

METODE PENELITIAN

Bahan Percobaan

Penyediaan Larva

Larva yang digunakan dalam percobaan ini berasal dari hasil penetasan telur. Telur-telur tersebut untuk tiap tahap percobaan berasal dari induk yang sama yang sudah dipelihara di PT ESAPUTLii PRAKASA UTAMA, Kabupaten Barru, Sulawesi Selatan. Induk-induk tersebut berukuran panjang minimal 60 cm dan bobot sekitar 4 kg.

Selama dalam pemeliharaan, induk-induk tersebut diberi pakan buatan. Untuk memenuhi kebutuhan nutrien, ke dalam 30 kg pakan tersebut ditambahkan 30 kg ikan rucah yang sudah dimasak dan digiling, 1 liter minyak ikan, larutan kanji 500 ml serta vitamin C dan E masing-masing 3 g, selanjutnya dicetak dan dikeringkan. Pakan buatan yang telah diperkaya tersebut diberikan kepada induk sebanyak 2 – 3% dari bobot tubuh per hari. Frekuensi pemberian pakan sebanyak 5 kali per hari dengan selang waktu 2 jam, mulai pukul 08.00 pagi sampai pukul 16.00 sore.

Implantasi hormon dilakukan untuk mempercepat perkembangan gonad serta untuk memperpendek masa istirahat induk bertelur. Hormon yang digunakan adalah LH-RHa (Lutenizing Hormon Releasing Hormon analog) dan 17 alpha metiltestosteron dengan dosis 200 mg/ekor. Implantasi hormon dilakukan tiga sampai lima kali dalam setahun. Rasio induk jantan dan betina dalam pemeliharaan yaitu 1:1. Pemijahan dilakukan secara alami dan berlangsung mulai tengah malam sampai pagi hari.

Telur-telur hasil pemijahan yang tertampung dalam hapa penampungan telur dipindahkan secara hati-hati menggunakan serok halus berdiameter 1.5 mm. Telur-telur tersebut selanjutnya di masukkan ke dalam ember plastik untuk dipisahkan

antara yang baik dengan yang jelek. Pemisahan telur dilakukan dengan menaikkan salinitas media, dengan cara menambahkan garam dapur sampai salinitas mencapai 35 ppt. Telur-telur yang baik akan mengapung, sedang yang jelek akan mengendap.

Telur-telur yang sudah diseleksi tersebut pada sore hari dipindahkan ke wadah penetasan berupa bak fiber volume 1 ton yang berisi air dengan salinitas 30 - 31 ppt. Sebelum ditebar ke dalam media penetasan, telur-telur tersebut diadaptasikan terhadap suhu dan salinitas dan ditebar dengan kepadatan 20 butir /liter. Telur-telur tersebut menetas dalam waktu 24 - 34 jam setelah pemijahan. Telur-telur yang tidak menetas berwarna putih keruh dan tenggelam di dasar wadah. Telur-telur tersebut dikeluarkan dengan jalan penyiponan.

Pemberian *Chlorella* dengan kepadatan berkisar antara 150 - 200 x 10⁴ sel/ml dilakukan pada larva mulai umur satu hari, sedangkan pemberian *Brachionus* yang merupakan pakan larva diberikan mulai larva umur dua hari. Pada larva mulai umur 2 - 14 hari diberi *Brachionus* dengan kepadatan 10 ekor/ml. Kepadatan ditingkatkan menjadi 20 ekor/ml mulai umur 15 - 24 hari dan 30 ekor/ml media mulai umur 25 hari.

Penyediaan Air Media

Air media yang digunakan dalam pemeliharaan larva larva bersalinitas antara 30 - 31 ppt. Untuk mendapatkan air media sesuai dengan salinitas yang dikehendaki, air laut tersebut diencerkan dengan air tawar dengan rumus pengenceran sebagai berikut:

$$S_m = \frac{V_1 \times S_1}{V_1 + V_2}$$

dengan : S_m = Tingkat salinitas air media yang dikehendaki (ppt)
 S_t = Tingkat salinitas air media yang akan diencerkan (ppt)
 V_1 = Volume air laut yang akan diencerkan (liter)
 V_t = Volume air laut yang akan ditambahkan (liter).

Sebelum digunakan sebagai media pemeliharaan, campuran air laut dan air tawar tersebut diaerasi selama 24 jam agar jenuh oksigen terlarut. Skema prosedur pembuatan media percobaan disajikan pada Tabel Lampiran 1.

