

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Uji *In Vitro*

3.1.1 Jenis dan Metode Penelitian

Uji *in vitro* merupakan metode yang digunakan untuk menilai aktivitas biologis dalam lingkungan terkontrol di luar organisme hidup. Penelitian ini menggunakan metode eksperimen laboratorium dengan pendekatan kuantitatif untuk mengevaluasi potensi bakteri probiotik sebelum melalui proses *freeze dry*. Penelitian ini akan dilakukan dalam tiga tahap utama: persiapan, pelaksanaan, dan analisis data. Tahap persiapan meliputi seleksi dan isolasi strain bakteri probiotik yang akan diuji, serta pengkondisian alat dan bahan. Strain bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus rhamnosus*, dan *Lactobacillus casei* yang diperoleh dari koleksi kultur mikroba. Kelima strain ini akan di kultur dalam media MRSA & MRSB hingga mencapai fase logaritmik pertumbuhan sebelum dilakukan proses *freeze drying*.

Bakteri probiotik yang telah dikultur akan mengalami proses *freeze dry*. Proses ini melibatkan pembekuan cepat pada suhu sangat rendah (sekitar -80°C) diikuti dengan pengeringan sublimasi di bawah tekanan vakum untuk menghilangkan air tanpa merusak struktur sel bakteri. Bakteri akan diuji potensi hidupnya melalui penanaman kembali pada media pertumbuhan *Plate Count Agar* (PCA) yang ditumbuhkan pada media MRSA dengan teknik *spread plate* dan metode pengujian *Total Plate Count* (TPC) untuk dihitung jumlah koloni yang tumbuh *Colony Forming Units* (CFU) dalam satu gram probiotik (CFU/mL).

Tahap analisis data melibatkan pengumpulan dan pengolahan data kuantitatif yang diperoleh dari hasil uji potensi bakteri. Data yang terkumpul akan dianalisis menggunakan metode statistik untuk menentukan signifikansi hasil. Analisis deskriptif akan digunakan untuk menggambarkan viabilitas bakteri probiotik sebelum *freeze drying*.

3.1.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Uji *In Vitro* dilaksanakan selama tiga bulan, dimulai dari bulan Februari hingga Mei 2024. Tahap persiapan, yang meliputi seleksi dan isolasi strain bakteri, serta pengkondisian alat dan bahan dilakukan selama satu bulan pertama. Tahap pelaksanaan, termasuk proses *freeze drying* dan uji potensi bakteri memakan waktu sekitar dua bulan. Sisa waktu digunakan untuk analisis data, interpretasi hasil, serta penulisan laporan penelitian. Jadwal yang terstruktur ini diharapkan dapat memastikan setiap tahapan penelitian berjalan sesuai rencana dan mencapai tujuan yang telah ditetapkan. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Formulasi dan Preparasi, *Integrated Laboratory of Bioproduct* (iLaB), Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN). Laboratorium ini dipilih karena dilengkapi dengan fasilitas yang memadai untuk kultivasi bakteri probiotik, serta peralatan canggih seperti *freeze dryer* untuk analisis viabilitas. Laboratorium ini juga memiliki akses ke berbagai media yang dibutuhkan untuk penelitian.

3.1.3 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh strain bakteri probiotik yang tersedia di koleksi kultur mikroba *Integrated Laboratory of Bioproduct* (iLaB), Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN). Populasi ini mencakup berbagai jenis bakteri probiotik yang telah diidentifikasi dan dikultur di laboratorium, termasuk beberapa strain dari genus *Lactobacillus*, *Pediococcus*, dan *Enterococcus* yang diketahui memiliki potensi probiotik. Populasi ini dipilih satu strain bakteri, yaitu *Lactobacillus casei*, berdasarkan pertimbangan karakteristik probiotik yang unggul, seperti kemampuan bertahan hidup di saluran pencernaan, serta manfaat kesehatan yang telah terbukti melalui berbagai penelitian sebelumnya. Sampel penelitian diambil secara *purposive sampling*, strain bakteri *Lactobacillus casei* dikultur dalam kondisi yang optimal hingga mencapai fase logaritmik pertumbuhan sebelum proses *freeze drying* dilakukan. Strain tersebut akan di inokulasi dalam jumlah yang cukup melalui optimasi suhu dan pH untuk dilakukan pengulangan percobaan sebanyak tiga kali guna memastikan keakuratan dan konsistensi hasil dengan menggunakan *spektrofotometer*. Jumlah sampel yang cukup

besar ini diharapkan dapat memberikan data yang representatif mengenai viabilitas dan potensi bakteri probiotik sebelum melalui proses *freeze drying*, sehingga dapat dilakukan analisis statistik yang valid untuk menguji hipotesis penelitian.

3.1.4 Alat dan Bahan Penelitian

Alat utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah *freeze dryer* (Labconco FreeZone 1), yang berfungsi untuk membekukan bakteri probiotik pada suhu sangat rendah dan kemudian mengeringkannya dengan sublimasi. Alat yang digunakan selanjutnya meliputi autoklaf (TOMY SX-700) untuk sterilisasi media dan alat-alat, serta inkubator (Drying Oven Memmert IPP55) untuk mengkultur bakteri pada suhu optimal. *Laminar air flow* (Sinergi LYLA4FEET) digunakan untuk menyediakan lingkungan steril selama proses penanaman bakteri, sedangkan *colony counter* (BOECO Germany) digunakan untuk menghitung jumlah koloni bakteri yang tumbuh setelah proses *freeze drying*. *Micropipette*, pipet pasteur, tabung reaksi & rak, cawan petri, *bunsen burner*, *loop inokulasi*, erlenmeyer, *beaker glass*, parafilm, *Microplate Reader* (TECAN Infinite 200 Pro) dan *centrifuge* (High Speed Refrigerated) juga diperlukan untuk proses isolasi dan kultivasi bakteri dalam kondisi steril.

Bahan yang digunakan dalam penelitian uji *in vitro* meliputi media kultur bakteri seperti MRSA & MRSB untuk *Lactobacillus casei*. Bahan kimia tambahan yang diperlukan meliputi larutan salin fisiologis, larutan PBS (*Phosphate Buffered Saline*) untuk mencuci sel. Diperlukannya bahan pembekuan seperti *cryoprotectant* (gliserol) untuk melindungi bakteri selama proses *freeze drying*.

3.1.5 Teknik Pengambilan Sampel

Teknik pengambilan sampel pada uji *in vitro* dilakukan dengan metode *purposive sampling*, di mana pemilihan sampel dilakukan secara sengaja berdasarkan karakteristik tertentu yang relevan dengan tujuan penelitian. Strain bakteri probiotik *Lactobacillus casei* dipilih karena memiliki potensi probiotik yang sudah dikenal luas. Pemilihan strain ini didasarkan pada kemampuan *Lactobacillus casei* untuk bertahan hidup di saluran pencernaan, memproduksi senyawa bioaktif, pertumbuhan yang cepat, dan viabilitas

tinggi. Strain ini diperoleh dari koleksi kultur mikroba *Integrated Laboratory of Bioproduct (iLaB)*, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), yang telah diisolasi dan diidentifikasi sebelumnya.

