3. METODOLOGI

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan untuk penelitian tentang aktivitas enzim amilase pada ikan Sidat (*Anguilla* sp.) stadia *glass eel* pada pemeliharaan dengan perbedaan salinitas adalah sebagai berikut:

- Toples kapasitas 10 liter sebanyak 15 buah
- Seser
- DO meter
- pH meter
- Timbangan analitik (ketelitian 10^{-2} gram)
- Neraca analitik “Mettler” (ketelitian 0 – 55 gram)
- Serbet
- Batu aerasi
- Selang air
- Plastik hitam
- Penjepit jemuran
- Labu ukur
- Gelas kimia
- Beaker glass
- Inkubator
- Erlenmeyer
- Tabung reaksi
- Rak tabung reaksi
- Labu ukur

- Pipet ukur
- Aerasi
- Heater
- Blower
- Spektronik (panjang gelombang ƛ 540)
- *Test tube mixer*
- Sentrifuse (kecepatan 5.000 RPM)
- Penggaris
- Nampan
- Lampu
- Lemari pendingin
- Timba
- Akuarium
- Refraktometer
- Inkubator
- Mortar dan alu
- *Freezer*
- Botol film
- Water bath

Beberapa gambar peralatan yang digunakan dalam penelitian dapat dilihat pada Lampiran 1.

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan untuk penelitian tentang aktivitas enzim amilase pada ikan Sidat (*Anguilla* sp.) stadia *glass eel* pada pemeliharaan dengan perbedaan salinitas adalah sebagai berikut:

- Ikan Sidat stadia *glass eel* ukuran 3 – 5 cm sebanyak 600 ekor
- Cacing sutra
- Kertas label
- Selotip
- Air
- Aquades
- Tissue
- Plastik
- Larutan amilum (pati jagung)
- Air laut
- Buffer phosphate pH 7
- Larutan nelson A (1,6 ml)
- Larutan nelson B (0,4 ml)
- Larutan somogi

Beberapa gambar peralatan yang digunakan dalam penelitian dapat dilihat pada Lampiran 1.

3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen. Metode eksperimen adalah prosedur penelitian yang dilakukan untuk mengungkapkan hubungan sebab akibat dua variabel atau lebih, dengan mengendalikan pengaruh variabel yang lain. Metode ini dilaksanakan dengan memberikan variabel bebas secara sengaja (bersifat *induse*) kepada objek penelitian untuk diketahui akibatnya didalam variabel terkait (Zulnaidi, 2007).

Teknik pengambilan data dilakukan dengan cara observasi partisipatif. Menurut Nurul (2012), observasi partisipan biasanya digunakan dalam penelitian eksploratif. Observasi ini biasanya digunakan untuk mengamati satuan sosial

yang besar seperti suku bangsa dan masyarakat. Semisal untuk mengamati adat kebiasaan suku Batak, bisa menggunakan observasi jenis ini. Observasi dikatakan observasi partisipan apabila pengamat turut mengambil bagian dalam suatu kegiatan yang diadakan oleh subjek peneliti. Jenis penelitian ini mula-mula dikembangkan untuk penelitian antropologi sosial, namun kemudian menyebar menjadi jenis observasi yang digunakan untuk mengamati situasi sosial, fenomena sosial, dan kejadian-kejadian sosial lainnya.

3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dimana diberikan perlakuan yang berbeda secara acak dalam satu kelompok. Rancangan acak lengkap atau *completely randomized design* merupakan salah satu model rancangan dalam rancangan percobaan. Rancangan acak lengkap ini digunakan bila unit percobaan homogen. Rancangan ini disebut rancangan acak lengkap, karena pengacakan perlakuan dilakukan pada seluruh unit percobaan. Rancangan ini dapat digunakan untuk melakukan percobaan di luar dan di dalam laboratorium (Randi, 2012).

Perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini adalah pemeliharaan pada media salinitas yang berbeda. Dalam penelitian ini, masing-masing perlakuan diberi ulangan sebanyak 3 kali yang ditempatkan secara acak seperti pada denah penelitian (Gambar 3).

