

3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

Materi pada penelitian ini adalah udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) dalam kondisi sehat yang akan diinfeksi dengan *Vibrio harveyi*, dimana sebelumnya diberi minyak cengkeh sebagai pencegah bakteri.

3.1.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: Akuarium sebanyak 20 buah, Refraktometer, pH meter, DO meter, Thermometer, Aerator, Pipet Volume, Pipet Tetes, Bola Hisap, Tabung Reaksi, Statif, Buret, Gelas Ukur, Beaker glass, Erlenmeyer, dan Spektrofotometer.

3.1.2 Bahan Penelitian

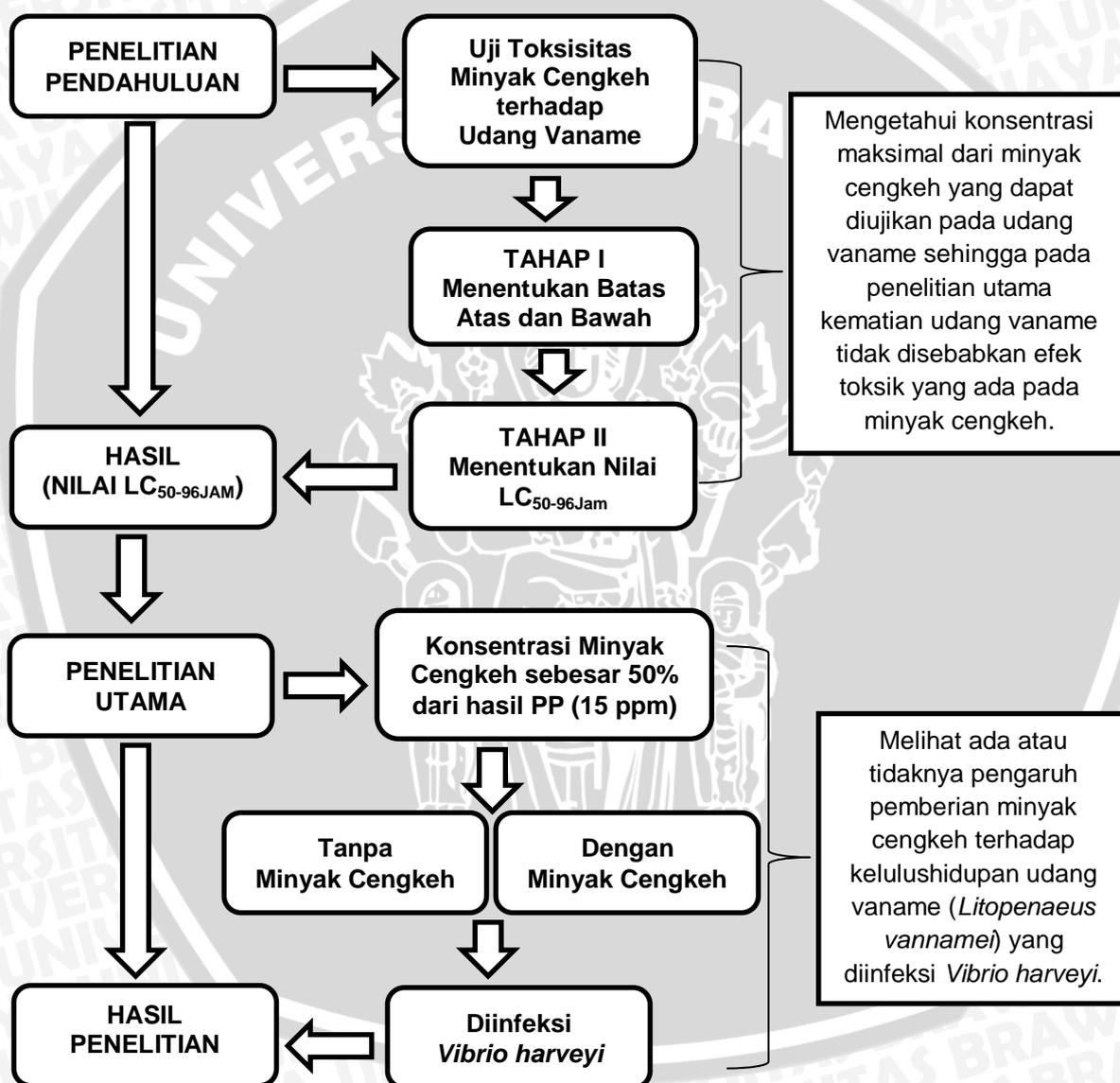
Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut : udang vaname Post Larva (PL) 13 berukuran ± 2 cm dalam kondisi sehat ketika diamati secara morfologi, minyak cengkeh, biakan murni *Vibrio harveyi*, air laut, air tawar, kertas label, tissue, aquades, nessler, indikator pp, dan Na_2CO_3 .

