

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kesehatan Ikan Jurusan Budidaya Perairan Universitas Lampung pada Mei-Juli 2014.

3.2. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain 6 buah kolam beton berukuran 1x 1x 1,5m³, dasar kolam buatan terbuat dari kayu sebagai kerangkanya dan strimin, DO meter, kertas lakmus, skopnet, ember, timbangan digital, millimeter blok, blower, lampu 75 watt sebanyak 6 buah, selang aerasi, batu aerasi, wadah 18 liter, blower, *cool box*, *ice pack*, ember, pipet tetes, sarung tangan, spuit ukuran 1 ml, tabung eppendorf, *haemocytometer*, baki, tisu atau lap, mikroskop, needle, kaca penutup, mikroskop, baki, spidol, gelas objek, tabung hematokrit dengan heparin, sentrifuge, mikropipet, *mikrotube* (1,5 ml), termometer, pH meter, dan DO meter.

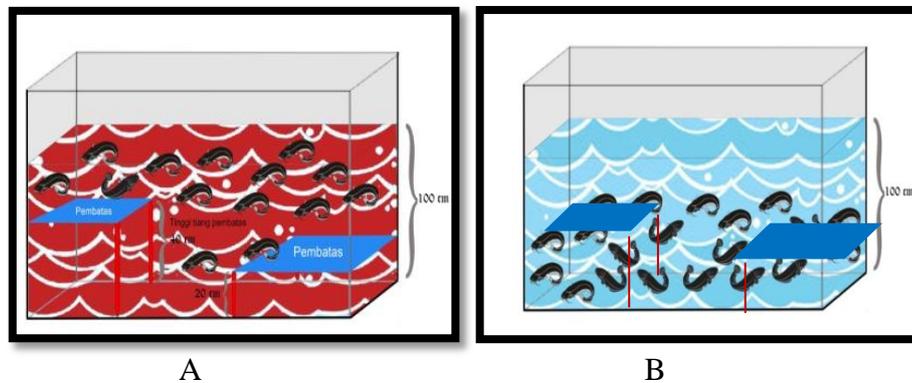
Sedangkan bahan yang diperlukan yaitu lele masamo (*Clarias gariepinus* ><*C. macrocephalus*) dengan ukuran 7-10 cm, pakan buatan, probiotik komersial (*Saccharomyces* sp.), probiotik komersial (*Lactobacillus casei*), ragi tape, molasse, larutan EDTA 10%, etanol, aquades, larutan turk, larutan giemsa, *kretosoel* (lilin), darah lele masamo, alkohol, minyak cengkeh, sampel air kolam pemeliharaan lele masamo.

3.3.Rancangan Penelitian

Penelitian ini terdiri dari 2 perlakuan dan masing-masing perlakuan diulang tiga kali. Perlakuan tersebut adalah:

Perlakuan A: Pemeliharaan benih lele di kolam dengan penambahan probiotik dan aplikasi 2 dasar kolam buatan

Perlakuan B: Pemeliharaan benih lele di kolam tanpa penambahan probiotik dengan aplikasi 2 dasar kolam buatan



Gambar 3. Desain Kolam

3.4.Prosedur Penelitian

3.4.1. Tahap Persiapan

3.4.1.1.Persiapan Wadah

Wadah yang akan digunakan berupa kolam beton sebanyak 6 buah. Sebelum digunakan kolam dibersihkan kemudian diisi air yang telah diendapkan dan diaerasi selama 2-3 hari. Tahap selanjutnya yaitu pengapuran. Kapur yang digunakan adalah kapur dolomit $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$ sebanyak $150\text{-}225 \text{ gr/m}^3$. Pemberian kapur disebar merata di permukaan air kolam, pemberian kapur dilakukan setiap 10 hari setelah penyedotan kotoran di dasar kolam.

3.4.1.2.Kultur Probiotik

Proses pembuatan probiotik untuk kolam dan pakan:

- a. Air bersih sebanyak 18 liter dimasukkan kedalam wadah.
- b. Ditambahkan 5 botol yakult (*Lactobacillus casei*), 1 liter molase, 1 botol EM4, 2 butir ragi tape yang sudah di tumbuk halus kedalam wadah yang berisi air bersih.
- c. Semua bahan diaduk selama 1-2menit agar larut merata dan diaerasi.
- d. Larutan difermentasi selama 6-7 hari. Proses fermentasi berlangsung sempurna ditandai perubahan larutan menjadi coklat dan berbau alkohol.

