

III. BAHAN DAN METODE

3.1. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Balai Benih Ikan (BBI) Fakultas Pertanian Universitas Islam Riau, Jalan Kaharudin Nasution Km 11, Kelurahan Air Dingin, Kecamatan Bukit Raya, Marpoyan, Kota Pekanbaru, selama 1 minggu pada bulan November 2017.

3.2. Bahan dan Alat

3.2.1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi : 1). Telur ikan baung yang sudah terbuahi sebanyak 1500 butir diperoleh dari hasil pemijahan Balai Benih Ikan (BBI) Fakultas Pertanian Universitas Islam Riau, 2). Jamur *Saprolegnia* sp yang menginfeksi telur sebanyak 3000 butir yang berasal dari telur ikan yang mati atau tidak terbuahi, diperoleh dari Balai Benih Ikan (BBI) Fakultas Pertanian Universitas Islam Riau. Telur yang terinfeksi *Saprolegnia* sp tersebut sebelumnya diidentifikasi di Stasiun Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas I Pekanbaru, untuk mengetahui apakah jamur yang digunakan adalah jamur jenis *Saprolegnia* sp. 3). Daun ketapang kering diperoleh dari sekitar pekarangan Fakultas Pertanian Universitas Islam Riau, kemudian daun ketapang diolah menjadi ekstrak di Laboratorium Kimia Universitas Muhammadiyah Riau (UMRI) Pekanbaru, sehingga didapatlah ekstrak daun ketapang dalam bentuk cair sebanyak 500 ml, 4). Potato Dextrose Agar (PDA) pabrikan KGaA, 64271 Darmstadt, Germany dalam bentuk tepung sebanyak 9,75 gr, 5). Aquades sebanyak 250 ml, 6). Alkohol, 7). Tisu, 8). Tusuk

gigi, 9). Zat pewarna metylen blue ,10). Kutek warna putih bening, 11). Sarung tangan latek, 12). Masker, 13). Sabun sunlight cair, 14). Kapas, 15). PK (kalium permanganate), 16). Kertas saring, 17). Kertas label, 18). Etanol 96% .

3.2.2. Alat

Adapun alat yang digunakan dalam persiapan media penelitian adalah sebagai berikut : 1). Timbangan analitik untuk menimbang daun ketapang, 2). Toples plastik ukuran 5 liter sebagai wadah inkubasi telur, 3). Instalasi aerasi yang terdiri dari blower, selang aerasi dan batu aerasi untuk suplai oksigen, 4). **Palintest/UK (ammonia meter)** alat untuk mengukur kadar Amoniak (NH₃), 5). Blender untuk menghaluskan daun ketapang, 6). Peralatan untuk mengukur kualitas air berupa termometer untuk mengukur suhu, dan pH meter untuk mengukur pH air.

Sedangkan alat laboratorium yang digunakan dalam proses pembiakan dan identifikasi Jamur *Saprolegnia sp* adalah sebagai berikut : 1). Mikroskop digital untuk mengidentifikasi Jamur *Saprolegnis sp*, 2). Autoklaf untuk mensterilkan alat-alat, 3). Inkubator untuk menyimpan kultur jamur, 4). UV Laminari air flow sebagai tempat menanam jamur agar terhindar dari kontaminasi, 5). Jarum ose untuk inokulasi jamur, 5). Tabung erlenmeyer digunakan sebagai wadah untuk melarutkan bubuk PDA dan aquades, 6). Lampu bunsen untuk sterilisasi jarum ose, 7). Pipet tetes untuk mengambil bahan cair, 8). Cawan petri sebagai wadah pembuatan medium PDA dan pembiakan jamur, 9). Gelas ukur untuk mengukur aquades dan larutan ekstrak ketapang, 10). Objek glass dan cover glass untuk membuat preparat jamur, 11). Pinset untuk mengambil telur yang berjamur, 12). Alumunium foil untuk penutup tabung erlenmeyer, 13). Jas lab.

