

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober sampai dengan Desember 2012 di Laboratorium Budidaya Perikanan dan Laboratorium Bioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Lampung.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Persiapan Penelitian

3.2.1.1 Pembuatan Media

Adapun alat dan bahan yang digunakan dalam pembuatan media adalah sebagai berikut:

- a. Alat : Petridish (Normax®), tabung reaksi (Iwaki glassTM), erlenmeyer (Pyrex®), *hot stirrer plate* (Stuart CB162TM), corong, lampu bunsen, autoklaf, *sprayer*, *aluminium foil*, timbangan digital, kapas, karet, plastik, kertas kopi dan refrigerator.
- b. Bahan : Alkohol 70%, aquadest, Media TSB (*triptic soy broth*) (CM0129, OXOIDTM), TSA (*triptic soy agar*) (CM0131, OXOIDTM), dan GSP (*glutamate starch phenile*) (VM 183430.032, KGaATM).

3.2.1.2 Pembuatan Vaksin *A. salmonicida*

Adapun alat dan bahan yang digunakan dalam pembuatan vaksin *A. salmonicida* adalah sebagai berikut:

- a. Alat : Jarum ose, spektrofotometer (Genesys-20, Thermospectronic), mikropipet dan sentrifuge⁽⁸⁰⁻²⁾, inkubator, sprayer, vortex (V-1 plus BOECO-GermanyTM).
- b. Bahan : Formaln 1%, isolat bakteri *A. salmonicida*, PBS (*phospat buffer saline*).

3.2.1.3 Persiapan Wadah dan Ikan Uji

Adapun alat dan bahan yang digunakan dalam persiapan penelitian adalah sebagai berikut:

- a. Alat : Akuarium ukuran 60 x 40 x 40 cm³ 18 buah (6 perlakuan dengan 3 kali ulangan), aerator, selang aerasi, dan batu aerasi.
- b. Bahan : Ikan mas (*C. carpio*) dengan bobot sekitar 30 gr sebanyak 180 ekor, dan pakan buatan (pellet) terapung (781-2) yang mengandung protein 31-33%.

3.2.1.4 Pencampuran Pakan

Adapun alat dan bahan yang digunakan dalam pencampuran pakan adalah sebagai berikut:

- a. Alat : Timbangan digital dan spatula.
- b. Bahan : Pakan buatan (pellet), vitamin C (Premiun C dengan kandungan asam askorbat 400mg/100g) dan putih telur (*binder*).

3.2.2 Tahap Pelaksanaan

3.2.2.1. Pemberian Vaksin dan Vitamin C

Adapun alat dan bahan yang digunakan dalam pemberian vaksin dan vitamin C adalah sebagai berikut:

- a. Alat : S spuit dengan needle 26 G ukuran 1 ml (TerumoTM).
- b. Bahan : Pakan buatan (Pellet), vitamin C, dan vaksin inaktif *A. salmonicida*.

3.2.3 Pengamatan

3.2.3.1 Titer Antibodi

Adapun alat dan bahan yang digunakan dalam pengamatan titer antibodi adalah sebagai berikut:

- a. Alat : S spuit dengan needle 26 G ukuran 1 ml, ember, refrigerator, botol falcon (IwakiTM), microtiter plate (REF. 650101, Greiner bio – oneTM ; PS – microplate – 96 well), mikropipet (Nesco®), tabung eppendorf, plastik, dan sentrifuge.
- b. Bahan : Minyak cengkeh (Cap House Brand), sampel darah ikan mas per ulangan (tanpa vaksin dan penambahan vitamin C pada pakan, vaksinasi tanpa penambahan vitamin C pada pakan, vaksinasi dengan penambahan 500 mg vitamin C pada pakan, vaksinasi dengan penambahan 750 mg vitamin C pada pakan, dan vaksinasi dengan penambahan 1000 mg vitamin C pada pakan, antigen (Ag) dan larutan EDTA (LT-BakerTM).

