

3. METODOLOGI

3.1 Materi Penelitian

Materi yang diteliti meliputi laju pertumbuhan dan deferensial leukosit ikan bandeng pada tambak polikultur dua komoditas (udang windu dan ikan bandeng) dan polikultur tiga komoditas (udang windu, ikan bandeng dan rumput laut), pengamatan plankton, serta dilakukan pula pengukuran parameter kualitas air yang meliputi parameter fisika yaitu suhu dan TSS, parameter kimia yaitu oksigen terlarut, pH, salinitas, amonia, nitrat, ortophosphat, dan kecerahan .

3.2 Alat dan bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian dapat dilihat pada Lampiran 2.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode survey. Pada metode ini sasarannya adalah mengumpulkan sejumlah data, data yang diperoleh kemudian diklasifikasi, dianalisis, ditafsirkan, kemudian dinilai guna mencapai suatu gambaran yang umum (Winardi, 1987).

Data adalah suatu hasil dari pengumpulan fakta yang meliputi hasil dari pengukuran berat ikan bandeng, jumlah leukosit dan deferensial leukosit, serta parameter kualitas air, wawancara, observasi di lapang dan juga dari sumber pustaka seperti buku maupun jurnal. Jika diolah dengan baik melalui berbagai analisis dapat melahirkan berbagai informasi. Dalam penelitian ini data yang diambil meliputi data primer dan data sekunder.

3.4 Pengambilan Sampel

Teknik pengambilan sampel pada penelitian ini adalah teknik pengambilan acak sederhana yaitu setiap individu spesies ikan bandeng memiliki kesempatan yang sama untuk menjadi sampel penelitian. Pada penelitian ini terdapat dua stasiun pengambilan sampel, yaitu tambak polikultur 2 komoditas (ikan bandeng dan udang windu) dan tambak polikultur 3 komoditas (ikan bandeng, udang windu dan rumput laut).

3.4.1 Pengambilan Sampel Ikan Bandeng

Menurut Carlander (1956) dalam Effendie (1979) bila untuk keperluan penelitian umur dan pertumbuhan untuk kesalahan 5 % jumlah ikan tiap kali pengambilan ialah 30 ekor. Pada penelitian ini pengambilan sampel untuk pertumbuhan ikan bandeng dilakukan 2 kali ulangan, selama 1 bulan

Pengambilan sampel ikan dilakukan dengan menggunakan jaring. Jaring dibentangkan pada tambak, kemudian ikan akan terperangkap pada jaring, setelah itu jaring ditarik keluar dari tambak. Selanjutnya, ikan bandeng dimasukkan dalam *coolbox* yang sudah diberi es agar sampel awet kemudian dibawa ke laboratorium dan dimasukkan ke dalam *freezer* agar tidak membusuk sampel ikan bandeng selanjutnya dianalisis untuk memperoleh laju pertumbuhannya.

3.4.2 Pengambilan Sampel Darah

Pengambilan sampel darah ikan bandeng dilakukan 1 kali dengan 3 kali pengulangan saat pengamatan. Deferensial leukosit yang diamati adalah jumlah neutrofil, limfosit dan monosit. Sedangkan untuk eosinofil dan basofil tidak dihitung karena jumlahnya sangat sedikit dalam sirkulasi darah. Menurut Scombes (1996) dalam Irianto (2005), jumlah eosinofil dan basofil pada ikan teleostei sangat rendah.

Pengambilan sampel darah dilakukan langsung pada lokasi penelitian. Ikan bandeng yang telah tertangkap dengan jaring sejumlah 3 ekor pada masing-masing tambak, kemudian diambil sampel darahnya. Teknik pengambilan sampel darah menurut Bijayanti (2005) adalah sebagai berikut :

- 1) Ikan dibius dengan menggunakan larutan anastesi
- 2) Disiapkan spuit insulin lengkap dengan jarumnya, hisap larutan antikoagulan sampai memenuhi seluruh dinding syringe
- 3) Kemudian keluarkan larutan antikoagulan dari spuit, sisakan antikoagulan tersebut sebanyak $\pm 50 \mu\text{l}$ dalam spuit
- 4) Dimasukkan jarum/spuit dan jarumnya yang telah berisi larutan antikoagulan pada garis tengah tubuh di belakang sirip anal
- 5) Dimasukkan jarum ke dalam musculus sampai mencapai tulang
- 6) Pastikan tidak ada gelembung air yang masuk ke dalam spuit, kemudian ditarik perlahan-lahan sampai darah masuk ke dalam spuit.