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Persiapan Wadah

Sebelum melakukan kegiatan penelitian pertama kali dilakukan persiapan peralatan dan bahan yang akan digunakan. Disiapkan toples dengan kapasitas

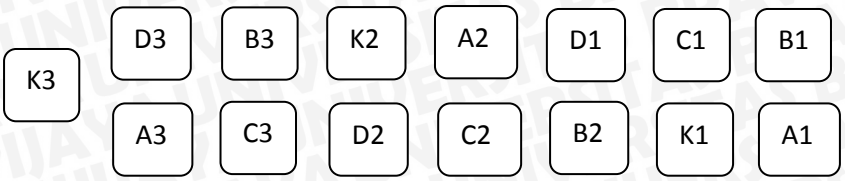
10 liter sebanyak 15 buah. Sebelumnya toples dibersihkan dengan cara dicuci menggunakan sabun dan dikeringkan di bawah sinar matahari, setelah kering lalu di semprotkan alkohol untuk sterilisasi. Toples diletakkan pada tempat yang telah ditentukan sesuai dengan denah penelitian (Gambar 3) dan dilakukan pemasangan aerasi (blower) dan heater pada akuarium. Selanjutnya akuarium diisi air sebanyak 8 liter/toples dan diberi aerasi selama 24 jam.

3.4.2 Penebaran Ikan Sidat (*Anguilla* sp.)

Sebelum melakukan penebaran, dilakukan aklimatisasi selama 1 minggu di dalam akuarium penampungan. Aklimatisasi bertujuan untuk penyesuaian ikan Sidat (*Anguilla* sp.) stadia *glass eel* terhadap lingkungan baru. Selanjutnya ikan ditebar 5 ekor/liter pada masing-masing toples, dengan jumlah total ikan 40 ekor.

3.4.3 Pelaksanaan Penelitian

Pelaksanaan penelitian dimulai dengan penimbangan berat awal (Wo) pada ikan Sidat (*Anguilla* sp.) stadia *glass eel*. Kemudian dilakukan pengukuran kebutuhan pakan dalam sehari, dengan jumlah pakan yang diberikan sebesar 5% dari berat total biomassa. Pemberian pakan dilakukan secara *ad station* dimana pemberian pakan sesuai dengan daya tampung lambung ikan, pakan diberikan secara berkala dengan jumlah yang sesuai. Pakan yang diberikan dalam masa pemeliharaan adalah cacing sutra dan diberikan dengan frekuensi 2 kali sehari yaitu pada pagi dan sore hari. Dilakukan penimbangan berat akhir ikan Sidat (*Anguilla* sp.) sebagai (Wt) pada akhir masa pemeliharaan. Dilakukan pengukuran kualitas air meliputi pengukuran salinitas tiap pagi pukul 08.00 WIB; pengukuran pH dan DO setiap pagi pukul 08.00 WIB dan sore pukul 16.00 WIB; pengukuran amonia, nirtit dan nitrat tiap 15 hari sekali. Kemudian pada diakhir pemeliharaan (hari ke 30) dilakukan analisis enzim amilase di Laboratorium Biokimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya.



Gambar 3. Denah penelitian

Keterangan :
Perlakuan A : perlakuan dengan salinitas 4 ppt
Perlakuan B : perlakuan dengan salinitas 8 ppt
Perlakuan C : perlakuan dengan salinitas 12 ppt
Perlakuan D : perlakuan dengan salinitas 16 ppt
Perlakuan K : kontrol
1,2,3 : ulangan

3.5 Parameter Uji

3.5.1 Parameter Utama

a. Aktivitas Enzim Amilase

Parameter utama yang diamati pada penelitian ini adalah aktivitas enzim amilase. Nilai aktivitas enzim diukur dari kadar glukosa yang diperoleh, menurut (Rahmawati dan Yunianti, 2015) rumusnya sebagai berikut:

$$\text{Glukosa} = \frac{\text{absorbansi}}{0{,}0106}$$

$$\text{AE} = \frac{(\text{C} \times \text{H} \times \text{FP})}{(\text{BM glukosa} \times \text{t} \times \text{E})}$$

