

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Desain Penelitian

Desain penelitian merupakan suatu proses secara keseluruhan dari tahap perencanaan, pelaksanaan, pengumpulan data, analisis data serta penafsiran data dari awal hingga akhir penelitian. Penelitian ini menggunakan jenis eksperimen lapangan dengan pendekatan kuantitatif. Desain eksperimen lapangan merupakan penelitian yang menggunakan latar yang realistis dengan menggunakan campur tangan dan manipulasi terhadap variabel bebas (Sarwono, 2018). Manipulasi pada penelitian eksperimental yakni dengan adanya perlakuan (*treatment*) yang secara sengaja diberikan kepada subjek penelitian berupa variabel bebas yang divariasikan (Prasetyo *et al.*, 2020).

Pendekatan eksperimen pada penelitian yakni mencoba untuk menentukan pengaruh dari variabel tertentu terhadap variabel lain dalam kondisi yang dikontrol ketat (Sugiyono, 2011). Adapun variabel yang terikat berupa jenis imunostimulan dan salinitas sedangkan variabel bebas berupa nilai THC dan DHC.

Penelitian ini menggunakan metode Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 2 perlakuan dan 3 pengulangan. Adapun perlakuan yang akan dilakukan sebagai berikut.

Tabel 3.1
Rancangan Perlakuan

Kolam (Pengulangan)		Jenis Imunostimulan (Perlakuan)	Salinitas
Tambak A	P7	<i>Lactobacillus sp</i> dan <i>Saccharomyces</i> 3 ppm	< 7 ppt
	P9		
	P10		
Tambak B	C7	Selenium 0,5 g/kg pakan dan β -glucan sebanyak 7 g/kg pakan	> 25 ppt
	C8		
	C9		

3.2. Objek Penelitian

Objek penelitian yang digunakan adalah imunostimulan yang terdiri dari *Lactobacillus sp* dan *Saccharomyces* serta Selenium dan β -glucan yang diperoleh secara komersil untuk dijadikan imunostimulan pada udang vaname. Kemudian dilakukan pengamatan dengan pengambilan hemolim pada udang vaname yang masih hidup serta pengamatan terhadap kualitas air setiap satu kali dalam satu minggu.

3.3. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April hingga Juni 2022 yang bertempat di Tambak Pendampingan PT Suri Tani Pemuka yang berada di Lampung.

3.4. Alat dan Bahan Penelitian

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 3.2.

Tabel 3.2
Alat Penelitian

No	Alat Penelitian	Fungsi
1	Sputit	Mengambil hemolim
2	Mikroskop	Mengamati sampel
3	<i>Hand counter</i>	Alat bantu menghitung jumlah hemosit
4	Hemositometer	Wadah untuk menghitung jumlah sel/partikel
5	Microtube	Menyimpan hemolim yang sudah diambil
6	Staining jar	Merendam ulasan hemolim untuk difiksasi
7	Object glass / preparat	Membuat ulasan hemolim
8	Bunsen	Memfiksasi ulasan hemolim
9	Refractometer	Mengukur kadar salinitas
10	pH meter	Mengukur pH
11	Test kit	Mengukur kadar amonium, fosfat, nitrit, dan nitrat

Tabel 3.3
Bahan Penelitian

No	Bahan Penelitian	Fungsi
1	Antikoagulan	Mencegah penggumpalan pada hemolim
2	Larutan giemsa	Memfiksasi hemolim
3	Larutan methanol	Memfiksasi hemolim
4	Aquades	Membilas ulasan hemolim

3.5. Prosedur Penelitian

3.5.1. Persiapan Kolam

Persiapan kolam dimulai dari pengeringan kolam yang dilakukan sekitar 2-4 minggu, kemudian dilanjutkan dengan penyemprotan kolam dengan pompa untuk membersihkan lumpur atau kotoran yang mengendap di dasar wadah, kemudian dilakukan pengapuran menggunakan kapur CaO sebanyak 300 g/m² di bagian dinding dan dasar kolam. Selanjutnya pengisian air kolam setinggi 30 cm serta penyetingan kincir yang memiliki daya 1 HP dengan dua daun kincir. Kemudian dilakukan bioremediasi dengan penebaran H₂O₂ sebanyak 20 mg/L dan bahan desinfektan dengan kandungan aldehyde, biocide, bioenzyme dan biosurfactant masing-masing sebanyak 5 mg/L.

Penebaran kupri sulfat (CuSO₄) sebanyak 1,5 mg/L untuk menekan pertumbuhan alga dengan menghambat proses fotosintesis dan fosforilasi oksidatif pada transportasi elektron (Pradeep *et al*, 2015) dan di hari berikutnya dilakukan pemberian probiotik cair sebanyak 30 mg/L dengan kandungan *Bacillus sp* dan *Lactobacillus sp* dan dilakukan pengisian kolam hingga mencapai ketinggian 90 cm. Selanjutnya dilakukan penebaran mineral dan *treatment* pada air kolam dengan melarutkannya terlebih dahulu di wadah yang terpisah kemudian dilakukan penebaran menggunakan gayung dengan mengelilingi kolam serta menghidupkan kincir agar larut dengan sempurna.

