

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada Mei - Juni 2014 di Laboratorium Basah Jurusan Budidaya Perairan Fakultas Pertanian Universitas Lampung.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi akuarium berukuran 30x20x20 cm, instalasi aerasi, timbangan digital, *thermometer*, DO meter, pH *paper*, autoklaf, hot plate stirrer, spektrofotometer, labu erlenmeyer, tabung reaksi, *petri disk*, *yellow tape*, jarum ose, aluminium foil, *sprayer*, *shaker* (Boeco Germany PSU-15i), laminar air flow (Nuair, Model No. NU-1264DDE). Sedangkan bahan-bahan yang digunakan penelitian ini yaitu udang vannamei berukuran PL-21, air laut steril (Lampiran 1), akuades, alkohol 70%, media TSA (Tryptone Soy Agar) (Oxoid) (Lampiran 2), media TSB (Tryptone Soy Broth) (Oxoid) (Lampiran 2), larutan MnSO₄ (Lampiran 3), larutan hipoklorit (Lampiran 4), larutan sodium phenate (Lampiran 5), isolat *Campylobacter* sp. TI6, *Listeria* sp. TI1, *Nitrosococcus* sp. TII5 dan limbah organik.

3.3 Rancangan Penelitian

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

Perlakuan 1 : Pemeliharaan udang vannamei yang diberi bakteri bioremediasi dan

limbah organik

Perlakuan 2 : Pemeliharaan udang vannamei yang tidak diberi bakteri bioremediasi, tetapi tetap diberi limbah organik

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Persiapan Penelitian

3.4.1.1 Persiapan Bakteri Uji *Campylobacter* TI6, *Listeria* TI1, *Nitrosococcus* TII5

Persiapan bakteri uji dilakukan dengan mengkultur kembali isolat bakteri *Campylobacter* sp. TI6, *Listeria* sp. TI1, *Nitrosococcus* sp. TII5 menggunakan media TSA (Lampiran 1). Kultur bakteri dilakukan dengan cara pemurnian terlebih dahulu pada agar lempeng, kemudian dilakukan kultur pada media TSA miring.

3.4.1.2 Persiapan Wadah dan Udang Uji

Wadah yang akan digunakan berupa akuarium berukuran 30x20x20 cm dengan jumlah 12 unit. Sebelum digunakan, akuarium dibersihkan kemudian diisi air laut sebanyak 3 liter, yang telah diendapkan selama 24 jam. Organisme uji yang digunakan adalah udang vannamei (*Litopenaeus vannamei*) ukuran PL-21 dengan jumlah 10 ekor/akuarium. Udang diaklimatisasi terlebih dahulu di media pemeliharaan selama 7 hari dan diberi makan 4 kali sehari secara *blind feeding*. Pakan yang diberikan adalah pakan pellet komersil berbentuk crumble. Kandungan pakan setidaknya terdiri dari protein 38%, lemak 6%, serat kasar 3%, kadar abu 13%, dan kadar air 11%.

3.4.2 Pelaksanaan Penelitian

3.4.2.1 Uji Patogenisitas Bakteri

Patogenisitas ditentukan berdasarkan nilai LD₅₀ (*Lethal Dosage 50*). LD₅₀ merupakan derajat keganasan patogen atau ukuran patogenisitas dari bakteri. Bakteri dikultur pada medium TSB kemudian diinkubasi dengan menggunakan *orbital shaker* selama 24 jam. Isolat bakteri disediakan dalam tingkatan densitas 0 CFU/ml sebagai kontrol, 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶ CFU/ml. Udang uji yang digunakan adalah udang vannamei PL 21, dengan panjang rata-rata 1,282 cm dan berat rata-rata 0,0084 gr (Umroh, 2007). Udang uji berasal dari Kalianda, Lampung Selatan. Setiap perlakuan ditebar udang berjumlah 10 ekor/ 3 liter air dengan tiga ulangan. Udang uji dipelihara dalam akuarium selama 7-14 hari dengan mengamati sintasan dan gejala klinis yang timbul.

Nilai LD₅₀ didapat dengan menggunakan metode aritmatik Reed dan Muench (1938), metode ini menggunakan nilai-nilai kumulatif sebagai dasar perhitungan. Kematian kumulatif diperoleh dengan menambahkan secara suksesif ke bawah dan hidup kumulatif diperoleh dengan menambahkan secara suksesif ke atas.

