

### III. MATERI DAN METODE PENELITIAN

#### A. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September sampai Oktober 2011, di Laboratorium Budidaya Perairan Fakultas Pertanian Universitas Lampung.

#### B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian adalah tabung reaksi, cawan petri, tabung *ependorf*, kaca preparat dan kaca penutupnya, *haemocytometer*, pipet hisap, mikroskop, kaca obyek, *sentrifuge*, batang spreader, corong, erlenmeyer, lampu bunsen, *autoclave*, jarum suntik (sprit) ukuran 0,5" 23G, *hot plate stirrer*, akuarium ukuran 50 x 40 x 40 cm, perlengkapan aerasi, *scoopnet*, *thermometer*, pH meter, DO meter, tabung pengambilan sampel air, mikropipet, *colony counter*, pompa air, pipa paralon, dan blower (Lampiran 7).

Bahan yang digunakan pada penelitian adalah isolat bakteri *A. salmonicida* yang sudah tersedia di laboratorium Program Studi Budidaya Perairan Universitas Lampung, ikan mas (*Cyprinus carpio* L.) ukuran 7 cm sampai 8 cm, probiotik *Bacillus* sp. dari produk komersil, pakan pelet, minyak cengkeh, larutan EDTA 10%, etanol, methanol, larutan asam asetat 10%, giemsa, aquades dan larutan turk (Lampiran 7).

## **C. Metode Penelitian**

Penelitian dirancang dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Terdiri dari 4 perlakuan, yaitu dosis probiotik 0 ml/kg pakan, 2 ml/kg pakan, 3 ml/kg pakan, dan dosis probiotik 4 ml/kg pakan. Tiap perlakuan diulang sebanyak 3 kali ulangan dengan asumsi ukuran dan kondisi ikan serta konsentrasi bakteri *A. salmonicida* pada tiap unit percobaan pada masing-masing metode uji homogen.

## **D. Prosedur Penelitian**

### **1. Tahap Persiapan**

#### **1.1 Sterilisasi Peralatan**

Sterilisasi merupakan upaya yang dilakukan untuk membebaskan peralatan dari mikroorganisme kontaminan. Peralatan yang akan digunakan dimasukkan ke dalam *autoclave*, yang sebelumnya alat-alat tersebut dibungkus dengan plastik tahan panas yang bertujuan untuk mencegah alat-alat tersebut terkena air. Sterilisasi dimulai pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 sampai 20 menit (Febriani, 2010).

#### **1.2 Persiapan Wadah dan Ikan Uji**

Wadah yang akan digunakan berupa akuarium berukuran 50 x 40 x 40 cm<sup>3</sup> dengan jumlah 12 unit. Wadah disusun dan diberi label secara acak. Sebelum

digunakan, akuarium terlebih dahulu dibersihkan kemudian diisi air yang telah diendapkan selama 24 jam sampai ketinggian 25 cm dan diberi peralatan aerasi.

Ikan uji yang digunakan adalah ikan mas berukuran panjang 8 cm sampai 10 cm dan berat kurang lebih 100 gram. Sebelum pemberian probiotik, terlebih dahulu dilakukan adaptasi untuk ikan uji selama satu minggu. Pemberian probiotik dilakukan dengan cara mencampurkannya dengan pelet. Probiotik diberikan selama penelitian.

### 1.3 Uji LD<sub>50</sub>

Uji LD<sub>50</sub> dilakukan untuk mengetahui tingkat patogenitas bakteri *A. salmonicida* terhadap ikan mas. Hasil yang didapatkan akan digunakan sebagai acuan untuk melaksanakan ujiantang. Pada uji LD<sub>50</sub> ikan mas diinjeksi dengan bakteri *A. salmonicida* pada konsentrasi yang berbeda yaitu 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup>, dan 10<sup>8</sup> cfu/ml/ekor ikan. Terdapat 10 ikan dalam setiap perlakuan. Konsentrasi tiap perlakuan yang akan digunakan dengan teknik pengenceran berseri (lampiran 1). Penyuntikan dilakukan secara intramuskular sebanyak 0,1 ml/ikan. Pengamatan dilakukan selama 7 hari dengan menghitung tingkat kelulusan hidup ikan. LD<sub>50</sub> dapat dihitung dengan:

$$\text{Selang proporsi} = \frac{\text{kematian diatas 50\%}-50}{\text{kematian diatas 50\%}-\text{kematian dibawah 50\%}}$$