3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan di dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Menurut Darmono dan Hasan (2002), metode eksperimen merupakan kajian empiris dan menggunakan analisis dengan bantuan statistik untuk menguji hipotesis. Ditambahkan oleh Solso dan MacLin 2002 dalam Ulfiatin (2004), penelitian eksperimen adalah suatu penelitian yang di dalamnya ditemukan minimal satu variabel yang dimanipulasi untuk mempelajari hubungan sebab – akibat. Tujuan dari penelitian eksperimen adalah untuk menyelidiki ada tidaknya hubungan sebab akibat serta berapa besar hubungan sebab akibat tersebut dengan cara memberikan perlakuan – perlakuan tertentu pada beberapa kelompok eksperimen dan menyediakan kontrol untuk penelitian.

3.3 Prosedur Penelitian

Penelitian dilakukan dalam dua tahap meliputi penelitian pendahuluan yaitu uji toksisitas untuk mengetahui nilai $LC_{50-96 \text{ jam}}$ dari minyak cengkeh terhadap udang vaname dan penelitian utama untuk mengetahui pengaruh pemberian minyak cengkeh terhadap kelulushidupan udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) yang diinfeksi *Vibrio harveyi*. Skema penelitian seperti bagan berikut :



Gambar 6. Skema Sistematis Penelitian

Analisis data untuk uji toksisitas (LC_{50}) 96 jam menggunakan analisis probit (Wardlaw, 1995). Pada penelitian utama, masing-masing perlakuan diulang

sebanyak 10 kali. Konsentrasi minyak cengkeh yang digunakan adalah 50% dari nilai uji LC₅₀ 96 jam (15 ppm) yang didapatkan pada penelitian pendahuluan. Hal ini dilakukan karena diasumsikan pada konsentrasi tersebut udang vaname sebanyak-banyaknya akan mengalami kematian sebesar 25% bahkan tidak mati sama sekali karena telah menyesuaikan diri dengan kondisi yang ada. Adapun parameter yang diamati yaitu tingkat kelulushidupan udang vaname dan kualitas air yang meliputi suhu, salinitas, pH, DO, Amonia dan CO₂ sebagai parameter penunjang.

3.3.1 Penelitian Pendahuluan

Uji pendahuluan dimaksudkan untuk menentukan nilai uji toksisitas LC₅₀ 96 jam dari minyak cengkeh sebagai ambang batas maksimal yang dapat diujikan pada udang vaname. Prosedurnya adalah sebagai berikut :

1. Menyiapkan bak-bak percobaan berkapasitas 2 liter untuk kadar konsentrasi minyak cengkeh yang berbeda.
2. Membuat larutan minyak cengkeh dengan konsentrasi 0.1 ppm; 1 ppm; 10 ppm; dan 100 ppm .
3. Memasukkan hewan uji *Litopenaeus vannamei* sebanyak 10 ekor pada tiap perlakuan.
4. Selama pengujian toksisitas (LC₅₀ 96 jam) dilakukan aerasi.
5. Mengamati setiap 24 jam sekali selama 96 jam untuk mengetahui mortalitasnya.
6. Ditentukan variasi kadar uji selanjutnya berdasarkan atas *interval progressive bisection* pada suatu skala logaritmik (Guthrie & Jerome,1980), dimana dipilih 5 konsentrasi dan ditambah 1 kontrol. (Lampiran 1.)

7. Melakukan pengamatan seperti pada langkah 1 – 5, yang berbeda hanyalah besaran konsentrasi (0; 13,5; 18; 24; 32 ppm dan 0 ppm sebagai kontrol) yang digunakan.
8. Tolak ukur yang diamati adalah jumlah *Litopenaeus vannamei* yang mati setiap 24 jam sekali dan dihitung kumulatifnya pada 96 jam. Prosentase mortalitas hewan uji dihitung dengan persamaan :

$$\text{Mortality Rate (MR)} = \frac{\text{Jumlah ikan yang mati}}{\text{jumlah populasi ikan awal}} \times 100\%$$

3.3.2 Penelitian Utama

Prosedur pada penelitian utama meliputi tahap persiapan dan pelaksanaan penelitian sebagai berikut :