3.4.1.3.Pemasangan Dasar Kolam Buatan

Dasar kolam buatan yang digunakan dalam penelitian ini terbuat dari kawat sebagai alas seluas 50cm yang diberi sanggahan kayu agar dapat berdiri tegak. Dalam satu kolam diberi dua dasar kolam buatan. Pemasangan dasar kolam buatan dapat dilakukan apabila kolam sudah bersih dan siap untuk digunakan. Dasar kolam buatan sebelumnya disesuaikan dengan ukuran kolam. Hal tersebut bertujuan agar pada saat kolam telah diisi air dasar kolam buatan tidak bergerak.

3.4.1.4.Pemberian Probiotik pada Air Kolam

Probiotik yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari campuran yakult(*Lactobacillus casei*), molasse, EM4, dan ragi tape. Bakteri *Lactobacillus* sp. yang berperan untuk menghasilkan enzim-enzim pencernaan seperti laktase. Enzim laktase dapat memanfaatkan karbohidrat menjadi asam laktat. Bakteri *Lactobacillus* sp. akan membentuk koloni dan menempel pada usus ikan.

Sehingga bakteri patogen tidak dapat tumbuh dan tidak dapat menghambat proses pencernaan ikan dan dapat meningkatkan daya cerna ikan (Ramadhan, 2008).

Kolam yang telah diisi air bersih ditambah probiotik sebanyak 100 ml/m³ secara merata ke seluruh permukaan kolam. Penambahan probiotik sebanyak 100 ml, ragi tape 1 butir per m³ dan 150-225 gr kapur dolomit setiap 10 hari sekali setelah itu ikan dipuasakan selama 24 jam.

3.4.2. Tahap Pelaksanaan

3.4.2.1. Penebaran Benih

Benih lele masamo yang digunakan berukuran dengan panjang 7-10 cm sebanyak 400ekor/kolam. Penebaran benih dilakukan pada pagi atau sore hari. Pada kedua kondisi ini umumnya tidak terdapat perbedaan nilai suhu air pada permukaan dan dasar kolam. Jika perbedaan suhu air wadah benih dan air kolam tebar cukup signifikan, maka perlu dilakukan upaya penyamaan suhu air wadah benih secara bertahap. Penyamaan suhu ini dilakukan agar benih tidak stress saat ditebarkan. Selama masa pemeliharaan atau adaptasi dilakukan manajemen kualitas air dan kesehatan ikan.

3.4.2.2. Pemberian Pakan dengan Penambahan Probiotik

Pakan yang diberikan adalah pellet jenis terapung dengan kandungan protein \pm 30% sebanyak 5 % bobot total ikan. Ukuran pakan buatan yang diberikan disesuaikan dengan bukaan mulut lele. Pencampuran probiotik pada pakan sebanyak 1 liter/kg pakan akan meningkatkan pertumbuhan karena nafsu makan meningkat dan tingkat penyerapan pakan menjadi daging mencapai 90%. Pemberian pakan ditaburkan secara merata agar semua ikan memiliki peluang memperoleh pakan yang sama. Frekuensi pemberian pakan 4 kali sehari, yaitu

pagi pukul 08.00 WIB, siang hari pukul 13.00 WIB , sore hari pukul 17.00 WIB dan malam hari 21.00 WIB.

3.4.2.3.Pengambilan Darah

Pengambilan darah melalui vena kaudal yang berada di pangkal ekor ikan menggunakan spuit ukuran 1 ml. Sebelumnya, jarum suntik dan tabung endorf dibilas dengan larutan EDTA 10% untuk mencegah pembekuan darah. Darah disimpan dalam mikrotube ukuran 1,5 ml. Pengambilan sampel darah ikan dilakukan pada hari ke-0, hari ke-15, hari ke-30, hari ke-45.

