

Materi dan Metode

3.1 Materi Penelitian.

Materi pada penelitian ini adalah udang fase dewasa dengan berat rata-rata 10 gram yang akan diinfeksi dengan virus WSSV, dimana sebelumnya diberi ekstrak *Gracilaria*.

3.2 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini lebih jelasnya dapat dilihat pada **Lampiran 1**.

3.3 Metode Pengambilan Data.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Salah satu tugas penting dalam riset ilmiah adalah menetapkan ada tidaknya hubungan sebab dan akibat diantara fenomena-fenomena dan menarik hukum-hukum tentang hubungan sebab-akibat. Metode eksperimen merupakan salah satu metode yang paling tepat untuk meneliti hubungan sebab-akibat. Pada dasarnya kita mengenal dua jenis eksperimen dalam bidang ilmu pengetahuan, yaitu *eksperimen eksploratif* dan *eksperimen developmental*. Eksperimen developmental mempunyai kedudukan lain. Ia tidak dimaksudkan untuk mencari problem atau mengembangkan hipotesis. Eksperimen developmental justru ditujukan untuk menguji, mengecek, atau membuktikan hipotesis tentang hubungan sebab-akibat. Eksperimen eksploratif berguna sebagai salah satu sumber hipotesis yang akan dicek dalam eksperimen developmental ini. Menurut Azwar (2013), Penelitian eksperimental murni dilakukan untuk meneliti kemungkinan adanya hubungan sebab akibat diantara variabel-variabel dengan cara menghadapkan kelompok eksperimental pada beberapa macam kondisi perlakuan dan membandingkan akibat dengan satu atau lebih kelompok kontrol yang tidak dikenai perlakuan

3.4 Teknik Pengumpulan Data

Data adalah informasi atau keterangan mengenai sesuatu hal yang berkaitan dengan tujuan penelitian karena tujuan utama dari penelitian adalah mendapatkan data (Sugiyono, 2010). Teknik pengumpulan data dibagi menjadi dua yaitu data primer dan data sekunder. Data primer merupakan data yang diperoleh dan dikumpulkan sendiri oleh peneliti yang dianggap relevan dengan penelitian, seperti wawancara dan observasi terhadap responden yang dinilai memberikan jawaban yang relevan bagi peneliti (Sati, 2003)

3.4.1 Data Primer

Pada penelitian ini data primer yang diamati meliputi morfologi udang, analisis kerusakan histologi udang yang disebabkan oleh infeksi virus WSSV, pengaruh pemberian imunostimulan dari bahan alami dengan parameter pengukuran yaitu tingkat kerusakan jaringan (histopatologi) pada insang dan parameter kualitas air pada aquarium yang meliputi parameter fisika dan kimia. Pengambilan data primer menggunakan teknik pengumpulan data, yaitu:

3.4.1.1 Observasi

Observasi dilakukan dengan seksama di laboratorium dan observasi ini akan timbul persoalan-persoalan dan pertanyaan-pertanyaan, karena tidak sesuai dengan pengalaman dan harapan penelitian berdasarkan pengetahuannya. Persoalan-persoalan dan pertanyaan itu dapat dicari jawabannya dalam penelitian (Sugito, 2009). Pengamatan dan pencatatan dilakukan secara langsung pada kegiatan penelitian di dalam laboratorium.

3.4.2 Data Sekunder

Menurut Azwar (2013), Data sekunder atau data tangan ke dua yang diperoleh lewat pihak lain, tidak langsung diperoleh oleh peneliti dari subjek penelitiannya. Data sekunder biasanya berwujud data dokumentasi atau data

laporan yang telah tersedia. Selain itu data sekunder biasanya juga diperoleh dari otorita atau pihak yang berwenang, mempunyai efisiensi yang tinggi akan tetapi kadang-kadang kurang akurat. Data sekunder dalam penelitian ini didapatkan melalui studi literatur dari beberapa jurnal, laporan skripsi, thesis serta kepustakaan ilmiah yang menunjang bagi penelitian ini.

