

## IV METODOLOGI PENELITIAN

### 4.1 Tempat dan Waktu

Kegiatan Penelitian ini dilaksanakan pada tanggal 10 Desember – 31 Maret 2015, di Laboratorium pendidikan Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga.

### 4.2 Materi Penelitian

#### 4.2.1 Peralatan Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian adalah alat penggilingan, saringan dengan ukuran 60 mikron, kertas saring, *beaker glass*, *vacum pump*, *vacum rotary evaporator*, bak plastik besar 5 buah, akuarium sebanyak 24 buah dengan ukuran 40x30x30 cm<sup>3</sup>, selang aerasi, batu aerasi, blower aerasi, seser/serok, selang, timbangan analitik, pengayakan, alat pencetak pelet, loyang, oven, plastik, gunting, kertas, *heater*, pH meter, DO meter dan thermometer, amoniak *test kit*.

#### 4.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam kegiatan penelitian ini meliputi : Ekstrak rumput laut, jenis rumput laut yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Gracilaria verrucosa* yang berasal dari petani rumput laut di desa Jabon Kabupaten Sidoarjo. Bahan pakan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi tepung ikan impor, bungkil kedelai, tepung jagung, minyak ikan, mineral mix, vitamin mix, dan CMC (*Carboxymethyl cellulose*) atau perekat bahan pangan. Antikoagulan (30 mM *trisodium citrate*, 0.34 M *sodium chloride*, 10 mM EDTA, pH 7.5). Hewan uji yang digunakan dalam penelitian adalah udang galah yang

berasal dari Balai Budidaya Udang Trenggalek, udang yang digunakan dengan ukuran 7cm. Jumlah udang galah yang dibutuhkan 240 ekor yang dibagi dalam 24 akuarium.

### 4.3 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimental dengan enam perlakuan empat kali ulangan. Penelitian ini membandingkan pengaruh penambahan ekstrak *Gracilaria verrucosa* dengan dosis berbeda terhadap total hemosit dan kelangsungan hidup udang galah (*Macrobrachium rosenbergii*).

Metode eksperimental digunakan untuk mengetahui kemungkinan hubungan sebab akibat dengan cara memberikan satu atau lebih kondisi perlakuan dan membandingkan hasilnya dengan satu atau lebih kelompok kontrol yang tidak diberikan perlakuan (Narbuko dan Achmadi, 2004). Kusriningrum (2008) menyatakan, eksperimen dapat didefinisikan sebagai suatu tindakan yang dibatasi dengan nyata dan dapat dianalisis hasilnya. Penelitian eksperimental digunakan untuk mengetahui pengaruh variabel tertentu terhadap suatu kelompok dalam kondisi yang terkontrol.

Variabel dalam penelitian adalah sebagai berikut :

Variabel bebas : dosis penambahan ekstrak *Gracilaria verrucosa*.

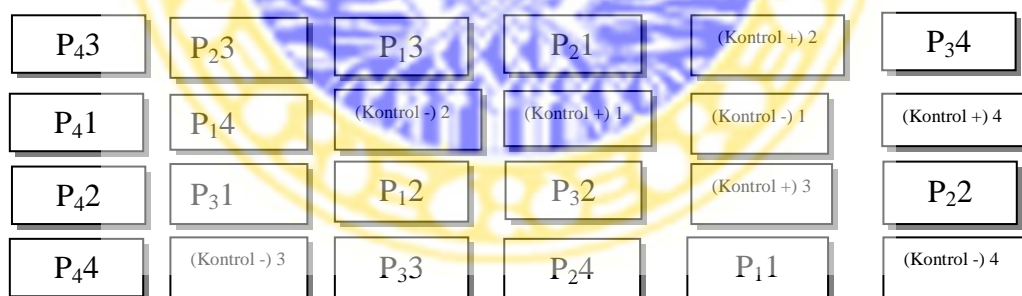
Variabel tergantung : total hemosit dan kelangsungan hidup.

Variabel terkontrol : kualitas air yang terdiri dari oksigen terlarut, pH, amoniak dan suhu.