Log negatif LD<sub>50</sub> = log negatif konsentrasi di atas 50% + selang proporsi

(Pratama, 2010).

## **2. Tahap Pelaksanaan**

### **2.1 Pemberian Probiotik**

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan 3 ulangan. Dosis yang digunakan dalam penelitian ini yaitu:

A: Dosis probiotik 0 ml/kg pakan (kontrol)

B: Dosis probiotik 2 ml/kg pakan

C: Dosis probiotik 3 ml/kg pakan

D: Dosis probiotik 4 ml/kg pakan

Setelah probiotik dicampurkan dalam pakan lalu dikering-anginkan selama 2 jam (Lampiran 9).

Pakan bercampur probiotik diberikan pada ikan mas setiap hari selama 22 hari pemeliharaan dengan frekuensi pemberian pakan sebanyak 3 kali sehari. Pakan yang diberikan sesuai perlakuan pada masing-masing akuarium dengan jumlah FR 4 % (Ringkasan SNI,1999).

### **2.2 Uji Tantang**

Uji tantang dilakukan pada hari ke 15 pemberian pakan dengan probiotik dengan menggunakan metode suntik dengan cara intramuskular. Sebelum dilakukan penyuntikan bakteri *A. salmonicida* terhadap ikan mas, terlebih dahulu dilakukan pembiusan dengan menggunakan minyak cengkeh dengan dosis 0,05 ppt (Lampiran 2). Bakteri yang digunakan adalah *Aeromonas salmonicida* dengan konsentrasi kepadatan berdasarkan dosis LD-50 sebanyak 0,1 ml/ekor pada setiap perlakuan (Pratama, 2010).

### 3. Tahap Pengamatan

#### 3.1 Pemeriksaan darah

Pemeriksaan darah ikan dilakukan dengan menghitung total leukosit dan persentase diferensial leukosit yaitu neutrofil, monosit dan limfosit. Pengambilan darah dilakukan melalui *vena caudalis* yang berada di pangkal ekor ikan menggunakan spuit 1 cc. Sebelumnya, jarum suntik dan tabung *ependorf* dibilas dengan larutan EDTA 10% untuk mencegah pembekuan darah. Kemudian darah disimpan dalam tabung *ependorf* tersebut (Lampiran 3). Pengambilan sampel darah ikan dilakukan pada hari ke-0 (sebelum pemberian probiotik), hari ke-14, dan hari ke-22.

1) Perhitungan total leukosit menurut Blaxhall dan Daisley (1973) dalam Zainun (2007) adalah:

1. Bilik hitung *haemocytometer* dan kaca penutupnya dibersihkan dengan etanol, kemudian kaca penutup dipasang pada *haemocytometer*.
2. Sampel darah dihisap dengan pipet berskala sampai 0,5 dilanjutkan dengan menghisap larutan turk sampai skala 11 (pengenceran 1:20), kemudian digoyangkan selama 3 menit agar bercampur homogen.
3. Empat tetesan pertama dibuang, tetesan berikutnya dimasukkan ke dalam *haemocytometer* dengan meletakkan ujung pipet pada bilik hitung tepat batas kaca penutup dan dibiarkan selama 3 menit agar leukosit mengendap dalam bilik hitung.
4. Bilik hitung tersebut diletakkan di bawah mikroskop menggunakan pembesaran lemah.
5. Penghitungan dilakukan pada 4 kotak besar *haemocytometer* (Lampiran 10).

