

BAB III

METODOLOGI

3.1 Materi Penelitian

Ekstrak rumput laut yang digunakan adalah ekstrak sodium alginat dari rumput laut coklat *sargassum crassifolium*. Ekstrak di didapatkan dari laboratorium Prodi Budidaya Perairan UNISNU Jepara. Pakan yang digunakan adalah pakan dasar dari laboratorium pakan buatan BBPBAP Jepara. Biota Uji yang digunakan adalah udang vaname (*Litopenaus Vannamei*) yang didapatkan dari tambak Blok A BBPBAP Jepara dengan berat sekitar 10-11,5 gr. Bakteri *vibrio harveyi* didapatkan dari koleksi isolat murni laboratorium Mikrobiologi Manajemen Kesehatan Hewan Akuatik (MKHA) BBPBAP Jepara.

3.2 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Tabel 1. Alat Penelitian

No	Alat	Spesifikasi	Fungsi
1	Timbangan Mas	Ketelitian 0,01 gr	Menimbang Ekstrak, Multivitamin, Progol dan Hewan Uji
2	Magnetik Stirer	Cimarec + Hotplate stirrer	Menghomogenkan bahan
3	Kontainer	Volume 200 L	Wadah perlakuan
4	Blower		Sumber aerasi
5	Lemari Pendingin	Merek Show Case	Tempat menyimpan bahan-bahan dan pakan perlakuan
6	Water Pump	Efos	Mengganti air
7	Termometer	0-200 °C	Mengukur suhu
8	pH meter	0,01 auto calibrate	Mengukur pH
9	Refraktometer	Atago master-P/TA	Mengukur salinitas
10	DO Meter	YSI 550 A	Mengukur DO
11	Hemosytometer	0,1 mm Nuebauer	Mengamati THC
12	Kaca Preparat	Sail brand Slides	Pembuatan dan pengamatan preparat fagositosis
13	Mikroskop	Binokuler	Tempat pengamatan THC dan Fagositosis
14	Handy Counter	4 digit	Menghitung sel

15	Mikrotube	1,5 ml	Tempat menyimpan hemolim
16	Mikropipet	Huawei 20-1000 µl	Mengambil bahan volume mikroliter
17	Sentrifius	6 tabung e-cataloge	Memisahkan nathan (bakeri) dari supernathan
18	Cool Box	Marine Cooler	Tempat menyimpan hemolim
19	Spektrofotometer	Thermo Scientific GENESYS 50 UV-Visible	Mengetahui absorbansi

(Sumber: Hasil penelitian, 2017)

3.3.2 Bahan

Tabel 2. Bahan Penelitian

No	Bahan	Funsgi
1	Multivitamin (Sanbe)	Supply senyawa organik non esensial yang dibutuhkan udang dalam jumlah kecil
2	Progol (PT. INDISCO)	Melindungi feed suplement didalam pakan
3	Akuades	Melarutkan Ekstrak, Multivitamin, Progol, pencucian preparat,
4	Formalin 10%	Inaktivasi bakteri
5	Detergent	Membersihkan peralatan penelitian
6	Kaporit	Sterilisasi media
7	Natrium Thiosulfat	Mengikat kaporit dan mengendapkan TSS pada media
8	<i>Vibrio Harveyi</i>	Bahan dasar bakterin
9	Phospat Buffer Saline (PBS)	Mencuci bakterin
10	EDTA 10%	Antikoagulan hemolim
11	Etanol 95%	Sterilisasi spet, cover glass dan hemosytometer
12	Safranine	Mewarnai preparat fagositosis
13	BaCl ₂	Bahan dasar pembuatan standar McFarland
14	H ₂ SO ₄	Bahan dasar pembuatan standar McFarland
15	Larutan Bakterin	Bahan dalam fagositosis

(Sumber: Hasil penelitian, 2017)

3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental laboratorium, yaitu suatu penelitian yang dimaksudkan untuk menyelidiki kemungkinan sebab akibat dengan cara mengenalkan kepada satu atau lebih kelompok eksperimental dan satu atau lebih kondisi perlakuan serta membandingkan hasilnya dengan satu atau lebih kontrol yang tidak dikenai kondisi perlakuan (Suryabrata, 2003).

