

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

Materi di dalam penelitian ini adalah mengenai pengamatan kerusakan insang udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) dengan metode histopatologi dengan menggunakan pewarnaan hematoksilin eosin (HE) yang didalamnya juga mempelajari tentang parameter kualitas air yang baik untuk budidaya udang vaname untuk mencegah terjadinya penyakit yang disebabkan oleh virus diantaranya meliputi parameter suhu, kecerahan, oksigen terlarut (DO), pH, salinitas, amonia, nitrit, nitrat, bakteri dan *survival rate* (SR).

3.2 Alat dan Bahan

Alat bahan yang digunakan dalam penelitian ini untuk mendapatkan data primer disajikan pada **Lampiran 1**.

3.3 Metode Penelitian

Pengambilan data pada penelitian ini menggunakan metode deskriptif. Penelitian deskriptif (*descriptive research*) adalah suatu metode penelitian yang ditujukan untuk menggambarkan fenomena-fenomena yang ada, yang berlangsung pada saat ini atau saat yang lampau. Penelitian deskriptif bisa mendeskripsikan sesuatu keadaan saja, tetapi bisa juga mendeskripsikan keadaan dalam tahapan-tahapan perkembangannya. Penelitian ini tidak mengadakan manipulasi atau pengubahan data variabel-variabel bebas, tetapi menggambarkan suatu kondisi apa adanya (Hamdi dan Bahrudin, 2014). Peneliti menggunakan metode diskriptif berdasarkan pertimbangan-pertimbangan bahwa peneliti akan menggambarkan keadaan yang terjadi di daerah tersebut.

3.4 Teknik Pengumpulan Data

Adapun teknik pengumpulan data yang dilakukan ada dua, yaitu pengambilan data primer dan data sekunder.

3.4.1 Data Primer

Data primer adalah data yang diperoleh langsung dari sumbernya. Data primer dapat diambil dengan melakukan observasi, wawancara, maupun partisipasi aktif. Menurut Hermawan (2005), data primer merupakan suatu data yang dikumpulkan secara langsung oleh peneliti yang digunakan untuk menjawab masalah atau tujuan penelitian yang dilakukan dalam penelitian eksploratif, deskriptif maupun kausal dengan menggunakan metode pengumpulan data berupa survei ataupun observasi. Data primer yang diambil dalam penelitian ini meliputi parameter kualitas air berupa parameter fisika, kimia dan biologi.

a. Observasi

Metode observasi dilakukan dengan cara mengamati perilaku, kejadian atau kegiatan orang atau sekelompok orang yang diteliti. Kemudian mencatat hasil pengamatan tersebut untuk mengetahui apa yang sebenarnya terjadi. Dengan pengamatan, peneliti dapat melihat kejadian sebagaimana subyek yang diamati mengalaminya, menangkap, merasakan fenomena sesuai pengertian subyek dan obyek yang diteliti (Djaelani, 2013). Menurut Budiarto dan Anggraeni (2003), observasi merupakan salah satu teknik pengumpulan data yang menggunakan pertolongan indera mata. Dalam penelitian ini, observasi dilakukan dengan melakukan pengamatan langsung ke lapang maupun dalam laboratorium.

b. Wawancara

Menurut Rahmat (2009), wawancara merupakan alat *re-checking* atau pembuktian terhadap informasi atau keterangan yang diperoleh sebelumnya. Wawancara mendalam adalah suatu proses memperoleh keterangan untuk tujuan penelitian dengan cara melakukan tanya jawab sambil bertatap muka antara pewawancara dengan informan atau orang yang diwawancarai, dengan atau tanpa menggunakan pedoman wawancara. Dalam penelitian ini, wawancara dilakukan dengan mengajukan pertanyaan kepada pihak-pihak yang lebih mengerti tentang bidang tersebut.

