

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei – Juni 2014. Lokasi penelitian di Laboratorium Budidaya Perikanan, Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Pertanian Universitas Lampung.

3.2 Peralatan dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi akuarium berukuran 30x30x20 cm, instalasi aerasi, Timbangan Digital Boeco BBL, autoklaf, *Hotplates and stirrers Stuart*, Spektrofotometer Genesys 20, *Orbital Shaker* Boesco PSU-1 5i, labu erlenmeyer, tabung reaksi, *petri disk*, mikropipet, *yellow tape*, jarum ose, aluminium foil, *sprayer*, termometer, DO meter, pH paper. Sedangkan bahan-bahan yang digunakan penelitian ini yaitu udang vaname yang berukuran PL-21, air laut steril (Lampiran 1), akuades, alkohol 70%, media *Tripticase Soy Agar* (TSA Oxoid), media *Tripticase Soy Broth* (TSB Oxoid), media *Thiosulfate Citrate-Bile Sucrose* (TCBSA Oxoid), isolat bakteri D2.2 dan *V. alginolyticus*.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian terdiri dari 2 perlakuan dan 3 kali ulangan. Perlakuan tersebut adalah sebagai berikut :

Perlakuan 1: pemeliharaan udang vaname tanpa pemberian bakteri biokontrol.

Perlakuan 2: pemeliharaan udang vaname dengan pemberian bakteri biokontrol *Bacillus* sp. D2.2.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Uji Patogenisitas Bakteri Biokontrol *Bacillus* sp. D2.2

3.4.1.1 Persiapan Bakteri Uji

Persiapan bakteri uji dilakukan dengan mengkultur kembali isolat bakteri *Bacillus* sp. D2.2 dengan menggunakan media TSA 10 ppt (Lampiran 2). Kultur bakteri dilakukan dengan cara pemurnian terlebih dahulu di agar lempeng, kemudian dilakukan kultur pada media agar miring.

3.4.1.2 Persiapan Organisme Uji

Organisme uji yang digunakan dalam penelitian adalah udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) ukuran PL-21 yang berasal dari PT. Syqua, Kalianda, Lampung Selatan. Udang diaklimatisasi terlebih dahulu di media pemeliharaan, yaitu akuarium selama 7 hari dan diberi makan 4 kali sehari.

3.4.1.3 Uji Patogenisitas

Uji patogenisitas dilakukan melalui uji LD50 (*Lethal Dosage 50*) untuk mengetahui pada dosis berapa isolat bakteri *Bacillus* sp. D2.2 bersifat patogen

terhadap larva udang vaname. LD50 merupakan derajat keganasan patogen atau ukuran patogenisitas dari bakteri. Nilai LD50 yang didapatkan akan digunakan untuk menentukan dosis bakteri biokontrol pada uji tantang saat bakteri *V.alginolyticus* dimasukkan ke media pemeliharaan. Isolat bakteri biokontrol dikultur pada medium TSB 10 ppt (Lampiran 3.) kemudian diinkubasi di *orbital shaker* selama 24 jam pada suhu ruang sekitar 27⁰ C. Isolat bakteri disediakan dalam tingkatan kepadatan 10³, 10⁴, 10⁵ dan 10⁶ CFU/ml. Udang uji yang digunakan untuk tiap perlakuan berjumlah sepuluh ekor tiap akuarium dengan tiga ulangan. Uji patogenisitas dilakukan dengan memasukkan bakteri *Bacillus* sp. D2.2 ke media pemeliharaan larva udang untuk menciptakan kondisi infeksi secara alami. Udang uji dipelihara dalam akuarium selama 14 hari dengan mengamati sintasan dan gejala klinis yang timbul.