3.3. Metode Penelitian

3.3.1. Rancangan Penelitian

Metode penelitian yang digunakan yaitu metode eksperimen dengan melakukan beberapa tahapan pengujian sebagai berikut :

1. Pengamatan uji virulensi Jamur *Saprolegnia* sp pada telur ikan baung.
2. Pengamatan Uji LD₅₀ pada telur ikan baung yaitu konsentrasi ekstrak daun ketapang yang dapat mengakibatkan kematian telur ikan uji sebesar 50% selama 12-24 jam.

Sedangkan Rancangan Penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) satu faktor dengan lima taraf perlakuan dan tiga kali ulangan, dimana perlakuan yang digunakan yaitu penggunaan dosis ekstrak daun ketapang yang berbeda.

Berdasarkan hasil Uji LD₅₀ yang telah dilakukan maka untuk dosis yang digunakan pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

P0 = Tanpa pemberian ekstrak daun ketapang sebagai kontrol

P1 = Pemberian ekstrak daun ketapang dengan dosis 10 ppm

P2 = Pemberian ekstrak daun ketapang dengan dosis 20 ppm

P3 = Pemberian ekstrak daun ketapang dengan dosis 30 ppm

P4 = Pemberian ekstrak daun ketapang dengan dosis 40 ppm

Adapun model rancangan acak lengkap (RAL) satu faktor menurut Sudjana (1992) yaitu :

$$Y_{ij} = U + T_i + E_{ij}$$

Keterangan :

Y_{ij} = Variabel yang akan dianalisis

U = Nilai rata-rata umum

T_{ij} = Pengaruh perlakuan ke-i

E_{ij} = Kesalahan percobaan dari perlakuan

3.3.2. Hipotesis dan Asumsi

Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini adalah :

H_0 = Tidak ada pengaruh pemberian ekstrak daun ketapang (*T. cattapa* L) terhadap daya tetas telur ikan baung (*H. nemurus*) yang diinfeksi jamur *Saprolegnia* sp.

H_1 = Adanya pengaruh pemberian ekstrak daun ketapang (*T. cattapa* L) terhadap daya tetas telur ikan baung (*H. nemurus*) yang diinfeksi jamur *Saprolegnia* sp.

Hipotesis di atas diajukan dengan asumsi sebagai berikut :

1. Ketelitian peneliti pada setiap perlakuan dianggap sama.
2. Penyebaran dan daya serang jamur *Saprolegnia* sp pada wadah penetesan telur dianggap sama.
3. Kualitas telur ikan baung uji yang digunakan dianggap sama.
4. Telur ikan uji yang digunakan untuk seluruh perlakuan pada kondisi lingkungan dianggap sama.

3.4. Prosedur Penelitian

3.4.1. Persiapan Wadah Penelitian

Wadah yang digunakan pada penelitian ini adalah toples dengan ukuran 5 liter yang mana toples tersebut terlebih dahulu disterilkan dengan melakukan pencucian menggunakan kalium permanganat (PK) dengan dosis 20 ppm selanjutnya dibilas dengan air bersih kemudian toples dikeringkan. Setiap toples diberi tanda menggunakan kertas sampel dengan kode sesuai perlakuan, setelah itu dilakukan penyusunan toples secara acak. Selanjutnya toples diisi dengan air bersih yang berasal dari sumur bor yang telah ditampung dalam tangki air sebanyak 4 liter dan diaerasi selama dua hari, selama masa ini toples ditutup dengan menggunakan tutup toples agar terhindar dari debu dan patogen negatif.

Wadah dan alat-alat yang digunakan disterilkan menggunakan larutan kalium permanganat 20 ppm selama 24 jam, kemudian dibilas dengan air bersih yang selanjutnya dikeringkan. Setelah itu dilakukan pengacakan wadah penelitian dan pengisian air bersih, diaerasi selama 3 hari (Syafriadiman *dalam Sine*, 2012).

3.4.2. Pembuatan Ekstrak Daun Ketapang

Ekstraksi adalah proses penarikan komponen/zat aktif dari suatu campuran padatan atau cairan dengan menggunakan pelarut tertentu. Proses ini merupakan langkah awal yang penting dalam penelitian tanaman obat, karena preparasi ekstrak kasar tanaman merupakan titik awal untuk isolasi dan pemurnian komponen kimia yang terdapat pada tanaman (Septina, 2007).