3.2.3.2 Pemeriksaan Darah

Adapun alat dan bahan yang digunakan dalam pemeriksaan darah adalah sebagai berikut:

- a. Alat : Sduit dengan needle 26 G ukuran 1 ml, tabung eppendorf, *haemocytometer*, kaca penutup, pipet tetes, mikroskop, baki, spidol, dan gelas objek.
- b. Bahan : Larutan EDTA 10%, etanol, larutan turk, methanol, giemsa, aquades, dan minyak imersi.

3.2.3.3 Pengukuran Kadar Hematokrit

Adapun alat dan bahan yang digunakan dalam pemeriksaan darah adalah sebagai berikut:

- a. Alat : Tabung hematokrit, sentrifuse
- b. Bahan : Lilin malam, darah ikan mas

3.2.3.4 Analisis Kualitas Air

Adapun alat dan bahan yang digunakan dalam pengamatan analisis kualitas air adalah sebagai berikut:

1. Alat : Termometer suhu, pH meter, dan DO meter
2. Bahan : Sampel air akuarium pemeliharaan ikan mas.

3.3 Desain Penelitian

Penelitian ini disusun dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap terdiri dari 6 perlakuan dan ulangan sebanyak 3 kali. Faktor yang digunakan adalah vaksinasi dan dosis vitamin C. Penentuan dosis berdasarkan penelitian Isnansetyo (1996) yang menambahkan vitamin C pada pakan buatan sebagai imunostimulan untuk pencegahan infeksi bakteri *A. hydrophila* pada ikan lele dumbo (*C. gariepinus*) dan penyuntikan vaksin inaktif *A. salmonicida*. Perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu:

Perlakuan A : Tanpa vaksinasi, tanpa penambahan vitamin C

Perlakuan B : Tanpa vaksinasi dengan penambahan 1000 mg vitamin C/kg pakan.

Perlakuan C : Vaksinasi, tanpa penambahan vitamin C

Perlakuan D : Vaksinasi dengan penambahan 500 mg vitamin C/kg pakan

Perlakuan E : Vaksinasi dengan penambahan 750 mg vitamin C/kg pakan.

Perlakuan F : Vaksinasi dengan penambahan 1000 mg vitamin C/kg pakan.

Model Linier Rancangan Acak Lengkap dengan uji ANOVA yang digunakan adalah sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$$

Keterangan:

Y_{ij} : Nilai pengamatan perlakuan kombinasi vaksin dan vitamin C ke-i terhadap peningkatan imunogenitas ikan mas dari infeksi *A. salmonicida* ulangan ke-j

μ : Nilai tengah umum.

ti : Pengaruh kombinasi vaksin dan vitamin C ke-i terhadap imunogenitas ikan mas dari infeksi *A. salmonicida* pada ikan mas.

εij : Pengaruh Galat Percobaan pada kombinasi vaksin dan vitamin C ke-i terhadap peningkatan imunogenitas ikan mas dari infeksi *Aeromonas salmonicida* ulangan ke-j.

3.4 Metode Penelitian

3.4.1 Persiapan Penelitian

3.4.1.1 Pembuatan Media

Adapun metode pembuatan media pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Alat dan bahan yang akan digunakan disterilisasi terlebih dahulu. Sterilisasi merupakan upaya yang dilakukan untuk membebaskan peralatan dari mikroorganisme kontaminan. Peralatan yang akan digunakan dibungkus dengan kertas kopi yang bertujuan untuk mencegah alat-alat tersebut terkena air, setelah itu dibungkus plastik tahan panas, lalu dimasukkan ke dalam autoklaf. Sterilisasi dilakukan pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15-20 menit.
- b. Media (TSB, TSA, GSP) dipersiapkan (Lampiran 1).
- c. Media yang akan digunakan ditimbang sesuai dengan takaran pada kemasan lalu dimasukkan kedalam labu Erlenmeyer kemudian ditambahkan aquades.
- d. Media dihomogenisasi menggunakan stirrer.
- e. Media TSB dituangkan ke dalam tabung reaksi, media TSA dan GSP kedalam cawan petri. Proses penuangan dilakukan di dekat bunsen agar bakteri yang tidak dibutuhkan tidak tumbuh pada media tersebut.