Penyediaan Pakan

Jenis pakan yang digunakan dalam percobaan ini adalah *Brachionus* dan pakan buatan. Pakan buatan yang digunakan adalah pakan komersial berbentuk mikrokapsul yang berukuran 80 mikron.

Untuk menumbuhkan *Brachionus* digunakan pakan berupa *Chlorella* dan diperkaya dengan minyak ikan yang mengandung asam lemak omega-3. Adapun tahapan kegiatannya adalah sebagai berikut:

1. Budidaya *Chlorella* skala besar

Tujuan budidaya *Chlorella* skala besar adalah menyediakan pakan alami untuk *Brachionus* dan media pemeliharaan untuk larva ikan bandeng. Adapun skema prosedur budidayanya disajikan pada Tabel lampiran 2.

2. Budidaya *Brachionus*

Budidaya *Brachionus* secara massa dilakukan dalam bak-bak kapasitas 24 ton. Sebelum digunakan, bak-bak dan peralatan aerasi dicuci dan disterilkan terlebih dahulu. Selanjutnya ke dalam bak-bak tersebut di masukkan air laut sebanyak 8 ton dan *Chlorella* 2 ton dengan kepadatan sekitar 15 juta sel/ml. Bibit *Brachionus* kemudian ditebar ke dalam bak dengan kepadatan 20 individu/ml. *Chlorella*

sebagai pakan *Brachionus* ditambahkan setiap hari sebanyak 1 ton. *Brachionus* dipanen setelah mencapai kepadatan 50 - 100 individu/ml, biasanya terjadi enam hari setelah penebaran bibit. Sebelum digunakan sebagai pakan, *Brachionus* diperkaya terlebih dahulu dengan minyak ikan yang mengandung asam lemak omega-3. Adapun prosedur pengkayaannya mengikuti prosedur yang dilakukan oleh Takeuchi (1988) sebagai berikut:

- *Brachionus* dimasukkan ke dalam wadah yang berisi air laut sebanyak 25 liter, salinitas 30 - 31 ppt, dengan kepadatan 500 - 1000 ekor/ml
- Emulsi minyak ikan sebanyak 20 ml dan ragi roti sebanyak 5 g dicampur dengan baik di dalam 100 ml air media kultur, selanjutnya dituang ke dalam wadah pengkayaan
 - Pengkayaan berlangsung selama 4 jam dan selama pengkayaan air media diberi aerasi. Lama waktu pengkayaan menurut metode tersebut selama 3 – 6 jam.
- Sebelum digunakan sebagai pakan, *Brachionus* hasil pengkayaan dicuci perlahan-lahan menggunakan air laut untuk menghilangkan sisa-sisa minyak ikan.

Metode Percobaan

Percobaan dilakukan dalam tiga tahap, yaitu untuk: (1) mengevaluasi efektivitas “green water” sebagai media pemeliharaan larva, (2) menentukan tercapainya fase definitive dari organ pencernaan berdasarkan perkembangan organ dan aktivitas enzim pencernaan serta (3) menentukan saat penggunaan pakan buatan yang tepat dalam pemeliharaan larva ikan bandeng

Efektivitas “Green water” Sebagai Media Pemeliharaan Larva

Wadah yang digunakan dalam percobaan ini adalah ember plastik warna jingga sebanyak 21 buah, 9 buah untuk pengamatan pertumbuhan, kelangsungan hidup larva dan kualitas air media, 9 buah untuk pengamatan konsumsi pakan dan 3 buah untuk ikan cadangan.

Percobaan menggunakan rancangan acak lengkap dengan tiga perlakuan dan tiga kali ulangan. Adapun perlakuan yang dicobakan adalah larva dipelihara di dalam media :

- “green water” mulai umur 1 - 12 hari dan “clear water” mulai umur 13 - 36 hari
- “green water” mulai umur 1 - 24 hari dan “clear water” mulai umur 25 - 36 hari dan
- “green water” mulai umur 1 - 36 hari

Media “green water” yang digunakan dalam percobaan ini adalah media dengan salinitas berkisar antara 28 – 32 ppt, ke dalamnya ditambahkan *Chlorella* yang merupakan fitoplankton bersel satu sampai kepadatan mencapai $150 - 200 \times 10^4$ sel/ml. Untuk mencapai kepadatan yang diinginkan, *Chlorella* ditambahkan pada pukul 09.00 pagi setiap hari. Sedangkan yang dimaksud media “clear water” adalah media pemeliharaan yang ke dalamnya tidak ditambahkan *Chlorella*. Selama dalam pemeliharaan, larva diberi pakan berupa *Brachionus* dengan kepadatan 10 individu/ml pada larva mulai umur 2 - 14 hari, 20 individu/ml mulai umur 15 - 24 hari dan 30 individu/ml media mulai umur 25 hari sampai akhir percobaan.