Pengambilan sampel dilakukan melalui proses kultivasi pada media MRSB hingga mencapai fase logaritmik pertumbuhan, yang merupakan tahap optimal untuk proses *freeze drying*. Sampel bakteri kemudian diambil dalam jumlah yang cukup untuk dilakukan pengulangan percobaan sebanyak tiga kali guna memastikan validitas dan reliabilitas data yang diperoleh menggunakan spektrofotometer. Setiap pengulangan akan diinokulasi dengan volume kultur bakteri yang sama, yaitu sekitar 50 mL untuk setiap kali ulangan, dengan tahapan optimasi suhu melalui inkubasi pada suhu tertentu dan dilanjutkan dengan optimasi pH untuk menentukan pH mana yang paling sesuai. Pembentukan konsentrat pelet sel bakteri probiotik *lactobacillus casei* menggunakan alat *centrifuge* berguna untuk memisahkan pelet sel dengan supernatan, lalu pelet sel tersebut dibekukan dengan menambahkan gliserol hingga konsentrasi 30% untuk dapat disimpan di suhu -80°C sebelum melalui proses *freeze dryer*. Strain *lactobacillus casei* sebelum melalui proses *freeze dryer* diuji viabilitasnya dengan metode *Plate Count Agar (PCA)* dan data yang diperoleh digunakan untuk mengevaluasi kualitas bakteri probiotik *freeze dry*.

3.1.6 Variabel Penelitian

Variabel independen dalam uji *in vitro* adalah proses *freeze drying* yang diterapkan pada bakteri probiotik. Proses ini melibatkan dua tahap utama, yaitu pembekuan cepat pada suhu sangat rendah (sekitar -80°C) diikuti dengan pengeringan sublimasi di bawah tekanan vakum. Variabel independen ini diatur untuk melihat bagaimana pengaruhnya terhadap potensi hidup dan kualitas bakteri probiotik saat melalui proses *freeze drying*. Aspek-aspek yang dipertimbangkan dalam proses ini termasuk suhu pembekuan, durasi pengeringan, dan penggunaan *cryoprotectant* seperti gliserol. Variabel dependen dalam uji *in vitro* adalah viabilitas dan potensi bakteri probiotik saat proses *freeze drying*. Viabilitas bakteri diukur dengan menghitung jumlah

koloni yang tumbuh (CFU/mL) setelah rehidrasi dan penanaman kembali pada media MRSA.

3.1.7 Prosedur Penelitian

3.1.7.1 Persiapan Bakteri Probiotik

Isolasi bakteri probiotik *Lactobacillus casei* dimulai dengan pengambilan sampel bakteri dari sumber yang telah ditentukan. Sampel ini kemudian diinokulasikan ke dalam media selektif *de Man, Rogosa, and Sharpe* (MRS) agar, yang dirancang khusus untuk mendukung pertumbuhan bakteri asam laktat seperti *Lactobacillus casei*. Proses inokulasi dilakukan dalam kondisi steril untuk mencegah kontaminasi dari mikroorganisme lain. Media kultur setelah inokulasi diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Koloni bakteri yang tumbuh selama periode akan diamati dan diidentifikasi berdasarkan karakteristik morfologis yang khas pada *Lactobacillus casei*. Koloni yang sesuai kemudian diisolasi dan dipindahkan ke media MRS agar yang baru untuk pemurnian lebih lanjut, memastikan bahwa koloni yang diperoleh adalah murni dan bebas dari kontaminan.

Persiapan bakteri probiotik *freeze dry* dimulai dengan mengkultur *Lactobacillus casei* dalam medium cair seperti MRS broth hingga mencapai fase eksponensial, di mana pertumbuhan sel bakteri berada pada tingkat optimal. Kultur bakteri disentrifugasi setelah mencapai fase ini, untuk memisahkan sel bakteri dari medium cair agar menghasilkan pelet sel bakteri. Pelet ini kemudian dicampur dengan *cryoprotectant*, seperti gliserol, yang berfungsi melindungi sel bakteri selama proses pembekuan dan pengeringan. Campuran sel bakteri dan *cryoprotectant* tersebut kemudian dibekukan pada suhu -80°C untuk memastikan sel bakteri beku sepenuhnya. Sel bakteri beku dikeringkan menggunakan alat *lyophilizer*, yang menghilangkan air dari sel dalam kondisi vakum, sehingga menghasilkan bakteri probiotik dalam bentuk *freeze dry*. Bakteri probiotik *freeze dry* yang dihasilkan kemudian disimpan dalam kondisi vakum atau nitrogen cair hingga siap digunakan dalam penelitian.

3.1.7.2 Uji Antibakteri Probiotik terhadap Patogen

Prosedur uji antibakteri probiotik *Lactobacillus casei* dilakukan untuk mengevaluasi kemampuan probiotik dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Uji ini menggunakan metode sumuran, di mana bakteri patogen yang akan diuji diinokulasikan secara merata pada permukaan media MRS agar. Sumuran yang telah diinokulasikan dalam suspensi *Lactobacillus casei* ditempatkan pada permukaan agar. Media kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Zona hambatan, yaitu area di sekitar sumuran di mana pertumbuhan bakteri patogen terhambat, diukur dalam milimeter untuk menilai aktivitas antibakteri *Lactobacillus casei*.

3.1.7.3 Pengukuran Optimasi pH dan Suhu

Prosedur pengukuran optimasi pH dan suhu dilakukan untuk menentukan kondisi terbaik bagi pertumbuhan *Lactobacillus casei* sebagai probiotik dalam pakan ikan mas (*Cyprinus carpio*). Pengukuran dimulai dengan menyiapkan beberapa kultur bakteri dalam media cair MRS broth, yang kemudian dibagi ke dalam berbagai kelompok perlakuan dengan rentang pH (3, 4, 5, 6, dan 7) dan suhu (30°C, 37°C, 40°C, 45°C, dan 50°C). Setiap kelompok perlakuan diinkubasi selama 24-48 jam. Pertumbuhan bakteri di setiap kelompok diukur dengan menggunakan *spektrofotometer* untuk mengukur kepadatan optik (OD) pada panjang gelombang 600 nm. Data yang diperoleh dianalisis untuk menentukan pH dan suhu yang menghasilkan pertumbuhan bakteri optimal.

3.1.7.4 Perhitungan Nilai TPC Bakteri *Lactobacillus casei*

Prosedur perhitungan nilai *Total Plate Count* (TPC) bakteri *Lactobacillus casei* dilakukan untuk mengukur jumlah koloni bakteri yang hidup dalam sampel. Dimulai dengan menyiapkan suspensi bakteri dari kultur cair *Lactobacillus casei* dalam larutan buffer steril. Suspensi ini kemudian diencerkan secara seri untuk mendapatkan beberapa tingkat pengenceran. Setiap pengenceran diinokulasikan pada media MRS agar dengan cara meneteskan 0.1 ml suspensi bakteri ke permukaan agar, kemudian diratakan menggunakan batang pengaduk. MRS agar yang telah

diinokulasi diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Jumlah koloni yang tumbuh setelah inkubasi dihitung dan dinyatakan sebagai CFU (*colony forming units*) per ml sampel. Perhitungan TPC dilakukan dengan mengalikan jumlah koloni pada cawan yang dipilih dengan faktor pengenceran.

3.1.7.5 Pengukuran Pertumbuhan *Lactobacillus casei* dengan OD

Prosedur pengukuran pertumbuhan *Lactobacillus casei* menggunakan *Optical Density* (OD) dilakukan untuk menentukan kepadatan sel bakteri dalam kultur cair. Kultur bakteri *Lactobacillus casei* disiapkan dalam medium MRS broth dan diinkubasi pada suhu optimal (37°C) dengan pengocokan kontinu. Setiap 24 jam, sampel diambil dari kultur untuk mengukur OD pada panjang gelombang 600 nm menggunakan *spektrofotometer*. Nilai OD yang diperoleh mencerminkan kepadatan sel bakteri dalam kultur. Pengukuran dilakukan secara berkala hingga mencapai fase stasioner pertumbuhan bakteri. Data OD yang terkumpul dianalisis untuk membuat kurva pertumbuhan bakteri, yang menunjukkan fase lag, log, eksponensial, dan stasioner.

