

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah penelitian *experimental laboratory*. Metode eksperimental merupakan proses pengujian di mana ada perubahan atau modifikasi terhadap *variable input* dari sebuah system, sehingga dapat diamati dan diidentifikasi sebab perubahan yang dihasilkan dalam penelitian (Arikunto, 2019). Metode ini termasuk dalam penelitian kualitatif. Dalam kelompok eksperimental, tindakan dilakukan pada subjek penelitian atau variabel yang akan diteliti (variabel terikat). Data yang diperoleh berasal dari hasil tindakan pada subjek penelitian dan dibandingkan dengan kelompok kontrol yang tidak diberikan perlakuan.

#### 3.2. Desain Penelitian

Desain Penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Desain penelitian ini digunakan dalam percobaan homogen dimana kelompok perlakuan yang dibandingkan dengan kontrol. Rancangan penelitian ini digunakan untuk membagi ikan nila menjadi tujuh kelompok, antara lain satu kelompok kontrol negatif, satu kontrol positif, dan lima kelompok perlakuan. Masing-masing kelompok diberi perlakuan yang berbeda selama 14 hari. Jumlah pengulangan pada setiap perlakuan ditentukan dengan perhitungan yang menggunakan rumus dari Federer (1963) dengan perhitungan sebagai berikut:

$$(n-1)(t-1) \geq 15$$

$$(n-1)(7-1) \geq 15$$

$$6n-6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3$$

Keterangan:

t = jumlah perlakuan

n = jumlah pengulangan.

Berdasarkan hasil perhitungan didapatkan jumlah pengulangan sebanyak tiga

kali dari setiap perlakuan, sehingga digunakan 21 ekor ikan nila dalam penelitian ini. Adapun parameter yang diukur dalam penelitian ini adalah pertumbuhan ikan nila yang meliputi bobot mutlak; panjang mutlak; laju pertumbuhan relatif; dan pertumbuhan panjang relatif, hematologi ikan nila yang meliputi jumlah eritrosit; leukosit; dan hematokrit.

### **3.3. Waktu dan Lokasi Penelitian**

#### **3.3.1. Waktu Penelitian**

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juni sampai dengan Agustus 2023. Dimulai dengan pembuatan tepung buah ciplukan dan bunga kecombrang pada bulan Juni hingga Juli. Pembuatan pakan dan uji proksimat dan uji *Radical Scavenging Activity* (RSA) dilakukan pada bulan Juli. Perlakuan pakan terhadap ikan dilakukan pada bulan Juli. Pembuatan laporan skripsi dilakukan pada bulan Agustus

#### **3.3.2. Tempat Penelitian**

Penelitian dilakukan di Universitas Pendidikan Indonesia. Pemeliharaan ikan dilakukan di Kebun Botani Universitas Pendidikan Indonesia, sedangkan pengujian hematologi dilakukan di Laboratorium Struktur Hewan, FPMIPA, Universitas Pendidikan Indonesia

### **3.4. Populasi dan Sampel Penelitian**

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah kelompok ikan nila (*Oreochromis niloticus*). Sampel pada penelitian ini adalah kelompok ikan nila sebanyak 42 ekor (21 ekor untuk sample uji dan 21 untuk hewan cadangan). Ikan nila yang digunakan berumur 8-10 minggu dengan berat 10-12 cm yang diperoleh dari salah satu peternak ikan yang berlokasi di Jl. Cijawura Hilir No.36, RT.5/RW.11, Cijaura, Kec. Buahbatu, Kota Bandung, Jawa Barat.

### **3.5. Prosedur Penelitian**

#### **3.5.1. Pengajuan *Ethical Exemption* (Pembebasan Etik)**

*Ethical Exemption* atau surat keterangan pembebasan etik sebagai syarat dalam penelitian yang menggunakan hewan uji didapatkan dari komite etik penelitian Universitas Padjadjaran (Lampiran 1).

### 3.5.2. Persiapan Alat dan Bahan

Alat dan bahan dalam penelitian ini digunakan untuk proses pembuatan tepung buah ciplukan dan tepung bunga kecombrang yakni proses pembersihan dan pengeringan serta penghalusan bahan mentah; proses pembuatan pakan ikan; dan perlakuan hewan uji (Lampiran 2.). Alat yang digunakan dalam pembuatan tepung buah ciplukan, tepung buah kecombrang dan pembuatan pakan ikan disterilkan sebelum digunakan, dengan cara dibersihkan menggunakan sabun dan air mengalir, dibersihkan menggunakan alkohol.