Peubah yang diteliti adalah: (1) tingkat pemanfaatan pakan, (2) pertumbuhan, (3) tingkat kelangsungan hidup dan (4) kualitas air media. Pengamatan tingkat pemanfaatan pakan, merujuk metode yang dilakukan oleh Duray, Estudillo dan Alpasan

(1996) sebagai berikut : satu jam setelah pemberian pakan, diambil 10 ekor larva dari setiap wadah kemudian difiksasi menggunakan larutan formalin 2%. Usus dibedah untuk menentukan "feeding incidence" (jumlah larva yang di dalam saluran pencernaannya mengandung pakan) dan jumlah *Brachionus* yang ada di dalam saluran pencernaan. Pengambilan contoh larva dilakukan pada larva umur 12, 18, 24, 30 dan 36 hari.

Pengukuran pertumbuhan juga dilakukan setiap 12 hari sekali, dengan mengambil contoh larva sebanyak 10 ekor. Setelah ditimbang ikan-ikan tersebut tidak dikembalikan ke dalam wadah semula, tetapi diganti dengan ikan cadangan yang mendapat perlakuan sama. Kelangsungan hidup dihitung pada akhir percobaan, kualitas air media juga diamati setiap 12 hari sekali.

Perkembangan Organ dan Aktivitas Enzim Pencernaan

Perkembangan organ pencernaan. Pengamatan terhadap organ pencernaan secara histologis dilakukan untuk menganalisis perkembangan morfologi organ tersebut yang meliputi lambung (kardiak, pilorik), usus dan hati serta kelenjar-kelenjar yang terkait, untuk menentukan tercapainya fase definitif dari organ tersebut. Pengamatan terhadap organ tersebut dilakukan pada larva ikan bandeng umur 5, 10, 15, 20, 25, 30 dan 35 hari setelah menetas. Pakan yang digunakan dalam percobaan ini adalah *Brachionus* dengan kepadatan 10 individu/ml pada larva mulai umur 2 - 14 hari, 20 individu/ml mulai larva umur 15 - 24 hari dan 30 individu/ml media pemeliharaan mulai umur 25 hari sampai akhir percobaan. Untuk membuat preparat histologis di ambil 10 ekor pada tiap kelompok umur. Adapun tahapan pembuatan preparat histologis adalah sebagai berikut :

- a. Fiksasi dengan menggunakan larutan Bouin selama 24 jam, dilanjutkan pembilasan dengan alkohol 70%
- b. Dehidrasi dengan menggunakan alkohol bertingkat.
- c. Penjernihan dengan menggunakan xylol
- d. Infiltrasi yaitu memasukkan parafin cair ke dalam sampel jaringan, dilanjutkan dengan pencetakan di dalam blok parafin
- e. Pemotongan jaringan dan dilanjutkan dengan pewarnaan menggunakan hematoksilin dan eosin. Preparat diamati di bawah mikroskop dan difoto.

Perkembangan aktivitas enzim pencernaan. Pengamatan terhadap aktivitas enzim pencernaan dilakukan pada larva umur 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30 dan 35 hari (setelah menetas). Enzim yang diukur aktivitasnya yaitu α -amilase, lipase, tripsin dan pepsin.

Seluruh bagian tubuh larva digunakan untuk mengukur aktivitas enzim-enzim tersebut, karena sulit memisahkan organ pencernaan pada larva yang ukurannya masih sangat kecil. Sebelum dilakukan pengukuran aktivitas enzim, beberapa individu dari kelompok umur tersebut diukur bobot dan panjang totalnya. Larva dari tiap kelompok umur tersebut selanjutnya diberi pakan berupa *Brachionus* secara *ad libitum* selama satu jam. Metode ini merujuk cara yang dilakukan oleh Munilla-Moran dan Stark (1989) dan Walford dan Lam (1993).