3.1.8 Parameter Penelitian

3.1.8.1 Diameter Koloni *Lactobacillus casei* terhadap Patogen

Parameter ini bertujuan untuk mengamati kemampuan antagonis bakteri *Lactobacillus casei* terhadap patogen dengan mengukur diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar koloni. Metode ini dilakukan menggunakan teknik sumuran. Bakteri patogen yang diuji diinokulasikan secara merata pada permukaan media MRS agar. Sumuran yang telah diinokulasikan dalam suspensi *Lactobacillus casei* ditempatkan pada permukaan agar dengan patogen. Media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam untuk mendukung pertumbuhan bakteri dan pembentukan zona hambat. Diameter zona hambat di sekitar sumuran diukur dalam milimeter menggunakan penggaris.

3.1.8.2 Pertumbuhan Bakteri pada Optimasi pH dan Suhu

Parameter ini bertujuan untuk menentukan kondisi pH dan suhu yang optimal bagi pertumbuhan bakteri *Lactobacillus casei* sebagai

probiotik dalam pakan ikan mas (*Cyprinus carpio*). Pengamatan dilakukan dengan mengkultur bakteri dalam media MRS broth pada berbagai tingkat pH (3, 4, 5, 6, dan 7) dan suhu (30°C, 37°C, 40°C, 45°C, dan 50°C). Kultur bakteri diinkubasi dalam kondisi tersebut selama 24-48 jam. Pertumbuhan bakteri diukur dengan menggunakan *spektrofotometer* untuk mengukur kepadatan optik (OD) pada panjang gelombang 600 nm. Nilai OD dianalisis untuk menentukan pH dan suhu yang menghasilkan pertumbuhan bakteri optimal.

3.1.8.3 Nilai *Total Plate Count* (TPC) Bakteri *Lactobacillus casei*

Parameter ini bertujuan untuk mengukur jumlah bakteri *Lactobacillus casei* dalam pakan probiotik yang diberikan kepada ikan mas (*Cyprinus carpio*). Prosedur ini dimulai dengan menyiapkan suspensi bakteri dari kultur cair *Lactobacillus casei* dalam larutan buffer steril. Suspensi tersebut kemudian diencerkan secara seri untuk mendapatkan beberapa tingkat pengenceran. Setiap pengenceran diinokulasikan pada media MRS agar dengan metode tuang atau sebar, di mana 0,1 ml dari setiap pengenceran diteteskan dan diratakan pada permukaan agar menggunakan batang penyebar steril. Media agar yang telah diinokulasi diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Koloni yang tumbuh pada media dihitung dengan menggunakan *colony counter* secara manual, dan hasilnya dinyatakan dalam satuan *colony forming units* (CFU) per ml sampel. Perhitungan TPC dilakukan dengan mengalikan jumlah koloni yang terhitung pada cawan yang sesuai dengan faktor pengenceran yang digunakan.

3.1.8.4 Pertumbuhan *Lactobacillus casei* dengan *Optical Density* (OD)

Parameter ini bertujuan untuk mengukur pertumbuhan bakteri *Lactobacillus casei* menggunakan *Optical Density* (OD) untuk menentukan konsentrasi sel bakteri dalam kultur cair, yang merupakan bagian penting dari evaluasi probiotik dalam pakan ikan mas (*Cyprinus carpio*). Prosedur ini dimulai dengan menyiapkan kultur bakteri dalam medium MRS broth yang kemudian diinkubasi pada suhu optimal (37°C) dengan pengocokan kontinu untuk memastikan distribusi bakteri yang merata. Setiap 24 jam,

sampel diambil dari kultur tersebut untuk mengukur OD pada panjang gelombang 600 nm menggunakan *spektrofotometer*. Nilai OD yang diperoleh mencerminkan kepadatan sel bakteri dalam kultur. Pengukuran dilakukan secara berkala hingga kultur mencapai fase stasioner pertumbuhan bakteri. Data OD dianalisis untuk membuat kurva pertumbuhan, yang menunjukkan fase lag, log, eksponensial, dan stasioner. Kurva ini membantu menentukan laju pertumbuhan bakteri dan efektivitas kondisi kultur yang digunakan. Pengukuran pertumbuhan dengan OD adalah metode yang cepat dan akurat untuk memonitor kepadatan bakteri.

3.1.9 Analisis Data

3.1.9.1 Pengumpulan Data

Pengumpulan data dalam penelitian ini dilakukan secara rutin dan sistematis untuk memastikan keakuratan dan konsistensi data yang diperoleh. Pengukuran konsentrasi bakteri probiotik pada pakan dilakukan dengan menghitung jumlah unit pembentuk koloni (CFU) sebelum pakan diberikan kepada ikan. Prosedur penghitungan melibatkan suspensi bakteri dalam larutan buffer steril, dilanjutkan dengan pengenceran seri, inokulasi pada media agar, inkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam, dan penghitungan jumlah koloni yang tumbuh.

3.1.9.2 Analisis Deskriptif

Analisis deskriptif dilakukan untuk menggambarkan data yang diperoleh dari penelitian mengenai potensi bakteri probiotik *freeze dry* pada pakan terhadap pertumbuhan dan kelangsungan hidup ikan mas (*Cyprinus carpio*). Statistik dasar yang dihitung meliputi nilai rata-rata (*mean*) dan standar deviasi (SD) dari konsentrasi bakteri probiotik (CFU/g).

3.1.9.3 Interpretasi Hasil

Analisis hasil penelitian mengenai potensi bakteri probiotik *freeze dry* pada pakan terhadap pertumbuhan dan kelangsungan hidup ikan mas (*Cyprinus carpio*), dilakukan beberapa analisis untuk memberikan pemahaman yang komprehensif. Analisis konsentrasi bakteri probiotik menunjukkan perbandingan nilai rata-rata konsentrasi bakteri probiotik (CFU/g) pada pakan di berbagai kelompok perlakuan.

3.2 Uji *In Vivo*

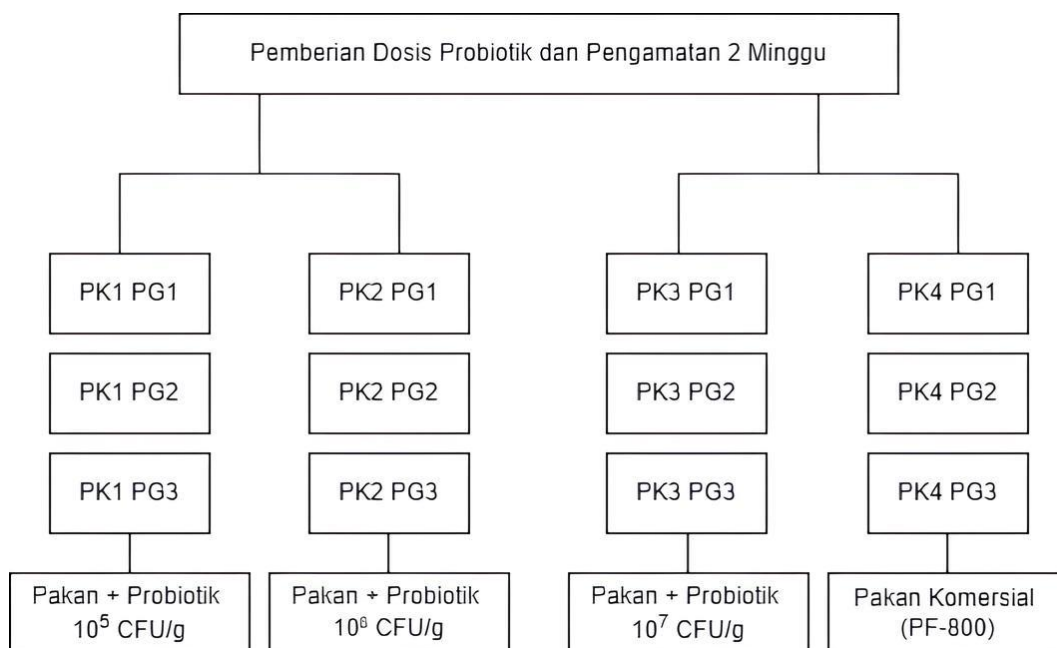
3.2.1 Jenis dan Metode Penelitian

Uji *in vivo* merupakan salah satu metode penting yang sering digunakan dalam penelitian untuk mengevaluasi efektivitas dan keamanan bahan biologi secara langsung pada organisme hidup. Penelitian ini menggunakan metode eksperimental dengan rancangan acak lengkap (RAL) yang terdiri dari empat perlakuan dan tiga ulangan. Rancangan ini dipilih karena memberikan setiap perlakuan agar mendapatkan kesempatan yang sama untuk diujikan, sehingga hasil yang diperoleh lebih valid dan dapat dipercaya. Terdapat empat perlakuan yang diterapkan pada pakan ikan mas:

- PK1 : Pakan dengan bakteri probiotik *freeze dry* konsentrasi 10^5 CFU/g (0,1g probiotik *Lactobacillus casei* dengan 100g pakan)
- PK2 : Pakan dengan bakteri probiotik *freeze dry* konsentrasi 10^6 CFU/g (1g probiotik *Lactobacillus casei* dengan 100g pakan)
- PK3 : Pakan dengan bakteri probiotik *freeze dry* konsentrasi 10^7 CFU/g (10g probiotik *Lactobacillus casei* dengan 100g pakan)
- K : Pakan tanpa tambahan probiotik (kontrol)

Setiap perlakuan akan diberikan kepada kelompok ikan mas yang terdiri dari 10 ekor ikan per akuarium dengan ukuran seragam pada panjang rata-rata 7-8 cm, untuk mengurangi variabilitas data yang disebabkan oleh perbedaan ukuran awal ikan. Pelaksanaan penelitian ini dilakukan di laboratorium budidaya perikanan (*hatchery*) dengan pemberian pakan probiotik dilaksanakan selama 14 hari. Parameter yang diamati meliputi *Survival Rate* (SR), *Specific Growth Rate* (SGR), *Feed Conversion Ratio* (FCR), dan Efisiensi Pemanfaatan Pakan (EPP). *Survival Rate* dihitung dengan membandingkan jumlah ikan yang hidup pada akhir penelitian dengan jumlah ikan awal penelitian. *Specific Growth Rate* (SGR) dihitung berdasarkan berat ikan pada awal dan akhir penelitian. *Feed Conversion Ratio* (FCR) dihitung dengan membandingkan jumlah pakan yang diberikan dengan pertambahan berat ikan. Efisiensi Pemanfaatan Pakan (EPP) dihitung dengan membandingkan seberapa efisien pakan yang diberikan dapat diubah menjadi pertumbuhan bobot ikan. Pengukuran parameter dilakukan setiap

satu minggu untuk memantau perkembangan ikan secara berkala. Berikut merupakan skema pemberian pakan dan dosis probiotik bagan penelitian:



Gambar 3.1 Skema Pemberian Pakan dan Dosis Probiotik

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan analisis varian (ANOVA) untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap parameter yang diamati. Jika terdapat perbedaan nyata, akan dilanjutkan dengan uji Duncan untuk mengetahui perlakuan yang memberikan hasil terbaik. Semua analisis statistik dilakukan dengan bantuan perangkat lunak statistik.

3.2.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Uji *In Vivo* dengan pemberian pakan probiotik dilaksanakan selama 14 hari pada bulan Juni 2024. Waktu pelaksanaan dipilih berdasarkan kondisi optimal untuk pertumbuhan ikan mas di lingkungan laboratorium. Setiap satu minggu sekali, akan dilakukan pengukuran parameter pertumbuhan dan kelangsungan hidup ikan untuk memastikan data yang diperoleh konsisten dan akurat. Rentang waktu ini memberikan kesempatan untuk dapat mengamati efek jangka panjang dari pemberian bakteri probiotik *freeze dry* dalam pakan terhadap pertumbuhan dan kelangsungan hidup ikan mas. Tempat penelitian Laboratorium Budidaya Perikanan (*hatchery*), Kampus UPI di Serang, Universitas Pendidikan Indonesia. Laboratorium ini dilengkapi dengan fasilitas yang memadai untuk melakukan penelitian

budidaya ikan, termasuk kolam uji coba, alat pengukur kualitas air, serta perangkat untuk analisis mikrobiologi. Pemilihan lokasi ini didasarkan pada ketersediaan sarana dan prasarana yang memadai serta dukungan teknis yang diperlukan untuk memastikan kelancaran dan keberhasilan penelitian.

3.2.3 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang dipelihara di Laboratorium Budidaya Perikanan (*hatchery*), Kampus UPI di Serang, Universitas Pendidikan Indonesia. Populasi ini terdiri dari berbagai ukuran dan usia ikan mas yang digunakan untuk berbagai kegiatan penelitian dan praktikum. Hanya ikan mas yang berusia benih dengan panjang rata-rata 7-8 cm yang akan digunakan. Pemilihan populasi ini didasarkan pada keseragaman ukuran dan usia ikan untuk mengurangi variabilitas hasil yang disebabkan oleh perbedaan pertumbuhan alami. Sampel penelitian diambil secara acak dari populasi yang telah ditentukan. Sebanyak 120 ekor ikan mas akan dipilih sebagai sampel penelitian, yang kemudian dibagi menjadi 12 aquarium, masing-masing berisi 10 ekor ikan. Setiap aquarium akan diberi perlakuan dosis pakan yang berbeda sesuai dengan rancangan penelitian: PK1 (probiotik 10^5 CFU/g), PK2 (probiotik 10^6 CFU/g), PK3 (probiotik 10^7 CFU/g), dan K (tanpa probiotik), dengan tiga ulangan untuk setiap perlakuan. Pemilihan sampel secara acak bertujuan untuk memastikan bahwa setiap individu dalam populasi memiliki kesempatan yang sama untuk dipilih, sehingga hasil penelitian dapat digeneralisasikan ke populasi ikan mas yang lebih luas. Prosedur pengambilan sampel dilakukan dengan hati-hati untuk menghindari stres pada ikan yang dapat mempengaruhi hasil penelitian.

3.2.4 Alat dan Bahan Penelitian

Penelitian uji *in vivo*, menggunakan berbagai alat untuk mendukung pelaksanaan dan pengumpulan data. Alat utama yang digunakan meliputi wadah pemeliharaan ikan yang berbentuk aquarium berukuran seragam dengan kapasitas 25 liter per aquarium. Setiap aquarium dilengkapi dengan sistem aerasi (aerator) untuk menjaga kualitas air dan oksigen terlarut. *Thermometer digital*, pH meter, dan DO meter digunakan untuk mengukur

suhu, pH air secara rutin dan kadar oksigen terlarut dalam air, guna memastikan kondisi lingkungan yang optimal bagi pertumbuhan ikan. Timbangan digital dengan ketelitian 0,1g digunakan untuk menimbang pakan dan ikan secara akurat serta milimeter block untuk mengukur panjang ikan.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian uji *in vivo* terdiri dari pakan ikan komersial sebagai dasar yang diperkaya dengan bakteri probiotik *freeze dry*. Bakteri probiotik yang digunakan adalah strain *Lactobacillus casei* yang telah diidentifikasi dan dikemas dalam bentuk *freeze dry* untuk memudahkan pencampuran dengan pakan. Air bersih dengan kualitas terkontrol digunakan sebagai media pemeliharaan ikan. Pakan ikan disiapkan dalam berbagai konsentrasi probiotik untuk diberikan kepada kelompok perlakuan, sementara kelompok kontrol menerima pakan standar tanpa tambahan probiotik.

