glas	2	Untuk menutup objek di atas kaca preparat.

13	Mikroskop	1	Alat untuk mengamati sel darah.
14	DO meter	1	Alat untuk mengukur oksigen terlarut.
15	pH meter		Alat untuk mengukur pH.
16	Alat Tulis	1	Untuk mencatat hasil penelitian.
17	Ember	4	Wadah untuk penelitian pendahuluan (uji toksisitas)

Sumber : Hasil Penelitian 2016

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada tabel 3 dibawah ini :

Tabel 3. Bahan yang digunakan dalam pelaksanaan penelitian

No.	Bahan	Fungsi
1.	Air tawar	Sebagai media dalam pengamatan
2.	Ikan Lele	Sebagai ikan yang akan diujicobakan
3	Ekstrak Buah majapahit	Sebagai bahan kimia alami yang akan diberikan pada ikan
4.	Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i>	Sebagai bakteri yang akan diinfeksi pada ikan lele
5.	Giemsa	Untuk mewarnai darah agar dapat terlihat jelas.
6.	EDTA	Sebagai anti koagulan/pembekuan.
7.	Metanol	Untuk mengikat sel darah.
8	Aquadest	Untuk membersihkan peralatan.

Sumber : Hasil Penelitian 2016

3.3 Prosedur penelitian

Penelitian ini dibagi menjadi beberapa tahap, yaitu persiapan wadah pemeliharaan, pengadaptasian ikan terhadap lingkungan uji, pengujian toksisitas dengan dosis yang berbeda mulai dari 0,55 µml, 0,65

μml , 0,75 μml , dan 0,85 μml , penyediaan bakteri uji, penyediaan ekstrak buah majapahit, aplikasi pengobatan bakteri *Aeromonas hydrophila* dengan melakukan ujiantang dan uji *in vivo* skala laboratorium.

3.3.1 Persiapan Wadah Pemeliharaan

Wadah pemeliharaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Aquarium ukuran 30 cm x 50 cm sebanyak 15 buah, terlebih dahulu aquarium dibersihkan dan dikeringkan selama 24 jam. Setelah itu toples diisi air 8 liter, untuk menjaga oksigen dan kestabilan suhu aquarium dilengkapi dengan aerator.

3.3.2 Pengadaptasian Ikan dan Uji Toksisitas (LD₅₀)

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 dibagi menjadi 2 tahap penelitian yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian utama. Dalam penelitian pendahuluan ada 4 ember yang digunakan untuk mengetahui dosis yang terbaik dari LD₅₀ di antaranya dosis yang diujikan yaitu, A (0,55 lt/ml), B (0,65 lt/ml), C (0,75 lt/ml) dan D (0,85 lt/ml) dimasukkan ke dalam ember uji coba. Ikan ukuran 10cm dipelihara selama 7 hari dan tidak diberi makan selama uji toksisitas agar tubuh ikan lele lemah sehingga mudah untuk terjangkit penyakit bakteri *Aeromonas Hydrophila* sekaligus mengetahui LD₅₀ yang terbaik untuk digunakan dalam penelitian utama.

3.3.3 Penyediaan Bakteri Uji

Bakteri *Aeromonas hydrophila* yang ditumbuhkan pada media *Tripticase Soy Agar* (TSA) berasal dari Kampus C Laboratorium Universitas Airlangga Surabaya.

3.3.4 Perendaman Ikan Lele dan Pemberian Ekstrak Buah Majapahit Secara *In Vivo*

Ikan yang telah melalui proses adaptasi kemudian diujiantang 192 ekor melalui metode perendaman karena cara ini lebih aplikatif dalam penyembuhan, dengan kepadatan bakteri *Aeromonas hydrophila* 10^7 cfu/ml. Selama 48 jam ikan diamati dan diseleksi menjadi 10 ekor per aquarium untuk perlakuan, perlakuan kontrol negatif tidak diinjeksi dengan bakteri sedangkan untuk perlakuan kontrol positif dan perlakuan dosis ekstrak buah maja (65 μ ml, 75 μ ml, dan 85 μ ml) Pemberian ekstrak buah maja dilakukan hari ke dua setelah penginfeksi.