### 3.5.3. Persiapan Wadah Penelitian

Wadah yang digunakan dalam penelitian yakni menggunakan *styrofoam* berkapasitas 60 liter sebanyak tujuh buah termasuk wadah kontrol. Wadah dibersihkan terlebih dahulu sebelum digunakan, dicuci menggunakan detergen dan dibilas dengan air mengalir hingga bersih, kemudian wadah yang telah dicuci, dikeringkan dibawah sinar matahari. Wadah yang sudah kering diberi label sesuai perlakuan, lalu wadah diisi air yang sesuai dengan kualitas air hidup ikan nila, yakni pH berkisar antara 5-11 (Arikunto & Suharsimi, 2019), kadar DO optimal 6,1- 14,5 mg/L (Pramleonita *et al.*, 2018), suhu yang optimal 22-29°C (Mjoun & Kurt, 2010), dan dipasang aerasi untuk suplai oksigen.

### 3.5.4. Pembuatan Tepung Ciplukan dan Kecombrang

Pembuatan tepung buah ciplukan dan bunga kecombrang dimulai dengan pengumpulan sampel buah yang akan digunakan. Masing-masing sampel buah ciplukan dan bunga kecombrang terlebih dahulu dicuci menggunakan air bersih mengalir dan dikering anginkan. Selanjutnya buah ciplukan dan bunga kecombrang dipotong-potong sebesar 3 cm dan dikeringkan dengan cara dijemur di bawah sinar matahari hingga buah ciplukan dan bunga kecombrang kering dan layu, tergantung adanya sinar matahari yang muncul. Masing-masing buah yang sudah kering kemudian dihaluskan menggunakan blender, hingga menjadi tepung dan diayak. Masing-masing tepung buah ciplukan, tepung bunga kecombrang dan campuran tepung ciplukan juga kecombrang yang sudah dihaluskan kemudian dianalisis kandungan antioksidan menggunakan metode *Radical Scavenging Activity* (RSA).

### 3.5.5. Uji Antioksidan *Radical Scavenging Activity* (RSA)

Uji antioksidan *Radical Scavenging Activity* tepung buah ciplukan, tepung buah kecombrang dan campuran keduanya (Lampiran 3.) dilakukan oleh Laboratorium Cendekia Nanotech Utama (CNH) yang berlokasi di Jl. Madusari 1 no. 76 Plamongansari Pedurungan Semarang dengan kode pos 50192 Indonesia. Uji antioksidan RSA yang dilakukan Laboratorium Cendekia Nanotech Utama. Adapun cara kerja dalam uji RSA yang dilakukan Laboratorium Cendekia Nanotech Utama di antaranya:

1. Ekstrak sampel sebanyak 0,1 g ditimbang.
2. Tambahkan pelarut hingga mencapai 5 ml, lalu dihomogenkan.
3. Untuk menentukan aktivitas antioksidan pada setiap konsentrasi, diambil sejumlah 0,6 ml menggunakan pipet.
4. Tambahkan 3 mL larutan DPPH 0,1 mM.
5. Larutan campurang yang telah ditambahkan larutan DPPH dihomogenkan
6. Tempatkan dan biarkan larutan campuran selama 30 menit di tempat gelap,
7. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 515 nanometer.
8. Aktivitas antioksidan dari sampel diukur melalui pengukuran besar hambatan serapan radikal DPPH dengan menghitung persentase inhibisi serapan DPPH menggunakan rumus:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Serapan kontrol} - \text{serapan sampel}}{\text{Serapan kontrol}} \times 100\%$$

### 3.5.6. Proses Pembuatan Pakan

Proses pembuatan pakan buatan ikan nila dilakukan dengan mencampurkan tepung buah ciplukan dan kecombrang sesuai formulasi yang telah di rancang dengan bahan-bahan baku untuk pakan ikan. Campuran pakan ikan diaduk sampai mencapai konsistensi yang tepat dan dapat dibentuk, lalu diproses dengan grinder. Pelet pakan yang telah dibentuk kemudian dikeringkan di bawah sinar matahari selama 1-2 hari sampai benar-benar kering, atau alternatifnya dapat menggunakan oven jika diperlukan. Setelah kering, pelet disimpan dalam wadah yang kering dan rapat agar terhindar dari jamur.