3.4.3 Pengambilan Sampel Air

Pengambilan sampel untuk kualitas air dilakukan 2 kali ulangan, selama 1 bulan. Pengamatan kualitas air dan pengambilan sampel air dilakukan dengan teknik komposit yaitu air sampel diambil dari 5 titik pengambilan sampel, 4 titik pada pojok tambak dan 1 titik pada tengah tambak. Parameter suhu, pH, oksigen terlarut, salinitas, dan kecerahan diukur langsung di lapang dengan cara seperti berikut :

a. Suhu (Hariyadi *et al.*, 1992)

- 1) Mencilupkan thermometer air raksa (skala 0-50) ke dalam perairan
- 2) Membiarkan selama 3 menit
- 3) Mengangkat sedikit thermometer dari air agar skala terlihat dengan jelas
- 4) Membaca skala pada thermometer ketika masih di dalam air

- 5) Mencatat hasil pengukuran dalam skala °C.

b. Derajat Keasaman (pH) (Suprpto, 2011)

- 1) Memasukan pH meter ke dalam air sampel selama 2 menit
- 2) Menekan tombol "HOLD" pada pH meter untk menghentikan angka yang muncul pada pH meter
- 3) Membaca hasil nilai pH ketika nilainya sudah stabil atau tidak berubah lagi.

c. Oksigen Terlarut (Suprpto, 2011)

- 1) Kalibrasi terlebih dahulu probe dengan masukkan ke dalam aquadest.
- 2) Nyalakan tombol power dan biarkan kurang lebih 3-5 menit hingga dalam keadaan stabil
- 3) Atur tombol untuk pengaturan pengukuran oksigen terlarut yaitu mg/l. tunggu sampai terbaca % oksigen
- 4) Ukur oksigen terlarut dalam perairan dengan memasukkan probe DO meter ke dalam perairan
- 5) Tunggu hingga angka stabil dimana angka atas menunjukkan nilai DO (oksigen terlarut) dan mencatat hasilnya, prosedur kerja dari DO meter dilakukan secara insitu (di lapang).

d. Salinitas (Hariyadi *et al.*, 1992)

Pengukuran kadar garam atau salinitas menggunakan alat refraktometer tipe Atago Hand Refraktometer S/mill E. Adapun langkah-langkahnya sebagai berikut :

- 1) Sebelum digunakan, terlebih dahulu kaca refraktometer dikalibrasi dengan aquades dan dikeringkan dengan tissue hingga refraktometer menunjukkan angka nol (0).



- 2) Setelah itu, air sampel uji diteteskan pada kaca refraktometer kemudian diarahkan pada sumber cahaya
- 3) Diamati angka yang ditunjukkan oleh batas biru sebelah kanan refraktometer dan dicatat hasilnya.

e. Kecerahan (Silalahi, 2010)

Untuk pengukuran kecerahan menggunakan keping secchi. Adapun langkah-langkahnya sebagai berikut :

- 1) Keping secchi dimasukkan ke dalam air secara perlahan – lahan sambil memperhatikan warna putih dari piringan itu tidak terlihat lagi kemudian diukur panjang talinya
- 2) Selanjutnya piringan itu diturunkan lagi ke dalam air, dan secara perlahan-lahan ditarik ke atas sampai warna putih dari piringan itu terlihat kembali, lalu diukur kedalamannya
- 3) Dari kedua kedalaman itu dihitung rata-ratanya, itulah angka tingkat kecerahan

Air sampel untuk uji TSS, amonia, nitrat, dan ortophospat dimasukkan kedalam botol mineral 600 ml sampai penuh yang terlebih dahulu dibersihkan dan ditandai sesuai lokasi pengambilan sampel dan langsung dimasukkan ke dalam *coolbox* yang sudah diberi es agar sampelnya awet dan kemudian dibawa ke laboratorium, setelah itu dimasukkan kedalam kulkas dan selanjutnya dianalisis agar diperoleh hasil nilai TSS, amonia, nitrat, dan ortophospat pada air.

