

### III. MATERI DAN METODE PENELITIAN

#### A. Waktu dan Tempat

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

#### B. Alat dan Bahan

Adapun alat dan bahan yang di gunakan dalam penelitian di sajikan pada Tabel 2 dan Tabel 3.

Tabel 2. Alat yang di gunakan dalam penelitian

<b>Nama Alat</b>	<b>Spesifikasi/merk</b>	<b>Jumlah</b>
<b>Akuarium</b>	Ukuran 60x40x40cm <sup>3</sup>	12
<b>Aerasi</b>	Aerator, selang dan batu aerasi	12 set
<b>Petridish</b>	Normax®	20
<b>Tabung reaksi</b>	Iwaki glass <sup>TM</sup>	20
<b>Hot Stirer</b>	Stuart CB162 <sup>TM</sup>	1
<b>Corong</b>	Iwaki glass <sup>TM</sup>	2
<b>Sprayer</b>	Canyon- indonesia	2
<b>Jarum ose</b>	Pyrex®	10
<b>Autoclave</b>	Shanshenyiliageixie	1
<b>Inkubator</b>	Pyrex®	1

Tabel 2. (Lanjutan) Alat yang di gunakan dalam penelitian

<b>Nama Alat</b>	<b>Spesifikasi/merk</b>	<b>Jumlah</b>
<b>Sentrifuge</b>	Sentrifuge <sup>(80-2)</sup>	1
<b>Lampu Bunsen</b>	Bahan bakar spritus	4
<b>Spektrofotometer</b>	Genesys-20, Thermospectronic	1
<b>Erlenmeyer</b>	Pyrex®	5
<b>Vortex</b>	V-1 plus BDECO-Germany <sup>TM</sup>	1
<b>Sprit</b>	23G volume 1ml Merk Terumo <sup>TM</sup>	4
<b>Botol Falcon</b>	Iwaki <sup>TM</sup>	4
<b>Baskom</b>	Plastic	2
<b>Sprit</b>	23G volume 1ml, Merk Terumo <sup>TM</sup>	4
<b>Jarum suntik</b>	Dysposable syringe	4
<b>Tabung <i>ependorf</i></b>	Pyrex®. Under lic	10
<b><i>Haemocytometer</i></b>	Marien Feld	1
<b>Mikroskop</b>	Olympus	1
<b>Pipet berskala</b>	Pyrex®	5
<b>Kaca pemulas</b>	Ilford. 2 Merit Rc	10
<b>Kaca objek</b>	Sail Brand 23	10
<b>Tabung reaksi</b>	Iwaki glass <sup>TM</sup>	12
<b>Hematokrit</b>	Iwaki	1
<b>Alat tulis(pulpen,buku)</b>	Standard,Sinar dunia	1
<b>DO meter</b>	Lutron . DO-5509	1
<b>pH meter</b>	Hanna Instruments. Microcomputer. Ketelitian : 0,00 – 14,00	1

Tabel 2. (Lanjutan) Alat yang di gunakan dalam penelitian

<b>Nama Alat</b>	<b>Spesifikasi</b>	<b>Jumlah</b>
<b>Termometer</b>	Japan. 1-100 <sup>0</sup> C	1
<b>Handrefraktometer</b>	Atago. Salinity 0 -100 %. Made in Japan	1

