

### III. METODE PENELITIAN

#### A. Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan pada bulan Januari sampai Februari 2010 yang bertempat di Laboratorium Stasiun Karantina Ikan Kelas I Panjang, Bandar Lampung dan di Laboratorium Kesehatan Ikan dan Lingkungan Balai Besar Pengembangan Budidaya Laut (BBPBL) Desa Hanura, Kecamatan Padang Cermin, Pesawaran.

#### B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang akan digunakan pada penelitian ini adalah suntikan, autoklaf, inkubator, oven, cawan petri, tabung reaksi, gelas ukur, erlenmeyer, pH meter, timbangan digital, blender, mikropipet, termometer, DO meter, jarum ose, bunsen, semprotan alkohol, tisu, plastik *wrapping*, alat bedah, kertas kopi, peralatan aerasi, objek glass dan cover glass, akuarium 15 buah, nampan bedah, mikroskop, *refrigerator*, *stainless stellbase mold*, *Casset Embedding*, *Staining Jar*, *Automatic Tissue Processor*, *Liquid Parafin Dispenser*, Mikrotom Putar, dan *Water Bath*.

Bahan yang digunakan adalah ekstrak daun ketapang, isolat bakteri *A. salmonicida*, ikan patin dengan ukuran  $\pm 15$  cm, media TSA (*Tryptic Soy Agar*), TSB (*Tryptic Soy Broth*), MHB (*Mueller Hinton Broth*), GSP (*Glutamat Starch Phenile*), PBS (*Phospate Buffer Saline*), formalin 80%, aquades, alkohol 70%,

alkohol 80%, alkohol 95%, alkohol Absolut I dan II, Xylol I, II, dan III, Parafin I dan II, larutan pewarnaan H-E, dan Entelan .

### C. Desain Penelitian

Penelitian dirancang dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Terdiri dari 5 perlakuan, yaitu konsentrasi ekstrak daun ketapang kontrol positif dan kontrol negatif. Tiap perlakuan diulang sebanyak 3 kali ulangan. Dengan asumsi ukuran ikan, pada tiap unit percobaan pada masing-masing metode uji homogen.

Adapun bentuk rancangan yang digunakan untuk analisis konsentrasi dengan RAL adalah sebagai berikut :