$$\text{Total leukosit/mm}^3 = \text{jumlah sel leukosit terhitung} \times \text{pengenceran}$$

2) Perhitungan diferensial leukosit (neutrofil, monosit, dan limfosit) sebagai berikut:

- Pembuatan sediaan apus darah

1. Kaca obyek dibersihkan dengan etanol. Kemudian diletakkan setetes darah ikan uji kira-kira 1 cm dari ujung sebelah kiri kaca obyek.
2. Sisi kiri kaca obyek dipegang dengan ibu jari dan telunjuk tangan kiri. Kaca pemulas dipegang dengan tangan kanan dan diletakkan di depan tetesan darah membentuk sudut kira-kira  $30^{\circ}$  dari kaca obyek membuka ke kanan.
3. Kaca pemulas disentuhkan pada tetesan darah kemudian digeser ke arah kanan sehingga darah tersebut akan menyebar sepanjang sisi kaca pemulas.
4. Sudut antara kedua kaca obyek harus dijaga agar tetap  $30^{\circ}$  kemudian kaca pemulas tersebut didorong dengan mantap dan cepat sepanjang kaca obyek, selanjutnya dikeringanginkan. Setelah kering siap diwarnai (Lampiran 11).

- Cara pewarnaan giemsa

1. Sediaan apus darah diletakkan di baki dengan sediaan apus di sebelah atas.
2. Sediaan tersebut digenangi dengan methanol secukupnya selama 5-10 menit, kemudian kelebihan methanol yang terdapat pada sediaan dibuang, selanjutnya digenangi dengan giemsa selama 25 menit.
3. Dibilas dengan aquades dan dikeringanginkan (Lampiran 11).

- Cara pemeriksaan
  1. Minyak imersi ditetaskan pada bagian sediaan yang eritrositnya tidak saling menumpuk, diamati dengan pembesaran kuat (obyektif 100x).
  2. Macam-macam bentuk leukosit dihitung sepanjang sediaan apus darah. Perhitungan dihentikan bila jumlahnya telah mencapai 100 sel leukosit. Hasilnya dihitung dalam persen (%).

### 3.2 Kualitas air

Parameter kualitas air yang diamati adalah suhu, pH, DO yang diukur setiap hari pada pagi dan sore hari. Pengukuran suhu, pH, dan DO menggunakan alat ukur kualitas air. Kualitas air dijaga dengan melakukan penyiponan setiap pagi dan dilakukan pergantian air setiap hari sebanyak 10% sampai 20% dari volume air (Pratama, 2010).

### 3.3 Perhitungan *Relative Percent Survival* (RPS) Ikan Mas

Pengamatan jumlah kematian ikan dari masing-masing perlakuan dilakukan setiap hari dimulai dari ujiantang hingga akhir perlakuan. Kemudian dihitung kelangsungan hidup relatif dengan rumus sebagai berikut:

$$RPS = \left[1 - \frac{V}{K}\right] \times 100\%$$

Keterangan : RPS = *Relative Percent Survival*

V = Mortalitas ikan yang diberi perlakuan

K = Mortalitas ikan kontrol

(Ellis, 1988; Setyawan, 2006)

## **E. Analisis Data**

Data hasil pengamatan total leukosit dan diferensial leukosit yang didapatkan dari hasil penelitian ini (Lampiran 5) dianalisis dengan analisis sidik ragam ANOVA menggunakan SPSS 19 (Lampiran 6). Apabila data yang dihasilkan berbeda nyata kemudian dilanjutkan dengan uji duncan pada taraf 5% (Mattjik dan Sumertajaya, 2002). Dengan asumsi bahwa ukuran dan kondisi ikan serta konsentrasi bakteri *A. salmonicida* pada tiap unit percobaan masing-masing metode uji homogen. Sedangkan data hasil pengamatan kualitas air, gejala klinis ikan mas dan *Relative Percent Survival* (RPS) dianalisis secara deskriptif.