3.4 Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan adalah acak lengkap (RAL) berpola 4 x 3. Udang yang digunakan adalah spesies Udang vaname (*Litopenaus Vannamei*) yang didapatkan dari tambak pembesaran Blok A BBPBAP Jepara dipelihara selama 4 minggu dengan pemberian perlakuan ekstrak sodium alginat perbedaan konsentrasi. Sebagai variabel independen adalah perlakuan ekstrak konsentrasi 0, 1, 2 dan 3 gr/kg pakan (Yudiati *et al.*, 2016). Sebagai variabel dependen adalah total hemosit count, aktivitas fagositosis dan indeks fagositosis. Setiap perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Sehingga terdapat 12 unit eksperimen. Adapaun tabel perlakuan disajikan pada tabel 1, tabel unit eksperimen pada tabel 2, sedangkan tabel rancangan acak lengkap dalam penelitian disajikan pada tabel 3.

Tabel 3. Tabel Perlakuan

No	Kode	Sodium Alginat	Multivitamin	Progol
1	A	0 gr/kg	1 gr/kg	2 gr/kg
2	B	1 gr/kg	1 gr/kg	2 gr/kg
3	C	2 gr/kg	1 gr/kg	2 gr/kg
4	D	3 gr/kg	1 gr/kg	2 gr/kg

(Sumber: Yudiati *et al.*, 2016)

Tabel 4. Unit Eksperimen

Perlakuan (4)	Ulangan (3)		
	1	2	3
A	A1	A2	A3
B	B1	B2	B3
C	C1	C2	C3
D	D1	D2	D3

(Sumber: Hasil penelitian, 2017)

Tabel 5. Rancangan Acak Lengkap

B2	A1	D1	C2
C1	D3	A2	B3
A3	C3	B1	D2

(Sumber: Hasil penelitian, 2017)

Perlakuan A : Perlakuan pemberian pakan tanpa sodium alginat, penambahan multivitamin 1 gr/kg pakan dan penambahan progol 2 gr/kg pakan.

Perlakuan B : Perlakuan pemberian pakan 1 gr sodium alginat, penambahan multivitamin 1 gr/kg pakan dan penambahan progol 2 gr/kg pakan.

Perlakuan C : Perlakuan pemberian pakan 2 gr sodium alginat, penambahan multivitamin 1 gr/kg pakan dan penambahan progol 2 gr/kg pakan.

Perlakuan D : Perlakuan pemberian pakan 3 gr sodium alginat, penambahan multivitamin 1 gr/kg pakan dan penambahan progol 2 gr/kg pakan.

1, 2, 3 adalah pengulangan dalam eksperimen.

3.5 Persiapan Penelitian

3.5.1 Persiapan Pakan

Pakan dasar ekstrak sodium alginat, multivitamin dan progol ditimbang untuk dilakukan coating. Pakan dasar ditimbang sebanyak 1 kg. Ekstrak sodium alginat ditimbang dengan konsentrasi 1, 2 dan 3 gr/kg pakan. Multivitamin ditimbang sebanyak 1 gr/kg pakan. Progol ditimbang sebanyak 2 gr/kg pakan. Masing-masing bahan tersebut secara terpisah dilarutkan dengan menggunakan 10 ml akuades. Ketiga bahan tersebut disemprotkan pada pakan secara berurutan yaitu sodium alginat, multivitamin dan progol. Setiap tahap penyemprotan dilakukan pengeringan pada suhu ruang AC 16⁰C hingga kering. Pakan yang telah kering dikemas dan disimpan pada suhu 4⁰C.

