I. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dan pembuatan preparat ulas darah serta perhitungan hematokrit sel darah merah dilakukan pada bulan Juli 2012 di Laboratorium Perikanan Jurusan Budidaya Perairan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung.

3.2 Hewan Uji

Ikan yang digunakan pada penelitian ini adalah benih ikan patin siam (*Pangasius hypopthalmus*) sehat dan berkualitas baik, dengan rerata berat tubuh 2,16 $\pm$ 0,24 gram. Jumlah ikan uji yang digunakan pada masing-masing wadah adalah 10 ekor dengan tiga kali pengulangan.

3.3 Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian berupa: Akuarium kaca 18 buah, saringan ikan, mikropipet, timbangan, kertas label, baki, ember, masker, sarung tangan, alat tulis, alat ukur kualitas air (termometer, kertas pH, DO meter), lemari pendingin, gelas objek, spuit, mikroskop, tabung kapiler, lilin malam, sentrifus, tabung eppendorf, gelas ukur, dan vortex.

3.4 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas: pakan benih ikan patin, herbisida ally 20 WDG, aquades, larutan EDTA, metanol, dan larutan giemsa 5%.

3.5 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Setiap perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Perlakuan pada uji penentuan selang konsentrasi dengan menggunakan 3 perlakuan dan 1 kontrol, yaitu sebagai berikut:

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

Pada uji definitif dengan menggunakan 5 perlakuan dan 1 kontrol, adalah sebagai berikut:

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

3.6 Persiapan Penelitian

3.6.1 Wadah Uji

Wadah yang digunakan dalam pengujian berupa akuarium kaca berukuran 40x40x50 cm^3 sebagai wadah untuk uji penentuan selang konsentrasi dan uji definitif. Akuarium kaca merupakan material yang tidak mengurangi konsentrasi melalui penyerapan atau penambahan bahan ke dalam media karena reaksi kimia sehingga tidak berpengaruh pada metil metsulfuron. Sebelum penelitian dilakukan, wadah pegujian dibersihkan terlebih dahulu dengan air. Media yang digunakan juga harus memiliki kualitas air yang sesuai dengan kebutuhan ikan patin.

3.6.2 Media Uji

Media uji yang digunakan adalah formulasi metil metsulfuron, yaitu Ally 20 WDG dengan konsentrasi tertentu di dalam air sebanyak 30 liter. Larutan stok 1000 ppm disiapkan terlebih dahulu dengan melarutkan 5 gram Ally 20 WDG dalam satu liter akuades. Larutan stok 1000 ppm kemudian diencerkan sesuai dengan konsentrasi perlakuan yang dibutuhkan.

3.7 Pelaksanaan Penelitian

3.7.1 Uji Penentuan Selang Konsentrasi

Pada uji penentuan selang konsentrasi terlebih dahulu dilakukan pembuatan stok 1000 ppm karena herbisida Ally 20 WDG yang digunakan mengandung bahan aktif metil metsulfuron 20 % maka dengan perhitungan:

1 gram bahan = X% kandungan

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

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

$$= \frac{1 \text{ gram}}{0{,}2}$$

$$= 5 \text{ gram}$$

Jadi 5 gram bahan herbisida dilarutkan di dalam 1 liter akuades/air

Keterangan:

X% : persentase bahan aktif.

Uji penentuan selang konsentrasi ini bertujuan untuk memperkirakan dosis metil metsulfuron yang menyebabkan mortalitas 100% serta mengetahui ambang atas dan ambang bawah penggunaannya. Lama perlakuan 2 hari (48 jam) dengan menggunakan konsentrasi 0; 1; 10; 100 ppm. Jumlah ikan uji pada setiap wadah adalah 10 ekor dalam 30 liter media uji. Pada uji penentuan selang konsentrasi menggunakan uji statis yaitu tanpa pergantian media uji. Selama uji berlangsung dilakukan pengamatan dan pencatatan mortalitas. Pada setiap pengujian dilakukan pencatatan data fisika dan kimia media uji, yaitu pada awal pengujian (0 jam), selama pengujian (24 jam) dan pada akhir pengujian (48 jam).