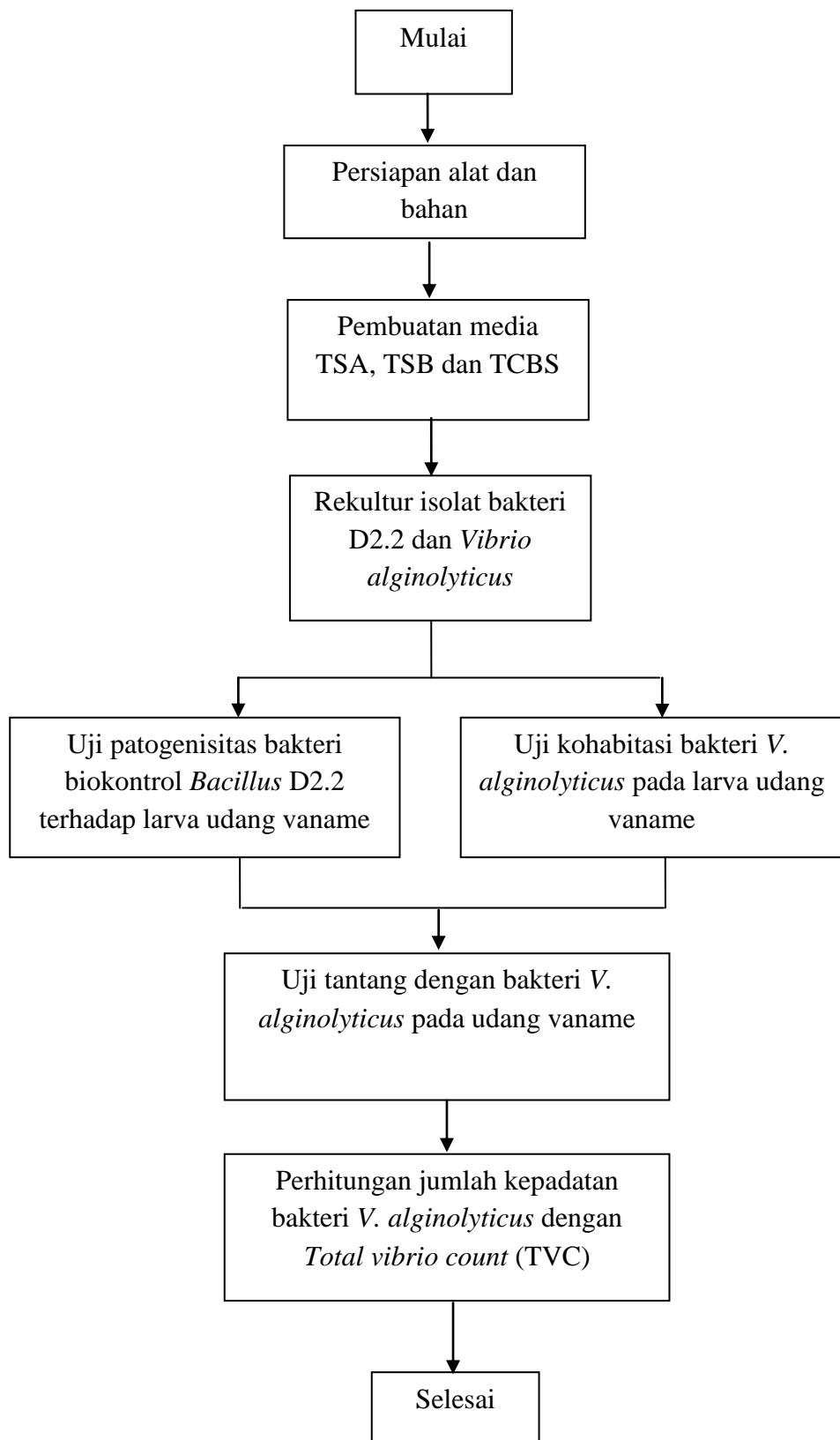
3.4.2 Uji Kohabitasi *Vibrio alginolyticus*

Sebelum bakteri patogen dimasukkan ke media pemeliharaan udang untuk uji *in vivo*, bakteri tersebut diaktifkan kembali keganasannya melalui metode kohabitasi (Mahasri *et al.*, 2012). Isolat bakteri *V. alginolyticus* yang berasal dari BBPBL Lampung (Balai Besar Pengembangan Budidaya Laut) dikultur di media TCBS (Lampiran 4.) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 28⁰ C. Koloni bakteri yang muncul di media TCBS dikultur di media cair TSB, lalu diinkubasi di *orbital shaker* selama 24 jam. Bakteri dengan kepadatan 10⁷ CFU/ml diinfeksi ke udang dengan memasukkan isolat bakteri *V. alginolyticus* ke dalam media pemeliharaan udang. Pengamatan dilakukan sampai udang menunjukkan gejala abnormal terserang vibriosis. Udang yang mati kemudian diambil bagian hepatopankreas dengan menggunakan jarum ose lalu ditanam ke

media TCBS. Bakteri yang tumbuh di media tersebut yang dapat dipakai untuk uji *in vivo*. Parameter yang diamati selama uji kohabtasi adalah gejala klinis yang ditimbulkan larva udang vaname dan sintasan hidup larva udang vaname.