3.5 Metode Analisis Data

Rancangan percobaan yang digunakan pada penelitian ialah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan tiga ulangan. Data kuantitatif yang diperoleh dianalisis menggunakan Microsoft Excel 2007 dan SPSS 16.0. Menurut Sugito (2009) Rancangan Acak Lengkap (RAL) dikatakan klasifikasi satu arah, karena hanya ada satu macam penggolongan observasi yang akan dikumpulkan dalam percobaan ini, yaitu penggolongan berdasarkan perlakuan yang dicoba. Penelitian ini terdiri dari satu faktor penelitian dengan 3 perlakuan dan 1 kontrol dengan 3 kali ulangan. Perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

K (+) = Udang sehat

K (-) = Udang tidak diberi ekstrak *Gracilaria verrucosa*

R = Perlakuan udang diberi ekstrak *Gracilaria verrucosa* dengan perendaman dosis 250 ppm

P = Perlakuan udang diberi ekstrak *Gracilaria verrucosa* dengan dicampur ke pakan dosis 10 g/kg.

3.6 Metode Pengambilan Sampel

Metode pengambilan sampel ini ialah perlakuan terhadap udang uji untuk diberikan perlakuan hingga peneiltian ini sendiri berakhir. Kesesuaian prosedur dalam menjalankan metode ini ialah langkah dari didapatnya hasil yang sesuai dengan tujuan penelitian.

3.6.1 Pengambilan Sampel Udang

Pengambilan sampel udang didapatkan dari Paciran Lamongan Jawa Timur. Udang yang sudah didapatkan maka harus ditempatkan pada *coolbox*. Perlakuan selanjutnya ialah mengkondisikan untuk udang ketika dibawa ke dalam laboratorium tidak mengalami stres, hal ini bisa mengakibatkan terjadinya kematian pada udang itu sendiri.

3.6.2 Pemeliharaan udang vaname (*Litopenaeus vannamei*)

Udang vaname yang digunakan pada penelitian ini ialah fase dewasa yang berukuran 10 gram berasal dari Lamongan, Jawa Timur. Sebelum digunakan untuk penelitian, udang SPF (*Specific Pathogen Free*) dipelihara terlebih dahulu selama 7 hari. Udang dipelihara dalam Aquarium ukuran 60 liter, yang sebelumnya telah dicuci dan didesinfeksi menggunakan kaporit 100 ppm. Media pemeliharaan udang ialah air laut yang berasal Tirta Air dengan salinitas berkisar antara 36 ppt. Kemudian diencerkan pada salinitas 20-30 ppt dengan rumus $V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$.

Selama pemeliharaan, udang diberi pakan lima kali sehari secara *ad satiation*, yaitu pada pukul 07.00, 11.00, 15.00, 19.00, dan 23.00 WIB. Untuk menjaga kualitas air wadah pemeliharaan, setiap hari dilakukan penyiponan air sebanyak 50 % hingga 70 %. Setiap peralatan yang sudah digunakan, dicuci dan didesinfeksi terlebih dahulu menggunakan alkohol, untuk mencegah adanya penyakit.

3.6.3 Persiapan Larutan Inokulum WSSV

Inokulum virus *White Spot* menggunakan virus yang berasal dari udang vannamei sakit yang diambil tambak udang di Desa Delegan Gresik. Inokulum virus dibuat sesuai dengan metode Rahma *et al.*, (2014) yaitu mengambil insang

dari *Litopenaeus vannamei* yang terinfeksi WSSV sebanyak 1 g dan digerus sampai halus, kemudian disuspensikan dalam 9 ml air laut steril, lalu disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit pada suhu 40 °C dan kecepatan 8000 rpm selama 30 menit pada suhu 40 °C. Semua supernatan yang dihasilkan dimasukkan dalam valcon agar homogen. Sehingga siap diinfeksi pada udang uji.

3.6.4 Persiapan dan Perlakuan Udang Uji

Udang yang telah dipelihara di dalam aquarium selama 3 hari, siap digunakan untuk perlakuan. Penelitian ini terdiri dari empat perlakuan dengan tiga ulangan, perlakuan udang uji dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Perlakuan Udang Uji.

