

I. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus sampai dengan Oktober 2011, di Laboratorium Program Studi Budidaya Perairan Fakultas Pertanian Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah akuarium 50x40x40 cm³ sebanyak 15 buah, instalasi aerasi, *scoopnet*, *sprayer*, timbangan analitik, termometer, pH meter, DO meter, cawan petri, tabung reaksi, bunsen, autoclave, gelas obyek, mikroskop, jarum ose, pipet tetes, erlenmeyer, *haemocytometer*, spektrofotometer, tabung *ependorf*, sentrifuge, *vortex*, mikropipet, *hot plate stirrer*, jarum suntik (sprit) ukuran 0,5” 23G, dan tisu (Lampiran 10).

Bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah ikan mas (*Cyprinus carpio* L) strain Majalaya asal Pagelaran dengan ukuran 10-15cm sebanyak 150 ekor, pakan buatan (pellet), ragi dengan komposisi *Saccharomyces cerevisiae* (fermipan), vitamin C (Premiun C dengan kandungan asam askorbat 400mg/100g), isolat bakteri *Aeromonas salmonicida*, TSA (*Tryptic Soy Agar*), TSB (*Tryptic Soy Broth*), aquades, dan alkohol 70% (Lampiran 10).

C. Desain Penelitian

Penelitian ini disusun dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) terdiri dari 5 perlakuan dan ulangan sebanyak 3 kali. Penentuan dosis berdasarkan penelitian Bakri (2010) yang menambahkan ragi (*yeast*) dan vitamin C pada pakan buatan sebagai imunostimulan untuk pencegahan infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* pada ikan lele (*Clarias gariepinus*). Perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu:

Perlakuan A : tanpa penambahan ragi dan vitamin C

Perlakuan B : penambahan ragi 5 g/kg pakan dan vitamin C 500 mg/kg pakan

Perlakuan C : penambahan ragi 10 g/kg pakan dan vitamin C 500 mg/kg pakan

Perlakuan D : penambahan ragi 5 g/kg pakan dan vitamin C 750 mg/kg pakan

Perlakuan E : penambahan ragi 10 g/kg pakan dan vitamin C 750 mg/kg pakan

D. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan

a. Sterilisasi Alat dan Bahan

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

b. Persiapan Wadah dan Ikan Uji

Wadah yang akan digunakan berupa akuarium berukuran 50x40x40 cm³ dengan jumlah 15 unit. Wadah disusun dan diberi label secara acak (Lampiran 1). Sebelum digunakan, akuarium terlebih dahulu dibersihkan dengan cara dicuci menggunakan air dengan detergen, lalu diberi klorin dan dikeringkan. Setelah itu dipasang peralatan aerasi lalu diisi air yang telah diendapkan selama 24 jam sampai ketinggian 25 cm.

Ikan uji yang digunakan adalah ikan mas strain majalaya asal Pagelaran dengan ukuran 10-15 cm dengan berat kurang lebih 20 gram. Sebelum ikan dimasukkan ke dalam akuarium, ikan diaklimatisasi terlebih dahulu selama 7 hari. Selama masa tersebut, ikan uji diberi pakan berupa pellet dengan frekuensi pemberian pakan tiga kali sehari pada pagi, siang, dan sore hari dengan FR 3% dari rata-rata berat ikan.

c. Pencampuran Pakan

Pakan buatan yang digunakan berupa pellet apung (781-2) yang mengandung protein 31-33% ditimbang sebanyak 1 kg. Kemudian ragi ditimbang sesuai dosis yang telah ditentukan dan dicampurkan air 100 ml, lalu dicampurkan pakan dengan bantuan sprayer. Pakan didiamkan selama 24 jam agar *Saccharomyces cerevisiae* dapat tumbuh. Setelah itu vitamin C ditimbang sesuai dosis dan dicampurkan dengan pakan yang sudah tercampur ragi sampai homogen dan diaduk dengan spatula. Pellet dikeringkan dengan cara diangin-anginkan, kemudian didinginkan pada suhu kamar dan dikemas dalam wadah (Lampiran 7).

2. Tahap pelaksanaan

a. Uji LD₅₀

Sebelum masuk pada percobaan, terlebih dahulu dilakukan uji LD₅₀. Uji ini dilakukan untuk mengetahui konsentrasi bakteri yang dapat menyebabkan kematian ikan uji sebanyak 50%. Ikan disuntik secara intramuskular dengan bakteri *Aeromonas salmonicida* sebanyak 0,1 ml/ekor dengan konsentrasi 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷, dan 10⁸ cfu/ml. Parameter yang diamati adalah jumlah kematian dan gejala klinis.