3.5.2. Penebaran Benur Udang

Benur yang digunakan adalah benur yang sudah tersertifikasi SPF (*Specific Pathogen Free*) yang berasal dari STP. Benur yang digunakan yaitu benur *Post Larva* 11 sebanyak 90-100 ekor/m². Penebaran benur dilakukan dengan proses aklimatisasi selama 30-60 menit.

3.5.3. Persiapan Pakan dan Imunostimulan

Pakan yang digunakan menggunakan pakan komersil yang berprotein 38% kemudian pakan tersebut dicampurkan dengan imunostimulan berupa *Lactobacillus* dan *Sachharomyces* sebanyak 3 ppm. Adapun pada pakan lainnya dicampurkan juga dengan selenium sebanyak 0,5 g/kg pakan dan β -glucan sebanyak 7 g/kg pakan kemudian ditambahkan air dan dicampurkan ke pakan sebanyak 150 mL/kg pakan kemudian diaduk secara merata. Pemberian pakan yang berimunostimulan tersebut dilakukan setiap hari setiap pukul 06.15 (23%), 10.15 (24%), 14.15 (25%), 17.30 (15%) dan 20.30 (13%) WIB.

3.5.4. Pengamatan *Total Hemocyte Count* (THC)

Udang yang dijadikan sampel yakni udang yang sudah dipelihara selama 30 hari. Pengambilan sampel dengan metode *Area Random Sampling*. *Random sampling* adalah pemilihan sampel secara acak dari populasi. Tujuan dari *random sampling* adalah agar dapat dilakukan generalisasi hasil penelitian pada level populasi. Sebelum pengambilan hemolim dilakukan pencampuran antikoagulan pada spuit kemudian pengambilan hemolim dilakukan di antara pangkal kaki renang dan kaki jalan pada udang. Setelah terambil kemudian di homogenkan dengan menggoyangkan seperti angka delapan. Kemudian diamati menggunakan Hemositometer Neubauer Improved dengan kedalaman 0,1 mm dan dihitung dengan bantuan mikroskop serta *hand counter*.

3.5.5. Pengamatan *Differential Hemocyte Count* (DHC)

Pengamatan DHC dilakukan dengan pengambilan hemolim yang sudah dilakukan pengulasan pada preparat kemudian di fiksasi dengan larutan methanol dan larutan giemsa masing-masing selama 15 menit. Kemudian dilakukan penghitungan berdasarkan jenis sel hyalin dan sel granular (termasuk sel semi granular).

3.5.6. Pengamatan Kualitas Air

Pengamatan kualitas air dilakukan setiap satu kali seminggu yang terdiri dari pengamatan terhadap amonium, fosfat, nitrit, nitrat, pH dan salinitas.

3.6. Parameter Penelitian

3.6.1. *Total Hemocyte Count* (THC)

Pengamatan terhadap nilai THC dilakukan dengan penghitungan hemosit dengan rumus (Ekawati *et al.*, 2012) :

$$\text{Total Hemosit (sel/ml)} = \text{Jumlah Sel (N)} \times 10^4 \times \text{FP}$$

$$\text{Faktor Pengencer} = \frac{\text{HM} + \text{AK}}{\text{HM}}$$

Keterangan :

N = jumlah sel

FP = faktor pengencer

HM = hemolim (darah udang)

AK = antikoagulan

3.6.2. *Differential Hemocyte Count* (DHC)

Jenis hemosit terdiri dari sel hyalin, sel semi granular dan sel granular. Pengamatan terhadap nilai DHC dilakukan dengan pengamatan terhadap sel hyalin dan sel granular (termasuk sel semi granular) dengan menggunakan rumus (Tampangallo *et al.*, 2012) :

$$\text{Persentase Jenis Sel Hemosit (\%)} = \frac{\text{jumlah hemosit tertentu}}{\text{total sel hemosit}} \times 100\%$$

3.6.3. Kualitas Air

Parameter kualitas air yang diamati terdiri dari amonium, fosfat, nitrit, nitrat yang dilakukan pengamatan menggunakan *test kit* serta kadar pH menggunakan pH meter dan salinitas menggunakan refraktometer.

3.7. Analisis Data

Pengamatan terhadap nilai THC dan DHC akan di analisis menggunakan *software* SPSS versi 25 dengan Uji Normalitas dan Uji Homogenitas terlebih dahulu kemudian dilakukan Uji *Independent T-Test*, untuk mengetahui hubungan dan evaluasi lebih lanjut dari salinitas pemeliharaan terhadap nilai THC akan di analisis dengan Uji Regresi Linear Sederhana, sedangkan pengamatan terhadap kualitas air akan dianalisis secara deskriptif.