c. Partisipasi aktif

Menurut Djaelani (2013), partisipasi adalah metode pengumpulan data melalui pengamatan dan penginderaan dimana keberadaan peneliti dapat terlibat secara aktif maupun tidak aktif. Menurut Spradley (1980) *dalam* Djaelani (2013), partisipasi atau suatu keterlibatan peneliti dapat dibagi menjadi empat, yaitu:

- a. Partisipasi pasif, dimana peneliti datang dan mengamati saja tetapi tidak ikut terlibat dalam kegiatan.
- b. Partisipasi moderat, dimana peneliti kadang ikut aktif terlibat kegiatan namun kadang tidak aktif.
- c. Partisipasi aktif, dimana peneliti terlibat aktif dalam kegiatan yang diteliti.
- d. Partisipasi lengkap, dimana peneliti sudah sepenuhnya terlibat sebagai orang dalam sehingga tidak terlihat seperti sedang melakukan penelitian.

Kegiatan partisipasi aktif dalam penelitian ini dilakukan dengan mengambil sampel air dan melakukan pengamatan dilapang serta melakukan pengamatan kualitas air di laboratorium.

3.4.2 Data Sekunder

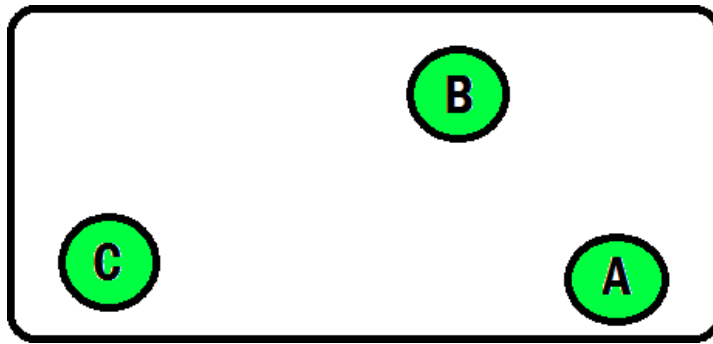
Menurut Wibisono (2003), data sekunder merupakan data yang didapat dan disimpan oleh orang lain yang biasanya merupakan suatu data masa lalu. Data sekunder merupakan suatu struktur data historis mengenai variabel-variabel yang telah dikumpulkan dan dihimpun sebelumnya oleh pihak lain. Sumber data sekunder bisa diperoleh dari dalam suatu perusahaan (sumber internal), berbagai internet websites, perpustakaan umum maupun lembaga pendidikan, membeli dari perusahaan-perusahaan yang memang mengkhususkan diri untuk menyajikan data sekunder, dan lain-lain (Hermawan, 2005).

3.5 Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan beberapa tahapan yaitu pengamatan morfologi udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) serta pengamatan kerusakan jaringan insang menggunakan teknik pengamatan histopatologi di akhir penelitian. Teknik histopatologi ada beberapa tahapan diantaranya proses pemotongan jaringan berupa makross, proses pengeblokan dan pemotongan jaringan, proses deparafinisasi, proses pewarnaan (HE), alkohol bertingkat, penjernihan (*clearing*), dan proses *mounting* dengan entelan dan *deckglass*.

3.5.1 Titik Pengambilan Sampel Air

Pengambilan sampel air dilakukan pada 2 petak tambak, yaitu tambak A (super intensif) sebagai petak percobaan dan tambak B (intensif) sebagai petak pembanding. Masing – masing petak diambil 3 titik sampel pengambilan air. Titik pengambilan sampel air dapat dilihat pada **Gambar 4**.



Gambar 4. Titik Pengambilan Sampel Air

Berdasarkan gambar tersebut dijelaskan bahwa ada 3 titik pengambilan sampel air pada petak percobaan yaitu titik A yang berada di dekat kincir air dimana terdapat kondisi kualitas air yang baik, titik B yang berada di dekat anco yang mewakili daerah dengan bahan organik tinggi karena merupakan daerah pemberian pakan udang, dan titik C yang berada jauh dari kincir air yang mewakili kemungkinan kondisi terburuk dari tambak. Begitu pula pada petak 2 sebagai petak pembanding juga diambil pada 3 titik pengambilan sampel air.

