

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei sampai dengan Juni 2014 di Laboratorium Budidaya Perikanan Jurusan Budidaya Perairan Fakultas Pertanian UNILA.

3.2 Alat dan Bahan

Adapun alat yang digunakan yaitu bak pemeliharaan 6 buah kolam berukuran 1,5 x 1 x 1 m³ dengan ketinggian air 70 cm, kayu, termometer, DO meter, ph meter, aerator, mikroskop, tabung hematokrit, *sentrifuge*, *mikrotube* (1,5 ml), autoklaf, *cool box*, *ice pack*, spuit dengan *needle* 26 G ukuran 1 ml dan *haemocytometer*.

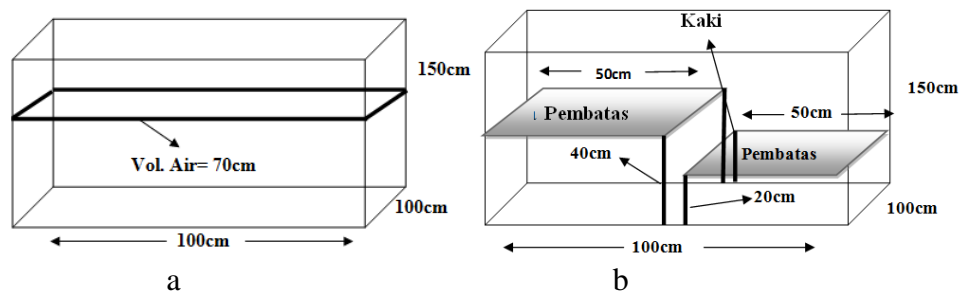
Sedangkan bahan yang digunakan yaitu lele masamo dengan ukuran panjang total ikan 7-10 cm, vitamin C, molase, ragi tape, dedak halus, probiotik komersial, kapur dolomit, dan pakan buatan (pellet komersial) dengan kandungan protein 29-35%. larutan EDTA 10%, aquades, minyak cengkeh, *kretosoel* (lilin), darah ikan masamo, alkohol 70%, etanol, larutan turk, methanol dan giemsa.

3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan dalam penelitian adalah rancangan acak lengkap yaitu terdiri 2 perlakuan dan masing-masing perlakuan diulang tiga kali. Hasil penelitian dianalisis dengan menggunakan uji statistik nilai tengah (uji t) pada selang kepercayaan 95%. Perlakuan tersebut adalah sebagai berikut:

Perlakuan A: Kolam pemeliharaan tanpa menggunakan dasar kolam buatan.

Perlakuan B: Kolam pemeliharaan dengan menggunakan 2 dasar kolam buatan.



Gambar 4. Sketsa Kolam Penelitian.

3.4 Persiapan Penelitian

3.4.1 Pembuatan Dasar Kolam Buatan

Dasar kolam buatan digunakan untuk membatasi ruang gerak ikan. Dasar kolam buatan berbentuk persegi panjang, dasar kolam buatan dibuat menggunakan jaring kawat. Kawat tersebut di beri tepian kayu dan di beri 4 buah penyangga untuk memudahkan pemasangan dasar kolam buatan di kolam pemeliharaan.

Penyangga tersebut berukuran 40 cm dan 20 cm, dalam satu kolam budidaya dipasangkan dua dasar kolam buatan dengan ukuran dasar kolam buatan 1 dengan kaki penyangga ukurang 40 cm dan Dasar kolam buatan 2 dengan ukuran kaki

penyangga 20 cm. Perbedaan kaki penyangga tersebut bertujuan untuk memberi ruang gerak yang sempit bagi ikan.

3.4.2 Penambahan Vitamin C dalam Pakan

Penambahan vitamin C dalam pakan berguna untuk kekebalan tubuh lele masamo. Vitamin C yang digunakan adalah vitamin C murni. Cara pemberian vitamin C dalam pakan tersebut yaitu dengan menghomogenkan 5 gram vitamin C, satu sendok minyak ikan dan satu kilogram pakan. Ikan tidak mampu mensintesis vitamin C sehingga untuk mempertahankan metabolisme sel sehingga perlu penambahan vitamin C pada pakan.

3.4.3 Pengkulturan Probiotik

Pembiakan probiotik secara massal bertujuan untuk mendapatkan beberapa jenis bakteri yang menguntungkan dan dapat mempertahankan kualitas air suatu perairan. Adapun cara pembuatan probiotik yaitu menuangkan 5 botol yakult® (*Lactobacillus* sp.) 1 liter molasses yang berfungsi sebagai sumber karbon, probiotik komersial dan 2 butir ragi tape ke dalam wadah yang telah berisi 18 liter air bersih. Semua bahan dilarutkan dalam wadah selama 1-2 menit agar semua bahan homogen kemudian nyalakan aerasi.