Tabel 3. Bahan yang di gunakan dalam penelitian

<b>Nama Bahan</b>	<b>Spesifikasi</b>	<b>Jumlah</b>
<b>Ikan mas</b>	Panjang total 7-8cm	120
<b>Isolat bakteri A. salmonicida</b>	Isolat Bakteri Koleksi Stasiun Karantina Ikan Kelas I Panjang, Lampung	1 biakan
<b>Pelet</b>	Protein 35% Lemak 3% Kadar abu max 12% Kadar air max 12%	1 pack netto 100gr
<b>Media TSB</b>	CM0129, OXOID <sup>TM</sup>	500gr
<b>Alkohol 70%,</b>	Central Kimia	1 liter
<b>Isolat bakteri A. salmonicida</b>	Isolat Bakteri Koleksi Stasiun Karantina Ikan Kelas I Panjang, Lampung.	1 biakan
<b>PBS (phospat buffer saline)</b>	CM0129, OXOID <sup>TM</sup>	500gr
<b>Ikan uji</b>	Panjang total 7-8cm	120
<b>Vaksin inaktif A. salmonicida,</b>	Isolat Bakteri Koleksi Stasiun Karantina Ikan Kelas I Panjang, Lampung.	1 biakan
<b>Minyak cengkeh 0.01 %</b>	Cap House Brand	1 botol
<b>Larutan EDTA 10%</b>	LT-Baker <sup>TM</sup>	0,5 liter
<b>Etanol,</b>	Central Kimia	0,5 liter
<b>Methanol</b>	Central Kimia	0,5 liter

Tabel 3. (Lanjutan) Bahan yang di gunakan dalam penelitian

<b>Nama Bahan</b>	<b>Spesifikasi</b>	<b>Jumlah</b>
<b>Akuades.</b>	Kimia Farma	5 liter
<b>Kretoseol</b>	Iwaki	4
<b>Darah ikan mas</b>	Diambil dari ikan uji	4 sampel
<b>Sampel air pemeliharaan ikan mas uji.</b>	Sampel air diambil dari masing-masing perlakuan secukupnya	4 sampel

### **C. Metode Penelitian**

Penelitian dirancang dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Terdiri dari 3 perlakuan pemberian vaksin inaktif *A. salmonicida* yaitu metode suntik, rendam, oral dan kontrol (tanpa pemberian vaksin). Tiap perlakuan diulang sebanyak 3 kali ulangan populasi. Dengan asumsi ukuran dan kondisi ikan serta konsentrasi vaksin *A. salmonicida* pada tiap unit percobaan pada masing-masing metode uji adalah homogen.

### **D. Prosedur Penelitian**

#### **1. Tahap Persiapan**

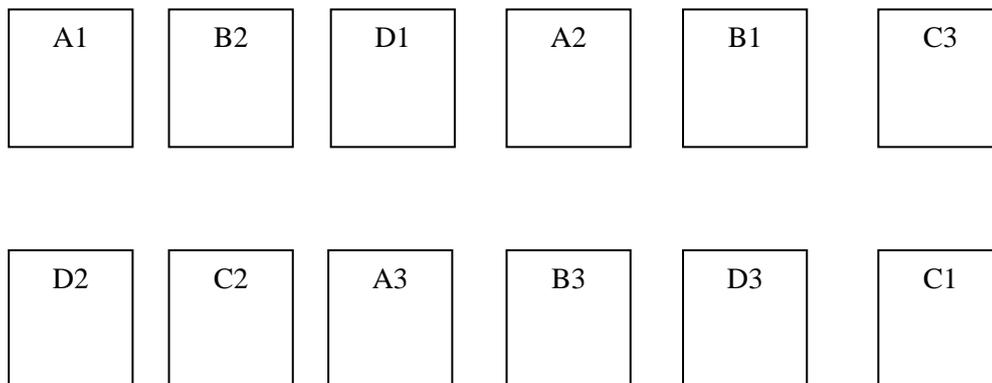
Tahap persiapan terdiri dari sterilisasi alat dan bahan, persiapan wadah dan ikan uji serta pembuatan vaksin inaktif *A. salmonicida*. Adapun uraiannya sebagai berikut.

### 1.1 Sterilisasi Peralatan

Sterilisasi merupakan upaya yang dilakukan untuk membebaskan peralatan dari mikroorganisme kontaminan. Peralatan yang akan digunakan dimasukkan kedalam *autoclave*, dimulai pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 sampai 20 menit (Febriani, 2010).

### 1.2 Persiapan Wadah dan Ikan Uji

Wadah pemeliharaan yang digunakan berupa akuarium berukuran panjang 75 cm, lebar 30 cm dan tinggi 40 cm yang berjumlah 12 unit. Akuarium terdiri dari 4 kelompok perlakuan dengan berbagai metode vaksinasi berupa oral, suntik, rendam dan kontrol yang disusun secara acak, posisi akuarium ditentukan dengan pengundian seperti gambar 3.