**Tabel 1.** Penyusunan data untuk Rancangan Acak Lengkap

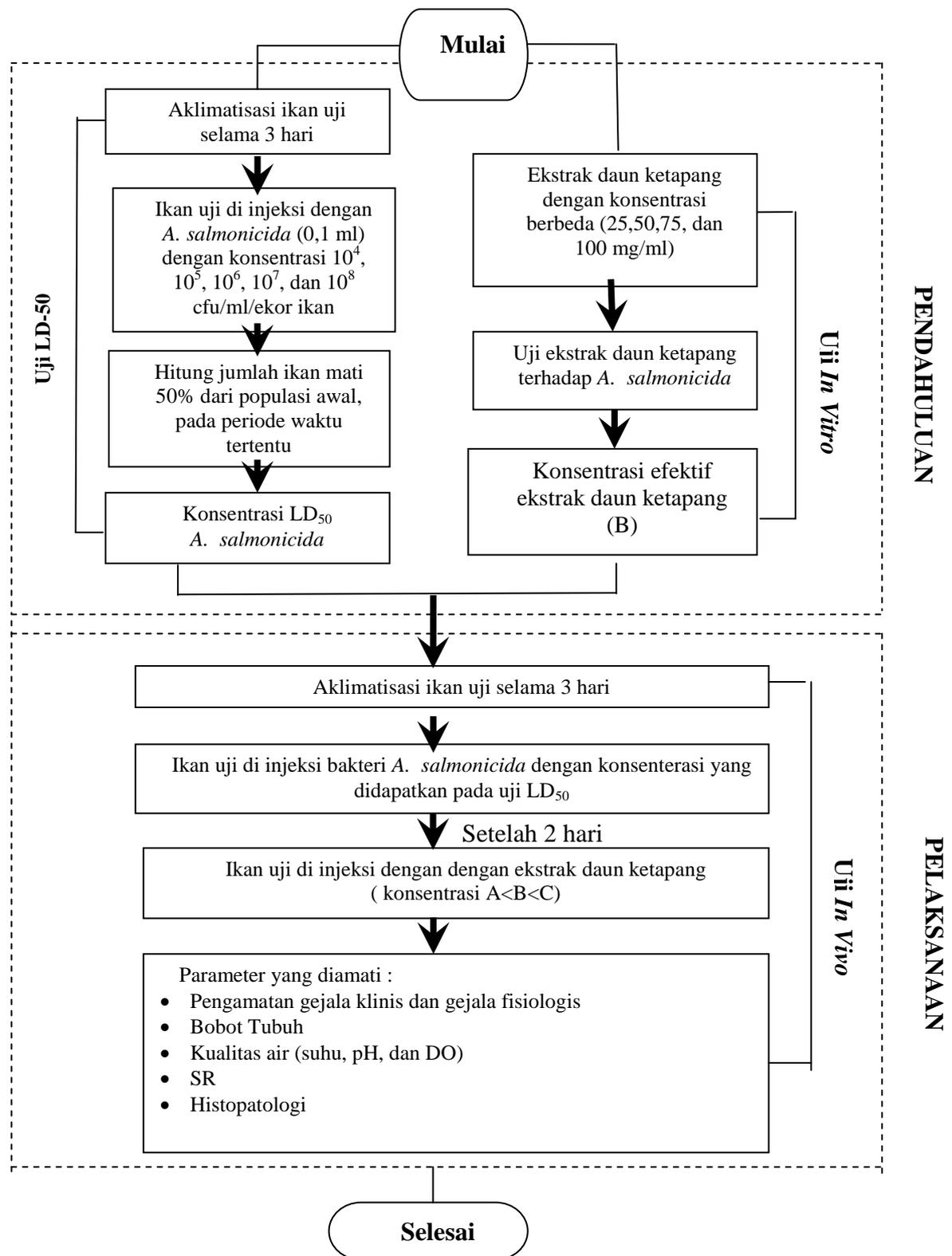
Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-rata ( $\bar{x}$ )
	1	2	3		
A	A1	A2	A3	TA	$\bar{x}_A$
B	B1	B2	B3	TB	$\bar{x}_B$
C	C1	C2	C3	TC	$\bar{x}_C$
K(-)	K-1	K-2	K-3	TK-	$\bar{x}_{K-}$
K(+)	K+	K+2	K+3	TK+	$\bar{x}_{K+}$

Hasil tabel sidik ragam yang menunjukkan beda nyata antar perlakuan kemudian dilanjutkan dengan uji lanjut Beda Nyata Terkecil (BNT) pada selang kepercayaan 95%. Sedangkan data hasil pengamatan uji refleks dan respon makan, penambahan bobot, histopatologi dan kualitas air dianalisa secara deskriptif (Walpole, 1995).

#### **D. Prosedur Penelitian**

Prosedur penelitian (Gambar 5) terdiri dari 3 tahap, yaitu :

1. Tahap persiapan, meliputi sterilisasi alat dan bahan, persiapan wadah dan ikan uji, serta pembuatan ekstrak daun ketapang.
2. Tahap pelaksanaan, meliputi berbagai macam uji diantaranya adalah uji  $LD_{50}$ , uji *in vitro*, dan uji *in vivo*.
3. Tahap pengamatan, meliputi mortalitas, gejala klinis, respon makan, pengamatan secara histopatologi, bobot tubuh, serta kualitas air.



**Gambar 5.** Tahapan penelitian

## **1. Tahap persiapan**

### **a. Sterilisasi alat dan bahan**

Kegiatan sterilisasi dengan tujuan untuk membebaskan alat dan bahan dari kontaminan. Terdapat beberapa jenis sterilisasi, diantaranya adalah sterilisasi basah dan sterilisasi kering. Alat yang digunakan untuk sterilisasi basah adalah diantaranya autoklaf, sedangkan untuk sterilisasi kering menggunakan oven. Alat-alat yang akan disterilisasi dimasukkan ke autoklaf atau oven yang sebelumnya alat-alat tersebut dibungkus dengan menggunakan kertas kopi yang bertujuan untuk mencegah alat-alat tersebut terkena air. Sterilisasi basah dimulai pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$ , tekanan 1 atm dengan waktu 15-20 menit. Sedangkan pada sterilisasi kering dengan menggunakan oven pada suhu  $120^{\circ}\text{C}$  dengan waktu 2 jam.