3.4 Parameter yang Diamati

Parameter yang diamati adalah Survival Rate (SR) yang biasanya disebut dengan indeks kelulusan hidup suatu jenis ikan dan Diferensial Leukosit sebagai parameter utama dan parameter pendukung gejala klinis dan kualitas air.

3.4.1 Tingkat Mortalitas

Perhitungan jumlah ikan yang mati dilakukan setelah ujiantang sampai pasca perlakuan. Tingkat kematian ikan uji dihitung dengan rumus (Effendi 1979 dalam Wahjuningrum 2010).

$$\text{Mortalitas (\%)} = \frac{\text{Jumlah ikan yang mati (ekor)}}{\text{Jumlah Populasi (ekor)}} \times 100\%$$

3.4.2 Differensial Leukosit

Pemeriksaan darah ikan lele lokal (*Clarias Batracus*) dilakukan dengan metode ulas darah. Pemeriksaan ini diawali dengan pengambilan darah ikan melalui *vena caudalis*. Metode pengambilan sampel darah pada ikan lele lokal (*Clarias Batracus*) dilakukan menurut Svobodova dan Vykusova (2008). Pengambilan darah ini dilakukan dengan menggunakan jarum suntik yang sebelumnya sudah ditambahkan *Ethylene Diamine Tetra Acetatic* (EDTA) dengan dosis 1,50 mg/ml darah (Bijanti, 2012). Kemudian satu tetes sampel darah yang telah diberi antikoagulan diletakkan pada preparat yang kering dan bersih. Membuat hapusan darah yang tipis. Hapusan darah dikeringkan kemudian hapusan darah difiksasi dengan menggunakan metanol 95% selama 1- 2 menit. Kemudian melakukan pengecatan pada hapusan darah yang telah difiksasi dengan

pengecatan *Giemsa*. Dengan pengecatan giemsa akan tampak gambaran jenis-jenis leukosit. Setelah itu menunggu selama 20 menit, kemudian preparat dibilas dengan menggunakan air mengalir dan dikeringkan. Hapusan darah diamati dibawah mikroskop. (Bijanti R 2000).

3.4.3 Gejala Klinis

Gejala klinis diamati secara visual setiap enam jam sekali setelah ikan diuji tangkap sampai akhir masa perlakuan selama kurun waktu 3 hari. Gejala klinis meliputi radang, hemoragi, nekrosis dan tukak.

3.4.4 Kualitas Air

Pengukuran sifat kimia air yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi suhu, pH, dan DO. Perhitungan ini dilakukan setiap hari pada pagi dan sore hari agar kondisi lingkungan pemeliharaan terkontrol. Pengukuran suhu menggunakan thermometer, pengukuran pH menggunakan pH meter/kertas lakmus, dan pengukuran DO menggunakan DO meter.

3.5 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini yaitu metode eksperimental, yaitu mengadakan pengamatan percobaan untuk melihat suatu hasil yang ditujukan 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 jawa (*Clarias Batrachus*).

Data sekunder berasal dari studi literature 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 jawa (*Clarias Batrachus*) telah dilakukan.

Studi pustaka dilakukan agar memperoleh bahan acuan yang mendukung dan melengkapi data primer.

3.5.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). Perlakuan yang digunakan sebanyak 3 (tiga) perlakuan dengan 4 kali ulangan. Ekstrak segar daun majapahit (*Crescentia cujete*) di campurkan langsung pada pakan ikan yang di akan dilakukan percobaan dimana sudah di infeksiikan dengan bakteri *Aeromonas hydrophila* dengan perlakuan dilakukan selama 7 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).