Penentuan 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 LD₅₀ didapat dari persamaan berikut :

$$\text{LD}_{50} = \text{Log Konsentrasi dibawah 50\%} + \text{selang proporsi}$$

3.4.2.2 Uji Kemampuan Bakteri Mendegradasi TAN

Uji skala laboratorium dilakukan dengan pemberian dosis bakteri yang didapat dari hasil uji LD₅₀. Setelah itu, pada pemeliharaan udang vannamei diberikan limbah organik berupa sedimen tambak dengan jumlah 900 gram/akuarium. Uji skala laboratorium dilakukan dengan 2 perlakuan, yaitu pemeliharaan udang vannamei yang diberikan bakteri bioremediasi dan diberi limbah organik serta pemeliharaan udang vannamei yang tidak diberi bakteri bioremediasi, namun tetap diberi limbah organik yang sama dengan perlakuan pertama. Pengamatan dilakukan selama 6 hari dengan parameter pengamatan sintasan hidup udang vannamei dan TAN (*Total Ammonia Nitrogen*). Udang diberi pakan komersial dengan metode pakan buta dan frekuensi pakan 4 kali dalam sehari (Subyakto, 2009).

3.4.3 Parameter Pengamatan

3.4.3.1 Sintasan

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 Yustianti (2013) adalah :

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

Keterangan :

SR : Kelangsungan hidup (Survival Rate)

N_t : Jumlah benur yang hidup di akhir penelitian

N_o : Jumlah total benur awal penebaran

3.4.3.2 Pengamatan Visual Abnormalitas Hewan Uji

Pengamatan secara visual dilakukan untuk mengamati tingkah laku yang terjadi pada larva udang uji. Pengamatan dilakukan setelah larva diinfeksi bakteri melalui perendaman pada media pemeliharaan. Pengamatan yang dilakukan meliputi nafsu makan dan pergerakan udang yang diberikan bakteri *Campylobacter* TI6, *Listeria* TI1, *Nitrosococcus* TII5.

Pada pengamatan pemberian pakan dilihat dari sisa pakan yang tidak dimakan dan diklasifikasikan sebagai berikut (Yulian, 2011) :

1. Sangat responsif (++++) = tidak ada sisa pakan
2. Responsif (++++) = sisa pakan sebanyak 10%
3. Kurang responsif (++) = sisa pakan sebanyak 50%
4. Tidak responsif (+) = sisa pakan sebanyak 80-100%

Pada pengamatan pergerakan udang pasca diberikan bakteri diklasifikasikan sebagai berikut :

1. Berenang normal (++++) = udang vannamei berenang di kolom air
2. Berenang tanpa arah (++) = udang vannamei berenang tidak beraturan
3. Berenang lemah di dasar (+) = sebagian besar udang vannamei berenang di dasar

3.4.3.3 Analisis TAN (*Total Ammonia Nitrogen*)

1. Analisis kadar TAN dilakukan dengan menyaring air sampel sebanyak 25 – 50 ml menggunakan kertas saring Whatman Cellulose Nitrate nomor 7140104 tipe WCN dengan mess size 0,45 μ m dan diameter 47 mm
2. Air sampel yang telah disaring diambil 10 ml menggunakan pipet dan masukkan ke dalam gelas piala.
3. Lalu, Air sampel ditambah 1 tetes larutan MnSO₄ (Lampiran 4), 0,5 ml *chlorox* (*oxidizing solution*) (Lampiran 5) dan 0,6 ml phenate (Lampiran 6). Phenate ditambahkan dengan segera dengan menggunakan pipet tetes yang sudah dikalibrasi. Didiamkan selama \pm 15 menit, sampai pembentukan warna stabil (warna akan tetap stabil sampai beberapa jam).
4. Larutan blanko dibuat dari 10 ml akuades. Dilakukan seperti prosedur 3.
5. Larutan standar dibuat dari 10 ml larutan standar ammonia (0,30 ppm) (Lampiran 7). Dilakukan seperti prosedur 3.
6. Sampel dan larutan standar diukur dengan larutan blanko pada panjang gelombang 630 nm, set spektrofotometer pada *absorbance* 0,00.

Menghitung konsentrasi ammonia-N total (TAN) dengan persamaan :

$$[\text{TAN}] = \text{mg/l sebagai N} = \text{ppm NH}_3\text{-N} = \frac{\text{Cst} \times \text{As}}{\text{Ast}}$$

Keterangan :

Cst : konsentrasi larutan standar (0,30 mg/l)

Ast : nilai *absorbance* (*transmittance*) larutan standar

As : nilai *absorbance* (*transmittance*) air sampel,

3.4.3.4 Kualitas Air

Pengukuran kualitas air dilakukan satu minggu sekali, yang meliputi pengukuran suhu, oksigen terlarut (DO), pH, dan salinitas.

3.5 Analisis Data

Data kelangsungan hidup udang vannamei dan *total ammonia nitrogen* (TAN) dianalisis menggunakan uji statistik nilai tengah (uji t) pada selang kepercayaan 95%. Sedangkan, pengamatan visual (tingkah laku) dan parameter kualitas dianalisa secara deskriptif.