### 4.3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Kusurningrum (2008) menyatakan bahwa rancangan acak lengkap dipergunakan apabila media, alat dan bahan percobaan seragam atau dapat dianggap seragam. Penelitian ini melibatkan enam perlakuan yang diulang sebanyak empat kali. Perlakuan kontrol - dan kontrol + sebagai kontrol (0 % ekstrak *Gracilaria verrucosa*/kg pakan), 1 (1 % ekstrak *Gracilaria verrucosa*/kg pakan), 2 (2 % ekstrak *Gracilaria verrucosa*/kg pakan), 3 (3 % ekstrak *Gracilaria verrucosa*/kg pakan), 4 (4 % ekstrak *Gracilaria verrucosa*/kg pakan).

Penentuan dosis penambahan ekstrak *Gracilaria verrucosa* ini berdasarkan hasil penelitian Sasmaya dkk., (2013), pemberian terbaik ekstrak *Gracilaria* sp. pada udang vaname adalah sebesar 2%. Denah penempatan tiap perlakuan dan ulangan penelitian setelah dilakukan pengacakan dapat dilihat pada Gambar 6 :



Gambar 6. Denah pengacakan penempatan perlakuan

### 4.3.2 Prosedur Kerja

#### A. Persiapan Ekstrak Rumput Laut

Pembuatan ekstrak *Gracilaria verrucosa* diawali dengan pengambilan rumput laut dari petani rumput laut di desa Jabon Kabupaten Sidoarjo. Selanjutnya, rumput laut dicuci dengan menggunakan air tawar untuk

menghilangkan garam, *epiphyte*, mikroorganisme dan bahan lainnya. Setelah bersih, rumput laut dikeringkan pada udara terbuka selama 3 hari. Rumput laut yang kering selanjutnya dipotong kecil-kecil dan dihaluskan dengan menggunakan penggilingan dan diayak dengan ayakan ukuran 60 *mesh*. Setelah mendapatkan tepung rumput laut, tepung ini dimasukkan ke dalam tabung *erlenmeyer* dan ditambahkan etanol dengan perbandingan 1:5 dan di *shaker* selama 12 jam. Fungsi etanol ini sendiri sebagai pelarut (Puspasari, 2010). Tepung rumput laut yang sudah direndam selanjutnya disaring dengan menggunakan pompa vakum yang diberi kertas saring agar diperoleh supernatan yang benar-benar terpisah dari residunya. Endapan tepung rumput laut kembali direndam dengan etanol, proses tersebut dilakukan sebanyak 3 kali. Setelah dilakukan proses perendaman-penyaringan, larutan yang diperoleh di *rotatory evaporator* pada suhu 50°C selama 3 hari. Ekstrak *Gracilaria verrucosa* yang dihasilkan langsung disimpan pada tempat kering atau di tempat bersuhu dingin.

#### B. Persiapan Pakan

Bahan pakan yang diperlukan disesuaikan dengan formulasi yang dikehendaki, digiling sehingga ukurannya menjadi lebih kecil dan diayak. Setelah semua bahan siap baru ditimbang sesuai dengan formulasi. Setelah ditimbang bahan yang memiliki porsi sedikit dicampur terlebih dahulu setelah itu baru memasukkan bahan yang memiliki porsi besar dan dicampur jadi satu sampai merata atau homogen. Kemudian ditambahkan ekstrak *Gracilaria verrucosa* dengan dosis 0 g/kg untuk perlakuan kontrol - dan kontrol + sebagai kontrol, 10 g/kg untuk perlakuan P<sub>1</sub>, 20 g/kg untuk perlakuan P<sub>2</sub>, 30 g/kg untuk perlakuan P<sub>3</sub>,



dan 40 g/kg untuk perlakuan P<sub>4</sub>, kemudian dicampur sampai homogen. Jumlah pakan yang dibuat dalam tiap perlakuan yakni 1 kg pakan.

Bahan pakan yang telah tercampur merata dimasukkan ke dalam loyang dan dikukus selama 15 menit. Setelah adonan siap, kemudian dicetak dengan menggunakan mesin pelet dan dikeringkan dalam oven dengan suhu 60°C selama 24 jam, setelah di oven pakan buatan siap digunakan (Agustono dkk., 2011). Pakan pada tiap perlakuan yang telah jadi dilakukan analisis proksimat untuk mengetahui kandungan nutrisinya.