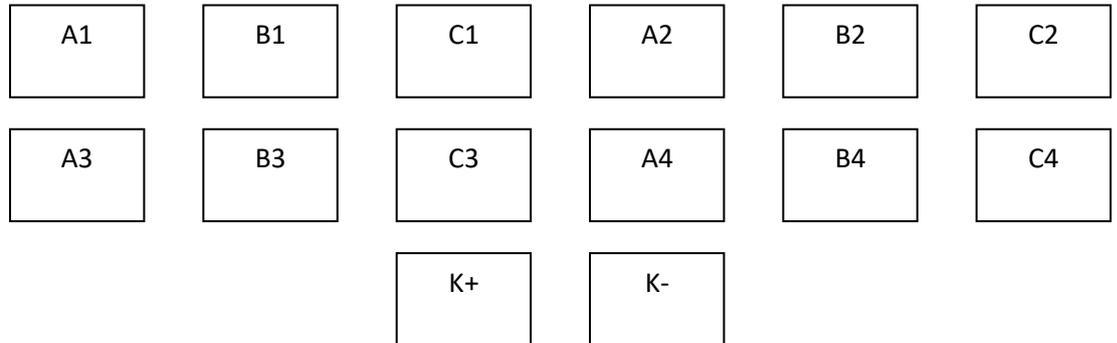
Perlakuan yang diberikan pada penelitian ini adalah pemberian ekstrak buah majapahit (*Crescentia cujete*) sebagai bahan alami, yang diberikan untuk mengurangi aktivitas bakteri *Aeromonas hydrophila* pada budidaya ikan jawa (*Clarias Batrachus*), didasarkan atas penelitian terdahulu dengan perlakuan 75 µml, bisa dilihat pada gambar 6 denah penelitian dibawah ini :

Perlakuan :

A = Pemberian ekstrak daun 0,65 μ ml

B = Pemberian ekstrak daun 0,75 μ ml

C = Pemberian ekstrak daun 0,85 μ ml



Gambar 3. Denah Penelitian

(Sumber. Hasil Penelitian 2016)

Keterangan :

Kontrol Negatif : Ikan sehat

Kontrol Positif : Ikan terinfeksi tanpa perlakuan

A, B, C : Perlakuan pemberian ekstrak buah majapahit

1,2,3,4 : Ulangan

Perlakuan :

Kontrol Negatif : Ikan Sehat Dengan Kepadatan Ikan Lele 10 Ekor

Kontrol Positif : Penginfeksian bakteri tanpa pemberian ekstrak buah majapahit dengan kepadatan ikan lele 10 ekor

Perlakuan A : Pemberian ekstrak buah majapahit dengan dosis 65 μ ml dengan kepadatan ikan lele 10 ekor

Perlakuan B : Pemberian ekstrak buah majapahit dengan dosis 75 μ ml dengan kepadatan ikan lele 10 ekor

Perlakuan C : Pemberian ekstrak buah majapahit dengan dosis 85 μ ml dengan kepadatan ikan lele 10 ekor

3.5.2 Parameter Penelitian

- a. Parameter Utama
 - 1) Sintasan / SR (Survival Rate)
 - 2) Differensial leukosit
- b. Parameter Penunjang
 - 1) Kualitas Air : a) Suhu b) pH c) Oksigen Terlarut

3.6 Analisis Data

Berdasarkan data pada penelitian ini menggunakan 3 perlakuan dan 4 kali ulangan, maka secara keseluruhan akan di dapat 12 unit percobaan yang akan dimasukkan dalam tabel pengumpulan data sesuai dengan masing-masing perlakuan. Analisis tersebut menggunakan program rancangan percobaan manual dengan menggunakan analisis sidik ragam ANOVA (*Analysis of Variance*). Apabila uji F menunjukkan berpengaruh nyata pada perlakuan, maka dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) antar perlakuan dengan taraf kesalahan 5% (Gasperz, 2001).