Yuliana Helen Setia Putra, 2023

**PENGARUH PEMBERIAN PAKAN BUATAN DENGAN PENAMBAHAN TEPUNG BUAH CIPLUKAN (*Physalis angulata*) DAN BUNGA KECOMBRANG (*Etlingera elatior*) TERHADAP PERTUMBUHAN DAN HEMATOLOGI IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*)**

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

### 3.5.7. Formulasi Pakan

Adapun formulasi pakan buatan yang digunakan dalam penelitian merujuk pada formulasi pakan yang digunakan pada penelitian Juniati (2022) dengan modifikasi pada formulasi penggunaan tepung yang akan diuji menjadi tepung buah ciplukan dan tepung buah kecombrang. Formulasi pakan buatan yang digunakan akan dijabarkan pada Tabel 3.1

Tabel 3. 1 Tabel Formulasi Pakan Buatan

Bahan Baku	K-	C100	K100	C25:K75	C50:K50	C75:K25
Tepung ikan	17	17	17	17	17	17
Tepung kedelai	35	25	25	25	25	25
Dedak	30	30	30	30	30	30
Bungkil kelapa	5	5	5	5	5	5
Tepung terigu	10	10	10	10	10	10
Vitamin & mineral mix	3	3	3	3	3	3
Tepung ciplukan	0	10	0	2.5	5	7.5
Tepung kecombrang	0	0	10	7.5	5	2.5
<b>Jumlah (gr)</b>	100	100	100	100	100	100

Bahan-bahan tersebut dicampur kemudian diberi air hangat untuk melunakan adonan sehingga memudahkan saat waktu pencetakan dengan grinder. Pakan yang telah dicetak dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 50°C hingga kekeringan yang ditentukan (Mulia *et al.*, 2017).

### 3.5.8. Uji Proksimat

Uji Proksimat pada seluruh pakan perlakuan (Lampiran 4) dimulai dari kelompok kontrol positif (komersial), kontrol negative (pakan buatan tanpa ciplukan dan kecombrang), pakan buatan dengan konsentrasi tepung ciplukan 100 gr/kg pakan (C100), pakan buatan dengan konsentrasi tepung kecombrang

Yuliana Helen Setia Putra, 2023

**PENGARUH PEMBERIAN PAKAN BUATAN DENGAN PENAMBAHAN TEPUNG BUAH CIPLUKAN (*Physalis angulata*) DAN BUNGA KECOMBRANG (*Etilingera elatior*) TERHADAP PERTUMBUHAN DAN HEMATOLOGI IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*)**

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

100 gr/kg pakan (K100), pakan buatan dengan konsentrasi tepung ciplukan dan kecombrang dengan perbandingan 75:25 gr /kg pakan (C75:K25), pakan buatan dengan konsentrasi tepung ciplukan dan kecombrang dengan perbandingan 50:50 gr /kg pakan (C50:K50), dan pakan buatan dengan konsentrasi tepung ciplukan dan kecombrang dengan perbandingan 25:75 gr /kg pakan (C25:K75). Uji Proksimat pakan dilakukan oleh Laboratorium Cendekia Nanotech Utama (CNH) yang berlokasi di Jl. Madusari 1 no. 76 Plamongansari Pedurungan Semarang dengan kode pos 50192 Indonesia.

*Standard Operating Procedures Proksimat* (AOAC) yang dilakukan oleh Laboratorium Cendekia Nanotech Utama di antaranya:

1. Analisis Kadar Air Metode Oven (SNI 01-2891-1992)

- Kadar air dalam pelet ikan diukur melalui perhitungan penurunan berat setelah mengalami pemanasan dalam oven sampai beratnya stabil.
- Sampel pelet seberat 1-2 gram ditimbang
- Sampel yang telah diukur, ditempatkan dalam wadah yang beratnya sudah diketahui.
- Cawan yang berisi pelet kemudian dimasukkan ke dalam oven pada suhu 105°C selama 3 jam.
- Cawan yang telah di oven kemudian didinginkan dalam eksikator selama 30 menit.
- Setelah dingin cawan berisi pellet ditimbang.