### **b. Persiapan wadah dan ikan uji**

Wadah atau tempat budidaya yang akan digunakan untuk uji *in vivo* adalah akuarium dengan ukuran 60 cm x 30 cm x 35 cm. Akuarium diisi air sampai ketinggian 20 cm dan diaerasi kuat selama 24 jam. Sebelum digunakan, akuarium dicuci dengan sabun dan didesinfeksi dengan menggunakan PK (Permanganat Kalium) dan didiamkan selama 30 menit lalu dibilas dengan air bersih.

Ikan uji yang digunakan adalah ikan yang berukuran  $\pm 10$  cm sebanyak 10 ekor, sebelum dimasukkan ke akuarium, ikan direndam terlebih dahulu dalam larutan garam dengan konsentrasi 5 ppm selama 5 menit. Perendaman ini bertujuan untuk mengurangi stress serta melepaskan ektoparasit yang menempel. Setelah itu, ikan dipindahkan ke akuarium. Masa pemeliharaan diawali dengan mengadaptasikan ikan terhadap pakan dan lingkungannya yang baru selama 3

hari. Ikan uji diberi pakan buatan berupa pellet terapung (kadar protein 28%) sebanyak 2 kali sehari pada pagi dan sore dengan FR (*feeding rate*) 3%.

### **c. Pembuatan ekstrak daun ketapang**

Berdasarkan penelitian dari Hardhiko *et al.* (2004), daun ketapang yang digunakan adalah daun ketapang yang sudah gugur dari pohonnya karena memiliki sifat antibakteri yang lebih baik dari daun ketapang segar. Daun ketapang dicuci dengan air bersih kemudian ditiriskan pada suhu ruang dengan bantuan cahaya matahari sampai daun mudah dipatahkan. Setelah daun kering, selanjutnya daun dihaluskan dengan blender dan kemudian diayak dengan saringan sampai didapatkan bubuk halus. Bubuk halus daun ketapang disimpan dalam tempat tertutup pada suhu kamar dan tidak terkena sinar matahari langsung. Proses ekstraksi dilakukan dengan melarutkan beberapa gram bubuk daun ketapang dengan akuades steril sesuai dengan dosis yang diinginkan. Campuran antara bubuk daun ketapang dengan air akuades steril diseduh pada suhu 50°C selama 15 menit. Kemudian, hasil seduhan disaring dengan menggunakan kertas saring Whatman supaya didapat ekstrak berupa cairan yang siap digunakan.

## **2. Tahap Pelaksanaan**

### **a. Uji LD<sub>50</sub>**

Uji pendahuluan yaitu uji LD<sub>50</sub> dilakukan untuk mengetahui konsentration bakteri yang bersifat patogenitas yang akan digunakan untuk uji *in vitro* maupun ujiantang.

Uji LD<sub>50</sub> dilakukan dengan cara menyuntikkan bakteri *A. salmonicida* pada ikan patin dengan konsentrasi berbeda yaitu 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup> dan 10<sup>8</sup> cfu/ml/ekor ikan. Masing-masing sebanyak 10 ekor ikan tiap perlakuan. Konsentrasi tiap bakteri yang akan digunakan dengan teknik pengenceran berseri. Sebagai pembanding disediakan kontrol yaitu penyuntikan ikan dengan larutan PBS steril. Penyuntikan dilakukan secara intramuskular sebanyak 0,1 ml per ikan. Pengamatan dilakukan selama 15 hari dengan menghitung jumlah ikan yang mati. Perhitungan LD<sub>50</sub> berdasarkan Reed dan Muench (1938) sebagai berikut :

$$\text{Selang proporsi} = \frac{\text{Kematian di atas 50\%} - 50}{\text{Kematian di atas 50\%} - \text{kematian di bawah 50\%}}$$

$$\text{Log negatif LD-50} = \text{Log negatif konsentrasi di atas 50\%} + \text{selang proporsi}$$

#### **b. Uji *In Vitro***

Uji *in vitro* dilakukan untuk melihat anti bakteri dari ekstrak daun ketapang terhadap bakteri *A. Salmonicida*. Uji ini dilakukan dengan menggunakan metode *Dillussion tubs*, yang meliputi uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dan uji MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*). MIC merupakan suatu pengujian untuk menentukan dosis terendah suatu antibiotik yang dapat menghambat pertumbuhan pathogen. MBC adalah konsentrasi antibiotik yang dapat membunuh bakteri. Dengan demikian dari uji ini dapat diperoleh konsentrasi optimum dari ekstrak daun ketapang yang efektif untuk menghambat atau membunuh bakteri *A. salmonicida* yang akan dijadikan acuan untuk dilakukan uji *in vivo* pada ikan patin.