Bobot contoh larva yang digunakan untuk pengujian adalah 2 gram (untuk analisis α -amilase, lipase, tripsin dan pepsin) dan tiap-tiap pengujian diulang tiga kali. Contoh larva tersebut selanjutnya di masukkan ke dalam wadah dan disimpan dalam lemari pendingin (suhu -10°C) sampai pengujian enzim dilakukan. Junge (1984)

mengemukakan bahwa lipase stabil paling tidak tiga minggu apabila disimpan pada suhu 4°C, sedangkan apabila disimpan pada suhu -20°C stabil lebih lama lagi. Amilase juga stabil selama beberapa minggu apabila disimpan pada suhu 4°C (Pierre dan Tung, 1984).

Pengukuran terhadap aktivitas enzim dilakukan pada temperatur yang rendah, yaitu dengan meletakkan wadah berisi larva di atas es. Air yang menempel pada larva dihilangkan dengan meletakkan larva tersebut di atas kertas saring.

Pengujian aktivitas enzim α -amilase berpedoman pada metode Bernfield *dalam* Knauer *et al.* (1996). Substrat yang digunakan adalah larutan pati, sedangkan bufernya adalah sitrat (pH 5.7). Aktivitas enzim α -amilase diekspresikan sebagai mg maltose yang dibebaskan dari pati dalam waktu 10 menit pada suhu 20°C. Maltose yang dihasilkan diukur secara kolorimeter yaitu dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 550 nm. Kurva standar yang digunakan adalah kurva standar maltose karena produk yang dihasilkan dari aktivitas enzim ini adalah maltose. Metode pengukuran aktivitas enzim tersebut disajikan pada Tabel lampiran 3. Kurva standar yang baik yaitu apabila nilai absorbansinya pada pengukuran aktivitas enzim berada dalam kurva tersebut.

$$\text{Aktivitas amilase} = \frac{\text{konsentrasi produk (mg/ml)} \times \text{faktor pengenceran}}{\text{vol. sampel enzim (ml)} \times \text{waktu inkubasi (menit)}}$$

Aktivitas lipase dideterminasi menggunakan metode Tietz dan Friedreck *dalam* Borlongan (1990), yaitu berdasarkan pengukuran terhadap asam lemak yang dihasilkan oleh hidrolisis enzimatik dari trigliserida yang ada dalam emulsi yang stabil dari minyak zaitun. Bufer yang digunakan adalah 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), sedangkan substratnya adalah minyak zaitun. Volume larutan NaOH standar yang digunakan untuk mentitrasi

asam lemak yang dihasilkan digunakan sebagai indek aktivitas lipase dari ekstrak enzim kasar ("crude enzyme"). Satu unit aktivitas lipase didefinisikan sebagai volume 0.05N NaOH yang dibutuhkan untuk menetralsir asam lemak yang dihasilkan 6 jam inkubasi dengan substrat dan setelah dikoreksi dengan blanko. Metode pengukuran aktivitas enzim tersebut disajikan pada Tabel lampiran 4. Aktivitas lipase diukur dengan menggunakan formula sebagai berikut :

$$\text{Aktivitas lipase} = \frac{(A-B) \times N \text{ NaOH} \times 1000}{W \times T}$$

dengan : A = Volume NaOH untuk titrasi sampel (ml)
 B = Volume NaOH untuk titrasi blanko (ml)
 N = Normalitas NaOH untuk titrasi
 W = Bobot sampel yang digunakan (mg)
 T = Waktu inkubasi (menit)
 1000 = Konversi dari m mol ke μ mol.

Aktivitas protease tipe asam (pepsin) diestimasi menggunakan metode Anson *dalam* Walford dan Lam (1993), sedangkan aktivitas protease tipe basa (tripsin) diestimasi menggunakan metode Kunitz *dalam* Walford dan Lam (1993). Substrat yang digunakan untuk pengukuran aktivitas pepsin adalah haemoglobin dan bufernya adalah glisin-NaCl-HCl (pH 2.0), sedangkan dalam pengukuran aktivitas tripsin digunakan substrat kasein dan buffer fosfat 9 pH 7.6). Adapun metode pengukurannya disajikan pada Tabel lampiran 5. Tirosin digunakan sebagai standar, 1 unit enzim ekuivalen dengan 1 mg tirosin yang dibebaskan dalam 1 menit. Aktivitas protease (pepsin dan tripsin) dihitung dengan menggunakan formula :

$$\text{Aktivitas protease} = \frac{\text{konsentrasi produk (mg/ml)} \times \text{faktor pengenceran}}{\text{volume sampel (ml)} \times \text{waktu inkubasi (menit)}}$$