3.2.5 Teknik Pengambilan Sampel

Teknik pengambilan sampel pada uji *in vivo* dilakukan secara acak untuk memastikan representativitas sampel terhadap populasi ikan mas yang ada. Pengambilan sampel ikan dilakukan dengan menggunakan metode *Random Sampling*, di mana ikan mas yang berusia benih dengan panjang rata-rata 7-8 cm dipilih secara acak dari populasi yang tersedia di Laboratorium Budidaya Perikanan (*hatchery*), Kampus UPI di Serang, Universitas Pendidikan Indonesia. Seluruh populasi ikan akan ditimbang beratnya dan diukur panjangnya sebelum pengambilan sampel. Pengambilan sampel dilakukan dengan metode acak manual untuk menentukan ikan yang sesuai kriteria akan digunakan sebagai sampel.

Sebanyak 120 ekor ikan mas akan diambil sebagai sampel dan dibagi ke dalam 12 akuarium, masing-masing aquarium berisi 10 ekor ikan. Setiap aquarium akan mendapatkan perlakuan berbeda sesuai dengan rancangan penelitian, yaitu PK1 (probiotik 10^5 CFU/g), PK2 (probiotik 10^6 CFU/g), PK3 (probiotik 10^7 CFU/g), dan K (tanpa probiotik), dengan masing-masing perlakuan diulang tiga kali. Teknik ini memastikan bahwa setiap individu ikan memiliki peluang yang sama untuk dipilih, mengurangi bias dan meningkatkan validitas hasil penelitian. Selama proses pengambilan sampel,

ikan ditangani dengan hati-hati untuk meminimalkan stres dan cedera, yang dapat mempengaruhi pertumbuhan dan kelangsungan hidup ikan selama penelitian.

3.2.6 Variabel Penelitian

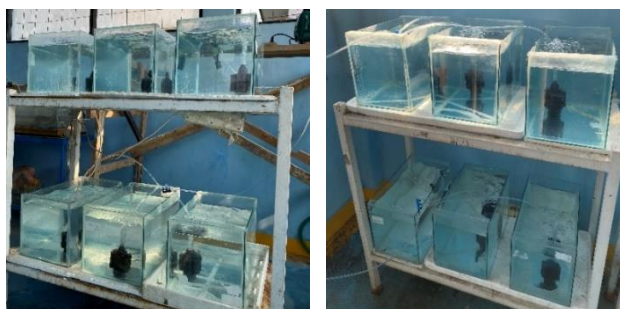
Variabel independen dalam uji *in vivo* adalah konsentrasi bakteri probiotik *freeze dry* yang ditambahkan ke dalam pakan ikan mas (*Cyprinus carpio*). Perlakuan terdiri dari empat tingkat konsentrasi, yaitu PK1 (probiotik 10^5 CFU/g), PK2 (probiotik 10^6 CFU/g), PK3 (probiotik 10^7 CFU/g), dan K (tanpa probiotik). Konsentrasi ini dipilih untuk mengevaluasi efek dosis yang berbeda dari bakteri probiotik terhadap pertumbuhan dan kelangsungan hidup ikan mas. Penambahan bakteri probiotik *freeze dry* ke dalam pakan dilakukan secara hati-hati dan merata untuk memastikan setiap kelompok ikan menerima perlakuan yang konsisten sesuai dengan rancangan penelitian. Variabel dependen dalam uji *in vivo* adalah pertumbuhan dan kelangsungan hidup ikan mas (*Cyprinus carpio*). Pertumbuhan ikan diukur menggunakan parameter *Specific Growth Rate* (SGR) yang dihitung berdasarkan perbedaan berat ikan pada awal dan akhir penelitian. *Feed Conversion Ratio* (FCR) juga diukur untuk menilai efisiensi pakan yang diberikan kepada ikan. *Survival Rate* (SR) diukur dengan menghitung jumlah ikan yang masih hidup pada akhir periode penelitian dibandingkan dengan jumlah ikan awal penelitian. Efisiensi Pemanfaatan Pakan (EPP) diukur untuk membandingkan seberapa efisien pakan yang diberikan dapat diubah menjadi pertumbuhan bobot ikan.

3.2.7 Prosedur Penelitian

3.2.7.1 Persiapan Aquarium dan Ikan Mas

Pengaturan aquarium dimulai dengan menyiapkan aquarium yang memiliki kapasitas cukup untuk menampung ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang sesuai dengan jumlah perlakuan yaitu sebanyak empat perlakuan dan tiga ulangan selama penelitian. Setiap aquarium berukuran seragam dengan kapasitas 25 L dan dilengkapi dengan sistem aerasi menggunakan aerator untuk memastikan kadar oksigen terlarut dalam air tetap optimal bagi pertumbuhan ikan. Setiap aquarium dilengkapi dengan sistem filtrasi yang efektif untuk menjaga kualitas air, serta dapat menghilangkan kotoran dan

sisia pakan yang mengakibatkan menurunnya kualitas lingkungan tempat hidup ikan. Akuarium juga dipantau secara berkala untuk memastikan kondisi fisik dan kimia air, seperti suhu, pH, dan konsentrasi amonia, tetap dalam batas yang sesuai untuk pemeliharaan ikan mas. Berikut merupakan contoh dokumentasi rancangan acak lengkap, yang dapat dilihat pada Gambar 3.2.



Gambar 3.2 Dokumentasi Rancangan Acak Lengkap
(Dokumentasi Penelitian, 2024)

Suhu air dalam akuarium diatur pada kisaran 24-28°C untuk memastikan lingkungan yang optimal bagi pertumbuhan dan kelangsungan hidup ikan mas (*Cyprinus carpio*), yang merupakan rentang suhu ideal untuk ikan mas. pH air dijaga pada kisaran 6.5-8 dengan memonitoring menggunakan pH digital, untuk memastikan lingkungan yang sesuai dengan kebutuhan fisiologis ikan mas. Parameter kualitas air lainnya juga dipantau secara rutin, termasuk oksigen terlarut (DO). Oksigen terlarut dipastikan tetap tinggi melalui sistem aerasi, sementara konsentrasi amonia, nitrit, dan nitrat dipantau dan dikendalikan dengan sistem filtrasi yang efektif serta penggantian air secara berkala. Monitoring ini dilakukan menggunakan alat pengukur kualitas air yang tepat seperti *Thermometer digital*, pH meter, dan DO meter. Dilakukannya monitoring setidaknya satu kali dalam seminggu untuk memastikan kondisi lingkungan tetap stabil dan mendukung kesehatan serta pertumbuhan ikan mas selama penelitian.

Proses aklimatisasi ikan dimulai dengan seleksi ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang memiliki ukuran dan kondisi kesehatan yang seragam untuk mengurangi variabilitas data yang dihasilkan. Ikan yang terpilih kemudian ditempatkan dalam akuarium yang telah disiapkan dengan kondisi air yang

sama seperti yang akan digunakan selama penelitian. Aklimatisasi dilakukan selama 14 hari, di mana ikan dibiarkan beradaptasi dengan lingkungan baru dan dipuasakan. Suhu air diatur pada kisaran 24-28°C dan pH dijaga pada kisaran 6.5-8 selama periode ini. Sistem aerasi dan filtrasi berjalan normal untuk menjaga kualitas air yang optimal. Pemberian pakan dilakukan secara rutin dengan jumlah yang sesuai untuk memastikan ikan mendapatkan nutrisi yang cukup selama proses aklimatisasi. Ikan diamati untuk memastikan mereka beradaptasi dengan baik dan tidak menunjukkan tanda-tanda stres atau penyakit, sehingga siap untuk menerima perlakuan probiotik *freeze dry* pada pakan dalam penelitian utama.