Uji *in vitro* dengan metode *Dillution tube* dilakukan dengan menggunakan tabung reaksi dengan konsentersasi 25, 50, 75, 100 mg/ml ekstrak daun ketapang pada media MHB (*Mueller Hinton Broth*) yang telah ditanamkan bakteri *A. salmonicida* hasil dari uji LD<sub>50</sub>. Kemudian diinkubasi selama 24 jam. Nilai MIC ditunjukkan oleh konsentersasi terendah yang menunjukkan tidak ada pertumbuhan bakteri (jernih).

Untuk menentukan nilai MBC dari uji MIC adalah dengan menginokulasikan dari tabung uji MIC, mulai dari konsentersasi MIC yang sudah diketahui dan konsentersasi diatasnya, pada media TSA dalam *petridish*. Kemudian diinkubasi selama 24 jam dan diamati pertumbuhan bakterinya. Media TSA yang tidak ada pertumbuhan bakteri adalah konsentersasi antibiotik yang dapat mematikan bakteri sebagai nilai MBC yang selanjutnya digunakan pada uji *in vivo*.

### **c. Uji *In Vivo***

Penelitian utama pada uji *in vivo* terdiri dari pengobatan penyakit akibat infeksi bakteri *A. salmonicida* pada ikan patin dengan ekstrak daun ketapang selain itu juga menggunakan dua kontrol, yaitu kontrol positif dan kontrol negatif. Masing-masing perlakuan terdiri dari 3 kali ulangan dan diamati selama 14 hari.

Kontrol negatif setiap ikan uji disuntik dengan PBS secara intramuskular sebanyak 0,1 ml/ekor sedangkan pada kontrol positif setiap ikan uji disuntik dengan bakteri *A. salmonicida* dengan konsentersasi kepadatan yang dihasilkan dari uji LD<sub>50</sub> sebanyak 0,1 ml/ekor. Perlakuan pengobatan setiap ikan uji disuntik dengan *A. salmonicida* secara intramuskular dengan kepadatan yang sama pada

uji *in vitro* pada hari ke-0 setelah masa adaptasi selama 3 hari. Setelah ikan uji diinfeksi bakteri *A. salmonicida* kemudian setelah 2 hari dilakukan ujiantang dengan memberikan ekstrak daun ketapang. Pemberian konsentrasi ekstrak daun ketapang terdiri dari 3 konsentrasi, yaitu konsentrasi ekstrak daun ketapang di bawah dan di atas konsentrasi terbaik. Konsentrasi terbaik ekstrak daun ketapang didapatkan dari MBC yang merupakan konsentrasi minimum ekstrak daun ketapang yang efektif untuk membunuh bakteri *A. salmonicida*. Ikan patin yang terinfeksi *A. salmonicida* diobati dengan konsentrasi ekstrak daun ketapang dua kali lebih besar dari hasil MBC pada uji *in vitro* (Normalina, 2007).

### **3. Tahap Pengamatan**

#### **a. Respon makan ikan**

Pada pengamatan respon makan ikan dilakukan pada pagi hari selama 14 hari pada saat ikan mulai diberi perlakuan dengan melihat respon ikan uji pada saat pemberian pakan dan sisa pakan yang tersisa. Hal ini bertujuan untuk melihat respon nafsu atau tidaknya makan yang terjadi pada ikan uji.

#### **b. Pengukuran bobot tubuh ikan**

Pengukuran pertambahan bobot tubuh ikan uji dilakukan pada awal dan akhir perlakuan dengan menggunakan timbangan. Ikan uji pada masing-masing akuarium ditimbang bobot tubuhnya, kemudian dihitung persentase pertambahan bobot tubuh ikan uji dengan menggunakan rumus :

$$\Delta W = \frac{W_t - W_0}{W_0} \times 100\%$$

Keterangan :  $\Delta W$  = Pertambahan bobot (%)

$W_t$  = Bobot rata-rata akhir (gram)

$W_0$  = Bobot rata-rata awal (gram)

(Efendi, 1997).