3.5.2 Pembuatan Kurva Standar McFarland

Pembuatan kurva standar McFarland dilakukan dengan cara membuat larutan standar McFarland terlebih dahulu. Larutan standar McFarland dibuat dari dua larutan yang dicampurkan, yaitu larutan BaCl₂ 1% dan H₂SO₄ 1%. Adapun formulasi pembuatan larutan standar disajikan pada tabel 4.

Tabel 6. Larutan Standar McFarland

Standar McFarland	1% BaCl ₂ (mL)	1% H ₂ SO ₄ (mL)	McFarland (x 10 ⁸ sel/ml)
1	0,1	9,9	3
2	0,2	9,8	6
3	0,3	9,7	9
4	0,4	9,6	12
5	0,5	9,5	15
6	0,6	9,4	18
7	0,7	9,3	21
8	0,8	9,2	24
9	0,9	9,1	27
10	1	9	30

(Sumber: McFarland, 1907)

Masing-masing larutan standar dibuat dengan 3 pengulangan pada komposisi dalam tabel 4. Setelah proses pencampuran dilakukan inkubasi 5 menit untuk memberikan waktu terjadinya reaksi pengendapan. Masing-masing larutan standar yang diperoleh selanjutnya dilakukan spektrofotometri dengan panjang gelombang 600 nm. Masing-masing larutan dilakukan pengulangan spektrofotometri sebanyak 3 kali. Nilai absorbansi yang didapatkan selanjutnya dibuat diagram titik dengan ketentuan sumbu X adalah kepadatan bakteri dan sumbu Y adalah absorbansi. Diagram titik yang terbentuk dilakukan analisis regresi linier sederhana dengan memunculkan persamaan regresi dan koefisien determinan. Persamaan tersebut digunakan untuk mengkonversi nilai absorbansi bakterin menjadi kepadatan bakteri sel/ml.

3.5.3 Pembuatan Bakterin

Media Zobell cair (5,0 gr bakto-pepton, 1,0 gr ekstrak khamir dan air laut steril (70%) hingga mencapai volume 1 liter) digunakan sebagai media kultur bakteri vibrio dengan pH diatur hingga 7,5 – 7,6. Bakteri *vibrio harveyi* stok dilakukan purifikasi dengan menggunakan

media TCBSA dengan metode *streak plate*. Koloni murni dilakukan inokulasi ke media miring dan media Zobell cair untuk di kultur 24 jam dengan seker agitasi 100 g, suhu 35°C.

Sentrifugasi 6000 rpm selama 15 menit kemudian supernatan dibuang. Peletnya di tambah formalin 10% dengan volume sama dengan volume awal. Inkubasi selama 24 jam pada kondisi terhindar dari sinar matahari dan suhu ruangan. Kemudian di lanjutkan sentrifugasi 6000 rpm selama 15 menit. Supernatan di buang, kemudian dilanjutkan pencucian sebanyak 3 kali menggunakan PBS steril dengan pH 7,4. Lalu di spektrofotometer 600 nm. Absorbansi yang didapat di konversi menjadi satuan sel/ ml menggunakan standar McFarland. Bakterin yang digunakan dilakukan pengenceran dengan menggunakan pelarut PBS hingga mendapatkan kepadatan 10^4 sel/ml.

3.5.4 Persiapan Wadah

Wadah yang digunakan adalah bak kontainer dengan ukuran panjang 70 cm, lebar 50 cm dan tinggi 40 cm yang sebelumnya dibersihkan dan disterilkan dengan menggunakan formalin 10%. Larutan formalin 10% selanjutnya di semprot secara merata keseluruhan sisi kontainer. Dikeringkan hingga kering selanjutnya dibilas dengan air mengalir hingga pengaruh formalin hilang. Setelah pengaruh formalin hilang bak kontainer siap untuk digunakan sebagai wadah perlakuan.