3.5.2 Pengamatan Morfologi Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*)

Pengamatan morfologi udang vaname dilakukan setiap minggu di lapang dengan mengamati apakah ada kelainan morfologi yang diderita oleh udang tersebut. Kelainan yang terjadi seperti antena patah, usus patah, terdapat bintik dan sebagainya dicatat setiap minggunya untuk keperluan data pendukung penelitian.

3.5.3 Pengamatan Histopatologi Insang Udang Vaname

Sampel udang vaname yang telah diperlihara kemudian diambil dan direndam di dalam bahan pengawet berupa formalin 10%. Kemudian dilanjutkan dengan pembuatan dan pengamatan preparat histopatologi. Adapun langkah-

langkah yang dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya adalah:

- Proses Pemotongan Jaringan Berupa Makroskopis

Jaringan atau spesimen penelitian harus sudah terfiksasi dengan formalin 10% atau dengan *buffer* formalin 10% minimal selama 7 jam sebelum dilakukan proses pengerjaan berikutnya. Jaringan kemudian dipilih yang terbaik sesuai dengan lokasi yang akan diteliti. Selanjutnya jaringan dipotong kurang lebih dengan ketebalan 2-3 mm lalu dimasukkan ke kaset dan diberi kode sesuai dengan kode gross peneliti. Jaringan kemudian diproses dengan alat *Automatic Tissue Tex Processor* selama 90 menit sampai alarm berbunyi tanda telah selesai.

- Proses Pengeblokan dan Pemotongan Jaringan

Jaringan diangkat dari mesin *Tissue Tex Processor* kemudian diblok dengan paraffin sesuai kode jaringan. Selanjutnya jaringan dipotong dengan alat *microtome* dengan ketebalan 3-5 mikron.

- Proses Deparafinisasi (Melepaskan Paraffin yang Melekat Pada Preparat)

Setelah disayat atau dipotong kemudian ditaruh dalam oven selama 30 menit dengan suhu 70-80°C. Kemudian potongan jaringan dimasukkan ke dalam 2 tabung larutan *xylol* masing-masing 20 menit. Kemudian dimasukkan ke dalam 4 tabung alkohol masing-masing 3 menit (Hidrasi), dan dimasukkan ke air mengalir selama 15 menit.

- Proses Pewarnaan Jaringan Menggunakan HE

Pada tahap ini jaringan direndam dalam cat utama Harris Hematoksilin selama 10-15 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 15 menit. Selanjutnya dicelupkan kedalam alkohol asam 1% selama 2-5 celup. Selanjutnya jaringan dicelupkan kedalam amonia lithium karbonat

selama 3-5 celup, dan terakhir direndam di dalam Eosin selama 10-15 menit.

- Tahap Alkohol bertingkat

Pada tahap ini, jaringan direndam di dalam alkohol 70%, 80%, 96%, dan alkohol absolut masing-masing selama 3 menit.

- Tahap Penjernihan (*Clearing*)

Pada tahap ini penjernihan dilakukan dengan direndam pada larutan *xylol* selama 15 menit sebanyak 2 kali.

- Tahap *Mounting* dengan Entelan (Sebagai perekat) dan *Deck glass*

Slide atau *object glass* ditutup dengan *deck glass* dan biarkan slide kering pada suhu ruangan. Setelah slide kering maka slide siap untuk diamati.

3.6 Kualitas Air

Pengamatan kualitas air pada tambak budidaya udang vaname dilakukan di lapang maupun di dalam laboratorium.