Keterangan:

AE : aktivitas enzim (µ mol glukosa / menit)
C : konsentrasi produk hidrolisis glukosa
H : V total produk hidrolisis (substrat + enzim) (10 ml)
FP : faktor pengencer (5 ml)
t : waktu inkubasi (10 menit)
E : volume enzim (0,1 ml)
BM : berat molekul glukosa (180 µ gram / µ mol)

Uji aktivitas enzim amilase diawali dengan mengambil beberapa dari sampel yang sudah diamati selama 30 hari, kemudian sampel tersebut digerus dengan mortar dan alu sampai halus, kemudian didiamkan dalam *freezer* sampai

dilakukan pengujian enzim. Sampel yang sudah siap kemudian ditimbang menggunakan neraca analitik “Mettler” setelah itu dipindahkan ke dalam botol film. Setelah semua sampel dipindahkan ke botol film, kemudian ditambahkan aquades 5 ml dan diaduk sampai sampel larut sebelum estraknya dipindahkan ke tabung reaksi sebanyak 0,1 ml. Tabung reaksi disiapkan sejumlah sampel yang diamati, lalu ditambahkan 1 ml amilum, kemudian diinkubasi pada suhu 42°C selama 10 menit dan diangkat lalu didinginkan selama ± 5 menit. Setelah itu ditambahkan ekstrak enzim 0,1 ml ke tabung reaksi, lalu diikubasi pada suhu 42°C selama 10 menit, kemudian dipanaskan pada suhu 100°C selama 10 menit dan didinginkan ± 5 menit. Kemudian ditambahkan larutan nelson A (1,6 ml) dan nelson B (0,4 ml) lalu dikocok sampai homogen, setelah itu diinkubasi lagi pada suhu 100°C selama 10 menit dan didinginkan selama ± 5 menit. Selanjutnya ditambahkan larutan somogi 2 ml dan dihomogenkan dengan test tube mixer selama 5 menit, kemudian ditambahkan aquades 4,9 ml dan dikocok untuk menghomogenkan sampai gas CO_2 keluar. Setelah itu di sentrifuse selama 10 menit dengan kecepatan 5.000 RPM, kemudian diukur absorbansinya dengan spektronik menggunakan panjang gelombang 540, setelah itu dimasukkan ke rumus uji aktivitas enzim. Skema kerja uji aktivitas enzim dapat dilihat pada Lampiran 2.

3.5.2 Parameter Penunjang

a. Laju Pertumbuhan

Pertumbuhan individu dapat dihitung dari berat akhir selama penelitian dikurangi berat akhir berat awal penebaran dibagi dengan waktu pemeliharaan kemudian dari hasil sampling tersebut bisa diperoleh perhitungan untuk laju pertumbuhan. Menurut (Alatise dan Effiong, 2013) rumus laju pertumbuhan yaitu:

$$\text{Spesific growth rate (SGR)} = \frac{\overline{\text{LnWt}} - \overline{\text{LnWo}}}{T} \times 100\%$$

Keterangan :

SGR : Pertumbuhan Individu (gram/hari)

Wo : Berat rata-rata ikan di akhir pemeliharaan (ekor)

Wt : Berat rata-rata ikan di awal pemeliharaan (ekor)

t : Lama pemeliharaan (hari)

3.5.3 Kualitas Air

Kualitas air yang diukur dalam penelitian ini meliputi DO, suhu, pH dan amonia, nitrat dan nitrit dimana :

- Salinitas diukur dengan menggunakan salinometer
- DO diukur dengan menggunakan DO meter
- pH diukur dengan menggunakan pH meter
- Amoniak, nitrat dan nitrit diukur dengan uji teskit

3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian dianalisa secara statistik dengan menggunakan *analysis of variance* (ANOVA) sesuai dengan rancangan yang digunakan yaitu rancangan acak lengkap (RAL). Apabila dari data sidik ragam diketahui bahwa perlakuan menunjukkan pengaruh yang berbeda nyata (*significant*) atau berbeda sangat nyata (*highly significant*), maka untuk membandingkan nilai antar perlakuan dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) dan regresi.