- f. Media kemudian disterilisasi dengan autoklaf.
- g. Media disimpan dalam refrigerator dan siap digunakan.

3.4.1.2 Pembuatan Vaksin *A. salmonicida*

Adapun metode pembuatan vaksin *A. salmonicida* adalah sebagai berikut:

- a. Isolat bakteri *A. salmonicida* dikultur pada media cair TSB, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang.
- b. Pengkayaan dilakukan dengan menuangkan inokulum *A. salmonicida* dari media TSB ke media TSA lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang.
- c. Bakteri *A. salmonicida* dipanen dengan cara dikumpulkan dengan batang spreader dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer menggunakan corong,
- d. Vaksin diinaktivasi dengan penambahan formalin 1,5% kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang.
- e. Uji viabilitas bakteri dilakukan pada medium spesifik GSP lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang.
- f. Jika bakteri sudah tidak tumbuh, vaksin dicuci menggunakan PBS dengan cara disentrifuse dengan kecepatan 3500 rpm selama 30 menit. Sentrifuse dilakukan sebanyak 3 kali, setiap kali sentrifuse, supernatan dibuang.
- g. Kepadatan vaksin in-aktif dihitung dengan spektrofotometer.

3.4.1.3 Persiapan Wadah dan Ikan Uji

Adapun metode persiapan penelitian adalah sebagai berikut:

- a. Ikan mas dipersiapkan dengan bobot sekitar 30 gr sebanyak 180 ekor lalu diadaptasikan selama 7 hari.

- b. Ikan dipelihara dan diberi pakan berupa pelet.
- c. Selama masa pemeliharaan atau adaptasi dilakukan manajemen kualitas air dengan dilakukan penyiponan setiap pagi.

3.4.1.4 Pencampuran Pakan

- a. Pakan buatan yang digunakan berupa pellet terapung. Pakan buatan ditimbang sebanyak 1 kg.
- b. Vitamin C ditimbang sesuai dosis lalu dicampurkan pada pakan dengan bantuan spatula, ditambahkan putih telur sebagai binder dan diaduk dengan spatula.
- c. Pellet dikeringkan dengan cara diangin-anginkan.

3.4.2. Tahap Pelaksanaan

3.4.2.1 Pemberian vaksin dan vitamin C

Metode pemberian vaksin yang digunakan adalah penyuntikan secara intra peritoneal (i.p) dengan dosis pemberian vaksin 0,1 ml/ikan dengan kepadatan bakteri 10^7 sel/ikan (Kamiso dkk., 2005). Sedangkan vitamin C dicampurkan merata ke dalam pakan, dan dosis vitamin C yang digunakan pada penelitian ini yaitu: 500 mg, 750 mg, dan 1000 mg. Pakan bercampur vitamin C diberikan pada ikan mas setiap hari selama masa 30 hari masa pemeliharaan dengan frekuensi pemberian pakan sebanyak 2 kali sehari yaitu pada pukul 08.00 dan 16.00. Pakan yang diberikan sesuai perlakuan pada masing-masing akuarium dengan jumlah FR 2% (Ringkasan SNI,1999).

3.4.3 Pengamatan

3.4.3.1 Titer Antibodi

Adapun metode pengamatan titer antibodi adalah sebagai berikut:

- a. Ikan diambil dan dimasukkan ke dalam ember lalu terlebih dahulu dibius dengan minyak cengkeh.
- b. Darah diambil menggunakan spuit ukuran 1 ml pada bagian vena caudal.
- c. Serum diambil untuk titer antibodi dari darah ikan pada rentang waktu sebelum divaksin, 7 hari setelah vaksinasi I, dan 7 hari setelah booster (vaksinasi II).
- d. Serum yang di ambil disimpan pada refrigerator. Pengujian dengan metode aglutinasi mengacu pada prosedur standar mikroaglutinasi (Roberson, 1990) dengan sedikit modifikasi sebagai berikut :
 - 1) Serum @ 25 ml dimasukkan ke dalam sumuran 1 dan 2.
 - 2) PBS @ 25 ml dimasukkan ke dalam sumuran 2 – 12.
 - 3) Sumuran kedua direpipping untuk mengencerkan serum, kemudian dilanjutkan ke sumuran 3 sampai 11.
 - 4) Ag @ 25 ml dimasukkan ke dalam sumuran 1 – 12.
 - 5) *Microdiluton plate* digoyang – goyangkan selama 3 menit dengan pola membentuk angka 8.
 - 6) Hasil titer diinkubasi dalam refrigerator selama 1 malam.
 - 7) Pengamatan dilakukan dengan melihat reaksi aglutinasi pada masing – masing sumur. yang ditandai dengan adanya kabut warna keruh/putih atau titik yang menyebar ke seluruh sumuran yang berarti antibodi telah terbentuk.

3.4.3.2 Pemeriksaan darah

Pemeriksaan darah ikan dilakukan dengan menghitung total leukosit. Pengambilan darah dilakukan melalui *vena caudalis* yang berada di pangkal ekor ikan menggunakan spuit 1 ml. Sebelumnya, jarum suntik dan tabung *ependorf* dibilas dengan larutan EDTA 10% untuk mencegah pembekuan darah. Kemudian darah disimpan dalam tabung *ependorf* tersebut. Pengambilan sampel darah ikan dilakukan pada hari ke-0 (sebelum pemberian vaksin dan vitamin C), 7 hari setelah vaksinasi I, 7 hari setelah vaksinasi II.

1) Perhitungan total leukosit menurut Blaxhall dan Daisley (1973) adalah:

1. Bilik hitung *haemocytometer* dan kaca penutupnya dibersihkan dengan etanol, kemudian kaca penutup dipasang pada *haemocytometer*.
2. Sampel darah dihisap dengan pipet berskala sampai 0,5 dilanjutkan dengan menghisap larutan turk sampai skala 11 (pengenceran 1:20), kemudian digoyangkan selama 3 menit agar bercampur homogen.
3. Empat tetesan pertama dibuang, tetesan berikutnya dimasukkan ke dalam *haemocytometer* dengan meletakkan ujung pipet pada bilik hitung tepat batas kaca penutup dan dibiarkan selama 3 menit agar leukosit mengendap dalam bilik hitung.
4. Bilik hitung tersebut diletakkan di bawah mikroskop menggunakan pembesaran lemah.
5. Penghitungan dilakukan pada 4 kotak besar *haemocytometer*.

$$\text{Total leukosit/mm}^3 = \text{jumlah sel leukosit terhitung} \times \text{pengenceran}$$

3.4.3.3 Pengukuran kadar hematokrit

- 1) Sampel darah dimasukkan ke dalam tabung hematokrit sampai kira-kira 4/5 bagian tabung, salah satu ujungnya disumbat dengan lilin malam.
- 2) Sentrifusi dengan sentrifuse hematokrit selama 15 menit dengan kecepatan 3.500 rpm.
- 3) Hematokrit dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Hematokrit} = \frac{B}{A+B+C} \times 100\%$$

Keterangan; A (nilai plasma darah),

B (nilai eritrosit),

C (nilai leukosit).

3.4.3.4 Analisis Kualitas Air

Parameter kualitas air yang diamati adalah oksigen terlarut, pH, dan suhu yang dilakukan setiap hari pada pagi dan sore. Pengukuran parameter kualitas air menggunakan alat ukur kualitas air. Kualitas air dijaga dengan melakukan penyiponan setiap pagi dan dilakukan pergantian air setiap hari (Pratama, 2010).

3.5 Analisis Data

Data hasil pengamatan titer antibodi, hematokrit dan total leukosit yang didapatkan dari hasil penelitian ini dianalisis dengan analisis sidik ragam (ANOVA). Apabila data yang dihasilkan berbeda nyata kemudian dilanjutkan dengan uji BNT dengan selang kepercayaan 95%. Sedangkan data hasil pengamatan kualitas air, dianalisis secara deskriptif.