3.6.1 Parameter Fisika

Pengamatan parameter fisika seperti suhu dan kecerahan dilakukan langsung dilapang menggunakan alat yaitu *thermometer* dan *secchi disk*.

a. Suhu

Menurut Herawati *et al.* (2009), cara pengukuran suhu dalam suatu perairan dapat dilakukan dengan cara:

- Mencelupkan *thermometer* ke dalam air dengan membelakangi matahari.
- Mendinginkan selama kurang lebih satu menit.
- Mencatat hasil yang tertera pada *thermometer* tersebut.

b. Kecerahan

Menurut Suryanto dan Takarina (2009), cara pengukuran kecerahan dengan menggunakan *secchi disk* adalah sebagai berikut:

- Menurunkan lempengan *secchi disk* secara perlahan-lahan ke dalam hingga tidak terlihat lagi, pegangi bagian tangkainya.
- Menandai tangkai dengan karet gelang.
- Mengukur kedalaman tangkai sebagai D_1 .
- Memasukan kembali lempengan *secchi disk* sampai benar-benar tidak terlihat.
- Mengangkat perlahan-lahan sampai terlihat pertama kali.
- Menandai tangkai.
- Mengukur kedalaman tangkai sebagai D_2 .
- Menghitung kecerahan dengan rumus

$$\text{Kecerahan (cm)} = \frac{D_1 + D_2}{2}$$

3.6.2 Parameter Kimia

Pengamatan parameter kimia kualitas air tambak udang vaname dilakukan di lapang dan di laboratorium. Adapun pengamatan yang dilakukan di lapang meliputi Oksigen Terlarut (DO), pH, dan salinitas. Sedangkan pengukuran amonia, nitrit dan nitrat dilakukan di dalam laboratorium.

a. Oksigen Terlarut (DO)

Menurut Herawati *et al.* (2009), kandungan oksigen terlarut didalam perairan dapat diukur dengan cara sebagai berikut:

- Mengkalibarsi DO meter terlebih dahulu sampai menunjukkan angka nol.
- Memasukkan ujung hitam pada DO meter ke dalam air yang akan diuji.
- Membiarkan selama kurang lebih 3 menit.

- Mencatat hasil pengukuran DO sesuai dengan angka yang tertera pada DO meter.

b. pH

Menurut Amril *et al.* (2013), cara pengukuran pH menggunakan pH meter adalah sebagai berikut:

- Mengkalibrasi pH meter dengan larutan *buffer* pH 4 dan 7.
- Menekan tombol *cal* pada alat pH meter.
- Mencilupkan elektroda ke dalam *buffer* pH 7 dan tunggu sampai nilai pH terbaca menjadi 7.
- Mencilupkan elektroda ke dalam *buffer* pH 4, lalu selesaikan kalibrasi pH meter.
- Membilas elektroda dengan air destilasi kemudian dikeringkan dengan tisu.
- Memasukkan elektroda ke dalam air sampel kemudian mencatat nilai pH meter yang dibaca pada alat.

c. Salinitas

Menurut Kordi dan Tancung (2007) *dalam* Yanuhar (2016), cara mengukur salinitas menggunakan refraktometer adalah sebagai berikut:

- Menyiapkan refraktometer.
- Membuka penutup kaca prisma.
- Membersihkan dengan menggunakan aquades.
- Meneteskan 1-2 tetes air sampel yang akan diukur salinitasnya.
- Menutup kembali dengan hati-hati supaya tidak terdapat gelembung udara pada permukaan kaca prisma.
- Mengarahkan ke arah sumber cahaya.
- Melihat nilai salinitas air yang diukur melalui kaca pengintai.

