

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Juli 2012 di Laboratorium Perikanan Jurusan Budidaya Perairan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung. Pembuatan preparat histologi insang dilakukan di Balai Penyidikan dan Pengembangan Veteriner (BPPV) Lampung.

3.2. Hewan Uji

Ikan yang digunakan pada saat penelitian adalah ikan patin siam (*Pangasius hypophthalmus*) dengan bobot $2,16 \pm 0,24$ g. Setiap perlakuan menggunakan ikan uji sebanyak 10 ekor dengan tiga kali pengulangan.

3.3. Alat dan Bahan

3.3.1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah akuarium dengan ukuran 50 x 40 x 40 cm³ dengan volume air sebanyak 30 liter, timbangan digital, aerator, blower, selang aerasi, batu aerasi, ember, gayung, gelas ukur, mikropipet, thermometer, DO meter, kertas pH, *scoopnet*, alat bedah, sarung tangan, masker, botol film, kaset *embedding*, *Automatic Tissue Processor*, pisau mikrotom, mikrotom, mikrotom putar, *Floating Bath*, jarum, objek gelas, gelas penutup, tempat pemanas (*hot plate*), mikroskop, lemari pendingin, tissue, dan alat tulis.

3.3.2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah herbisida dengan merk dagang Ally 20 WDG berbahan aktif metil metsulfuron 20%, akuades, pakan, formalin 5%, alkohol 70%, 80%, 95%, 100%, xylol, paraffin, hematoksilin, dan eosin.

3.4. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan menggunakan 3 perlakuan dan 1 kontrol. Setiap perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Perlakuan yang digunakan adalah sebagai berikut:

3.4.1 Perlakuan pada Uji Penentu Selang Konsentrasi

Perlakuan K: konsentrasi metil metsulfuron 0 ppm (kontrol)

Perlakuan A: konsentrasi metil metsulfuron 1 ppm

Perlakuan B: konsentrasi metil metsulfuron 10 ppm

Perlakuan C: konsentrasi metil metsulfuron 100 ppm

3.4.2 Perlakuan pada Uji Definitif

Perlakuan K: konsentrasi metil metsulfuron 0 ppm (kontrol)

Perlakuan A: konsentrasi metil metsulfuron 2,5 ppm

Perlakuan B: konsentrasi metil metsulfuron 6,25 ppm

Perlakuan C: konsentrasi metil metsulfuron 15,6 ppm

Perlakuan D: konsentrasi metil metsulfuron 39 ppm

Perlakuan E: konsentrasi metil metsulfuron 97,5 ppm

3.5. Persiapan Penelitian

3.5.1. Wadah

Wadah pengujian berupa akuarium berukuran 50 x 40 x 40 cm³ yang dibersihkan terlebih dahulu. Akuarium diisi dengan air sebanyak 30 liter kemudian diberi aerasi.

3.5.2. Media Uji

Media uji yang digunakan dalam penelitian adalah air sebanyak 30 liter yang diberi perlakuan metil metsulfuron. Volume air yang digunakan disesuaikan dengan ukuran ikan, yaitu 1 liter air untuk ikan berukuran 4-6 cm (Probosunu, 2004). Sebelum air pemeliharaan diberi perlakuan, terlebih dahulu dilakukan pembuatan larutan stok 1000 ppm dengan melarutkan 5 gram Ally 20 WDG dengan akuades sebanyak 1 liter. Larutan stok 1000 ppm dibuat dengan perhitungan sebagai berikut:

$$1 \text{ gram bahan} = x \% \text{ kandungan}$$

$$1 \text{ gram kandungan} = \frac{1 \text{ gram bahan}}{x \% \text{ kandungan}}$$

$$= \frac{1 \text{ gram}}{20 \%}$$

$$= 5 \text{ gram}$$

Keterangan:

x %: Persentase bahan aktif

3.6. Pelaksanaan Penelitian

3.6.1. Uji Penentu Selang Konsentrasi

Uji penentu selang konsentrasi bertujuan untuk menentukan ambang daya racun letal bahan kimia terhadap ikan uji. Uji dilakukan dengan cara menentukan konsentrasi ambang atas (LC₁₀₀-24 jam) yaitu konsentrasi terendah dimana semua hewan uji mati dalam selang waktu 24 jam dan konsentrasi ambang bawah (LC₀-48 jam) yang merupakan konsentrasi tertinggi dimana hewan uji tetap hidup dalam selang waktu 48 jam. Konsentrasi yang digunakan pada uji penentu selang konsentrasi yaitu 0 ppm, 1 ppm, 10 ppm, dan 100 ppm. Konsentrasi perlakuan berbasis angka 10 (Koesoemadinata, 1983 *dalam* Rudiyantri, dkk., 2009).

Sistem pemaparan yang digunakan pada uji penentu selang konsentrasi adalah sistem uji statis, yaitu hewan uji dipaparkan dalam air tenang dalam wadah uji. Bahan uji ditambahkan ke dalam air sehingga terjadi pengenceran bahan uji untuk mendapatkan konsentrasi yang diinginkan. Hewan uji kemudian dimasukkan ke dalam masing-masing wadah dan tidak dilakukan pergantian air selama uji berlangsung.