Pakan uji yang digunakan adalah pakan buatan berbentuk *crumble* yang diransum sendiri. Sedangkan ukuran pakannya disesuaikan dengan ukuran bukaan mulut udang galah. Komposisi pakan antar perlakuan dihitung dengan menggunakan metode gabungan trial dan bujur sangkar (Pearson). Pemberian pakan selama perlakuan sebanyak 3% dari total berat tubuh. Frekuensi pemberian pakan tiga kali sehari, yaitu pukul 09.00 WIB, 13.00 WIB dan 17.00 WIB (Putri dkk., 2013).

### C. Komposisi Bahan Pakan

Komposisi bahan pakan untuk udang galah (*Macrobrachium rosenbergii*) pada setiap perlakuan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi dan analisis proksimat pakan udang galah yang digunakan dalam penelitian.

	Bahan Pakan	Perlakuan / Pakan				
		Kontrol (- dan +)	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>4</sub>
1	Tepung ikan %	36	36	36	36	36
2	Bungkil kedelai %	30	30	30	30	30
3	Tepung jagung %	26	25	24	23	22
4	Minyak ikan %	2	2	2	2	2
5	Premix %	4	4	4	4	4
6	CMC %	2	2	2	2	2
7	Ekstrak <i>Gracilaria</i> %	0	1	2	3	4
		100	100	100	100	100
Analisis Proksimat Pakan						
	Protein (%)	34,846	34,933	36,015	37,079	37,162
	Lemak (%)	7,834	7,334	6,841	6,291	6,083
	Abu (%)	7,269	7,455	7,767	7,918	8,267
	Serat (%)	3,832	3,985	4,046	4,090	4,132
	BETN (%)	34,568	33,890	33,212	32,534	31,856
	Energi(kal/100g)	429,611	425,843	422,969	420,500	417,982
	Air (%)	10,057	10,297	10,680	10,907	11,064

Keterangan: Hasil analisis proksimat pakan.

#### D. Persiapan Akuarium dan Air Media Pemeliharaan

Akuarium yang akan digunakan sebanyak 24 buah dengan ukuran 40x30x30 cm<sup>3</sup>. Sebelum digunakan, akuarium dibersihkan dengan dibilas dengan air dan disikat dengan sabut kelapa untuk menghilangkan kotoran yang menempel. Akuarium diisi dengan air sampai penuh dan ditambahkan kaporit sebanyak 3 gram untuk desinfeksi akuarium. Akuarium direndam selama 24 jam, setelah 24 jam air kaporit dibuang dan akuarium dibilas dengan menggunakan air bersih, selanjutnya dilakukan proses pengeringan wadah, yaitu akuarium diletakan dengan posisi terbalik dalam waktu 24 jam agar semua air dapat menguap. Setelah akuarium kering, dilakukan pengisian air dari air tandon yang telah diendapkan

sampai volume setengah akuarium. Persiapan terakhir adalah pengecekan sistem aerasi, agar oksigen terdistribusi dengan baik.

#### E. Persiapan Udang Uji

Udang yang digunakan dalam penelitian ini adalah udang galah dengan ukuran 7 cm yang sehat dan tidak terserang penyakit. Setiap akuarium diisi 10 ekor udang galah yang telah diaklimatisasi.

#### F. Uji Stres

Udang yang telah diberi ekstrak *Gracilaria* selama 2 minggu dengan kepadatan 10 ekor/akuarium kemudian diuji stres dengan cara menaikkan suhu 34°C selama 2 hari (Cheng and Chen, 2000) untuk mengetahui efek pemberian ekstrak *Gracilaria verrucosa* terhadap respon imun udang galah. Sebelum diuji stres udang galah dipindahkan terlebih dahulu ke dalam akuarium yang sudah diatur suhunya.