3.2.7.2 Pencampuran Pakan Bakteri *Lactobacillus casei*

Proses pencampuran pakan ikan mas (*Cyprinus carpio*) dengan bakteri probiotik *freeze dry Lactobacillus casei* dan *Phosphate Buffered Saline* (PBS) dirancang untuk memastikan distribusi yang merata dan integrasi sempurna antara pakan dengan probiotik. Bakteri probiotik *freeze dry Lactobacillus casei* ditimbang sesuai konsentrasi yang diperlukan 10^5 CFU/g (0,1g probiotik *Lactobacillus casei* dengan 100g pakan), 10^6 CFU/g (1g probiotik *Lactobacillus casei* dengan 100g pakan), 10^7 CFU/g (10g probiotik *Lactobacillus casei* dengan 100g pakan), dan K (Pakan tanpa tambahan probiotik). Bakteri ini kemudian disuspensikan dalam larutan PBS steril, yang membantu menyebarkan bakteri secara homogen dalam pakan. Pakan ikan komersial ditimbang dan ditempatkan dalam wadah steril. Suspensi PBS yang mengandung bakteri probiotik ditambahkan sedikit demi sedikit ke dalam pakan sambil diaduk dengan menyeluruh menggunakan spatula secara manual dalam kondisi steril. Proses pengadukan dilakukan secara hati-hati untuk memastikan setiap butir pakan terlapisi dengan suspensi bakteri probiotik. Pakan yang telah diperkaya dengan probiotik dikeringkan pada suhu ruang untuk menghilangkan kelembaban berlebih, kemudian disimpan dalam wadah tertutup yang bersih dan kering untuk menjaga viabilitas bakteri hingga pakan digunakan dalam penelitian.

3.2.7.3 Pemberian Pakan Perlakuan

Pemberian pakan kepada ikan mas (*Cyprinus carpio*) dilakukan dua kali sehari, yaitu pada pukul 08.00 dan 16.00, untuk memastikan ikan mendapatkan nutrisi yang cukup sepanjang hari. Jumlah pakan yang diberikan disesuaikan dengan berat badan ikan, dengan dosis sekitar 3-5% dari berat tubuh ikan per minggu. Berat tubuh ikan diukur setiap minggu untuk menentukan jumlah pakan yang tepat. Pakan yang telah dipersiapkan dengan berbagai konsentrasi dosis bakteri probiotik *freeze dry* kemudian diberikan secara merata ke dalam setiap akuarium. Pakan yang diberikan dicatat dengan teliti, termasuk jumlah yang diberikan dan sisa pakan yang tidak dimakan, untuk menghitung *Feed Conversion Ratio* (FCR) dan Efisiensi Pemanfaatan Pakan (EPP) secara akurat.

Monitoring dan pencatatan dilakukan secara rutin selama periode penelitian untuk memastikan data yang akurat dan komprehensif. Pemberian pakan dicatat setiap hari, termasuk jumlah pakan yang diberikan dan sisa pakan yang tidak dimakan oleh ikan mas (*Cyprinus carpio*). Hal ini dilakukan untuk menghitung *Feed Conversion Ratio* (FCR) dan Efisiensi Pemanfaatan Pakan (EPP) agar memastikan bahwa ikan mendapatkan nutrisi yang cukup sesuai dengan perlakuan yang diterapkan. Perilaku ikan juga diamati dan dicatat secara berkala, mencakup aktivitas berenang, respons terhadap pakan, dan tanda-tanda kesehatan atau stres. Pengamatan dilakukan setidaknya dua kali sehari, pagi dan sore, untuk mendapatkan gambaran yang lengkap tentang kondisi ikan selama penelitian.

3.2.7.4 Pengukuran Pertumbuhan Bobot Mutlak

Prosedur ini dilakukan untuk mengukur peningkatan berat badan ikan mas (*Cyprinus carpio*) selama periode penelitian dalam mengevaluasi efektivitas bakteri probiotik *freeze dry* pada pakan. Metode yang digunakan melibatkan penimbangan berat ikan secara rutin setiap minggu menggunakan timbangan digital dengan ketelitian 0,1g untuk memastikan akurasi data. Setiap ikan ditimbang pada awal penelitian untuk mendapatkan berat awal, kemudian ditimbang kembali setiap minggu hingga akhir periode penelitian. Pengukuran ini dilakukan pada semua ikan

dalam setiap kelompok perlakuan untuk mendapatkan data yang representatif. Prosedur penimbangan dilakukan dengan hati-hati untuk meminimalkan stres pada ikan, memastikan bahwa hasil yang diperoleh mencerminkan pertumbuhan yang sebenarnya.

3.2.7.5 Pengukuran Pertumbuhan Panjang Mutlak

Prosedur ini dilakukan untuk mengukur peningkatan panjang tubuh ikan mas (*Cyprinus carpio*) selama periode penelitian guna menilai efektivitas bakteri probiotik *freeze dry* yang ditambahkan dalam pakan. Metode yang digunakan melibatkan pengukuran panjang tubuh ikan dari ujung kepala hingga ujung ekor menggunakan milimeter block dengan ketelitian tinggi setiap minggu. Setiap ikan diukur pada awal penelitian untuk mendapatkan panjang awal, kemudian diukur kembali setiap minggu hingga akhir periode penelitian. Pengukuran ini dilakukan pada semua ikan dalam setiap kelompok perlakuan untuk mendapatkan data yang representatif. Prosedur pengukuran dilakukan dengan hati-hati untuk meminimalkan stres pada ikan dan memastikan hasil yang akurat.

3.2.7.6 Pengukuran Laju Pertumbuhan Harian

Prosedur ini dilakukan untuk mengukur Laju Pertumbuhan Harian (*Specific Growth Rate*) ikan mas (*Cyprinus carpio*) dalam menilai efektivitas bakteri probiotik *freeze dry* pada pakan terhadap pertumbuhan ikan. Pengukuran berat badan ikan dilakukan setiap minggu menggunakan timbangan digital dengan ketelitian tinggi. Data berat badan awal dan akhir ikan dicatat secara sistematis untuk setiap kelompok perlakuan. Perhitungan SGR dilakukan untuk semua kelompok perlakuan yang meliputi berbagai konsentrasi bakteri probiotik (10^5 , 10^6 , 10^7 CFU/g) serta kelompok kontrol tanpa probiotik. Hasil perhitungan SGR dianalisis untuk menentukan apakah ada peningkatan signifikan dalam laju pertumbuhan ikan akibat pemberian bakteri probiotik.

3.2.7.7 Pengukuran Rasio Konversi Pakan

Prosedur ini dilakukan untuk menilai efisiensi konversi pakan menjadi pertumbuhan ikan mas (*Cyprinus carpio*) melalui pengukuran *Feed Conversion Ratio* (FCR). Metode yang digunakan untuk menghitung FCR

melibatkan pencatatan jumlah total pakan yang diberikan kepada ikan selama periode penelitian dan mengukur pertambahan berat badan total ikan. Data jumlah pakan yang diberikan dicatat setiap hari, sedangkan berat badan ikan ditimbang secara rutin setiap minggu untuk memperoleh pertambahan berat badan yang akurat. FCR yang lebih rendah menunjukkan efisiensi konversi pakan yang lebih baik, berarti pakan yang diberikan lebih efektif diubah menjadi massa tubuh ikan.