Sampel air untuk melihat kelimpahan fitoplankton diambil dengan menggunakan planktonet. Menurut Herawati & Kusriani (2005), prosedur pengambilan sampel plankton pada lokasi penelitian adalah sebagai berikut:

- 1) Memasang botol film pada plankton net no.25 (mesh size 64).

- 2) Mengambil sampel air sebanyak 25 liter dan mencatat jumlah air yang disaring tersebut sebagai (W).
- 3) Menyaring sampel air dengan plankton net sehingga konsentrasi plankton akan tertampung dalam botol film, dicatat sebagai (V).
- 4) Memberi lugol sebanyak 3-4 tetes untuk pengawetan serta mempertahankan warna dan bentuk pada sampel plankton dalam botol film untuk preservasi sampel sebelum pengamatan genus dan kelimpahan plankton.
- 5) Memberi label pada botol film yang berisi sampel plankton.

3.5 Prosedur Analisis Sampel

3.5.1 Pengukuran Berat Ikan (Mariskha dan Abdulgani, 2012)

Prosedur pengukuran berat ikan adalah sebagai berikut:

- 1) Disiapkan alat berupa timbangan digital analitik.
- 2) Diletakkan ikan di atas timbangan dan diamati skala yang tertera pada timbangan.
- 3) Dicatat berat ikan dan didapatkan hasilnya.

3.5.2 Sampel Darah

3.5.2.1 Jumlah Leukosit

a. Preparasi Sampel Darah (Bijanti, 2005)

- 1) Darah ikan yang telah dicampur dengan antikoagulan diambil dengan pipet leukosit sebanyak 0,5 μ l kemudian diencerkan dengan larutan turk dalam pipet leukosit sampai menunjukkan angka 11 μ l.
- 2) Darah yang telah tercampur dikocok hingga homogen dalam pipet tersebut, lalu dibuang 2 tetes dimaksudkan agar larutan yang diambil benar-benar larutan yang telah homogen.

- 3) Dimasukan ke dalam kamar hitung *Improved Neubauer* dan ditutup dengan cover glass. Lalu hitung jumlah leukosit dengan menggunakan mikroskop cahaya.

b. Menghitung Jumlah Sel Leukosit (Bijanti, 2005)

- 1) Pakailah lensa objektif kecil dengan perbesaran 10 x. turunkan lensa kondensor atau kecilkan diafragma. Mikroskop harus diletakkan dimeja datar.
- 2) Kamar hitung dengan bidang bergarisnya diletakkan dibawah obyektif dan fokus mikroskop diarahkan pada garis-garis tersebut.
- 3) Dihitung semua leukosit yang terletak pada keempat "bidang besar" (kotak warna hijau)
- 4) Perhitungan dimulai dari sudut kiri atas, terus ke kanan, kemudian turun ke bawah dari kanan ke kiri (pada empat kotak berwarna hijau). Cara seperti ini dilakukan pada keempat bidang "bidang besar"
- 5) Kadang-kadang ada sel-sel yang letaknya menyinggung garis bidang. Sel yang menyinggung garis batas sebelah kiri atau garis atas haruslah dihitung, sebaliknya sel-sel yang menyinggung garis batas sebelah kanan atau garis bawah tidak boleh dihitung.