2. Analisis Kadar Abu (SNI 01-2891-1992)

- Sebanyak 2-3 g sampel pellet ditimbang,
- Sample pellet yang telah ditimbang, dimasukkan ke dalam cawan porselen yang telah diketahui beratnya.
- Cawan berisi sampel dimasukkan ke dalam tanur bersuhu 550°C selama 12 jam atau hingga bahan berubah warna menjadi putih.
- Cawan berisi sampel diambil, dan dimasukkan ke dalam desikator selama 30 menit, dan ditimbang.

3. Analisis Kadar Protein Metode Kjeldahl (SNI 01-2891-1992)

- Sampel sebanyak 0,1 gr dimasukkan ke dalam tabung mikro Kjeldahl 30 ml

Yuliana Helen Setia Putra, 2023

**PENGARUH PEMBERIAN PAKAN BUATAN DENGAN PENAMBAHAN TEPUNG BUAH CIPLUKAN (*Physalis angulata*) DAN BUNGA KECOMBRANG (*Etilingera elatior*) TERHADAP PERTUMBUHAN DAN HEMATOLOGI IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*)**

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

- Sample kemudian ditambahkan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2,5 mL) dan tablet Kjeldahl.
  - Sampel dididihkan selama 1 - 1,5 jam sampai jernih
  - Sample yang telah dididihkan kemudian di dinginkan.
  - Isi labu dituangkan ke dalam alat destilasi.
  - Labu dibilas 5-6 kali dengan aquades 20 ml.
  - Air bilasan juga dimasukkan ke dalam alat destilasi, ditambahkan larutan NaOH 4% sebanyak 20 ml.
  - Cairan dalam ujung kondensor ditampung dalam Erlenmeyer 125 ml berisi larutan H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> dan 3 tetes indikator (cairan metil merah dan metilen blue) yang ada di bawah kondensor.
  - Destilasi dilakukan hingga diperoleh 200 ml destilat yang bercampur dengan H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> dan indikator dalam Erlenmeyer.
  - Destilat dititrasi dengan HCl 0,1 N sampai terjadi perubahan warna menjadi merah.
  - Hal yang sama juga dilakukan terhadap blanko.
4. Analisis Kadar Lemak Metode Hidrolisis Weibull (SNI 01-2891-1992)
- Sampel yang telah dihancurkan diambil sebanyak 3 g (C).
  - Sampel dihidrolisis menggunakan 30 ml HCl 25% dan akuades sebanyak 20 ml, lalu dipanaskan selama 15 menit.
  - Sampel disaring sampai HCl hilang dari sampel, kemudian dibungkus dengan kertas saring,
  - Kertas saring berisi sampel diletakan ke dalam alat ekstraksi Soxhlet.
  - Ekstraksi dilakukan dengan hexane selama 3 jam.
  - Minyak atau lemak yang terapung di dalam ekstraksi soxhlet dikeringkan dalam oven 105°C sampai berat konstan lalu ditimbang.
5. Penentuan Kadar Karbohidrat (*by difference*) (Winarno 1997)
- Penentuan kadar karbohidrat dilakukan dengan menggunakan perhitungan *Carbohidrat by Difference*.
  - Perhitungan ini bukan berdasarkan analisis tetapi berdasarkan perhitungan sebagai berikut:

$$\% \text{ Karbohidrat} = 100\% - \% (\text{air} + \text{abu} + \text{lemak} + \text{protein})$$

### 3.5.9. Persiapan Hewan Uji

Persiapan hewan uji yakni ikan nila ditempatkan dalam tujuh wadah *styrofoam* berkapasitas 60 Liter, setiap wadah diisi ikan nila sebanyak 6 ekor (3 ekor untuk cadangan). Dengan kondisi lingkungan yang tidak akan terkena air hujan, dan menggunakan air yang telah disesuaikan dengan kualitas air hidup ikan nila. Ikan nila kemudian dibagi menjadi tujuh kelompok dengan tiga pengulangan yaitu kelompok positif (K+), kontrol negatif (K-), kelompok perlakuan (C100); (K100); (C75:K25); (C50:K50); dan (C25:K75). Semua perlakuan dilakukan dengan tiga pengulangan. Pengelompokan Rancangan Acak lengkap (RAL) pada penelitian sehingga dihasilkan terdapat 21 percobaan seperti (Tabel 3.2).