3.3.2.1 Persiapan Penelitian

a. Adaptasi udang vaname

1. Udang vaname diaklimatisasi dan diadaptasikan terlebih dahulu dengan cara udang yang baru datang dimasukkan ke dalam bak selama 1 hari, untuk menghindari terjadinya stres.
2. Udang vaname dimasukkan ke dalam bak penampungan bervolume 45 liter yang diisi air sebanyak 2/3 bagian, serta diberi aerasi sebagai tambahan oksigen.
3. Selama pengadaptasian dilakukan pengamatan secara morfologi untuk memastikan udang vaname dalam kondisi sehat.

b. Persiapan bakteri *Vibrio harveyi*

1. Biakan murni *Vibrio harveyi* diinokulasikan ke dalam media *nutrient broth*
2. Diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C
3. Diambil sebanyak 1 ml untuk diencerkan sampai beberapa kali pengenceran sesuai konsentrasi yang diinginkan untuk perlakuan

4. Jumlah *Vibrio harveyi* yang diinfeksi pada udang vaname dengan rumus menurut Boyd (1982) :

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

Keterangan :

V_1 = volume stok *Vibrio harveyi* yang akan ditebar (ml)

N_1 = konsentrasi *Vibrio harveyi* yang tersedia (sel/ml)

V_2 = volume media uji (ml)

N_2 = konsentrasi *Vibrio harveyi* yang dibutuhkan (sel/ml)

3.3.2.2 Pelaksanaan Penelitian

1. Memasukkan air laut sesuai salinitas yang ditentukan kedalam bak-bak percobaan
2. Udang vaname yang telah diaklimatisasi dimasukkan ke dalam 20 bak percobaan (10 tiap perlakuan)
3. Diberikan perlakuan sesuai prosedur penelitian (dengan dan tanpa pemberian minyak cengkeh), dimana dilakukan 10 kali pengulangan.
4. Setelah 30 menit, udang vaname diinfeksi *Vibrio harveyi* dengan konsentrasi 10^7 sel/ml
5. Mengamati kelulushidupan udang vaname setiap hari sekali
6. Mengamati suhu, salinitas, pH, DO, amonia, dan CO_2

3.4 Parameter Uji

Parameter utama yang digunakan dalam penelitian adalah tingkat kelulushidupan (survival rate) udang vaname *Litopenaeus vannamei* didasarkan pada jumlah udang vaname yang hidup pada hari pertama sampai hari terakhir penelitian setelah diinfeksi *Vibrio harveyi*.

Tingkat kelulushidupan udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) dihitung dengan persamaan :

$$SR = \frac{N_t}{N_0} \times 100\%$$

Keterangan :

SR = survival rate/tingkat kelulushidupan (%)

N_t = jumlah udang yang hidup pada waktu ke-t (ekor)

N_0 = jumlah udang yang hidup di awal (ekor)

3.5 Prosedur Pengukuran kualitas Air

3.5.1 Suhu

Prosedur pengukuran suhu menurut Kordidan Tancung (2007), adalah :

1. Mencilupkan thermometer ke dalam media kultur.
2. Membiarkan 1-2 menit agar keadaannya konstan.
3. Mengangkat dan membaca besarnya suhu pada skala thermometer tersebut.

3.5.2 Salinitas

Prosedur pengukuran salinitas menurut Kordi dan Tancung (2007), adalah :

1. Membuka penutup refraktometer dan menetesinya dengan aquades serta menstandarkannya agar garis biru berhimpit dengan angka nol.
2. Membersihkan kaca obyek refraktometer dan menetes air sampel secukupnya.
3. Melihat nilai salinitasnya yang tertera pada skala refraktometer.
4. Mencatat hasilnya.

3.5.3 pH

Prosedur pengukuran pH menurut Bloom (1998), adalah :

1. Mengkalibrasi pH meter terlebih dahulu dengan aquades.
2. Mencilupkan pH meter kedalam air media beberapa saat.
3. Membaca angka yang tertera pada alat tersebut

3.5.4 Dissolved Oxygen (DO)

Prosedur pengukuran DO menurut Bloom (1998), adalah :

1. Mengkalibrasi DO meter dengan aquades.
2. Mencelupkan ujung pendeteksi ke dalam air selama beberapa saat.
3. Membaca angka pada layar DO meter yang menunjukkan jumlah oksigen yang terlarut atau DO.