3.5.2.2 Deferensial Lueukosit

a. Pembuatan Film Darah Tipis (Suntoro, 1983)

- 1) Darah diambil dengan pipet tetes. Kemudian tetesan darah diletakkan pada sisi kanan objek gelas A, kira-kira 2,5 cm tepi kanan objek gelas.
- 2) Tariklah objek gelas B sedikit kearah belakang, hingga menyentuh tetesan darah pada objek gelas A dan timbul kapilaritas.
- 3) Setelah terjadi kapilaritas, kemudian doronglah objek gelas B kearah yang betul, yakni kea rah menjauhi sisi kanan objek gelas A, sehingga terjadi film yang baik.

b. Pemeriksaan Jenis Sel (Bijanti, 2005)

- 1) Buat hapusan darah yang tipis
- 2) Hapusan darah dikeringkan, kemudian difiksasi hapusan darah dengan menggunakan methanol 95% selama 1-2 menit
- 3) Dilakukan pengecatan hapusan darah yang telah difiksasi dengan pengecatan *Giemsa* atau *May Grunwald*
- 4) Ditunggu selama ± 5 menit. Kemudian bilas slide dengan menggunakan air mengalir dan keringkan
- 5) Diperiksa hapusan darah dibawah mikroskop. Dengan pengecatan giemsa akan tampak gambaran jenis leukosit.

3.5.3 Prosedur Pengukuran Kualitas Air**a. Total Suspended Solid (TSS) (SNI, 1990)**

- 1) Kertas saring tersebut diletakkan dalam oven pada temperatur 103-105°C selama 1 jam.
- 2) Dinginkan dalam desikator lebih kurang selama 10 menit
- 3) Ditimbang kertas saring dengan neraca analitik
- 4) Ulangi langkah (1) sampai (3) hingga diperoleh berat tetap (konstan) misalnya B
- 5) Siapkan kertas saring yang telah diketahui beratnya
- 6) Kocok contoh air/limbah cair hingga homogen
- 7) Ambillah 100 ml contoh air/limbah cair, kemudian saring dengan kertas saring yang telah diketahui beratnya
- 8) Setelah endapan tersaring semuanya, keringkan kertas saring tersebut di dalam oven pada suhu 103-105°C selama 1 jam
- 9) Setelah 1 jam, ambil kertas saring tersebut dengan menggunakan alat penjepit, lalu masukkan ke dalam desikator

- 10) Apabila kertas saring tersebut sudah dingin, timbangan dengan neraca analitik
- 11) Ulangi percobaan (4) sampai (6) hingga diperoleh berat konstan, misalnya A mg
- 12) Hitung nilai TSS dengan rumus :

$$\text{zat padat tersuspensi (mg/L)} = \frac{(A-B) \times 1000}{\text{mL contoh}} \times 1000$$

Keterangan: A= Berat kertas saring berisi zat padat tersuspensi

B= Berat kertas saring kosong

b. Amonia (Sihaloho, 2009)

- 1) Mengambil 50 ml air sample.
- 2) Memasukkan kedalam erlenmeyer berukuran 250 ml.
- 3) Menambahkan 1 ml larutan nessler ke dalam erlenmeyer yang telah berisi sampel.
- 4) Mendinginkan kurang lebih 10 menit
- 5) Memasukkan ke dalam cuvet
- 6) Menghitung kadar amonia menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 425 μm .

c. Nitrat (SNI, 1990)

- 1) Menyaring 100 ml air sampel dan menuangkan kedalam cawan porselen.
- 2) Mengukapkan di atas pemanas sampai kering.
- 3) Menambahkan 2 ml asam fenol disulfonik, diaduk dengan pengaduk gelas dan diencerkan dengan 10 ml aquades.
- 4) Menambahkan NH_4OH 1:1 (merupakan perbandingan antara konsentrasi NH_3 dan aquades masing-masing 1 ml) sampai terbentuk warna kuning.

Diencerkan dengan aquades sampai 100 ml, kemudian dimasukkan kedalam cuvet.

- 5) Menghitung nilai nitrat dengan spektrofotometer.
- 6) Menggunakan konsentrasi 410 μm .

d. Orthofosfat (SNI, 1990)

- 1) Mengukur dan menuangkan 50 ml sampel ke dalam erlenmeyer
- 2) Menambahkan 2 ml ammonium molybdat dan dikocok
- 3) Menambahkan 5 tetes SnCl_2 dan dikocok
- 4) Menghitung nilai orthofosfat dengan spektrofotometer.
- 5) Menggunakan konsentrasi 690 μm .

e. Plankton (Herwati & Kusriani, 2005)

Prosedur identifikasi plankton sebagai berikut:

- 1) Mengambil obyek glass dan cover glass.
- 2) Mencuci dengan aquadest.
- 3) Mengeringkan dengan tissue, cara mengeringkannya dengan mengusap secara searah.
- 4) Mengambil botol film yang berisi sampel fitoplankton dan mengaduk.
- 5) Mengambil sampel dari botol film dengan pipet tetes sebanyak 1 tetes.
- 6) Meneteskan pada obyek glass dan menutup dengan cover glass, dengan sudut kemiringan saat menutup 45°C.
- 7) Mengamati di bawah mikroskop dimulai dengan perbesaran terkecil sampai terlihat gambar organisme pada bidang pandang.
- 8) Menulis ciri-ciri plankton serta jumlah plankton (n) yang di dapat dari masing-masing bidang pandang.
- 9) Mengidentifikasi dengan bantuan buku Prescott (1970) dan Davis (1955)

Perhitungan kelimpahan plankton dilakukan untuk mengetahui berapa besar kelimpahan setiap genus tertentu yang ditemukan selama pengamatan. Pengamatan fitoplankton menggunakan metode "Lackey drop". Nilai kelimpahan plankton dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Eaton *et al.*, 1995).

$$N \text{ (ind/l)} = \frac{T \times V}{L \times v \times W \times P} \times n$$

Keterangan : T = Luas cover glass (20 x 20 mm²)

L = Luas lapang pandang dalam mikroskop (mm²)

V = Volume kosentrat plankton dalam botol penampung

v = Volume kosentrat plankton dibawah cover glass (ml)

W = Volume air yang tersaring dengan plankton net (Liter)

P = Jumlah lapang pandang (5)

n = Jumlah fitoplankton yang ada dalam lapang pandang

N = Jumlah plankton (individu/liter)

3.6 Analisis Data

3.6.1 Laju Pertumbuhan Spesifik (SGR)

Dalam penelitian ini untuk mengetahui pertumbuhan ikan selama penelitian yaitu dengan menentukan Spesifik Growth Rate (SGR). Laju pertumbuhan spesifik (SGR) dapat diketahui dengan rumus perhitungan sebagai berikut :

$$\text{SGR} : \frac{[\ln W_t - \ln W_o]}{t} \times 100 \%$$

Keterangan : SGR : Laju Pertumbuhan Spesifik (% berat tubuh/ hari)

Wt : Bobot rata-rata akhir (g/ekor)

Wo : Bobot rata-rata awal (g/ekor)

t : Waktu (hari)

3.6.2 Jumlah Leukosit

Dalam penelitian ini jumlah leukosit ikan dihitung dengan rumus :

Perhitungan jumlah leukosit (Bijianti, 2005) :

$$\text{SDP} = N \times \frac{1}{4 \times 0.1} \times 20$$

Keterangan : SDP = Jumlah leukosit (sel/mm³)

N = Jumlah sel leukosit terhitung

4 = Jumlah kotak haemocytometer yang diamati

0.1 = Volume kota haemocytometer yang diamati

20 = Faktor Pengenceran

3.6.3 Deferensial leukosit

Jumlah deferensial dihitung dengan menggunakan rumus menurut

Stoskopf (1993) :

$$\Sigma \text{ deferensial leukosit (\%)} = \frac{\text{komponen sel}}{\Sigma \text{ leukosit}} \times 100 \%$$

3.6.4 Perbedaan Laju Pertumbuhan dan Deferensial Leukosit Ikan Bandeng

Data yang diperoleh dari penelitian ini selanjutnya dianalisis dengan cara membandingkan laju pertumbuhan dan deferensial leukosit pada tambak polikultur dua komoditas dengan polikultur tiga komoditas. Dalam penelitian analisis statistik yang dipakai untuk laju pertumbuhan dan jumlah leukosit digunakan uji-t pada selang kepercayaan 95 % dan 99%. Uji-t merupakan teknik statistik yang digunakan untuk menguji signifikansi dengan cara membandingkan t_0 (t hasil observasi atau 1 hasil perhitungan) dengan t tabel (harga titik tabel yang tercantum dalam tabel nilai t).