Penggunaan Pakan Buatan Dalam Pemeliharaan Larva

Rancangan percobaan. Percobaan ini dilakukan dalam tiga tahap yaitu penggantian *Brachionus* dengan pakan buatan mulai umur (1) 10 hari, (2) 15 hari dan (3) 20 hari. Penentuan saat penggantian pakan didasarkan pada percobaan sebelumnya. Pada tiap-tiap tahap percobaan digunakan rancangan acak lengkap dengan tiga perlakuan dan tiga kali ulangan. Adapun perlakuan yang dicobakan adalah larva diberi pakan berupa: (1) *Brachionus*, (2) kombinasi antara *Brachionus* dan pakan buatan serta (3) pakan buatan.

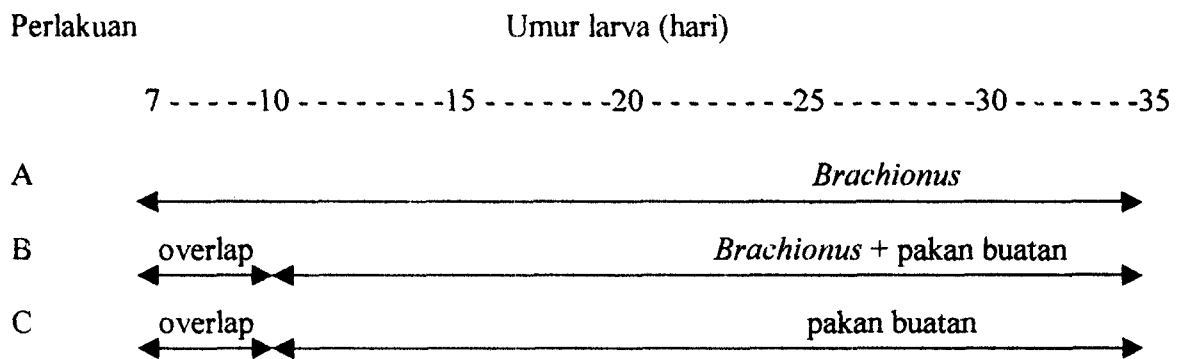
Jumlah *Brachionus* dipertahankan dengan kepadatan 10 individu/ml media pada larva mulai umur 10 – 14 hari, 20 individu/ml media mulai umur 15 – 24 hari dan 30 individu/ml media pemeliharaan mulai umur 25 hari sampai akhir percobaan. Pengontrolan kepadatan *Brachionus* dilakukan dua kali per hari yaitu pada pukul 7 pagi dan 2 siang, untuk menentukan jumlah *Brachionus* yang harus ditambahkan.

Pakan buatan diberikan sebanyak 2 g/m³/hari pada larva mulai umur 10 – 14 hari, 4 g/m³/hari mulai umur 15 – 24 hari dan 6 g/m³/hari mulai umur 25 hari sampai akhir percobaan. Pemberian pakan dilakukan enam kali per hari yaitu pada pukul 7 dan 10 pagi, 1 siang, 4 sore, serta pukul 7 dan 10 malam. Untuk larva yang diberi pakan berupa kombinasi antara *Brachionus* dan pakan buatan, *Brachionus* dipertahankan 5 individu/ml media mulai umur 10 – 14 hari dan ditambah pakan buatan sebanyak 1 g/m³/hari, mulai umur 15 – 24 hari kepadatan *Brachionus* dipertahankan 10 individu/ml media dan ditambah pakan buatan 2 g/m³/hari, sedangkan mulai umur 25 hari sampai akhir percobaan kepadatan *Brachionus* dipertahankan 15 individu/ml media ditambah pakan buatan 3 g/m³/hari. Sebelum percobaan dimulai, larva