Tabel 3. 2 Tabel Randomisasi Nila

C50:K50 2	K- 1	C25:K75 3	C75:K25 2	C100 2	K+ 2	K100 2
K- 2	C25:K75 1	K+ 3	C50:K50 1	C100 3	K100 3	C75:K25 1
C100 1	K+ 1	C75:K25 3	K100 1	C50:K50 3	K- 3	C25:K75 2

### 3.5.10. Perlakuan Hewan Uji

Metode perlakuan hewan uji dimodifikasi berdasarkan metode penelitian Iskandar & Elrifadah (2015). Hewan uji yang digunakan adalah 21 ekor bibit ikan nila (*Oreochromis niloticus*) sehat, berusia 2 bulan dengan ukuran panjang  $\pm$  10-12 cm. Bibit ikan nila dimasukkan ke dalam masing-masing wadah yang telah disediakan, 6 ekor ikan per wadah (3 ekor tambahan ikan pengganti). Padat tebar ikan yakni 1 ekor/2 Liter air, dengan ketinggian air 50 cm. Sebagai upaya menjaga kualitas air tetap bagus, dilakukan penyiponan sisa-sisa pakan maupun kotoran ikan setiap 2 hari sekali, yakni dengan membuang air sebanyak 20% volume air total dan mengganti dengan air bersih yang baru. Pakan akan diberikan sesuai perlakuan 2 kali sehari yakni (07.00-08.00 dan 17.00-18.00 WIB) sebanyak 5%/bb/hari. Selama 14 hari ikan nila diberikan perlakuan sesuai kelompok sebagai berikut:

1. Kelompok kontrol positif (K+) pakan komersial
2. Kelompok kontrol negatif (K-) pakan buatan tanpa penambahan tepung buah

Yuliana Helen Setia Putra, 2023

**PENGARUH PEMBERIAN PAKAN BUATAN DENGAN PENAMBAHAN TEPUNG BUAH CIPLUKAN (*Physalis angulata*) DAN BUNGA KECOMBRANG (*Etlingera elatior*) TERHADAP PERTUMBUHAN DAN HEMATOLOGI IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*)**

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

ciplukan dan tepung bunga kecombrang

3. Kelompok perlakuan dengan konsentrasi tepung ciplukan 100 gr (C100)
4. Kelompok perlakuan dengan konsentrasi tepung kecombrang 100 gr (K100)
5. Kelompok perlakuan dengan konsentrasi tepung ciplukan dan kecombrang dengan perbandingan 75:25 gr (C75:K25)
6. Kelompok perlakuan dengan konsentrasi tepung ciplukan dan kecombrang dengan perbandingan 50:50 gr (C50:K50)
7. Kelompok perlakuan dengan konsentrasi tepung ciplukan dan kecombrang dengan perbandingan 25:75 gr (C25:K75)

### 3.6. Teknik Pengumpulan Data

#### 3.6.1. Pertumbuhan Ikan Nila

Pengambilan data pertumbuhan ikan nila dilakukan dengan melihat pertumbuhan bobot badan mutlak, pertumbuhan panjang badan mutlak, laju bobot relatif, laju panjang relatif, ditambah data tambahan berupa *Survival Rate* (SR), dan kesehatan insang. Pertumbuhan ikan didefinisikan sebagai perubahan ikan dalam berat, ukuran juga volume seiring perubahan waktu. Berat dianggap sebagai suatu fungsi dari panjang, adapun hubungan berat dan panjang nyaris mengikuti hukum kubik yakni berat ikan merupakan pangkat tiga dari panjangnya (Mujdiman, 1998). Pada nyatanya, hubungan berat dan Panjang pada ikan tidak mengikuti hukum kubik, karena bentuk dan panjang yang ikan milki berbeda-beda (Effendie, 2002).