3.4.3. Tahap Pengamatan

3.4.3.1.Perhitungan Total Leukosit

Perhitungan total leukosit dalam penelitian ini dilakukan menurut Blaxhall dan Daisley (1973) dengan sedikit modifikasi. Pertama kali bilik hitung *haemocytometer* dan kaca penutupnya dibersihkan dengan etanol, kemudian dipasang kaca penutup pada *haemocytometer*. 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. Empat tetesan pertama dibuang, tetesan berikutnya dimasukkan kedalam *haemocytometer* dengan meletakkan ujung pipet pada bilik hitung tepat batas kaca penutup dan dibiarkan selama 3 menit agar leukosit mengendap dalam bilik hitung. Bilik hitung diletakkan di bawah mikroskop menggunakan pembesaran lemah. Penghitungan dilakukan pada 4 kotak besar haemocytometer. Rumus yang digunakan untuk menghitung adalah sebagai berikut:

$$\text{Total leukosit/mm}^3 = \text{jumlah sel leukosit terhitung} \times \text{pengenceran} \times \frac{1}{\text{Volumekotakbesar}}$$

3.4.3.2.Persentase Diferensial Leukosit (Neutrofil, Monosit dan Limfosit)

Perhitungan diferensial leukosit (neutrofil, monosit dan limfosit) dilakukan menurut Amlacher (1970) dengan sedikit modifikasi adalah sebagai berikut:

a. Pembuatan Sediaan Apus Darah

Kaca objek dibersihkan dengan etanol. Kemudian ditetaskan darah ikan uji sekitar 1 cm dari ujung sebelah kiri kaca objek. Kemudian sisi kiri kaca objek dipegang dengan ibu jari dan telunjuk tangan kiri. Kaca pemulas dipegang dengan tangan kanan dan diletakkan di depan tetesan darah membentuk sudut sekitar 30° dari kaca objek membuka ke kanan. Kaca pemulas disentuh pada tetesan darah kemudian digeser ke arah kanan sehingga darah tersebut akan menyebar sepanjang sisi kaca pemulas. Sudut antara kedua kaca objek harus dijaga agar tetap 30° kemudian kaca pemulas didorong dengan mantap dan cepat sepanjang kaca objek, selanjutnya dikeringanginkan dan siap untuk diwarnai.

b. Cara Pewarnaan Giemsa

Sediaan apus darah diletakkan di baki dengan sediaan apus di sebelah atas. 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. Dibilas dengan akuades dan dikeringanginkan.

c. Cara Pemeriksaan

Minyak imersi ditetaskan pada bagian sediaan yang eritrositnya tidak saling menumpuk diamati dengan perbesaran kuat (objektif 100x). Macam-macam bentuk leukosit dihitung sepanjang sediaan apus darah. Perhitungan

dihentikan bila jumlahnya telah mencapai 100 sel leukosit dan hasilnya dihitung dalam persen (%).

3.4.3.3. Pengukuran Kadar Hematokrit

Dalam Penelitian ini pengukuran kadar hematokrit pada darah dilakukan menurut Anderson and Siwicki (1993) dengan sedikit modifikasi. Sampel darah dimasukan kedalam tabung hematokrit sampai kira-kira 4/5 bagian tabung, ujungnya (bertanda merah) disumbat dengan kretoseal. Hematokrit tersebut disentrifus selama 15 menit dengan kecepatan 3.500 rpm. Pengukuran kadar hematokrit dilakukan dengan membandingkan volume padatan sel darah dengan volume seluruh darah pada skala hematokrit.

$$\text{Kadar Hematokrit} = \frac{\text{volume sel darah merah}}{\text{total darah}} \times 100\%$$

3.4.4. Perhitungan Sintasan

Sintasan merupakan nilai persentase jumlah ikan yang hidup selama masa pemeliharaan tertentu dan menentukan produksi yang akan diperoleh (Najiyati, 1992).

Sintasan lele masamo dihitung dengan rumus (Effendie, 1997)

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

Keterangan:

SR = Tingkat Kelangsungan hidup ikan uji (%)

N_t = Jumlah ikan uji pada akhir penelitian(ekor).

N_o = Jumlah ikan uji pada awal penelitian(ekor)

3.4.5. Manajemen Kualitas Air

Pengukuran parameter kualitas air meliputi oksigen terlarut, pH, suhu dan ammonia dilakukan pada awal, pertengahan dan akhir penelitian. Selama penelitian berlangsung dilakukan pergantian air 10 hari dengan cara mengurangi volume air bagian dasar sebanyak 30% setelah itu dilakukan penambahan volume air sebanyak 30%. Selain air, dilakukan pula penambahan probiotik sebanyak 100 ml/m³ dan ragi tape 1 butir/m³.

3.4.6. Analisis Data

Pengaruh perlakuan terhadap variabel imunitas non spesifik yaitu total leukosit, diferensial leukosit, kadar hematokrit dan kelangsungan hidup dianalisis dengan menggunakan uji statistik nilai tengah (uji t) satu arah pada selang kepercayaan 95% dengan menggunakan microsoft excel.