Dalam pembuatan ekstrak daun ketapang terlebih dahulu daun ketapang dibuat simplisia dengan menggunakan bagian dari daun ketapang saja dan membuang tulang daunnya. Simplisia adalah bahan alamiah yang dipergunakan

sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga yaitu berupa bahan yang dikeringkan (Sumino *et al.*, 2013)

Pembuatan simplisia dipilih daun ketapang yang sudah gugur dari pohonnya, dicuci dengan air bersih, kemudian ditiriskan dengan cara digantung tanpa terkena cahaya matahari langsung sampai daun mudah dipatahkan. Setelah kering tulang daunnya dibuang kemudian dihaluskan dengan blender.

Daun ketapang yang digunakan sebaiknya adalah daun yang sudah gugur dari pohonnya karena daun ketapang ini memiliki sifat anti bakteri atau jamur yang lebih baik dari pada ketapang segar (Suganda *et al.*, 2004).

Pembuatan ekstrak daun ketapang dilakukan dengan cara maserasi (perendaman) dengan langkah sebagai berikut; simplisia ditimbang sebanyak 2000 gram, masukkan ke dalam botol gelap kemudian tambahkan larutan etanol 96% sebanyak 3 liter, tutup rapat, tempatkan pada tempat yang terlindung cahaya matahari, dan diamkan selama 4 hari 4 malam, ekstraksi dilakukan berulang-ulang kali hingga sampel terekstraksi secara sempurna yang ditandai dengan pelarut pada sampel berwarna bening. Sampel yang direndam dengan pelarut tadi disaring dengan kertas whatman No. 4 untuk mendapat maseratnya. Kemudian maseratnya dibebaskan dari pelarut dengan menguapkan secara *in vacuo* dengan *rotary evaporator*, setelah itu diperoleh ekstrak daun ketapang sebanyak 500 ml (stok). Larutan ekstrak daun ketapang disimpan dalam botol kaca gelap hal ini dilakukan agar larutan tidak terkena cahaya matahari langsung yang dikhawatirkan dapat merusak kualitas larutan.

3.4.3. Identifikasi Jamur *Saprolegnia* sp

Identifikasi jamur *Saprolegnia* sp dilakukan di Stasiun Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas 1 Pekanbaru. Identifikasi ini dilakukan untuk mendapatkan jamur *Saprolegnia* sp yang digunakan saat penelitian. Identifikasi dilakukan dengan mengambil sampel bagian telur ikan yang terinfeksi atau terdapat jamur dengan tanda-tanda telur ikan tidak menetas dan terdapat benang-benang harus berwarna putih pada telur.

Sebelum jamur diidentifikasi, jamur terlebih dahulu dibiakkan pada medium *Potato Dextrose Agar* (PDA). Pembuatan medium PDA sebagai berikut, medium PDA yang digunakan adalah PDA pabrikan berbentuk bubuk merk KGaA, 64271 Darmstadt, Germany. Kemudian PDA ditimbang seberat 9,75 gram dan masukkan kedalam erlenmeyer kemudian tambahkan 250 ml aquades dan tutup mulut erlenmeyer dengan aluminium foil, setelah itu aduk hingga larutan menjadi homogen dengan cara menggoyangkan erlenmeyer dan memutar berlawanan arah jarum jam. Setelah larutan homogen panaskan larutan di dalam autoklaf lebih kurang selama 60 menit hingga suhu mencapai angka 65°C. Setelah itu tuangkan larutan ke dalam cawan petri dengan ketebalan 2-3 mm lakukan terus pada cawan petri selanjutnya hingga larutan habis. Setelah larutan dituang pada semua cawan petri diamkan hingga larutan memadat atau membentuk agar. Medium PDA yang sudah memadat kemudian disimpan pada inkubator dan siap digunakan.