- Mencatat hasilnya.

d. Amonia

Menurut *Inhouse Method* Laboratorium Kimia Analitik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya (2017), cara pengujian kadar amonia antara lain:

- Mengambil contoh air 25 ml dan memasukkan ke dalam labu ukur 50 ml.
- Menambahkan 2 ml larutan K.Na tatrak + 2 ml larutan Nessler, mengocok dan menambahkan aquades sampai tanda batas dan mengocok sampai homogen.
- Mengukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 420 nm, dan mencatat nilai absorbansinya.

e. Nitrit

Adapun prosedur pengujian nitrit (NO_2) menurut *Inhouse Method* Laboratorium Kimia Analitik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya (2017), adalah:

- Mengambil 10 ml larutan.
- Memasukkan ke dalam tabung reaksi.
- Menambahkan 1 sendok pereaksi KID dan dihomogenkan.
- Memanaskan larutan dalam penangas air dengan suhu 40°C selama 30 menit.
- Membaca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 525 nm dan mencatat nilai absorbansinya.

f. Nitrat

Adapun prosedur pengujian nitrat (NO_3) menurut *Inhouse Method* Laboratorium Kimia Analitik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya (2017), adalah:

- Mengambil contoh air 5 ml dan memasukan ke dalam gelas piala 50 ml.
- Menguapkan atau memanaskan dengan penangas air sampai kering.
- Menambahkan 2 ml larutan *phenol* sulfat dan mengaduk dengan pengaduk gelas.
- Memasukan ke dalam labu ukur 50 ml.
- Menambahkan 7 ml amoniak pekat sehingga timbul warna kuning dalam larutan, tanda bataskan dengan aquades.
- Membaca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 410 nm dan mencatat nilai absorbansinya.

3.6.3 Parameter Biologi

Pengamatan parameter biologi untuk bakteri dilakukan di dalam laboratorium, sedangkan untuk perhitungan *Survival Rate* (SR) dapat dilakukan di lapang.

a. Bakteri

Pengamatan bakteri dilakukan di Laboratorium Biologi Ikan Divisi Parasit dan Penyakit Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya. Adapun prosedur pengamatan bakteri menurut *Inhouse Method* Laboratorium Biologi Ikan Divisi Parasit dan Penyakit Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya (2017), terdiri dari beberapa tahapan, diantaranya:

A. Pembuatan Larutan Na-Fis

Adapun proses dalam pembuatan larutan Na-Fis adalah sebagai berikut:

- Menimbang 1,8 gram serbuk NaCl.
- Memasukkan ke dalam *beakerglass*.
- Menambahkan aquades sampai 200 ml.
- Menghomogenkan larutan.
- Mengambil larutan Na-Fis sebanyak 9 ml dengan pipet volume dan memasukan ke dalam tabung reaksi.
- Menutup tabung reaksi dengan kapas.

B. Pembuatan Media PCA

Adapun proses dalam pembuatan media PCA adalah sebagai berikut:

- Menimbang media PCA sebanyak 6,75 gram.
- Menimbang serbuk NaCl sebanyak 15 gram.
- Memasukkan serbuk media PCA ke dalam erlenmeyer.
- Menambahkan aquades sebanyak 300 ml.
- Memasukkan serbuk NaCl ke dalam larutan media dan dihomogenkan.
- Menutup erlenmeyer menggunakan kapas dan alumunium foil.
- Memanaskan larutan media pada *hot plate*.
- Mendinginkan larutan media sampai suhu ruangan.

C. Sterilisasi Alat

Adapun proses dalam sterilisasi alat adalah sebagai berikut:

- Memasukkan tabung reaksi berisi Na-fis, media PCA, *bluetip* dan cawan petri yang telah dibungkus koran ke dalam autoklaf.
- Menutup tutup autoklaf dan mengunci secara diagonal.
- Menyalakan autoklaf.
- Menunggu sampai keluar uap kemudian menutup klep autoklaf.

- Membiarkan sampai tekanannya mencapai 121 atm.
- Mengatur waktu sterilisasi selama 15 menit.
- Mengecilkan autoklaf maksimal sampai lampu indikator sterilisasi menyala.
- Menunggu proses sterilisasi sampai autoklaf berbunyi.
- Membuka klep autoklaf supaya uap dapat keluar.
- Membuka tutup autoklaf dan mengeluarkan peralatan dan media.