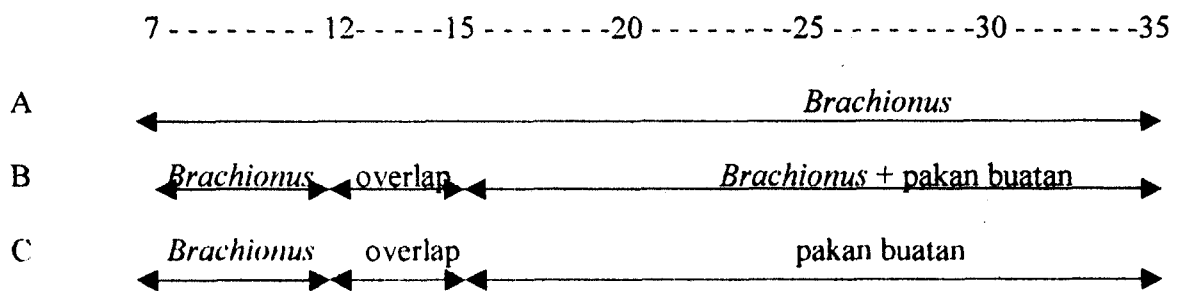
diadaptasikan terhadap lingkungan selama tiga hari dan selama adaptasi khusus larva yang akan mendapat pakan berupa kombinasi antara *Brachionus* dan pakan buatan maupun yang akan diberi pakan buatan dibiasakan terhadap pakan yang digunakan, yaitu larva diberi pakan kombinasi antara *Brachionus* dan pakan buatan.

Jadwal pemberian pakan untuk setiap tahap percobaan adalah sebagai berikut:

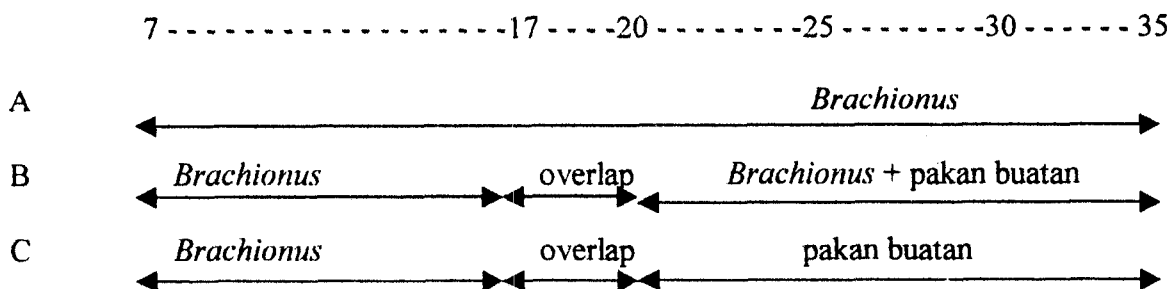
Tahap I



Tahap II



Tahap III



Keterangan: overlap: ikan diberi pakan berupa *Brachionus* + pakan buatan

Pelaksanaan percobaan. Wadah yang digunakan dalam percobaan ini berupa ember plastik warna jingga volume 100 liter sebanyak 63 buah, 27 buah untuk pengamatan vitalitas larva, 27 buah untuk pengukuran aktivitas enzim dan pengamatan struktur organ serta 9 buah untuk ikan cadangan. Tiap-tiap wadah diisi air media sebanyak 75 liter. Media pemeliharaan yang digunakan adalah media "green water" sampai larva umur 24 hari dan "clear water" mulai larva umur 25 hari sampai akhir percobaan, dengan salinitas salinitas 30 – 31 ppt.

Hewan uji yang digunakan tiap tahap percobaan adalah hasil penetasan telur yang berasal dari satu induk. Larva umur 1 – 10 hari dipelihara dalam media "green water" dan diberi pakan berupa *Brachionus* mulai umur 2 hari, dengan padat penebaran larva sebesar 10 ekor per liter.

Penggantian air dilakukan setiap hari untuk menggantikan air yang keluar pada saat penyiponan. Penggantian air sebanyak 50% dilakukan setiap 5 hari sekali. Analisis kualitas air dilakukan setiap 5 hari sekali dan dilakukan sebelum penggantian air.

Pengukuran pertumbuhan dan aktivitas enzim dilakukan setiap 5 hari sekali. Setelah ditimbang, ikan-ikan tersebut tidak dikembalikan ke wadah semula tetapi diganti dengan ikan cadangan yang mendapat perlakuan yang sama dengan bobot relatif sama. Sedangkan kematian larva dihitung pada akhir percobaan.