3.5.5 Persiapan media

Media yang digunakan adalah air laut dari perairan pantai utara Jepara. Air diambil dari laut menggunakan pipa air laut yang selanjutnya dilakukan filtrasi menggunakan sand filter, filter micron dan plankton net T90. Air laut tersebut diletakkan pada tandon air laut tersebut dilakukan sterilisasi menggunakan kaporit konsentrasi 15 ppm, di homogenkan dan inkubasi 24 jam. Selanjutnya dilakukan pengendapan dengan menggunakan natrium thiosulfat

konsentrasi 30 ppm, larut homogen dan inkubasi 24 jam. Setelah 2 jam akan terbentuk endapan di dasar, lalu dilakukan penyiponan hingga bersih. Media air tersebut dilakukan pemberian aerasi selama 2 x 24 jam. Media tersebut siap digunakan dalam pelaksanaan penelitian.

3.5.6 Persiapan Udang

Udang vaname (*Litopenaus Vannamei*) yang didapatkan dari tambak pembesaran Blok A BBPBAP Jepara diletakkan dalam bak stok fiber bervolume 1 ton dan selanjutnya diaklimatisasi selama 1 minggu. Aklimatisasi dilakukan terhadap media hidup yang baru, jenis pakan yang diberikan dan pola makan yang diberikan. Jenis pakan yang diberikan adalah pakan dasar tanpa penambahan zat aditif. Pola makan yang diberikan adalah pada pagi (07.00 WIB), siang(12.00 WIB), sore (17.00 WIB) dan malam (22.00 WIB). Setelah aklimatisasi pada bak stok, udang di distribusikan ke masing-masing bak kontainer perlakuan. Proses distribusi dilakukan grading dan homogenitas ukuran hewan percobaan. Udang yang digunakan adalah ukuran 10-11,5gr. Jumlah udang yang digunakan per bak perlakuan sebanyak 15 ekor.

3.6 Prosedur Pemeliharaan Udang

Udang dipelihara selama 28 hari. Pakan diberikan sebanyak 5 % biomassa. Pakan diberikan sebanyak 4 kali sehari pada pagi (07.00 WIB), siang(12.00 WIB), sore (17.00 WIB) dan malam (22.00 WIB). Dilakukan penggantian air media setiap hari sebanyak 50%. Sedangkan ketika melakukan pengambilan data feses dan sisa pakan maka sebelumnya dilakukan penggantian air 100%. Pengambilan data sisa pakan dilakukan 1 jam sebelum pemberian pakan berikutnya. Data feses diambil pada satu siklus pemberian pakan yaitu pada jam 6 pagi sebelum pemberian pakan timbangan baru berikutnya. Sisa pakan dan feses

dilakukan pengeringan dan ditimbang. Pengambilan data sisa pakan dan feses dilakukan satu minggu sekali. Data SR dilakukan pengamatan setiap hari pada pukul 08.00 WIB, sedangkan data bobot udang dilakukan satu minggu sekali pada jam 09.00 WIB.

3.7 Prosedur Pengambilan Data Kualitas Air

Kualitas air yang diambil adalah suhu, pH, salinitas dan DO. Parameter suhu dilakukan pengukuran menggunakan alat termometer. pH dilakukan menggunakan alat pH meter. Salinitas dilakukan menggunakan alat refractometer. DO dilakukan pengukuran menggunakan alat DO meter. Pengukuran parameter kualitas air dilakukan setiap hari jam 08.00 WIB.

3.8 Prosedur Pengambilan Data Hemolim

Pengambilan hemolim udang vaname (*bleeding*) dilakukan menggunakan spuit ukuran 26_{GX} dengan volume 1 ml yang telah terlebih dulu dibasahi dengan EDTA 10%. Hemolim udang diambil secara langsung tanpa adanya pembiusan. Udang diambil dari bak kontainer kemudian disuntik pada bagian pangkal pleopod pada segment abdominal dekat lubang genital. Ambil hemolim sebanyak 0.3 ml kemudian ditampung dalam mikrotube yang sebelumnya telah dibasahi dengan larutan EDTA 10%. Hemolim udang vaname yang didapat siap untuk dilakukan analisa hematologi, yang meliputi penghitungan total hemosit dan aktivitas fagositosis dan indeks fagositosis.