3.2.7.8 Pengukuran Efisiensi Pemanfaatan Pakan

Prosedur ini dilakukan untuk mengukur Efisiensi Pemanfaatan Pakan (EPP) dalam mengevaluasi seberapa efektif pakan yang mengandung bakteri probiotik *freeze dry* untuk mendukung pertumbuhan ikan mas (*Cyprinus carpio*). EPP dihitung dengan menggunakan formula yang membandingkan pertambahan berat badan ikan dengan jumlah pakan yang dikonsumsi selama periode penelitian. Data yang diperlukan untuk perhitungan EPP meliputi berat awal ikan, berat akhir ikan, dan jumlah total pakan yang diberikan. Setiap ikan ditimbang pada awal dan akhir penelitian untuk memperoleh data berat badan, sementara jumlah pakan yang dikonsumsi dicatat secara harian. Hasil perhitungan EPP memberikan informasi mengenai efisiensi pakan dalam meningkatkan pertumbuhan ikan. Nilai EPP yang lebih tinggi menunjukkan bahwa pakan probiotik lebih efisien dalam mendukung pertumbuhan ikan.

3.2.7.9 Pengukuran Tingkat Kelangsungan Hidup

Prosedur ini dilakukan untuk menentukan persentase ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang bertahan hidup selama periode penelitian guna mengevaluasi efektivitas bakteri probiotik *freeze dry* pada pakan. Metode yang digunakan melibatkan pengamatan harian terhadap ikan dalam setiap akuarium, di mana jumlah ikan yang mati dicatat setiap hari. Jumlah ikan di setiap akuarium dicatat sebagai jumlah ikan awal, dan jumlah ikan yang masih hidup pada akhir periode penelitian dicatat sebagai jumlah ikan hidup. *Survival Rate* yang lebih tinggi menunjukkan bahwa perlakuan pakan dengan probiotik memiliki efek positif terhadap kelangsungan hidup ikan.

3.2.7.10 Parameter Kualitas Air

Monitoring parameter kualitas air dilakukan secara rutin untuk memastikan lingkungan yang optimal bagi pertumbuhan dan kelangsungan hidup ikan mas (*Cyprinus carpio*) selama penelitian. Pengukuran suhu air dilakukan setiap minggu menggunakan *thermometer digital* untuk memastikan suhu tetap berada dalam kisaran optimal 24-28°C. pH air juga diukur setiap minggu menggunakan pH meter untuk memastikan nilai pH tetap stabil antara 6.5-8. Oksigen terlarut (DO) diukur setiap minggu menggunakan DO meter untuk memastikan kadar oksigen dalam air mencukupi kebutuhan ikan sekitar 5-7 mg/L.

3.2.7.11 Pengamatan Tingkah Laku Ikan

Pengamatan tingkah laku ikan mas (*Cyprinus carpio*) dilakukan secara rutin untuk menilai respons ikan terhadap perlakuan pakan yang mengandung bakteri probiotik *freeze dry*. Pengamatan dilakukan dua kali sehari, setiap pagi dan sore, bersamaan dengan pemberian pakan. Parameter tingkah laku yang diamati meliputi aktivitas berenang, pola makan, interaksi antar ikan, serta tanda-tanda stres atau penyakit seperti perubahan warna tubuh, lesu, atau perilaku menyendiri. Aktivitas berenang yang normal, respons cepat terhadap pakan, dan interaksi sosial yang aktif dianggap sebagai indikator kesehatan dan kondisi yang baik. Sebaliknya, perilaku menyendiri, gerakan lambat, atau hilangnya nafsu makan dapat mengindikasikan masalah kesehatan atau stres.

3.2.8 Parameter Penelitian

3.2.8.1 Bobot Mutlak

Bobot mutlak merupakan peningkatan berat badan ikan selama periode tertentu. Termasuk parameter penting dalam penelitian ini untuk memahami laju pertumbuhan dan kondisi kesehatan ikan. Pertumbuhan bobot mutlak (*Absolute Weight Gain*) dapat dihitung dengan rumus berikut:

$$\Delta W = W_t - W_0$$

Keterangan:

ΔW : Pertumbuhan bobot mutlak (*Absolute Weight Gain*)

W_t : Berat ikan pada waktu t (*final weight*)

W_0 : Berat awal ikan (*initial weight*)

3.2.8.2 Panjang Mutlak

Panjang mutlak merupakan peningkatan panjang tubuh ikan selama periode tertentu. Termasuk parameter penting yang digunakan dalam penelitian ini untuk mengevaluasi laju pertumbuhan dan kondisi kesehatan ikan. Pertumbuhan panjang mutlak (*Absolute Length Gain*) dapat dihitung dengan rumus berikut:

$$\Delta L = L_t - L_0$$

Keterangan:

ΔL : Pertumbuhan panjang mutlak (*Absolute Length Gain*)

L_t : Panjang ikan pada waktu t (*final length*)

L_0 : Panjang awal ikan (*initial length*)

3.2.8.3 Specific Growth Rate (SGR)

Specific Growth Rate (SGR) merupakan pengukuran seberapa cepat ikan tumbuh setiap hari dalam periode tertentu. Dinyatakan dalam persentase dan memberikan gambaran tentang efisiensi pertumbuhan ikan dari hari ke hari. Laju Pertumbuhan Harian dapat dihitung dengan rumus berikut:

$$\text{SGR (\%)} = \left(\frac{\ln W_t - \ln W_0}{t} \right) \times 100$$

Keterangan:

SGR : Laju Pertumbuhan Harian (*Specific Growth Rate*)

W_t : Berat ikan pada waktu t (*final weight*)

W_0 : Berat awal ikan (*initial weight*)

t : Jumlah hari dalam periode pengukuran

3.2.8.4 Feed Conversion Ratio (FCR)

Feed Conversion Ratio (FCR) merupakan pengukuran efisiensi penggunaan pakan dalam budidaya ikan. Menunjukkan berapa banyak pakan yang dibutuhkan untuk menghasilkan peningkatan berat badan ikan

tertentu. Semakin rendah nilai FCR, semakin efisien penggunaan pakan. *Feed Conversion Ratio* dapat dihitung dengan rumus berikut:

$$FCR = \frac{F}{\Delta W}$$

Keterangan:

FCR : Rasio konversi pakan (*Feed Conversion Ratio*)

F : Jumlah pakan yang dikonsumsi (*Feed given*)

ΔW : Pertambahan bobot ikan (*Weight gain*)

3.2.8.5 Efisiensi Pemanfaatan Pakan (EPP)

Efisiensi Pemanfaatan Pakan (EPP) merupakan ukuran yang menunjukkan seberapa efisien pakan yang diberikan dapat diubah menjadi pertumbuhan bobot ikan. EPP dinyatakan dalam bentuk persentase (%). Efisiensi Pemanfaatan Pakan (EPP) dapat dihitung dengan rumus berikut:

$$EPP (\%) = \left(\frac{\Delta W}{F} \right) \times 100$$

Keterangan:

EPP : Efisiensi Pemanfaatan Pakan (*Feed Efficiency Percentage*)

ΔW : Pertambahan bobot ikan (*Weight gain*)

F : Jumlah pakan yang dikonsumsi (*Feed given*)

3.2.8.6 Survival Rate (SR)

Survival Rate (SR) merupakan persentase jumlah ikan yang tetap hidup selama periode tertentu. Termasuk parameter penting dalam penelitian ini untuk menilai kondisi lingkungan, kualitas manajemen, dan kesehatan ikan. Tingkat kelangsungan hidup dapat dihitung dengan rumus berikut:

$$SR (\%) = \left(\frac{N_t}{N_0} \right) \times 100$$

Keterangan:

SR : Tingkat kelangsungan hidup (*Survival Rate*)

N_t : Jumlah ikan yang hidup pada akhir periode pengukuran

N_0 : Jumlah awal ikan pada awal periode pengukuran

3.2.8.7 Kualitas Air

1. Suhu Air

Parameter ini bertujuan untuk menjaga suhu air dalam kisaran optimal untuk mendukung pertumbuhan dan kelangsungan hidup ikan mas (*Cyprinus carpio*). Metode yang digunakan melibatkan pengukuran suhu air seminggu sekali menggunakan termometer digital untuk memastikan kondisi lingkungan yang stabil dan sesuai dengan kebutuhan ikan. Suhu air dipantau secara rutin untuk memastikan bahwa suhu berada dalam kisaran optimal 24-28°C, yang merupakan suhu ideal bagi pertumbuhan dan kesehatan ikan mas. Pengukuran dilakukan pada waktu yang sama setiap minggu untuk mendapatkan data yang konsisten dan akurat. Data suhu harian ini dicatat dan dianalisis untuk memverifikasi bahwa kondisi lingkungan tetap stabil sepanjang periode penelitian.