Peubah-peubah dan cara pengukurannya. Peubah yang diteliti dalam percobaan ini adalah: (1) aktivitas enzim pencernaan, (2) aktivitas enzim eksogen, (3) struktur organ pencernaan, (4) tingkat konsumsi pakan, (5) pertumbuhan, (6) tingkat kelangsungan hidup larva, (7) nilai gizi pakan dan (8) kualitas air media pemeliharaan

1. Aktivitas enzim pencernaan

Aktivitas enzim yang diukur dalam percobaan ini adalah α -amilase, lipase, tripsin dan pepsin. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan pada awal percobaan, selanjutnya setiap lima hari sekali. Larva diberi pakan secara *ad libitum* selama 1 jam. Jenis pakan yang digunakan sesuai dengan perlakuan yang dicobakan. Metode pengukuran aktivitas enzim sama seperti yang dilakukan pada percobaan sebelumnya.

2. Aktivitas enzim eksogen

Untuk mempelajari kemungkinan kontribusi enzim eksogen yang berasal dari pakan digunakan metode modifikasi Munilla-Moran dan Stark (1989) dengan membandingkan aktivitas enzim pada:

- a. Ekstrak larva ikan yang dipuasakan selama 24 jam ditambah dengan *Brachionus* sebanyak dua kali pakan maksimal yang terdapat dalam saluran pencernaan pada tiap-tiap kelompok umur larva. Ekstrak tersebut diinkubasikan selama 30 menit. Jumlah *Brachionus* yang ditambahkan pada saat larva umur 10, 15, 20, 25, 30 dan 35 hari berturut-turut sekitar 30, 80, 130, 200, 360 dan 500 individu per ekor larva atau sekitar 19 400, 18 900, 17 900, 16 700, 16 400 dan 15 200 individu per gram larva ikan.
- b. Larva pada tiap kelompok umur yang diberi pakan berupa *Brachionus* selama 3 jam sebelum pengujian dilakukan.
- c. Larva pada tiap kelompok umur yang diberi pakan buatan selama 3 jam sebelum pengujian dilakukan.
- d. Larva tiap kelompok umur yang dipuasakan selama 24 jam.

Untuk mengevaluasi kemungkinan kontribusi enzim yang berasal dari jaringan selain organ pencernaan juga digunakan metode Munilla-Moran dan Stark (1989), yaitu dengan membandingkan antara aktivitas enzim pada:

- a. Organ pencernaan ikan bandeng umur 60 hari yang diberi pakan berupa *Brachionus*.
- b. Seluruh bagian tubuh ikan bandeng umur 60 hari
- c. Jaringan yang lain, yaitu bagian tubuh ikan tanpa organ pencernaan

Bobot larva pada umur tersebut berkisar antara 0.7 – 1.2 g dengan panjang total antara 4.8 – 6.4 cm.

3. Struktur organ pencernaan

Evaluasi terhadap perkembangan morfologi organ pencernaan secara histologi dan penyimpanan glikogen di hati dilakukan pada awal percobaan, selanjutnya setiap lima hari sekali. Selain itu juga diukur tinggi vili pada lapisan permukaan usus. Pengukuran dilakukan pada gambar potongan melintang dari usus dan dilakukan pada awal dan akhir percobaan.

4. Konsumsi pakan

Pengaruh jenis pakan terhadap konsumsi pakan hanya dievaluasi antara larva yang diberi pakan berupa *Brachionus* dengan yang diberi pakan buatan. Evaluasi dilakukan pada awal percobaan, selanjutnya setiap periode lima hari sekali. Adapun metode pengukuran konsumsi pakan adalah sebagai berikut:

- Larva ikan dipuasakan selama 24 jam. Larva-larva tersebut selanjutnya dibagi menjadi tiga kelompok dan tiap-tiap kelompok diulang tiga kali: (a) diberi pakan berupa *Brachionus*, (b) diberi pakan buatan dan (c) tidak diberi pakan.

- Ikan-ikan tersebut diberi pakan selama satu jam dengan jumlah pakan pada tiap-tiap kelompok umur sesuai dengan yang digunakan dalam percobaan ini per hari.
- Ikan-ikan tersebut selanjutnya dikeringkan di dalam oven selama 15 menit pada suhu 100⁰C dan didinginkan di dalam desikator. Bobot pakan yang dikonsumsi dihitung berdasarkan selisih antara bobot kering ikan yang diberi pakan dengan bobot kering ikan yang tidak diberi pakan.
- Selanjutnya dihitung tingkat konsumsi pakan relatif (%), yaitu merupakan proporsi antara bobot pakan yang dikonsumsi dengan bobot ikan.