Perlakuan Kontrol - : pakan tanpa pemberian ekstrak *Gracilaria verrucosa* dan tanpa uji stres

Perlakuan Kontrol + : pakan tanpa pemberian ekstrak *Gracilaria verrucosa* dan uji stress dengan menaikkan suhu 34 ° C

Perlakuan P<sub>1</sub> : pakan dengan penambahan Ekstrak *Gracilaria verrucosa* sebanyak 1 %, uji stres dengan menaikkan suhu 34° C

Perlakuan P<sub>2</sub> : pakan dengan penambahan Ekstrak *Gracilaria verrucosa* sebanyak 2 %, uji stres dengan menaikkan suhu 34° C

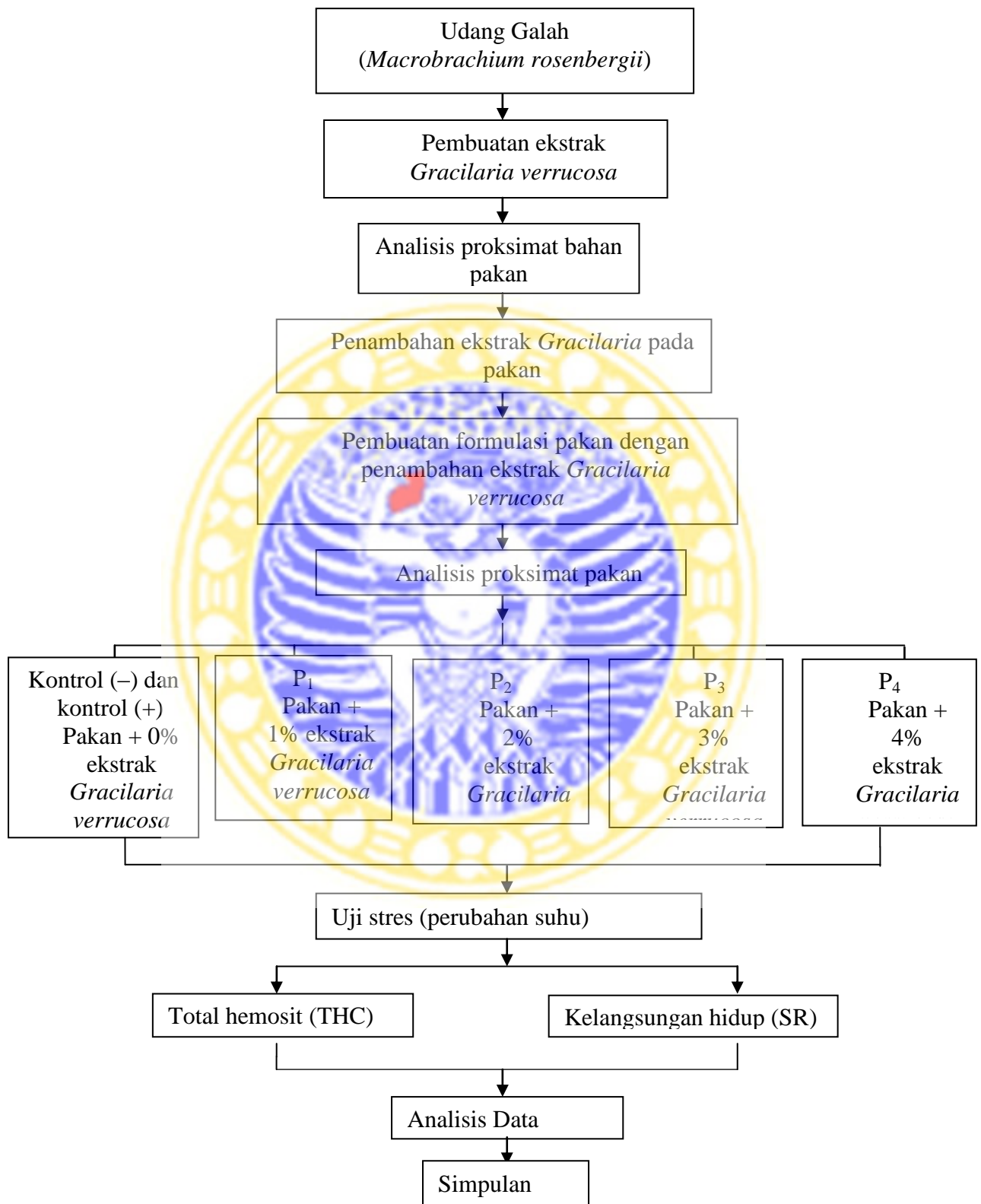
Perlakuan P<sub>3</sub> : pakan dengan penambahan Ekstrak *Gracilaria verrucosa* sebanyak 3 %, uji stres dengan menaikkan suhu 34° C