Pertumbuhan bobot mutlak adalah perhitungan untuk penambahan bobot ikan selama pemeliharaan. Adapun rumus yang digunakan menurut dengan rumus Everhart *et al.* (1975) dalam Effendie (1997) adalah sebagai berikut:

$$H = W_1 - W_0$$

Keterangan :

$W_1$  = Bobot total pada akhir pemeliharaan (gram)

$W_0$  = Bobot total pada awal pemeliharaan (gram)

H = Pertumbuhan bobot mutlak (gram)

Pertumbuhan panjang mutlak adalah perhitungan untuk penambahan panjang ikan selama pemeliharaan. Adapun rumus yang digunakan, sebagai berikut:

$$L_m = TL_1 - TL_0$$

Keterangan :

$TL_1$  = Panjang total pada akhir pemeliharaan (cm)

$TL_0$  = Panjang total pada awal pemeliharaan (cm)

$L_m$  = Pertumbuhan panjang mutlak (cm)

Menurut De Silva dan Anderson (1995), laju pertumbuhan relatif ikan dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$RGR = \frac{W_t - W_0}{W_0 \times t} \times 100\%$$

Keterangan :

RGR = Pertumbuhan bobot relatif / laju pertumbuhan relatif (%)

$W_t$  = Bobot rata-rata ikan pada akhir penelitian (cm)

$W_0$  = Bobot awal ikan pada awal penelitian (cm)

$t$  = Waktu pemeliharaan (hari)

Menurut Effendie (1997), pertumbuhan panjang relatif ikan dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$LR = \frac{L_t - L_0}{L_0 \times t} \times 100\%$$

Keterangan :

$L_r$  = Pertumbuhan panjang relatif (%)

$L_t$  = Panjang rata-rata ikan pada akhir penelitian (cm)

$L_0$  = Panjang awal ikan pada awal penelitian (cm)

$t$  = Waktu pemeliharaan (hari)

*Survival Rate* (SR) atau kelangsungan hidup merupakan peluang hidup suatu individu dalam saat tertentu (Rachmawati & Samidjan, 2014), sedangkan mortalitas merupakan kematian yang terjadi pada satu populasi yang berakibat pada pengurangan jumlah individu dalam populasi tersebut. Adapun nilai persentase *survival rate*: SR  $\geq$  50% dapat dikelompokkan memiliki SR yang baik, SR 30-50% dikelompokkan memiliki SR sedang, dan persentase SR yang kurang

dari 30% dikelompokkan memiliki SR tidak baik (Lesmana *et al.*, 2021). *Survival rate* adalah perhitungan jumlah ikan nila yang masih hidup, setelah diberi pakan, dilakukan pada akhir penelitian. Penghitungan kelangsungan hidup dirumuskan oleh (Mudjiman, 1998) sebagai berikut :

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

Keterangan :

SR = Tingkat kelangsungan hidup (%)

N<sub>t</sub> = Jumlah ikan hidup pada akhir pemeliharaan

N<sub>0</sub> = Jumlah ikan hidup pada awal pemeliharaan

Untuk mendukung data SR dan pertumbuhan ikan, dilakukan pengamatan warna pada organ insang. Insang terdiri atas lembar-lembar insang yang setiap lembar insang memiliki sepasang filamen, tiap filamennya tersusun dari lamela-lamela yang berguna sebagai tempat pertukaran gas. Faktor yang dapat menyebabkan adanya iritasi pada insang dari respons patologi ikan yakni rendahnya jumlah oksigen terlarut di dalam air, sehingga berdampak pada kesehatan insang ikan. Adapun kerusakan yang terjadi pada sel-sel insang di antaranya edema, hiperplasia, dan fusi sel (Roberts, 2001).

### 3.6.2. Pemeriksaan Hematologi

Dalam melihat kekebalan tubuh ikan nila dapat dilakukan uji darah. Limfosit berperan sebagai indikator pertahanan tubuh alami dan merupakan bagian dari sistem kekebalan non spesifik yang berfungsi melindungi tubuh dari agen penyebab penyakit. Limfosit, yang dipicu oleh kehadiran imunostimulan, mampu berkontribusi dalam sintesis antibodi dan juga dalam fagositosis bakteri. Dampak imunostimulan dapat meningkatkan jumlah limfosit T dalam sirkulasi darah, yang memiliki peran krusial dalam kekebalan seluler. Kekebalan seluler ini memiliki peran penting dalam melindungi tubuh dari patogen seperti bakteri dan virus yang bersifat intraselular (Tiard, 1987). Pengambilan sampel darah dilakukan dengan membius ikan terlebih dahulu menggunakan minyak cengkeh dengan dosis 0,5mL/10L selama 2 jam hingga ikan pingsan. Darah ikan diambil menggunakan *syringe* 1 ml yang telah dibasahi dengan Na-sitrat 3,8% untuk mencegah pembekuan darah, darah dimasukkan ke dalam tabung eppendorf.