Berdasarkan pada hasil uji penentu selang konsentrasi, dapat ditentukan deret konsentrasi metil metsulfuron untuk digunakan pada uji definitif dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Log } \frac{N}{n} = k \left(\log \frac{a}{n} \right) \dots \dots \dots (1)$$

Dimana:

- N : konsentrasi ambang atas
- n : konsentrasi ambang bawah
- a : konsentrasi terkecil dalam deret konsentrasi
- k : jumlah konsentrasi yang diujikan (a,b,c,d,e)

(Finney, 1971)

3.6.2 Uji Definitif

Uji Definitif (LC₅₀-96 jam) dilakukan dengan cara yang sama dengan uji penentu selang konsentrasi tetapi dengan variasi konsentrasi yang lebih sempit. Selama uji definitif berlangsung sebaiknya dilakukan aerasi pada setiap perlakuan agar hasil yang diperoleh merupakan efek dari bahan uji, bukan karena kekurangan oksigen selama masa pengujian. Pada uji definitif dilakukan pengamatan pola aktivitas hewan uji (tingkah laku), kualitas air, dan mortalitas (Probosunu, 2004).

Hubungan nilai logaritma konsentrasi uji dengan persentasi mortalitas (dalam probit), merupakan fungsi linier : $Y = a + bX$. Nilai LC₅₀-96 jam diperoleh anti log m. Nilai m merupakan nilai X pada saat kematian sebesar 50% sehingga fungsi liniernya adalah $5 = a + bX$. Untuk menentukan nilai a maupun b digunakan persamaan sebagai berikut:

$$b = \frac{\sum XY - \frac{1}{n}(\sum X)(\sum Y)}{\sum X^2 - \frac{1}{n}(\sum X)^2}$$

$$a = \frac{1}{n}(\sum Y - b\sum X)$$

$$m = \frac{5 - a}{b}$$

$$LC_{50} - 96 \text{ jam} = \text{unlog } m \dots \dots \dots (2)$$

Keterangan:

Y = nilai probit mortalitas hewan uji

- X = logaritma konsentrasi uji
 a = konstanta
 b = slope
 m = nilai X pada Y = 5 (nilai probit 50% mortalitas hewan uji)
 (Finney, 1971)

Sistem pemaparan yang digunakan yaitu sistem uji statis (tanpa pergantian media). Selama pengujian berlangsung dilakukan pengukuran kualitas air (suhu, pH, dan DO). Pencatatan data mortalitas dilakukan pada 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72 dan 96 jam. Pengujian diulangi jika kematian ikan uji dalam kontrol lebih dari 10%. Rumus yang digunakan untuk menghitung kelulusan hidup (*survival rate*) adalah sebagai berikut:

$$SR = \frac{N_t}{N_o} \times 100 \dots\dots\dots(3)$$

Keterangan:

SR = Kelulusan hidup hewan uji (%).

Nt = Jumlah ikan uji pada akhir penelitian (ekor).

No = Jumlah ikan uji pada awal penelitian (ekor).

(Effendie, 1979)

3.6.3. Pembuatan Preparat

Preparat histologis yang dibuat adalah preparat bagian insang ikan patin siam menggunakan pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE).

Adapun prosedur dalam pembuatan preparat adalah:

1. Ikan dibedah dan diambil bagian insang.
2. Insang difiksasi menggunakan formalin 5 % selama 24 jam dengan tujuan untuk pengawetan, kemudian diletakkan pada kaset *embedding*.
3. Jaringan insang didehidrasi dengan perendaman pada alkohol 70%₁, 70%₂, 80%₁, 80%₂, 95%₁, 95%₂, absolut₁, absolut₂ masing-masing selama 1 jam. Dehidrasi dilakukan untuk menghilangkan kandungan air dalam jaringan.
4. Jaringan insang direndam pada xylol₁ dan xylol₂ masing-masing 1 jam agar jaringan menjadi jernih.
5. Jaringan insang direndam dalam parafin₁ dan parafin₂ masing-masing 1 jam, kemudian dicetak pada cetakan *stainless* dan dibiarkan mengeras.
6. Jaringan insang yang telah dicetak kemudian diiris menggunakan mikrotom.
7. Jaringan yang telah diiris diregangkan ke dalam *floating bath* kemudian ditempel pada objek gelas.
8. Jaringan pada gelas objek dikeringkan pada *hot plate* lalu dilakukan proses pewarnaan dengan HE.
9. Proses pewarnaan hematoksilin dan eosin adalah sebagai berikut:
 - a. Jaringan pada gelas objek direndam dengan xylol₁, xylol₂, alkohol absolut₁, alkohol absolut₂, alkohol 95%₁, alkohol 95%₂ masing-masing 2 menit untuk mengeluarkan sisa paraffin.
 - b. Jaringan pada gelas objek direndam dengan hematoksilin selama 5 menit, kemudian jaringan dialiri aquades selama 2 menit.

- c. Jaringan pada gelas objek direndam acid alkohol selama 1 menit, kemudian dialiri air selama 5 menit.
- d. Jaringan pada gelas objek direndam dalam eosin selama 5-15 menit.
- e. Proses selanjutnya adalah perendaman dengan alkohol 95%₁, alkohol 95%₂, alkohol absolut₁, alkohol absolut₂, xylol₁, xylol₂, xylol₃ masing-masing selama 2 menit.
- f. Jaringan pada gelas objek ditutup dengan gelas penutup, kemudian diamati di bawah mikroskop setelah kering (Panigoro, dkk., 2007).

3.6.4 Analisis Data

Data mortalitas yang diperoleh dari uji definitif, terlebih dahulu dilakukan uji normalitas dan homogenitas untuk mengetahui sebaran data. Selanjutnya data dianalisis dengan uji ANOVA (*Analysis of Variance*) dan jika hasil menunjukkan adanya pengaruh yang berbeda, maka dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan (Steel and Torrie, 1976). Analisis secara deskriptif dilakukan pada preparat histologi insang ikan patin siam, dengan membandingkan preparat insang ikan patin siam kontrol dengan preparat insang ikan patin siam yang diberi perlakuan metil metsulfuron.