Perlakuan P<sub>4</sub> : pakan dengan penambahan Ekstrak *Gracilaria verrucosa* sebanyak 4%, uji stres dengan menaikkan suhu 34° C

Selama uji stres dilakukan pengamatan jumlah kematian udang setiap 6 jam sekali dalam 2 hari (48 jam). Hemolim udang diambil pada saat awal pemeliharaan, setelah pemberian ekstrak *Gracilaria verrucosa* (hari ke-14), dan setelah uji stres (hari ke-16) untuk menghitung total hemosit. Diagram alir penelitian dapat dilihat pada Gambar 7.







Gambar 7. Diagram alir penelitian

## 4.4 Parameter

### 4.4.1 Parameter Utama

Parameter uji utama dalam penelitian ini adalah :

#### A. Total hemosit

Menurut Van de Braak (2002), pengambilan hemolim (darah) udang dilakukan pada bagian pangkal pleopod pada segmen abdominal kedua dekat lubang genital dengan menggunakan *sprit insulin* 1 mL yang telah dibasahi larutan antikoagulan (30 mM *trisodium citrate*, 0.34 M *sodium chloride*, 10 mM EDTA, pH 7.5).

Hemolim diambil pada awal penelitian (hari ke-0), sebelum diuji stres (hari ke-14), dan pada akhir penelitian (2 hari setelah uji stres). Penghitungan jumlah total hemosit (THC) dengan menggunakan rumus *small block* pada haemocytometer dengan prosedur Campa-Cordova *et al.* (2002).

$$\text{Jumlah Hemosit} = \frac{\text{Jumlah sel yang di hitung}}{5 \times 4} \times \text{pengenceran} \times 10^6$$

#### B. Kelangsungan hidup

Kelangsungan hidup atau SR (*Survival Rate*) adalah presentase tingkat kelangsungan hidup organisme selama masa pemeliharaan. Untuk uji stres, kelangsungan hidup udang diamati dan dicatat pada 6 jam sekali selama 2 hari (48 jam).

Menurut Effendi (1997) dalam Ermantianingrum dkk. (2013) kelangsungan hidup juvenil udang galah (*Macrobachium rosenbergii*) dapat dihitung menggunakan rumus :

$$SR = \frac{Nt}{NO} \times 100\%$$

Keterangan :

SR = Sintasan larva (%)

Nt = Jumlah total larva pada akhir perlakuan (ekor)

NO = Jumlah total larva pada awal perlakuan (ekor)

#### 4.4.2 Parameter Pendukung

Sebagai data pendukung pada kegiatan penelitian ini adalah suhu, pH, DO dan amoniak. Kegiatan pengamatan suhu dilakukan dengan menggunakan termometer, pH air diukur dengan alat pH meter, kandungan oksigen terlarut diukur dengan menggunakan DO meter dan amoniak diukur dengan menggunakan amoniak *test kit*. Parameter suhu juga digunakan untuk uji stres. Pengukuran parameter pendukung dilaksanakan selama pemberian ekstrak *Gracilaria*.

#### 4.5 Analisis Data

Data total hemosit dan kelangsungan hidup udang galah dianalisis dengan *Analysis of Variance* (ANOVA), apabila hasil menunjukkan bahwa perlakuan penambahan ekstrak *Gracilaria* sp. dalam pakan buatan menghasilkan total hemosit dan kelangsungan hidup yang berbeda nyata atau sangat berbeda nyata, maka untuk membandingkan pengaruh antar perlakuan dilanjutkan dengan Uji Jarak Berganda Duncan (*Duncan's Multiple Range Test*) (Kusriningrum, 2008).