Penanaman jamur *Saprolegnia* sp dilakukan dengan menyiapkan sampel jamur berupa telur ikan yang terserang jamur. Kemudian telur ikan yang terserang jamur disaring guna memisahkan telur dari air dan kotoran, setelah itu siapkan medium PDA sebanyak 5 buah dan selanjutnya letakkan sampel telur yang

terserang jamur pada bagian tengah medium PDA dengan masing-masing satu butir telur pada setiap medium. Kemudian tutup dengan penutup cawan petri dan beri label pada setiap tutup, medium PDA yang sudah ditanami jamur diinkubasi selama 4-5 hari dalam inkubator.

Setelah diinkubasi selama 4-5 hari jamur akan tumbuh dan memenuhi permukaan medium PDA, jika pada medium PDA terdapat gumpalan kapas putih tebal ini menunjukkan ciri-ciri jamur *Saprolegnia* sp dan ini akan diambil sebagai sampel untuk tahap selanjutnya. Setelah mendapatkan sampel jamur, selanjutnya akan dilakukan pemurnian jamur dengan penanaman jamur pada cover glass. Pertama siapkan cawan petri, letakkan kapas di dalam cawan petri jangan terlalu tebal, basahi kapas dengan aquades usahakan hanya membuat kapas lembab, letakkan dua buah tusuk gigi di atas kapas dengan jarak 3 cm, selanjutnya letakkan objek glass di atas tusuk gigi, ambil potongan medium PDA dengan ukuran 1 cm berbentuk persegi dan letakkan secara hati-hati di atas objek glass, selanjutnya ambil sampel jamur yang sudah dibiakkan dengan cara menggores bagian permukaan jamur dengan jarum ose dan selanjutnya goreskan jarum ose pada medium agar yang berbentuk persegi pada setiap sisinya, kemudian letakkan cover glass di atas medium yang sudah digores jarum ose terakhir tutup kembali cawan petri dengan penutupnya, masukkan ke dalam inkubator dan tunggu 4-5 hari. Setelah 5 hari jamur akan terlihat menempel pada cover glass.

Langkah selanjutnya adalah pembuatan preparat jamur, pembuatan preparat dilakukan agar mudah dalam melakukan identifikasi jamur. Pertama siapkan tisu 5-7 lembar letakkan objek glas di atasnya kemudian teteskan zat pewarna metylen blue sebanyak 2 tetes, letakkan objek glass yang sudah ditumbuhi jamur di

atasnya, kemudian tekan secara vertikal dengan tisu dari atas usahakan jangan tergeser. Bersihkan pinggiran objek glass sampai rapi diamkan beberapa menit setelah itu beri kutek pada pinggir cover glass agar cover glass merekat. Tunggu beberapa menit hingga kutek kering dan preparat bisa diidentifikasi dengan mikroskop.

Identifikasi jamur *Saprolegnia* sp dilakukan dengan menggunakan mikroskop digital dengan metode konvensional melalui pengamatan makrokopis dan mikrokopis. Pengamatan makrokopis meliputi bentuk koloni dan warna koloni. Sedangkan Pengamatan mikrokopis meliputi bentuk hifa dan bentuk spora.

Pengamatan makroskopis menunjukkan koloni jamur berwarna putih seperti kapas tebal spongaria berbentuk bulat, hifa jamur panjang, transparan, membentuk banyak percabangan, tidak beruas dan bentuk spora kecil agak lonjong. Menurut Stoskopf (1993) genus *Saprolegnia* sp memiliki ciri terdapat koloni menyerupai kapas berwarna putih. Menurut Khoo (2000) pengamatan *Saprolegnia* sp di bawah mikroskop menunjukkan hifa berbentuk transparan (hialin), bercabang dan tidak mempunyai sekat pemisah (septa) sehingga hasil identifikasi jamur yang didapat di balai karantina Ikan Pekanbaru benar bahwa isolat tersebut adalah jamur *Saprolegnia* sp.

3.4.4. Uji Virulensi Jamur *Saprolegnia* sp.

Uji virulensi dilakukan untuk mengetahui virulensi atau keganasan jamur dan agar dapat membuktikan bahwa jamur yang digunakan benar-benar bersifat patogen terhadap telur ikan uji, sehingga penyakit jamur tersebut mampu

menginfeksi telur ikan dengan efektif. Selain itu uji virulensi dilakukan untuk mengetahui dosis jamur yang paling efektif dalam menyerang telur ikan uji.