Berdasarkan Reed dan Muench (1938); Lesmanawati (2006) perhitungan LD₅₀ sebagai berikut :

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

$$\text{Log negatif LD}_{50} = \text{Log negatif konsentrasi 50\%} + \text{selang proporsi}$$

b. Pemeliharaan Ikan dan Pemberian Pakan

Pemeliharaan ikan dilakukan selama 28 hari. Sebelum diberi perlakuan, ikan diaklimatisasi terlebih dahulu selama 3 hari. Ikan dipelihara dan diberi pakan buatan yang telah dicampur dengan ragi dan vitamin C sebanyak 4% (SNI,1999) dari rata-rata bobot ikan per hari. Pemberian pakan dilakukan sebanyak tiga kali sehari yaitu pada pukul 08.00, 12.00, dan 16.00. Untuk menjaga kualitas air, dilakukan penyiponan dan pergantian air setiap hari pada pagi hari.

c. Uji Tantang

Pada minggu ke-2 pemeliharaan ikan, dilakukan uji tantang dengan cara menginfeksi ikan mas melalui penyuntikan bakteri *Aeromonas salmonicida*

sebanyak 0,1 ml/ekor dengan kepadatan yang diperoleh saat uji LD₅₀ secara intramuscular. Pada masa pengamatan setelah ujiantang, ikan dipelihara seperti masa sebelumnya dengan pemberian pakan dan penyiponan. Pengamatan gejala klinis dan kelangsungan hidup ikan dilakukan setiap hari selama 14 hari.

3. Tahap Pengamatan

a. Gejala Klinis

Pengamatan gejala klinis dilakukan setiap hari selama 14 hari (setelah ujiantang). Gejala klinis yang diamati adalah pergerakan ikan, respon makan, peradangan kulit dan sirip rusak. Adapun cara pengamatan gejala klinis sebagai berikut :

- Pergerakan ikan dapat diamati dengan cara memperhatikan cara berenang ikan, masih stabil atau tidak stabil,
- Respon makan dapat diamati dengan melihat reaksi ikan uji pada saat pemberian pakan, apakah langsung tanggap, kurang tanggap, atau tidak tanggap,
- Peradangan pada kulit dapat diamati dengan memperhatikan bagian kulit ikan uji, apakah ikan mengalami pendarahan, abses, perut agak gembung (*dropsy*), timbul bercak merah, dan

b. Perhitungan RPS (*Relative Percent Survival*) Ikan Mas

Pengamatan jumlah kematian ikan dari masing-masing perlakuan akan dihitung menggunakan persentase perlindungan relatif (RPS) dengan rumus sebagai berikut (Amend, 1981) :

$$\text{RPS} = \left[1 - \frac{\text{kematian ikan yang diberi perlakuan}}{\text{kematian ikan kontrol}} \right] \times 100\%$$

RPS (*Relative Percent Survival*) merupakan tingkat perlindungan relatif yang menunjukkan efikasi bahan imunostimulan berupa ragi dan vitamin C dalam melindungi ikan dari serangan bakteri. Hal tersebut dilakukan untuk mengetahui tingkat ketahanan ikan uji yang diberi perlakuan (ragi dan vitamin C) dengan ikan tanpa perlakuan.

c. Aspek Haematologi (melalui perhitungan sel darah putih)

Salah satu aspek dari infeksi adalah terjadinya perubahan aspek darah. Darah mengalami perubahan yang serius, khususnya bila terkena penyakit infeksi (Amlacher 1970; Bakri, 2010). Pada ikan yang terinfeksi terjadi perubahan pada kandungan hemoglobin, jumlah sel darah putih (leukosit), dan sel darah merah (eritrosit) (Lagler *et al.*, 1977; Bakri, 2010).

Sampel darah dikumpulkan dari ikan (3 ekor dari setiap akuarium atau 30% dari populasi ikan). Pengambilan darah dilakukan pada hari pertama, hari ke-14 (sebelum uji tantang) dan hari ke-21 (setelah uji tantang). Pengambilan darah dilakukan pada bagian vena caudalis yang berada di pangkal ekor ikan, kemudian dihitung jumlah sel darah putihnya (Lampiran 8). Alat yang digunakan untuk menghitung sel darah putih adalah *haemocytometer*. Penghitungan total leukosit (Lampiran 8) dilakukan pada 4 kotak besar *haemocytometer* dengan rumus :

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

d. Kualitas air

Untuk menjaga kualitas air selama penelitian dilakukan penyiponan dan pergantian air sebanyak 10% dari volume air setiap hari. Parameter kualitas air yang diukur adalah suhu, DO, dan pH. Pengukuran kualitas air tersebut dilakukan dua kali sehari pada pagi dan sore hari, mulai dari masa pemeliharaan sampai masa pengamatan setelah uji tantang.

E. Analisis Data

Hasil pengamatan total leukosit akan dianalisis menggunakan analisis ragam pada selang kepercayaan 95% dengan software SPSS 16. Jika hasil yang diperoleh berbeda nyata, maka akan dilanjutkan dengan uji Duncan dengan selang kepercayaan 95%. Selain itu, analisis data deskriptif dilakukan pada perhitungan RPS (*Relative Percent Survival*), pengamatan gejala klinis dan kualitas air.