ULANGAN	PERLAKUAN			
	Kontrol (+)	Kontrol (-)	P1	P2
1	4 ekor	4 ekor	4 ekor	4 ekor
2	4 ekor	4 ekor	4 ekor	4 ekor
3	4 ekor	4 ekor	4 ekor	4 ekor

Keterangan :

K (+) = Udang sehat

K (-) = Udang tidak diberi ekstrak *Gracilaria verrucosa*

P1 = Perlakuan udang diberi ekstrak *Gracilaria verrucosa* dengan perendaman dosis 250 ppm

P2 = Perlakuan udang diberi ekstrak *Gracilaria verrucosa* dengan dicampur ke pakan dosis 10 g/kg

Sebelum udang ditebar di akuarium berukuran 60 liter, dilakukan pencucian akuarium dengan detergen. Kemudian dilakukan desinfeksi wadah dengan kaporit 100 ppm yang diisi oleh air tawar dan didiamkan selama 24 jam. Selain itu, dilakukan pula pemasangan instalasi aerasi pada setiap akuarium. Setelah 24 jam, air dibuang dan dibilas dengan air bersih agar sisa-sisa kaporit yang menempel pada dinding akuarium terbuang. Kemudian akuarium diisi air laut yang sudah didesinfeksi menggunakan kaporit 30 ppm. Setiap akuarium diisi air laut sebanyak 10 liter dan ditebar udang masing-masing 4 ekor untuk pengamatan mortalitas. Udang uji yang ditebar, ditimbang bobotnya menggunakan timbangan digital pada awal dan akhir perlakuan. Kualitas air dipertahankan sesuai dengan kehidupan udang dan dilakukan pergantian air 30% dari volume total setiap hari sebelum pemberian pakan.

3.7 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian adalah langkah-langkah yang digunakan sebagai alat untuk mengumpulkan data dan menjawab pertanyaan-pertanyaan dalam penelitian. Didalam prosedur penelitian ini penulis membahas tentang proses pembuatan ekstrak *Gracilaria verrucosa*, penginfeksian WSSV dan pembuatan jaringan histopatologi.

3.7.1 Proses Pembuatan Ekstrak *Gracilaria verrucosa* dan Pencampuran dengan Pakan

Rumput laut *Gracilaria verrucosa* diperoleh dari tambak bandeng di Sidoarjo, Jawa Timur sebanyak 5 kg. Rumput laut dicuci sampai bersih, lalu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan sampai kering selama 7 hari, setelah kering dipotong kecil-kecil dan diblender sampai halus.

Pembuatan ekstrak dilakukan secara maserasi dengan cara melarutkan serbuk simplisia sebanyak 700 gram ke dalam 2,1 liter etanol 96 % lalu ditutup

dengan aluminium foil dan dibiarkan selama 48 jam. Setelah 48 jam, sampel yang direndam tersebut disaring dengan kertas saring sehingga diperoleh filtrat dan ampas. Filtrat dievaporasi dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental *Gracilaria verrucosa*. Kemudian dilanjutkan pemekatan ekstrak dengan pemanas air (*waterbath*) dengan suhu 50°C sampai hampir kering untuk menghilangkan kadar air (Budiardi *et al.*, 2008).

3.7.2 Perlakuan Pemberian Ekstrak

Udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) diaklimatisasi selama \pm 3 hari. Air sebelum digunakan terlebih dahulu diberi 1 ml *chlorine* dalam masing-masing akuarium (volume air 10 liter), selama 1 hari sebagai desinfektan dan membersihkan akuarium dari bakteri dan kotoran-kotoran yang menempel. Kemudian diberikan 2 ml *Na-thiosulfat* untuk menghilangkan toksik dari efek perlakuan *chlorine* selama 1 hari. Langkah selanjutnya, akuarium dibersihkan menggunakan air bersih dan didiamkan selama 1 hari, akuarium siap untuk digunakan. Setelah itu, masing-masing akuarium diisi air sebanyak 10 liter (2/3 volume akuarium) dan diberi aerasi. Kemudian dilakukan pemberian ekstrak *Gracilaria verrucosa* dengan cara perendaman ekstrak 0 ppm, 250 ppm, dan pakan (1 kg pakan/10 gr ekstrak).