### c. Survival Rate (SR)

Tingkat kelangsungan hidup suatu populasi ikan merupakan nilai persentase jumlah ikan yang berpeluang hidup selama masa pemeliharaan tertentu. Tingkat kelangsungan hidup atau survival rate (SR) akan sangat menentukan produksi yang akan diperoleh dan erat kaitannya dengan ukuran ikan yang dipelihara

Pengamatan terhadap kelangsungan hidup dilakukan setiap hari hingga akhir perlakuan setelah penginfeksi dengan bakteri *A. salmonicida*. Untuk mengetahui tingkat kematian ikan uji selama penelitian dilakukan penghitungan dengan rumus :

$$SR = \frac{\text{Jumlah ikan akhir}}{\text{Jumlah ikan awal}} \times 100\%$$

Keterangan :

SR : Survival Rate

$N_t$  : Jumlah ikan akhir (saat penelitian)

$N_0$  : Jumlah ikan awal (saat penelitian)

(Najiyati, 1992).

#### **d. Pengamatan organ dalam**

Pengamatan organ dalam dilakukan pada akhir perlakuan yang bertujuan untuk mengetahui kelainan yang terjadi, dengan membandingkan organ dalam ikan yang diberi perlakuan dengan organ dalam ikan uji kontrol negatif dan kontrol positif. Dengan cara mengambil satu ekor ikan uji secara acak dari tiap-tiap perlakuan kemudian dibedah dan diamati organ dalam secara makroskopik maupun mikroskopik.

Pengamatan secara makroskopik dengan melihat perubahan morfologi dan warna pada organ dalam ikan uji. Selain itu organ dalam juga diamati secara mikroskopik (histopatologi), untuk mengetahui kerusakan jaringan pada organ dalam tersebut akibat infeksi bakteri *A. salmonicida*

Di dalam pembuatan preparat histopatologi terdiri dari beberapa tahapan yaitu preservasi jaringan, dehidrasi, clearing, infiltrasi parafin dan teknik embedding, serta proses pewarnaan dan kemudian pemeriksaan dengan mikroskop. Proses pembuatan preparat histopatologi berdasarkan acuan metode Kurniasih (1999).

#### **e. Gejala klinis dan pengukuran diameter klinis**

Pengamatan terhadap gejala klinis dilakukan setiap hari setelah ikan uji diinfeksi bakteri *A. salmonicida*.

Pengukuran diameter klinis dilakukan dengan mengukur luas kelainan klinis pada permukaan tubuh ikan dengan menggunakan penggaris, kemudian data yang telah diperoleh diberi skor. Menurut Geetha (2005) dalam Nasution (2003) nilai skor kelainan klinis yaitu :

N = ikan normal	nilai skor = 0
Sm = ikan sembuh	nilai skor = 0
Hi = ikan hiperemia	nilai skor = 1
H = ikan hemoragi	nilai skor = 2
Ne = ikan nekrosis	nilai skor = 3
T = ikan tukak	nilai skor = 4
M = ikan mati	nilai skor = 5

Diameter klinis dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu :

1. Bila diameter kelainan klinis berada diantara 0,1 – 1,4 diberi angka 1
2. Bila diameter kelainan klinis berada diantara 1,5 – 2,4 diberi angka 2
3. Bila diameter kelainan klinis berada diantara 2,5 – 3,4 diberi angka 3
4. Bila diameter kelainan klinis berada diantara 3,5 – 4,5 diberi angka 4

(Angka dalam Sopiana, 2005).

#### **f. Pengukuran kualitas air**

Selama perlakuan kualitas air dijaga dengan melakukan penyiponan, pergantian air, dan penggunaan sistem aerasi. Kualitas air yang diukur meliputi suhu, DO (*Disolved oxygen*), dan pH. Pengukuran ini dilakukan pada awal dan akhir perlakuan.

#### **g. Analisis statistik**

Data yang didapatkan dari hasil penelitian ini dianalisis dengan analisis sidik ragam satu arah (*one way analisis of variant*). Apabila data yang dihasilkan berbeda nyata kemudian dilanjutkan dengan uji lanjut BNT (Beda Nyata Terkecil) pada taraf nyata 5%:

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

Keterangan :

$Y_{ij}$  = pengamatan pada perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

$\mu$  = Rataan umum

$\tau_i$  = Pengaruh perlakuan ke-i

$\varepsilon_{ij}$  = Pengaruh acak pada perlakuan ke-i ulangan ke-j

Dengan asumsi bahwa ukuran ikan, kepadatan jumlah bakteri *A. salmonicida* pada tiap unit percobaan masing-masing metode uji homogen. Data yang digunakan pada uji statistik adalah kelangsungan hidup ikan (SR) dan gejala klinis.