Gambar 3. Susunan akuarium sesuai hasil pengundian secara acak.

Keterangan :

Vaksinasi ikan uji ini menggunakan berbagai metode yaitu : (A) metode suntik; (B) metode rendam; (C) metode oral; (D) control.

Akuarium dibersihkan kemudian diisi air yang telah diendapkan selama 24 jam sampai ketinggian 25 cm dan diberi aerasi. Ikan uji dimasukkan kedalam akuarium masing-masing 10 ekor. Ikan uji berupa ikan mas dengan panjang total

7- 8 cm. Ikan uji diaklimatisasi selama 7 hari. Selama proses aklimatisasi dilakukan pengontrolan kualitas air, diberi pakan terapung berupa pellet komersil hiprovit 781-2. Pemberian pakan 3 kali sehari dengan FR masing-masing akuarium yang diberi pakan (Ringkasan SNI, 1999).

### **1.3. Pembuatan Vaksin inaktif *A. salmonicida***

Preparasi vaksin bakterial dengan perlakuan kimiawi (biasanya dengan formalin) (Alifuddin, 2002) dilakukan sebagai berikut :

1. Biakan murni bakteri dalam media cair umur 24 jam dimatikan dengan formalin 0,5% selama 24 jam;
2. Biakan dipanen, kemudian dipusingkan dengan sentrifus 3500 rpm, selama 15 menit; selanjutnya pelet dan supernatannya dipisahkan;
3. Pelet vaksin dicuci dengan PBS 3 kali, sehingga diperoleh pelet vaksin murni sebagai vaksin utuh (*whole cell vaccine*).
4. Pelet vaksin diuji viabilitas pada media GSP apakah vaksin telah inaktif atau masih aktif, jika ternyata setelah diuji bakteri yang telah diinaktivasi tersebut tetap hidup/berkembangbiak maka dilakukan inaktivasi kembali.

## **2. Tahap Pelaksanaan**

### **2.1 Pemberian Vaksin**

Setelah aklimatisasi selama 7 hari, dilakukan vaksinasi 1 yaitu ikan uji dan vaksin inaktif *A. salmonicida* dengan metode suntik, rendam, oral, dan kontrol dengan kepadatan  $10^7$  sel/ikan. Metode suntik dilakukan dengan cara penyuntikan melalui intra peritoneal (i.p.), sedangkan metode rendam dilakukan dengan menambahkan

vaksin dalam akuarium dengan pemberian aerasi kuat agar vaksin dapat terserap oleh ikan dan yang terakhir yaitu oral dilakukan dengan cara memasukkan vaksin dalam mulut ikan dengan spuit. Setelah 7 hari pemberian vaksin 1, dilakukan Vaksinasi ke-2 (booster) dengan metode dan dosis yang sama.

## **2.2 Uji Tantang Pathogen *A.salmonicida***

Uji tantang dilakukan satu minggu setelah vaksinasi ke II (booster), menggunakan metode injeksi yaitu menyuntikkan patogen aktif *A. salmonicida* ke dalam tubuh ikan secara *intraperitoneal* sebanyak 0,1 ml dengan kepadatan  $10^7$  sel ke semua ikan uji dalam perlakuan.

## **3. Tahap Pengamatan**

### **3.1 Pemeriksaan Darah**

Pemeriksaan darah ikan dilakukan dengan menghitung total leukosit dan pengukuran kadar hematokrit. Pengambilan darah dilakukan melalui *vena caudalis* yang berada di pangkal ekor ikan menggunakan spuit 1 cc. Sebelumnya, jarum suntik dan tabung *ependorf* dibilas dengan larutan EDTA 10% untuk mencegah pembekuan darah. Kemudian darah disimpan dalam tabung *ependorf* tersebut. Sampel darah yang diambil sebanyak 0,3 ml. Pengambilan sampel darah ikan dilakukan pada hari ke-0 (sebelum pemberian vaksin), hari ke-7 setelah vaksinasi 1, dan hari ke-14 (setelah vaksinasi ke-2). Pengambilan sampel darah dilakukan dengan metode ulangan populasi pada masing-masing perlakuan.