3.4.3 Uji Tantang dengan Bakteri Patogen *V. alginolyticus*.

Setelah mendapatkan nilai LD50, baru dapat ditentukan dosis bakteri *Bacillus* sp. D2.2 yang akan digunakan untuk uji tantang terhadap bakteri patogen *V. alginolyticus*. *V. alginolyticus*, yang sebelumnya diganaskan terlebih dahulu, dimasukkan ke dalam media pemeliharaan udang. Kepadatan bakteri *V. alginolyticus* yang digunakan pada uji tantang sama dengan bakteri biokontrol. Uji *in vivo* dilakukan dengan 2 perlakuan, yaitu pemeliharaan udang vaname tanpa pemberian bakteri biokontrol (P1). Sedangkan yang lain, pemeliharaan udang vaname dengan pemberian bakteri biokntrol *Bacillus* sp. D2.2 (P2). Pengamatan dilakukan selama 3-7 hari dengan parameter pengamatan sintasan hidup udang vaname dan TVC (*Total Vibrio Count*). Tahapan kerja penelitian digambarkan pada Gambar 4.



Gambar 4. *Roadmap* penelitian

3.5 Parameter Pengamatan

3.5.1 Sintasan

Sintasan atau tingkat kelangsungan hidup udang merupakan perbandingan jumlah udang yang hidup dengan total udang yang ditebar pada awal pemeliharaan.

Persamaan yang digunakan dalam mengukur kelangsungan hidup menurut Effendi (2004) adalah :

$$SR = \frac{N_t}{N_o} \times 100\%$$

Keterangan :

SR : Kelangsungan hidup (*Survival rate*)

Nt : Jumlah benur yang hidup di akhir penelitian

No : Jumlah total benur awal penebaran

3.5.2 Total Vibrio Count (TVC)

Total Vibrio Count (TVC) merupakan metode untuk menghitung kepadatan bakteri *Vibrio* sp. dengan melihat koloni bakteri di cawan petri. Frekuensi perhitungan TVC dilakukan setiap hari untuk mengetahui jumlah koloni bakteri *Vibrio* sp. di pemeliharaan udang. Sampel diambil dari air akuarium pemeliharaan udang dan dikultur di media agar TCBS. Media diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang, kemudian dihitung koloni bakteri yang terbentuk.

3.5.3 Gejala Klinis Udang

Gejala klinis udang diamati setiap hari dengan melihat ada atau tidaknya gejala yang ditimbulkan setelah diberi perlakuan dengan bakteri *Bacillus* sp. D2.2 dan setelah diuji tantang dengan *Vibrio* sp. Tingkah laku udang yang diamati yaitu, nafsu makan dan pergerakkan udang.

3.5.4 Kualitas Air

Pengukuran kualitas air dilakukan satu minggu sekali, yang meliputi pengukuran suhu, oksigen terlarut (DO), pH, salinitas dan total amoniak nitrogen (TAN). Pengukuran kualitas air menggunakan termometer, DO meter, pH meter, refraktometer dan TAN kit.

3.6 Analisis Data

Nilai LD50 dianalisis dengan menggunakan perhitungan berdasarkan metode aritmatik Reed dan Muench (1983). Metode ini menggunakan nilai-nilai kumulatif. Kematian kumulatif diperoleh dengan menambahkan secara suksesif ke bawah dan hidup kumulatif diperoleh dengan menambahkan secara ke atas. Perhitungan LD50 didapatkan berdasarkan persamaan berikut :

$$\text{Selang proporsi} = \frac{\text{kematian di atas } 50\% - 50}{\text{kematian di atas } 50\% - \text{kematian di bawah } 50}$$

Sehingga nilai LD50 didapatkan,

$$\text{LD50} = \log \text{konsentrasi dibawah } 50\% + \text{selang proporsi}$$

Data kelangsungan hidup udang vaname dan *total vibrio count* (TVC) dianalisis dengan menggunakan uji statistik nilai tengah (uji t) pada selang kepercayaan 95%. Sedangkan pengamatan tingkah laku udang dan parameter kualitas air dianalisa secara deskriptif.