Yuliana Helen Setia Putra, 2023

**PENGARUH PEMBERIAN PAKAN BUATAN DENGAN PENAMBAHAN TEPUNG BUAH CIPLUKAN (*Physalis angulata*) DAN BUNGA KECOMBRANG (*Etilingera elatior*) TERHADAP PERTUMBUHAN DAN HEMATOLOGI IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*)**

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

Perhitungan eritrosit dan leukosit dilakukan dengan menggunakan metode Klontz (1994) dan Blaxhall dan Daisley (1973). Pada perhitungan eritrosit menggunakan pipet eritrosit untuk mengambil sampel darah dari tabung eppendorf, hingga garis menunjukkan 0.5 ml, kemudian pada sampel eritrosit ditambahkan larutan Hayem hingga garis 101, dihomogenkan dengan menggoyangkan pipet eritrosit membentuk angka delapan kurang lebih lima menit. Darah yang telah homogen, dibuang sebanyak dua tetes dengan tujuan untuk menghilangkan udara, darah diteteskan pada kotak *haemocytometer* dan ditutup kaca penutup. Selanjutnya diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 10 x 40. Jumlah eritrosit dihitung dengan 5 lapangan pandang di kotak kecil *haemocytometer*.

Pada perhitungan leukosit menggunakan pipet leukosit untuk mengambil sample darah dari tabung eppendorf hingga garis menunjukkan 0.5 mL, kemudian pada sample eritrosit ditambahkan larutan Turk hingga garis 11, dihomogenkan dengan menggoyangkan pipet leukosit membentuk angka delapan sekitar lima menit. Darah yang homogen, dibuang sebanyak dua tetes dengan tujuan untuk menghilangkan udara, darah diteteskan pada kotak *haemocytometer* dan ditutup kaca penutup. Selanjutnya diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 10 x 40. Jumlah leukosit dihitung dengan mikroskop pada 4 kotak besar *haemocytometer*.

Perhitungan jumlah sel eritrosit dan leukosit menggunakan rumus Blaxhall & Daisley dalam Alifuddin (1999) yakni dengan rumus sebagai berikut:

$$\sum \text{Eritrosit} = \sum N \times 10^4 \text{ sel/mm}^3$$

$$\sum \text{Leukosit} = \sum N \times 50 \text{ sel/mm}^3$$

Hematokrit merupakan persentase zat padat dalam darah terhadap cairan darah, yang nilainya dipengaruhi oleh ukuran dan jumlah eritrosit (Dosim *et al.*, 2013). Terjadinya penurunan hematokrit dapat mengindikasikan bahwa ikan mengalami gejala anemia., yang mana berdampak pada terhambatnya pertumbuhan ikan karena rendahnya jumlah eritrosit yang dapat mengakibatkan berkurangnya suplai makanan ke sel, jaringan dan organ sehingga proses metabolisme ikan terhambat (Kurniawan *et al.*, 2014). Hematokrit pada ikan nila berkisar antara 27,3-37,8% (Hardi *et al.*, 2011).

Perhitungan hematokrit darah ikan nila dilakukan menggunakan metode dari penelitian Yanto *et al.* (2015) dengan mengambil sample darah dari dalam tabung eppendorf kemudian memasukkannya ke dalam kapiler hematokrit yang akan ditutup dengan penutup lilin (vitrex). Darah pada kapiler hematokrit di sentrifuge dengan lama waktu selama 3 menit menggunakan kecepatan 11.000 rpm, panjang endapan eritrosit dan leukosit pada kapiler hematokrit akan diukur menggunakan penggaris dan dihitung persentase volumenya, sedangkan endapan berwarna kekuning-kuningan akan dicatat sebagai hemoglobin.

Adapun rumus yang digunakan untuk menghitung hematokrit menggunakan rumus menurut Anderson & Siwicki dalam Alifuddin (1999).