Berikut ini akan disajikan pengamatan penggunaan dosis ekstrak buah majapahit (*Crescentia cujete*) yang berbeda terhadap menurunnya aktivitas bakteri *Aeromonas hydrophila* terhadap ikan lele sangkuriang (*Clarias gariepinus*) pada tabel 4 sebagai berikut :

Tabel 4. Menyusun data untuk rancangan acak lengkap

Ulangan	Perlakuan			Total	Rata-rata
	A	B	C		
1	A1	B1	C1	T1	R1
2	A2	B2	C2	T2	R2
3	A3	B3	C3	T3	R3
4	A4	B4	C4	T4	R4
Total	TA	TB	TC	GT	
Rata-rata	RA	RB	RC		

Sumber : Hasil Penelitian (2016)

Keterangan:

- 1,2,3,4 : Ulangan
A, B, C : Perlakuan
TA, TB, TC : Total dari masing-masing perlakuan
T1, T2, T3, T4 : Total dari ulangan 1 sampai 4
R1, R2, R3, R4 : Rata-rata ulangan 1 sampai 4
RA, RB, TC : Rata-rata dari perlakuan A, B, C

Perhitungan:

- Faktor Koreksi : $\frac{GT^2}{\text{Perlakuan} \times \text{Ulangan}}$
- JKT : $(A1)^2 + (A2)^2 + (A3)^2 + \dots + (C3)^2 - FK$
- JKP : $\frac{(T1)^2 + (T2)^2 + (T3)^2 - FK}{\text{Ulangan}}$
- JKU : $\frac{(T1)^2 + (T2)^2 + (T3)^2 - FK}{\text{Perlakuan}}$
- JK Sisa (JKS) : $JKT - JKP - JKU$
- KT Perlakuan (KTP) : $\frac{JKP}{\text{dbPerlakuan}}$
- KT Ulangan (KTU) : $\frac{JKU}{\text{dbPerlakuan}}$
- KT Sisa (KTS) : $\frac{JKS}{\text{dbSisa}}$
- F Hitung : $\frac{KTP}{KTS}$

Dari hasil perhitungan tersebut dimasukkan dalam daftar analisa sidik ragam yang disajikan dalam tabel 5 sebagai berikut :

Tabel 5. Daftar analisa sidik ragam

Sumber Keragaman	Derajat	Jumlah	Kuadrat	F _{hitung}	F _{table}	
	Bebas (db)	Kuadrat (JK)	Tengah (KT)		5%	1%
Ulangan	U -1	JKU	KTU			
Perlakuan	P -1	JKP	KTP	KTP/KTS		
Sisa		JKS	KT S			
Total	((PxU) -1)					

Sumber : Hasil Penelitian (2016)

Keterangan:

JK adalah Jumlah Kwadrat

KT adalah Kwadrat Tengah

Db adalah Derajat Bebas

Selanjutnya untuk mengetahui apakah ada perbedaan nyata diantara perlakuan yang diberikan, maka menurut Sastrosupadi (2000) dilakukan perbandingan antara F_{hitung} dan F_{tabel} dengan ketentuan sebagai berikut:

- Apabila nilai $F_{hitung} > F_{1\%}$ maka terdapat perbedaan yang sangat nyata diantara perlakuan (*highly significant*).
- Apabila nilai $F_{hitung} > F_{5\%}$ tetapi $< F_{1\%}$ maka terdapat perbedaan yang nyata diantara perlakuan (*significant*).
- Apabila nilai $F_{hitung} < F_{5\%}$ maka tidak ada perbedaan yang nyata diantara perlakuan (*non significant*).

Apabila uji F menunjukkan perbedaan pada perlakuan, maka dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) menurut Sastrosupadi (2000) dengan rumus:

$$\text{Rumus : BNT } 5\% = t_{0,05}(\text{dbGalat}) \times \frac{\sqrt{2 \text{KTG}}}{n}$$

$$\text{BNT } 1\% = t_{0,01}(\text{dbGalat}) \times \frac{\sqrt{2 \text{KTG}}}{n}$$

Apabila nilai tengah dari perlakuan tersebut lebih besar dari pada nilai BNT maka nilai tersebut berbeda nyata atau sangat nyata, karena itu uji BNT tersebut dilakukan dengan menggunakan selisih tengah perlakuan.