Berdasarkan pada hasil uji penentuan selang konsentrasi tersebut dapat ditentukan konsentrasi herbisida dengan bahan aktif metil metsulfuron untuk digunakan pada uji definitif dengan rumus di bawah ini, Rumus untuk menentukan deret konsentrasi perlakuan adalah sebagai berikut:

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

Keterangan :

N : konsentrasi ambang atas

n : konsentrasi ambang bawah

a : konsentrasi terkecil dalam deret konsentrasi

k : jumlah konsentrasi yang diujikan (a,b,c,d,e)

Perhitungan konsentrasi :

$$\frac{a}{n} = \frac{b}{a} = \frac{c}{b} = \frac{d}{c} = \frac{e}{d} = \frac{N}{e}$$

(Finney, 1971)

3.7.2 Uji Definitif (Toksisitas Akut)

Tujuan dilakukannya uji definitif adalah untuk menentukan konsentrasi bahan uji yang menghasilkan efek merugikan terhadap suatu organisme uji dalam selang waktu pemaparan yang pendek dibawah kondisi terkontrol. Langkah awal yang dilakukan pada uji definitif adalah membagi ikan uji pada wadah sebanyak 10 ekor ikan pada setiap perlakuan. Ikan uji tersebut diberi perlakuan berupa pemaparan metil metsulfuron dengan 6 konsentrasi berbeda yaitu 0; 2,5; 6,25; 15,6; 39; 97,5 ppm (Lampiran 1). Pada perlakuan metode ulas darah dan perhitungan hematokrit dilakukan pada ikan dengan konsentrasi 0 ppm (K); 15,6 ppm (C); dan 39 ppm (D).

Selama uji definitif berlangsung dilakukan pengamatan dan pencatatan kematian ikan uji. Jumlah ikan uji pada setiap wadah adalah 10 ekor dan 30 liter media uji. Sistem pemaparan yang digunakan yaitu sistem uji statis (tanpa pergantian media). Pada setiap pengujian dilakukan pencatatan data fisika dan kimia media

uji, yaitu pada selang waktu 0, 48, 72, dan 96 jam. Pencatatan data mortalitas dilakukan pada selang waktu 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72 dan 96 jam.

Hubungan nilai logaritma konsentrasi uji dengan persentasi mortalitas (dalam probit), merupakan fungsi linier : Y = a + bX. Nilai LC_{50}-96 jam diperoleh unlog 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:

$$b = \frac{\sum XY - \frac{1}{n}(\sum X)(\sum Y)}{\sum X2 - \frac{1}{n}(\sum X)2}$$

$$a = 1/n\ (\sum Y\ -\ b\sum X)$$

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

LC_{50}-96 jam = unlog m

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)

3.8 Pembuatan Preparat Ulas Darah

3.8.1 Persiapan ulas darah

Pada persiapan ulas darah dilakukan dengan pengambilan darah menggunakan jarum suntik steril pada bagian *vena caudalis* dekat ekor di antara sisik ikan uji. Jarum suntik tersebut sebelumnya telah dibasahi dengan larutan EDTA yang berfungsi sebagai antikoagulan.

3.8.2 Pembuatan Preparat Ulas Darah

Pembuatan preparat ulas darah dilakukan dengan menempatkan satu tetes darah pada satu gelas objek, dan gelas objek kedua diletakkan dengan sudut 45° terhadap gelas objek pertama. Kemudian gelas objek kedua digeser hingga menyentuh darah dan darah menyebar merata di antara dua gelas objek tersebut. Selanjutnya gelas objek kedua digeser ke arah berlawanan, sehingga terbentuk lapisan darah yang tipis pada gelas objek pertama. Preparat tersebut kemudian dibiarkan kering udara selama 15 menit dan selanjutnya direndam dalam metanol selama 5 menit.

3.8.3 Pewarnaan dan Pengamatan Preparat Ulas Darah

Preparat dikeringkan untuk kemudian dilakukan pewarnaan dengan cara direndam dalam Giemsa 5% selama 15 menit. Proses pewarnaan dapat memudahkan dalam pengamatan komponen jaringan. Pengamatan dilakukan dengan cara mengamati sel darah merah yang rusak pada preparat ulas darah menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400 kali. Data yang diperoleh dari hasil pengamatan dibawah

mikroskop dilihat perubahannya dan membandingkan antara kelompok kontrol dengan perlakuan serta dicatat dan difoto (Yudha, 1999).

3.9 Metode Mikro Hematokrit

Hematokrit adalah persentase volume sel darah merah (eritrosit) dalam darah. Metode pengukuran hematokrit dilakukan dengan cara mengisi tabung kapiler dengan darah yang telah diberi EDTA dan dimampatkan dengan lilin malam pada salah satu ujung tabung. Tabung kapiler tersebut kemudian disentrifus dengan kapasitas putar 3000 rpm selama 10 menit. Pada metode mikro hematokrit tingginya kolom eritrosit dinyatakan dalam persen dari volume darah pada tabung kapiler tersebut.

3.10 Metode 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, 2001).

Analisis secara deskriptif dilakukan pada preparat ulas darah dan hematokrit ikan patin siam (*Pangasius hypopthalmus*), dengan membandingkan preparat ulas darah dan hematokrit ikan patin siam kontrol dengan yang diberi perlakuan konsentrasi metil metsulfuron.