3.7.3 Penginfeksian WSSV

Penularan virus penyebab penyakit bintik putih ini dilakukan dengan cara perendaman sesuai metode Taqwa *et al.*, (2012), yaitu dalam larutan inokulum WSSV 20 µg/ml dan dicampurkan dengan air laut sebanyak 10 liter ditambah *oxytetracilin* (OTC) 10 ppm.

Sebanyak 4 ekor udang uji dimasukkan ke dalam wadah gelas volume 40 ml lalu ditutup dengan kain kasa agar udang tidak lompat keluar, kemudian direndam dalam media penularan.

3.7.4 Pembuatan Histopatologi Insang Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*)

Udang vaname yang telah dipelihara selama 12 hari, lalu diambil sampel hepatopankreas untuk diamati histopatologinya. Sampel hepatopankreas dimasukkan ke dalam botol film dan diberi bahan pengawet yaitu formalin 10 %, dilanjutkan dengan pembuatan dan pengamatan preparat hasil histopatologinya.

Tahapan-tahapannya sebagai berikut :

- Tahap *Fiksasi*
Sampel hepatopankreas udang yang akan diamati jaringannya diambil. Jaringan tersebut kemudian direndam dalam larutan buffer yaitu formalin 10 % selama 24 jam.
- Tahap *Dehidrasi*
Tahap dehidrasi dilakukan dengan penarikan air secara bertahap menggunakan alat *auto technicon* selama 20 jam. Tabung *auto technicon* terdiri atas alkohol 70 % selama 1 jam, alkohol 80 % selama 1 jam, alkohol 90 % selama 2 jam alkohol 96 % selama 2 jam, alkohol absolute 1 selama 2 jam dan alkohol absolute 2 selama 2 jam.
- Tahap *Clearing*
Tahap *clearing* untuk mentrasparankan serta menggantikan larutan alkohol dari jaringan. Dilakukan dengan mencelupkan ke dalam larutan xylol 1 selama 1 jam, xylol 2 selama 2 jam, dan xylol 3 selama 2 jam.
- Tahap *Impregnasi*
Tahap *impregnasi* bertujuan untuk menyamakan keadaan jaringan dengan bahan pengeblokan (*embedding*). Dilakukan dengan mencelupkan bahan ke paraffin cair dengan suhu 56—60 °C selama 2

am, kemudian dilanjutkan dengan mencelupkan kembali ke dalam paraffin cair dengan suhu 56—60 °C selama 2 jam.

- Tahap *Embedding* (pengeblokan)

Tahapan ini bertujuan untuk memudahkan penyayatan dengan menggunakan mikrotom. Setelah penyayatan bahan yang sudah diblok selesai, langkah berikutnya adalah memasukkan hasil sayatan ke dalam *waterbath* (suhu 40 °C), kemudian pilih hasil sayatan yang terbaik dan siapkan obyek glass (untuk persiapan pewarnaan HE), sebelumnya obyek glass harus diolesi dengan perekat *polyisin*. Berikutnya, keringkan pada oven dengan suhu 50—60 °C kurang lebih selama 30 menit.

- Teknik pewarnaan jaringan dengan menggunakan HE

Pewarnaan dengan menggunakan HE dilakukan dengan beberapa tahapan yaitu deparafinisasi, hidrasi, cat utama, dehidrasi dan clearing

- Tahap *Mounting*

Preparat dilem dengan menggunakan DPX *mounting*, medium kemudian ditutup dengan *cover glass* jaringan sampai terjadi gelembung. Preparat dibiarkan dalam suhu ruangan sampai lem mengering, kemudian diamati dibawah mikroskop. Dengan pewarnaan HE, inti yang bersifat asam akan berwarna ungu tua oleh *Hematoksilin* yang bersifat basa, sedangkan sitoplasma yang bersifat basa akan berwarna merah oleh *eosin* yang bersifat asam.