Uji virulensi ini dilakukan dengan cara melakukan penetasan telur ikan yang sudah terbuahi dalam media air yang sudah dimasukkan Jamur *Saprolegnia* sp. Pertama siapkan wadah penetasan telur berupa toples berukuran 5 liter, isi air sebanyak 4 liter dan aerasi selama dua hari dua malam, selama proses aerasi toples ditutup dengan penutup toples hal ini bertujuan agar wadah penetasan terhindar dari patogen negatif. Selanjutnya siapkan telur ikan yang sudah terbuahi, telur diperoleh dari hasil pemijahan Balai Benih Ikan Teropong Universitas Islam Riau. Jamur yang digunakan dalam Uji Virulensi ini adalah jamur *Saprolegnia* sp yang telah menginfeksi telur ikan lele yang tidak terbuahi dengan kriteria terdapat benang halus berwarna putih pada telur.

Selanjutnya uji virulensi dilakukan dengan pertama-tama menyiapkan jamur *Saprolegnia* sp yang telah menginfeksi telur, uji dilakukan dengan dua perlakuan pertama dengan dosis jamur 1:1 yaitu jumlah telur yang terbuahi sebanyak 100 butir dan jamur yang menginfeksi telur sebanyak 100 butir dan kedua dengan dosis 1:2 yaitu telur yang terbuahi sebanyak 100 butir dan jamur yang menginfeksi telur sebanyak 200 butir. Penginfeksian dilakukan dengan mengencerkan jamur terlebih dahulu. Campurkan telur yang terinfeksi dengan sejumlah air, kemudian mengaduk air hingga telur yang berjamur hancur dan air berubah keruh. Ini bertujuan agar hifa dan spora yang terdapat pada telur yang berjamur terlepas dari dinding telur dan melayang-layang dalam air, sehingga spora jamur dapat lebih mudah mencapai atau menyerang telur ikan uji. Setelah itu masukkan air jamur ke dalam wadah penetasan dan aduk, selanjutnya

masukkan telur ikan yang sudah terbuahi sebanyak yang sudah ditentukan dan amati hingga telur menetas. Telur ikan baung akan menetas setelah 24-36 jam, setelah itu telur akan dihitung baik jumlah telur yang menetas, telur yang tidak menetas dan telur yang terserang jamur *Saprolegnia* sp. Dari hasil uji didapatkan hasil pada perlakuan 1:1 yaitu telur yang menetas sebanyak 27 butir, telur yang terserang jamur sebanyak 53 butir dan 20 butir tidak menetas dan tidak terserang jamur. Sedangkan pada perlakuan 1:2 telur yang menetas sebanyak 6 butir, dan sisanya berjumlah 94 butir telur tidak menetas dan terserang jamur.

Berdasarkan hasil Uji Virulensi di atas maka dosis yang akan digunakan pada penelitian selanjutnya adalah dengan perbandingan 1:2 pada telur yang terbuahi dan telur yang terinfeksi jamur.

3.4.5. Uji LD₅₀ Ekstrak Daun Ketapang

Uji LD₅₀ (*Lethal Dosis* 50%) dilakukan untuk mengetahui konsentrasi ekstrak daun ketapang yang dapat menyebabkan kematian sebanyak 50% pada telur ikan uji. Uji LD₅₀ pada ekstrak daun ketapang dilakukan dengan cara melakukan penetasan telur ikan baung yang sudah terbuahi pada media yang sudah ditambahkan larutan ekstrak daun ketapang dengan konsentrasi 10 ppm, 50 ppm, 90 ppm, dan 130 ppm selama 12-24 jam. Berdasarkan hasil Uji LD₅₀ akan dijadikan patokan dasar dalam menentukan konsentrasi ekstrak daun ketapang dalam melakukan penelitian.

Ajizah (2004) menyatakan uji LD₅₀ perendaman dilakukan untuk mendapatkan konsentrasi dengan mortalitas sebanyak 50% selama 12-24 jam pada akuarium 20 liter.