D. Pengenceran Sampel Air Bakteri

Adapun proses dalam pengenceran air sampel bakteri adalah sebagai berikut:

- Menyiapkan bunsen yang telah menyala pada ruangan khusus untuk sterilisasi.
- Mengambil 1 ml air sampel menggunakan mikropipet dan menuangkan pada larutan Na-Fis di dalam tabung reaksi.
- Menghomogenkan dengan *sentrifuge*.
- Mengambil 1 ml air sampel pada tabung reaksi pertama dan menggunakan mikropipet dan menuangkan pada larutan Na-Fis di dalam tabung reaksi kedua.
- Menghomogenkan dengan *sentrifuge*.
- Mengulangi langkah tersebut sampai 10 kali pengenceran.
- Menandai tabung reaksi pada pengenceran ke 8, 9 dan 10.

E. Penanaman Bakteri

Adapun proses dalam penanaman bakteri adalah sebagai berikut:

- Menyalakan bunsen.
- Mengambil 1 ml air sampel pada tabung reaksi menggunakan mikropipet.

- Menuangkan ke dalam cawan petri.
- Menuangkan larutan media PCA ke dalam cawan petri.
- Memutar cawan petri membentuk angka 8.
- Membungkus cawan petri dengan plastik *warp*.
- Memasukkan cawan petri berisi sampel bakteri ke dalam inkubator selama 24 jam.

F. Perhitungan Jumlah Bakteri

Adapun proses dalam pengenceran air sampel bakteri adalah sebagai berikut:

- Mengambil cawan petri berisi bakteri dari inkubator.
- Menyalakan *Colony Counter*.
- Menghitung bakteri pada cawan petri dengan menekan atau memberi tanda titik pada bakteri menggunakan spidol.

G. Pembuatan Koloni Tunggal (Biakan Murni)

Adapun proses dalam pembuatan koloni tunggal (biakan murni) adalah sebagai berikut:

- Menyiapkan media NA yang sudah dituang kedalam cawan petri dan sudah dalam bentuk gel.
- Menandai satu jenis bakteri yang akan diambil dari media PCA.
- Menyalakan bunsen
- Memanaskan jarum ose pada bunsen
- Mengambil satu jenis bakteri yang sudah ditandai menggunakan jarum ose.
- Menggoreskan pada cawan petri berisi media NA secara zigzag.
- Menginkubasi didalam inkubator.

b. Survival Rate (SR)

Adapun cara yang digunakan untuk menghitung tingkat kelangsungan hidup atau *survival rate* menurut Ghufuran dan Kordi (2009), adalah dengan rumus sebagai berikut:

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

Keterangan:

SR = Kelangsungan hidup (%)

N_t = Jumlah biota pada saat panen (ekor)

N_o = Jumlah biota pada awal penebaran (ekor)

3.7 Analisis Data

Analisis yang digunakan adalah dengan menggunakan Uji T yang bertujuan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan setiap parameter kualitas air pada kedua jenis tambak yang berbeda padat tebaranya. Sebelum dilakukan uji T, maka data diuji normalitas terlebih dahulu. Apabila $P > 0,05$, maka data berdistribusi normal sehingga dapat dilanjutkan menggunakan uji T. Pada tahapan uji T, rata-rata hasil pengamatan setiap kolam dibandingkan. Apabila hasil uji T mendapatkan nilai $P > 0,05$, maka hipotesis awal (H_0) diterima, artinya tidak ada perbedaan antara kedua jenis tambak tersebut.

Uji t adalah suatu tes statistik yang memungkinkan kita membandingkan dua skor rata-rata, untuk menentukan probabilitas (peluang) bahwa perbedaan antara dua skor rata-rata merupakan perbedaan yang nyata bukan yang terjadi secara kebetulan (Setyosari, 2013). Menurut Santoso (2005) dalam Sani (2016), uji t memiliki ciri-ciri jumlah sampel yang relatif kecil, dimana besar yang bisa diolah kurang dari 30 sampel, jika lebih besar dari 30 maka dilakukan uji z.