3.7.5 Perlakuan Pemberian Ekstrak

Udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) diaklimatisasi selama \pm 3 hari. Air sebelum digunakan terlebih dahulu diberi 1 ml *chlorine* dalam masing-masing akuarium (volume air 10 liter), selama 1 hari sebagai desinfektan dan

membersihkan akuarium dari bakteri dan kotoran-kotoran yang menempel. Kemudian diberikan 2 ml *Na-thiosulfat* untuk menghilangkan toksik dari efek perlakuan *chlorine* selama 1 hari. Langkah selanjutnya, akuarium dibersihkan menggunakan air bersih dan didiamkan selama 1 hari, akuarium siap untuk digunakan. Setelah itu, masing-masing akuarium diisi air sebanyak 10 liter (2/3 volume akuarium) dan diberi aerasi. Kemudian dilakukan pemberian ekstrak *G. verrucosa* dengan cara perendaman ekstrak 0 ppm, 250 ppm, dan pakan (1 kg pakan/10 gr ekstrak).

3.8 Kualitas Air.

Kualitas air adalah suatu ukuran kondisi air dilihat dari karakteristik fisik, kimiawi dan biologisnya. Kualitas air juga menunjukkan ukuran kondisi air relatif terhadap kebutuhan biota air dan manusia. Kualitas air seringkali menjadi ukuran standar terhadap kondisi kesehatan ekosistem air.

3.8.1 Suhu.

Pengukuran suhu dengan menggunakan alat yaitu thermometer Hg, pengukuran suhu pada penelitian ini diacu menurut Tim Praktikum Limnologi adapaun tahapan pengukuran adalah sebagai berikut :

- Memasukkan thermometer ke dalam perairan sekitar 10 cm dan ditunggu sekitar 2 menit sampai air raksa dalam skala thermometer berhenti pada skala tertentu.
- Mencatat dalam skala °C.
- Membaca skala pada termometer masih brada dalam air.



3.8.2 Salinitas.

Pengukuran salinitas dengan menggunakan alat yaitu refraktometer.

Pengukuran salinitas pada penelitian ini diacu menurut Tim Praktikum Limnologi adapun tahapan pengukuran adalah sebagai berikut :

- Menetesi refraktometer dengan aquadest
- Bersihkan dengan kertas tisyu sisa aquadest yang tertinggal
- Teteskan air sampel yang ingin diketahui salinitasnya Lihat ditempat yang bercahaya
- Akan tampak sebuah bidang berwarna biru dan putih
- Garis batas antara kedua bidang itulah yang menunjukkan salinitasnya
- Bilas kaca prisma dengan aquades, usap dengan tisyu dan simpan refraktometer di tempat kering.

3.8.3 pH.

Pengukuran pH dengan menggunakan alat yaitu pH paper atau pH pen.

Pengukuran pH pada penelitian ini diacu menurut Tim Praktikum Limnologi adapun tahapan pengukuran adalah sebagai berikut :

- Memasukkan pH paper kedalam air sekitar 2 menit.
- Mengkibas-kibaskan pH paper sampai setengah kering.
- Mencocokkan perubahan warna pH paper dengan kontak standar.

3.8.4 DO

Penentuan oksigen secara titrimetri dilakukan menurut metoda standar Winkler dengan menggunakan titrasi iodometri.

- Menggunakan botol winkler atau juga metoda Iodometri.
- Metoda ini oksigen tidak dititrasi secara langsung akan tetapi diikat terlebih dahulu dengan pereguksi $Mn(OH)_2$ sehingga terbentuk endapan coklat $Mn(OH)_2$.
- Endapan ini dalam kondisi asam akan larut dan membebaskan I_2 dari KI
- I_2 bebas dari dalam air akan berwarna kuning sampai kecoklatan tergantung pada jumlah molekul yang ada .
- Jumlah I_2 bebas inilah yang akan ditentukan jumlahnya dengan jalan titrasi dengan thiosulfat ($S_2O_3^{2-}$).
- Karena jumlah molekul thiosulfat diketahui sebelumnya ($0,025N$) dan jumlah atau volume yang digunakan untuk mengikat I_2 dapat dilihat pada akhir titrasi,
- maka kadar O_2 terlarut dalam air dapat dihitung