Laju konsumsi pakan relatif selama percobaan ditentukan dengan menggunakan rumus

$$\frac{dc}{dt} / W = aW^{b-1}$$

dengan: $\frac{dc}{dt} / W$ = konsumsi pakan relatif pada saat t (%)
 W = bobot individu rata-rata (g)
 $b-1$ = laju konsumsi pakan relatif selama percobaan.

5. Pertumbuhan

Laju pertumbuhan bobot individu selama percobaan ditentukan dengan formula Kamler (1992) sebagai berikut:

$$W_t = W_0 e^{Gt}$$

dengan : W_t = bobot individu rata-rata pada saat t (g)
 W_0 = bobot individu rata-rata pada saat t = 0 (g)
 G = laju pertumbuhan spesifik.

6. Kelangsungan hidup (%)

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

dengan: S = kelangsungan hidup (%)

N_t = jumlah larva ikan pada saat t (ekor)

N_0 = jumlah larva ikan pada saat t = 0 (ekor).

6. Nilai gizi pakan

Nilai gizi pakan yang dievaluasi meliputi kadar protein lemak, karbohidrat, asam amino dan asam lemak esensial.

8. Sifat fisik dan kimia air

Sifat fisik dan kimia air yang diamati meliputi kandungan oksigen terlarut, N-NH₃, pH, suhu dan salinitas. Suhu dan salinitas diukur setiap hari, sedangkan peubah yang lain diukur setiap lima hari sekali sebelum penggantian air. Cara dan alat yang digunakan untuk pengukuran disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Cara dan alat untuk pengukuran sifat fisik dan kimia air media

Peubah	Cara dan alat	Waktu pengukuran
Salinitas (ppt)	Salino refraktometer	Setiap hari
Suhu (°C)	Termometer	Setiap hari (07.00, 14.00)
pH	pH meter	Lima hari sekali (sebelum penggantian air)
Oksigen terlarut (ppm)	Titrasi metode Winkler	Lima hari sekali (sebelum penggantian air)
N-NH ₃ (ppm)	Kolorimeter, metode Brucine (spektrofotometer)	Lima hari sekali (sebelum penggantian air)

Analisis Data

Efektivitas “Green Water” Sebagai Media Dalam Pemeliharaan Larva

Analisis respon kontras polinomial ortogonal (Steel dan Torrie, 1991) diaplikasikan untuk melihat respon tingkat konsumsi pakan, pertumbuhan dan tingkat kelangsungan hidup larva terhadap media pemeliharaan. Analisis ini ditujukan untuk memprediksi pola respon peubah-peubah tersebut serta untuk menentukan lama waktu optimum penggunaan “green water” dalam pemeliharaan larva ikan bandeng.

Perkembangan Organ dan Enzim Pencernaan

Evaluasi terhadap perkembangan morfologi organ pencernaan secara histologi dan aktivitas enzim pencernaan bertujuan untuk mendapatkan informasi yang dapat dijadikan dasar pertimbangan dalam menentukan saat yang tepat melakukan penggantian pakan alami dengan pakan buatan. Evaluasi tersebut berdasarkan tercapainya fase definitif dari organ pencernaan dan saat terjadinya peningkatan relatif terbesar aktivitas enzim. Fase definitif tercapai pada saat organ-organ tersebut sudah tampak dan terletak pada posisinya (Boulhic dan Gabaudan, 1992).

Saat Penggunaan Pakan Buatan Yang Tepat Dalam Pemeliharaan Larva

Untuk mengetahui pengaruh jenis pakan (*Brachionus*, kombinasi antara *Brachionus* dan pakan buatan serta pakan buatan) pada setiap waktu penggantian pakan terhadap aktivitas enzim pencernaan, tingkat konsumsi pakan, tingkat kelangsungan hidup serta pertumbuhan larva digunakan analisis ragam model rancangan acak lengkap dan dilanjutkan dengan uji W-Tukey untuk menentukan jenis pakan yang tepat (Steel dan Torrie, 1991). Terhadap struktur organ pencernaan, evaluasi dilakukan dengan jalan

mengamati apakah perbedaan jenis pakan berpengaruh terhadap perkembangan organ tersebut, sedangkan terhadap kualitas pakan serta sifat fisika dan kimia air media dilakukan analisis secara diskriptif. Evaluasi terhadap kualitas pakan dilakukan dengan jalan membandingkan antara nilai gizi pakan dengan kebutuhan larva, sedangkan terhadap kualitas air media, evaluasi berdasarkan kriteria kelayakan bagi pertumbuhan larva bandeng.