3.4.6. Uji Tantang Ekstrak Daun Ketapang

Uji tantang dilakukan sesuai dengan penelitian yang nanti akan dilakukan. Uji tantang dilakukan dengan langkah-langkah sebagai berikut, pertama masukkan ekstrak daun ketapang sesuai dengan dosis pada setiap perlakuan yaitu P0 tanpa ekstrak daun ketapang, P1 dosis 10 ppm, P2 dosis 20 ppm, P3 dosis 30 ppm dan P4 dosis 40 ppm. kemudian tambahkan telur ikan baung yang sudah terbuahi ke dalam media penetasan sebanyak 100 butir pada setiap perlakuan, selanjutnya siapkan jamur *Saprolegnia* sp yang akan diinfeksi pada telur ikan baung, penginfeksian jamur *Saprolegnia* sp pada telur menggunakan perbandingan 1:2.

Jamur *Saprolegnia* sp yang digunakan adalah jamur yang telah menginfeksi telur ikan dengan kriteria terdapat benang halus berwarna putih pada telur. Telur yang terinfeksi jamur tersebut kemudian dihitung sebanyak 3000 butir yang akan digunakan untuk semua perlakuan. Telur tersebut kemudian diencerkan ke dalam 1500 ml air, aduk hingga telur hancur dan benang-benang halus atau hifa dan spora pada telur lepas hal ini bertujuan agar telur uji dapat terinfeksi dengan maksimal, selanjutnya masukkan jamur yang sudah diencerkan sebanyak 100 ml pada setiap perlakuan, kemudian aduk dengan perlahan agar jamur menebar dengan rata pada media penetasan.

Pengamatan dilakukan setelah telur menetas lebih kurang dalam waktu 24-36 jam. Penghitungan angka penetasan dilakukan secara manual yaitu dengan menghitung satu persatu larva ikan baung.

3.5. Parameter Pengamatan

3.5.1. Intensitas Serangan Jamur

Jamur diamati melalui telur yang terserang jamur *Saprolegnia* sp. Telur-telur yang terserang jamur akan memperlihatkan tanda-tanda di sekeliling telur terdapat benang-benang yang menyelimuti telur seperti benang atau kapas, pengamatan telur yang terserang jamur dilakukan dengan cara visual dan mikrokopis.

3.5.2. Daya Tetas Telur

Penghitungan daya tetas telur dilakukan satu hari setelah telur menetas, penghitungan dilakukan dengan cara manual yaitu dengan mengamati dan menghitung secara langsung pada wadah penetasan. Kemudian persentase daya tetas telur dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut Suseno (1994) :

$$\text{Daya Tetas Telur} = \frac{\text{Jumlah telur yang menetas}}{\text{Jumlah telur keseluruhan}} \times 100\%$$

3.5.3. Kualitas Air

Pengamatan kualitas air meliputi suhu, pH dan NH_3 . Pengukuran suhu menggunakan Thermometer yang dilakukan sebanyak 3 kali setiap harinya yaitu pada jam 07:00, 12:00, 17:00 WIB. Sedangkan pengukuran pH menggunakan kertas pH yang dilakukan pada awal dan akhir penelitian.

3.6. Analisa Data

Pada penelitian ini data yang diamati adalah hasil uji LD_{50} ekstrak daun ketapang, infeksi jamur *Saprolegnia* sp pada telur uji dan daya tetas telur ikan baung pada masing-masing perlakuan, serta pengamatan terhadap kualitas air

yang diduga berpengaruh selama penelitian. Parameter kualitas air yang diukur yaitu suhu, pH dan NH_3 . Data yang diperoleh disajikan dalam bentuk tabel dan grafik untuk memudahkan dalam menarik kesimpulan.

Hasil pengukuran dianalisa dengan menggunakan ANAVA (sidik ragam) pola Acak Lengkap RAL. Bila ANAVA menunjukkan F hitung $<$ F tabel taraf 95%, maka tidak ada pengaruh perlakuan dan bila F hitung $>$ F tabel taraf 99% maka perlakuan ini berpengaruh sangat nyata (Sudjana, 1992). Hasil Analisa Variansi Data yang menunjukkan perbedaan sangat nyata akan dilanjutkan dengan UJI NEWMAN-KEULS.