2. pH Air

Parameter ini bertujuan untuk menjaga pH air dalam kisaran optimal guna mendukung pertumbuhan dan kelangsungan hidup ikan mas (*Cyprinus carpio*). Metode yang digunakan melibatkan pengukuran pH air setiap minggu menggunakan pH meter untuk memastikan bahwa lingkungan akuatik tetap sesuai dengan kebutuhan fisiologis ikan mas. Pengukuran pH dilakukan secara rutin pada waktu yang sama setiap minggu untuk mendapatkan data yang konsisten. Kisaran optimal pH yang diupayakan adalah antara 6.5-8, yang merupakan rentang ideal bagi kesehatan dan pertumbuhan ikan mas. Data pH harian dicatat dan dianalisis untuk memastikan bahwa pH air berada dalam kisaran yang diinginkan sepanjang periode penelitian.

3. *Dissolved Oxygen (DO)*

Parameter ini bertujuan untuk memastikan kadar oksigen terlarut (DO) dalam air mencukupi kebutuhan ikan mas (*Cyprinus carpio*) guna mendukung pertumbuhan dan kelangsungan hidup mereka. Metode yang digunakan melibatkan pengukuran DO setiap minggu menggunakan DO meter untuk memastikan bahwa kadar oksigen dalam air tetap dalam kisaran optimal. Pengukuran dilakukan pada waktu yang sama setiap

minggu untuk mendapatkan data yang konsisten dan akurat. Kisaran optimal yang diupayakan adalah ≥ 5 mg/L, yang merupakan tingkat oksigen terlarut ideal untuk mendukung proses fisiologis dan aktivitas metabolisme ikan mas. Data harian mengenai kadar DO dicatat dan dianalisis untuk memastikan lingkungan akuatik tetap mendukung sepanjang periode penelitian. Pengendalian kadar oksigen terlarut yang baik sangat penting untuk meminimalkan stres dan memastikan kondisi optimal bagi ikan.

3.2.9 Analisis Data

3.2.9.1 Pengumpulan Data

Pengumpulan data dilakukan untuk mengukur berat dan panjang ikan setiap minggu menggunakan timbangan digital dan milimeter block, serta data ini dicatat secara sistematis dalam tabel. Parameter kualitas air, termasuk suhu, pH, dan kadar oksigen terlarut (DO), diukur setiap minggu dan hasilnya dicatat dalam tabel untuk memastikan lingkungan tetap optimal bagi pertumbuhan ikan. Tingkat kelangsungan hidup (*survival rate*) dicatat dengan mencatat jumlah ikan yang mati setiap hari dan menghitung *survival rate* secara mingguan. Rasio konversi pakan (FCR) dan Efisiensi Pemanfaatan Pakan (EPP) dihitung berdasarkan jumlah total pakan yang diberikan selama periode penelitian dan pertambahan berat badan total ikan pada setiap kelompok perlakuan.

3.2.9.2 Analisis Deskriptif

Statistik dasar yang dihitung meliputi nilai rata-rata (*mean*) dan standar deviasi (SD) pada berat badan, panjang tubuh, SGR, FCR, EPP, dan SR untuk setiap kelompok perlakuan. Koefisien variasi (CV) dihitung untuk parameter berat badan, panjang tubuh ikan, dan parameter kualitas air seperti suhu, pH, dan kadar oksigen terlarut (DO) untuk menilai tingkat variabilitas data. Data yang terkumpul kemudian disajikan dalam bentuk tabel dan grafik untuk memudahkan interpretasi. Tabel akan menyajikan ringkasan statistik dasar, sementara grafik seperti histogram akan digunakan untuk menunjukkan berat badan, panjang tubuh, SGR, FCR, EPP, dan SR di berbagai kelompok perlakuan.

3.2.9.3 Analisis Statistik

Analisis statistik dalam penelitian ini dimulai dengan uji normalitas untuk memeriksa apakah data berdistribusi normal. Uji *Shapiro-Wilk* atau *Kolmogorov-Smirnov* digunakan untuk variabel seperti, berat badan, panjang tubuh, SGR, FCR, EPP, dan SR. Prosedur ini dilakukan menggunakan perangkat lunak statistik, dan jika $p\text{-value} > 0.05$, data dianggap berdistribusi normal. Uji homogenitas varian dilakukan menggunakan uji *Levene* atau uji *Bartlett* untuk memastikan kesamaan varian antar kelompok perlakuan. Variabel yang diuji mencakup parameter yang sama, dan jika $p\text{-value} > 0.05$, varian dianggap homogen. Menentukan perbedaan signifikan antara kelompok perlakuan, digunakan ANOVA satu arah. Kelompok perlakuan ditetapkan sebagai faktor, sementara variabel yang diukur (berat badan, panjang tubuh, SGR, FCR, EPP, dan SR) sebagai variabel respon. Analisis ANOVA dilakukan dengan perangkat lunak statistik, dan jika $p\text{-value} < 0.05$, terdapat perbedaan signifikan antara kelompok perlakuan. Jika ANOVA menunjukkan adanya perbedaan signifikan, maka dilanjutkan dengan uji *post-hoc*, seperti uji *Duncan*, untuk menentukan kelompok mana yang berbeda. Prosedur uji *post-hoc* dilakukan menggunakan perangkat lunak statistik, dan hasilnya diinterpretasikan untuk mengidentifikasi kelompok perlakuan yang berbeda signifikan.

3.2.9.4 Interpretasi Hasil

Analisis pertumbuhan berat dan panjang ikan dengan membandingkan nilai rata-rata dan pertumbuhan spesifik (% per hari) antara kelompok perlakuan. Hasil ini menentukan apakah penggunaan probiotik *freeze dry* pada pakan memberikan peningkatan signifikan dalam pertumbuhan berat dan panjang pada laju pertumbuhan harian ikan mas. Analisis *survival rate* (SR) membandingkan tingkat kelangsungan hidup ikan antara kelompok perlakuan dan menentukan apakah ada perbedaan signifikan dalam kelangsungan hidup antara kelompok kontrol dan perlakuan. Analisis rasio konversi pakan (FCR) dan Efisiensi Pemanfaatan Pakan (EPP) dilakukan dengan membandingkan nilai rata-rata FCR & EPP di berbagai kelompok perlakuan dan menentukan apakah terdapat

perbedaan signifikan dalam FCR & EPP antar kelompok perlakuan berdasarkan hasil uji statistik. Analisis kualitas air memastikan bahwa semua parameter kualitas air, seperti suhu, pH, dan kadar oksigen terlarut (DO), berada dalam kisaran optimal selama periode penelitian. Pengaruh kualitas air terhadap hasil penelitian juga dianalisis jika ada indikasi bahwa parameter kualitas air mempengaruhi pertumbuhan dan kelangsungan hidup ikan mas.