3.9 Analisis Hematologi

3.9.1 Total Hemosit Count (THC)

Penghitungan total hemosit dilakukan pada sampel udang dengan prosedur menurut Campa-cordova *et.al*, (2002) dalam Alim (2007). Alat yang digunakan adalah Neubauer

Counting Chamber dan cover glass dibersihkan dengan ethanol 95%. Hemolim udang diteteskan diatas Neubauer Counting Chamber kemudian ditutup dengan cover glass. Letakkan dibawah mikroskop kemudian diamati dengan perbesaran total 400X. Pada Neubauer Counting Chamber terdapat bilik hitung yaitu 16 kotak besar dan 25 kotak kecil. Penghitungan haemosit dilakukan pada 4 kotak besar pada bilik hitung leukosit.

Perhitungan jumlah Hemosit menggunakan rumus:

$$\text{THC} = \frac{\text{Jumlah sel yang dihitung}}{\text{Volume yang dihitung}} \times 10^6 \text{ sel/L}$$

3.9.2 Aktivitas dan Indeks Fagositosis (AF dan IF)

Analisis fagositosis ditentukan menggunakan prosedur menurut Alim (2007). Hemolim udang diambil menggunakan jarum suntik 1 mL yang telah diberi antikoagulan. Hemolim sebanyak 100 µl didalam mikrotube dicampur dengan 100 µl bakteri *V. Harveyi* dan kemudian diinkubasi selama 20 menit. Sampel sebanyak 5 µl yang telah diinkubasi diteteskan di atas objek glass dan dibuat preparat apusan dengan menggunakan cover glass, apusan diusahakan dibuat setipis mungkin, tidak terputus dan kering anginkan. Preparat apusan difiksasi dengan ethanol 95 % selama 5 menit lalu kering anginkan. Pewarnaan dilakukan dengan Safranin 0.15 % selama 10 menit dan dibilas dengan aquades mengalir, kering anginkan. Preparat yang telah didapatkan dilakukan pengamatan dibawah mikroskop dengan perbesaran total 400X, amati minimal 100 sel. Hitung sel yang melakukan aktivitas fagositosis dan bakteri yang terfagositosis. Nilai AF dan IF dapat diketahui dengan rumus :

$$\text{AF (\%)} = \frac{\text{Jumlah sel fagosit yang aktif}}{\text{Jumlah sel hemosit yang diamati}} \times 100$$

$$\text{IF} = \frac{\text{Jumlah bakteri yang terfagosit}}{\text{Jumlah sel fagosit yang aktif}}$$

3.10 Analisis Statistik

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 4 perlakuan (Pakan A (alginat 0gr/kg), Pakan B (alginat 1gr/kg), Pakan C (alginat 2gr/kg), Pakan D (alginat 3gr/kg), dengan masing-masing 3 kali ulangan. Data parameter hematologi dilakukan deskriptif clustered column menggunakan error bar with standar eror pada program Microsoft Excel. Data dilakukan uji pendahuluan normalitas, homogenitas dan aditivitas dengan menggunakan program SPSS 16.0. Jika ketiga analisis pendahuluan menyatakan bahwa data bersifat normal, homogen dan aditif maka selanjutnya dilakukan analisis *one way annova* dengan $\alpha = 0,05$. Jika perlakuan memberikan nilai respon imun yang berbeda secara nyata ($p < 0,05$) maka selanjutnya dilakukan uji post Hoc Test dengan analisis tukey pada $\alpha = 0,05$.