Wadah beserta bahan-bahan tersebut difermentasi selama 6-7 hari agar terjadi proses fermentasi dengan sempurna yang ditandai dengan cairan di dalam wadah berubah warna menjadi coklat dan berbau alkohol. Probiotik komersial, yang ditambahkan pada media pemeliharaan merupakan suatu kultur dari mikroorganisme yang hidup secara alami dan menguntungkan untuk

meningkatkan kualitas air yang tercemar, karena probiotik komersial akan menguraikan bahan-bahan yang tidak berguna dan beracun.

3.4.4 Penebaran Benih

Penebaran benih dilakukan pada pagi atau sore hari. Pada kedua kondisi ini umumnya perbedaan nilai suhu air pada permukaan dan dasar kolam tidak terlalu besar. 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 stres saat ditebarkan.

3.4.5 Proses Pembesaran

a. Pemberian Pakan dengan Penambahan Vitamin C

Lele termasuk ikan yang aktif mencari makan di malam hari atau disebut nokturnal, oleh karena itu pemberian pakan di malam hari menggunakan porsi yang lebih banyak. Pencampuran vitamin C yang dicampurkan pada pakan sebelum pakan diberikan sampai kondisi lembab akan meningkatkan pertumbuhan karena nafsu makan terpacu dan tingkat penyerapan pakan menjadi daging mencapai 90%.

Setiap hari pakan yang diberikan sebanyak 3-6 % bobot total ikan. Cara pemberian pakan atau pellet ditebarkan secara merata agar semua ikan memiliki peluang memperoleh pakan yang sama. Frekuensi pemberian pakan 4 kali sehari, pemberian pakan pagi 08.00 WIB, siang hari 13.00 WIB, sore hari 17.00 WIB dan malam hari 21.00 WIB.

3.5 Pegumpulan Data

3.5.1 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, dan hari ke-45.

3.5.2 Tahap Pengamatan

3.5.2.1 Perhitungan Total Leukosit

Perhitungan total leukosit mengacu pada metode Blaxhall dan Daisley (1973) dengan sedikit modifikasi, yaitu bilik hitung *haemocytometer* dan kaca penutupnya dibersihkan dengan etanol, sampel darah yang sudah dibasahi EDTA di hisap dengan pipet sampai skala 0,5 ml dilanjutkan dengan menghisap larutan turk sampai skala 11 ml, larutan digoyangkan selama tiga menit agar homogen.

Tiga tetesan pertama dibuang dan tetesan ke empat dan kelima dimasukkan ke dalam *hemacytometer* yang sebelumnya telah ditetesi akuades lalu tutup dengan kaca penutup. Selanjutnya dilakukan pengamatan di bawah mikroskop dengan pembesaran 10 x 40. Perhitungan dilakukan pada 4 kotak besar *hemacytometer*. Perhitungan jumlah eritrosit dihitung sesuai dengan rumus:

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

3.5.2.2 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 darah ikan ditetaskan 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 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 dikeringkan.

c. Cara pemeriksaan

Bagian sediaan ditetaskan minyak imersi 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 (%).

3.5.2.3 Pengukuran Kadar Hematokrit

Pengukuran kadar hematokrit mengacu pada metode Anderson *et al.*, (1993) yaitu dengan cara memasukkan sampel darah dalam kapiler mikrohematokrit sampai kira-kira 4/5 bagian tabung, kemudian menyumbat bagian ujungnya (bertanda merah) dengan kretoseal (lilin penutup). *Sentrifuge* kapiler mikrohematokrit di *sentrifuge* hematokrit selama 15 menit dengan kecepatan 3500 rpm, selanjutnya pengukuran panjang endapan eritrosit pada kapiler hematokrit dengan skala hematokrit dan hitung persentase volumenya. Perhitungan kadar hematokrit dinyatakan sebagai % volume padatan sel darah. Berikut merupakan rumus menghitung persentase hematokrit:

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

3.5.2.5 Sintasan

Sintasan suatu populasi ikan merupakan nilai persentase jumlah ikan yang berpeluang hidup selama masa pemeliharaan tertentu (Najiyati, 1992).

Sintasan diperoleh dengan mengikuti rumus :

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

Keterangan:

SR = Tingkat Sintasan ikan uji

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

N_o = Jumlah ikan uji pada awal penelitian

3.5.3 Analisis Data

Data hasil pengamatan meliputi beberapa variabel darah yaitu total leukosit, diferensial leukosit, kadar hematokrit dan sintasan lele masamo. Analisa data bertujuan untuk melihat perbedaan rata-rata hasil pengamatan variabel darah lele masamo signifikan atau tidak. Pengujian hipotesis menggunakan uji-t satu arah. Uji-t dihitung menggunakan microsoft excel dan menggunakan selang kepercayaan 95%.