**a. Perhitungan total leukosit**

Total leukosit dihitung dengan rumus ( Blaxhall dan Daisley, 1973) yaitu:

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 kemudian digoyangkan selama 3 menit agar bercampur homogen.
3. Empat tetes pertama dibuang, tetes 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 *haemocytometer* tersebut diletakkan di bawah mikroskop menggunakan pembesaran lemah 10x.
5. Penghitungan dilakukan pada 4 kotak besar *haemocytometer* (Lampiran 10).

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

**b. Pengukuran kadar hematokrit**

Kadar hematokrit (He) diukur menurut Anderson dan Siwicki (1993). Kadar He ditentukan dengan cara: sampel darah dimasukkan dalam tabung mikrohematokrit sampai kira-kira 3/4 bagian tabung, kemudian ujungnya disumbat dengan crytoseal sedalam 1 mm. Tabung mikrohematokrit yang telah diisi tersebut disentrifus dengan kecepatan 5000 rpm selama 5 menit. Kemudian dilakukan pengukuran panjang darah yang mengendap (a) serta panjang total volume darah yang terdapat

didalam tabung (b) (Gambar 4). Kadar He dinyatakan sebagai % volume padatan sel darah dan dihitung dengan cara =  $(a/b) \times 100\%$

**c. Titer antibodi**

Pengambilan serum darah ikan; sebelum divaksin, 7 hari setelah divaksin, dan 7 hari setelah booster sebanyak 0,2 - 0,3 ml. Pengambilan darah dilakukan dengan menyedot darah ikan menggunakan spuit 1 ml dari bagian vena caudal. Serum yang diambil disimpan pada refrigator. Pengujian dengan metode aglutinasi mengacu pada prosedur standar mikroaglutinasi (Robberson, 1990 *dalam* Agustin, 2012).

Metode mikroaglutinasi, sebagai berikut :

- 1) Dimasukkan serum sebanyak 25 mL ke dalam sumuran 1 dan 2.
- 2) Dimasukkan PBS sebanyak 25 mL ke sumuran 2 – 12. (kecuali sumuran ke – 11, sebagai pembatas).
- 3) Diripeting Sumur 2 untuk mengencerkan serum, dilanjutkan sumur ke-3 – ke-10.
- 4) Dimasukkan Ag H sebanyak 25 ml ke sumuran 1 – 12.
- 5) Microdilution plate digoyang – goyangkan selama  $\pm 3$  menit dengan pola membentuk angka 8 atau huruf S.
- 6) Diinkubasi dalam refrigator selama 1 malam.
- 7) Terbentuknya reaksi aglutinasi pada masing – masing sumur dapat diamati dengan adanya kabut warna keruh/putih atau dot yang menyebar ke seluruh sumuran.

- 8) Adanya reaksi aglutinasi yang terbentuk pada sumuran hingga pengenceran terakhir dicatat.

#### **4. Kualitas Air**

Parameter kualitas air yang diamati adalah suhu, pH, DO yang diukur setiap hari pada pagi dan sore hari. Pengukur suhu, pH, dan DO menggunakan alat ukur kualitas air. Kualitas air dijaga dengan melakukan penyiponan setiap pagi dan dilakukan pergantian air setiap hari sebanyak 10% sampai 20% dari volume air (Pratama, 2010).

#### **5. Gejala Klinis**

Gejala klinis ikan uji diamati selama ujiantang yaitu satu minggu setelah vaksinasi ke-II (booster).

#### **E. Analisis Data**

Analisis data pada penelitian ini, yaitu parameter utama berupa total leukosit, hematokrit (He), dan titer antibodi ikan uji. Setiap perlakuan hingga pengenceran yang tercatat akan dilakukan dengan analisis statistik, disajikan dalam bentuk tabel. Sedangkan parameter pendukung berupa kualitas air akan analisis secara deskriptif.