3.5.5 Karbondioksida (CO₂)

Prosedur pengukuran CO₂ menurut Bloom (1998), adalah:

1. Memasukan air sampel 25 ml ke dalam erlenmeyer
2. Menambahkan 2 – 3 tetes indikator PP
3. Bila air berwarna pink berarti dalam perairan tidak mengandung CO₂ bebas
4. Bila air tidak berwarna, dititrasi dengan Na₂CO₃ 0,0454 N sampai menjadi pink pertama kali
5. Mencatat ml titran yang terpakai
6. Perhitungan CO₂ :

$$(\text{mg/l}) = \frac{V_{\text{titran}} \times N_{\text{titran}} \times 22 \times 1000}{V_{\text{sampel}}}$$

3.5.6 Amoniak

Prosedur pengukuran amoniak menurut Bloom (1998), adalah :

1. Diambil 25 ml air sampel, kemudian disaring
2. Ditambahkan 2 ml pereaksi nessler, kemudian diaduk
3. Dibiarkan selama ±10 menit kemudian dimasukkan ke dalam cuvet
4. Diukur pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 425 μm

3.6 Analisis data

Analisis data yang digunakan dalam parameter kelulushidupan udang vaname dengan menggunakan uji beda (uji-t) berpasangan, uji-t ini digunakan

untuk menguji hipotesis guna menunjukkan hasil-hasil observasi yang berpasangan, dan uji-t adalah uji statistik yang membuktikan perbedaan mean yang signifikan dalam satu variabel diantara dua kelompok, uji-t memasukkan rata-rata dan standart deviasi dari dua kelompok pada variabel dan menguji apakah perbedaan numerical dalam rata-rata berbeda signifikan, dinyatakan signifikan jika probabilitas kurang dari 0,05 (Djarwanto dan Subagyo, 2000).

Maksud dari berpasangan adalah bahwa data tersebut diperoleh sepasang demi sepasang tidak boleh saling dipertukarkan. Karena datanya adalah berpasangan, maka proses perhitungan didasarkan kepada selisih nilai setiap pasangan data (*difference* atau disingkat dengan D), dengan perhitungan sebagai berikut (Suharjo, 2008) :

$$t = \frac{\bar{D}}{S_D / \sqrt{n}}$$

Dengan

$\bar{D} = \frac{\sum D_i}{n}$ adalah rata-rata selisih setiap pasangan

$$D = x_i - y_i$$

$$S_D = \sqrt{\frac{\sum (D_i - \bar{D})^2}{n - 1}}$$

Menentukan perbedaan masing-masing perlakuan dan analisis ini dilakukan menggunakan software SPSS 13 for windows.

3.7 Analisis Probit

Analisis data dalam penelitian ini menggunakan analisis probit. Analisis probit umumnya digunakan dalam menentukan toksisitas relatif bahan kimia terhadap organisme hidup. Hal ini digunakan untuk menguji respon organisme uji pada berbagai konsentrasi bahan kimia serta membandingkannya. Untuk

menentukan analisis probit ini dapat dihitung melalui data statistik seperti SPSS, dan Microsoft Excel.

Menurut Wardlaw (1995), langkah – langkah melakukan analisis Probit untuk memperoleh nilai LC_{50} adalah sebagai berikut :

1. Membuat tabel probit
2. Memasukkan nilai konsentrasi perlakuan (mg/L)
3. Memasukkan nilai log₁₀ konsentrasi perlakuan
4. Memasukkan jumlah sampel atau organisme uji yang digunakan
5. Memasukkan jumlah kematian hewan uji pada setiap konsentrasi perlakuan
6. Mempersentase jumlah kematian (M_{obs})
7. Menghitung nilai koreksi kematian (apabila mortalitas pada kontrol lebih dari 0% dan kurang dari 20%) dengan menggunakan rumus Abbot's :

$$Koreksi\ kematian = \frac{M_{obs} - M_{kontrol}}{100 - M_{kontrol}}$$

8. Mentransformasi nilai koreksi kematian ke dalam tabel transformasi probit (Lampiran. 3), namun hanya tiga konsentrasi terbawah yang digunakan dalam penentuan nilai LC_{50}
9. Membuat grafik regresi untuk mendapatkan nilai LC_{50} , sumbu Y merupakan nilai transformasi probit, sedangkan sumbu X nilai log 10 konsentrasi perlakuan. Selanjutnya dari grafik tersebut ditentukan rumus regresi yaitu ; $y = ax+b$. Nilai antilog x merupakan nilai LC_{50} .