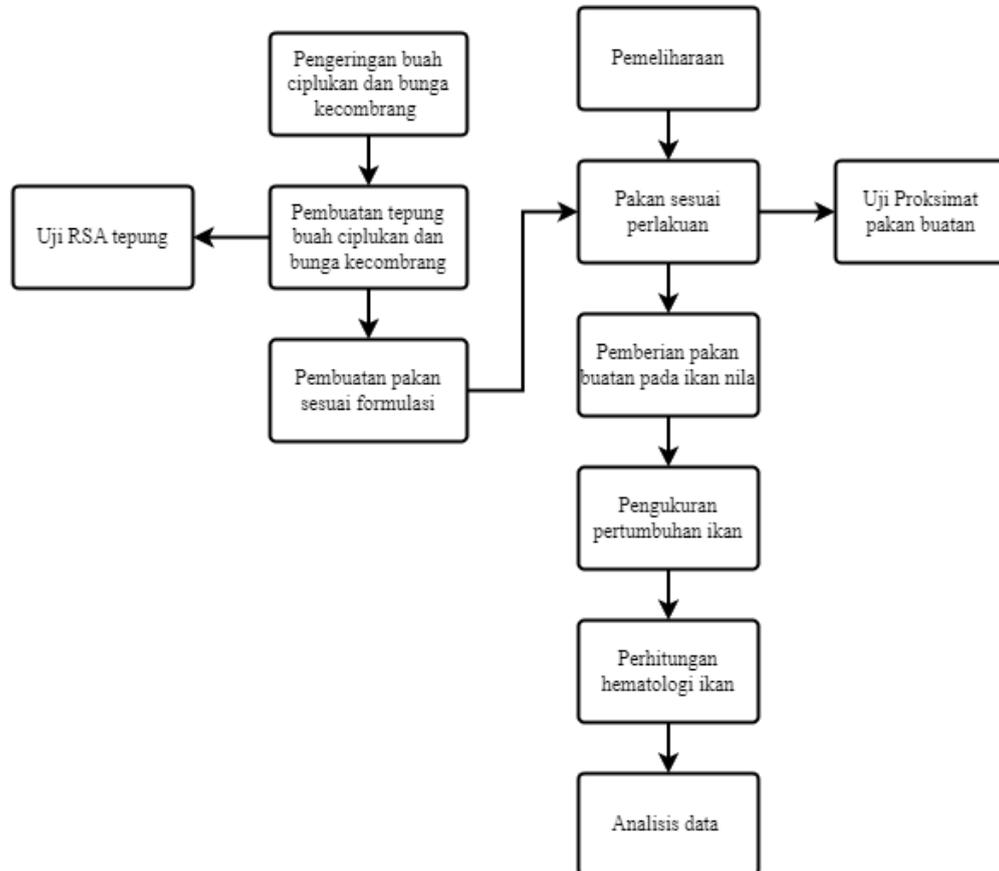
$$\text{Hematokrit} = \frac{\text{Panjang endapan eritrosit pada pipa kapiler}}{\text{Panjang total}} \times 100\%$$

### 3.7. Analisis Data

Analisis data untuk data hasil uji proksimat disajikan dalam bentuk tabel dan kemudian dibahas secara deskriptif dengan pendekatan literatur yang berkaitan dengan hasil penelitian sebelumnya. Analisis data hasil pengamatan menggunakan aplikasi program SPSS versi 22, data jumlah sel eritrosit, jumlah sel leukosit, persentase hematokrit, bobot mutlak, panjang mutlak, laju pertumbuhan relatif, dan pertumbuhan panjang relatif, pertama-tama diuji untuk normalitas distribusinya dan homogenitas varian. Jika data tersebut terdistribusi secara normal dan varian homogen, analisis dilakukan dengan menggunakan metode *One Way Anova*, dan uji lanjut *Duncan* digunakan dengan tingkat kepercayaan 95%. Namun, jika data terdistribusi normal tetapi varian tidak homogen, metode uji *Games-Howell* digunakan. Data yang tidak terdistribusi normal dianalisis menggunakan uji non-parametrik seperti *Kruskal-Wallis* dan *Mann Whitney*. Sedangkan untuk data pendukung seperti data kualitas air (pH, suhu, DO, dan TDS), kesehatan insang, tingkat kelangsungan hidup (SR), serta nilai % inhibisi RSA dari tepung dijabarkan dalam bentuk tabel dan diuraikan secara deskriptif. Penjelasan tersebut kemudian didiskusikan dengan pendekatan literatur yang relevan, mengacu pada temuan-temuan sebelumnya dalam penelitian serupa.

### 3.8. Alur Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan dengan alur yang disajikan dalam diagram alur sebagai berikut (Gambar 3.1).



Gambar 3. 1 Alur Penelitian