

### **III. METODE PENELITIAN**

#### **A. Waktu dan Tempat**

Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari - Februari 2010, di Laboratorium Stasiun Karantina Ikan Kelas I Panjang, Bandar Lampung dan Laboratorium Budidaya Perairan Fakultas Pertanian Universitas Lampung.

#### **B. Alat dan Bahan**

##### **1. Uji LD-50**

Alat-alat yang digunakan dalam uji LD-50 adalah : akuarium ukuran 50cm x 40cm x 40cm sebanyak 5 buah, ember, *sputit*, sarung tangan, masker, peralatan aerasi, kertas label. Sedangkan bahan-bahan yang digunakan adalah ikan patin ukuran 10 cm sebanyak 50 ekor, tissue, ethanol, minyak cengkeh dan biakan bakteri *A. salmonicida* dengan kepadatan  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  cfu/ml.

##### **2. Uji *In Vitro***

Alat-alat yang digunakan dalam uji *in vitro* adalah : tabung reaksi, rak tabung, vortex, mikropipet, masker, jas lab. Sedangkan bahan yang digunakan adalah PBS (*Phosphate Buffer Saline*), ethanol, aquades steril, media MHB (*Mueller Hinton Broth*), media TSA, biakan bakteri *A. salmonicida* dengan konsentrasi

yang didapatkan dari uji LD-50 dan konsentrasi ekstrak daun ketapang 25, 50, 75, dan 100 gr/ml

### **3. Uji *In Vivo***

Alat-alat yang digunakan adalah : akuarium ukuran 50cm x 40cm x 40cm sebanyak 15 buah, ember, *sputit*, sarung tangan, masker, peralatan aerasi, kertas label, *haemocytometer*, mikroskop, gelas objek, *cover glass*, pipet tetes, *stopwatch* dan baki. Sedangkan bahan-bahan yang digunakan adalah ikan patin ukuran 10 cm sebanyak 150 ekor, tissue, ethanol, minyak cengkeh, biakan bakteri *A. salmonicida* dengan konsentrasi yang dihasilkan dari uji LD-50, ekstrak daun ketapang dengan konsentrasi yang dihasilkan dari uji *in vitro* (konsentrasi ekstrak yang berada diatas dan di bawah konsentrasi yang dihasilkan), EDTA 10%, Asam Asetat 4%, methanol, giemsa, aquades dan minyak imersi.

### **C. Prosedur Penelitian**

Pelaksanaan penelitian terbagi menjadi 3 tahap, yaitu :

- 1) Tahap persiapan, meliputi : sterilisasi alat dan bahan, persiapan wadah dan ikan uji, dan pembuatan ekstrak daun ketapang.
- 2) Tahapan pelaksanaan, meliputi : uji LD-50, uji *in vitro* dan uji *in vivo*.
- 3) Tahap pengamatan, meliputi : respon nafsu makan ikan, pengamatan bobot rata-rata ikan, gejala klinis, pemeriksaan darah, dan kualitas air.

## **1. Tahap persiapan**

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

Pada pelaksanaan penelitian diawali dengan persiapan dan sterilisasi (alat dan bahan). Sterilisasi merupakan upaya yang dilakukan untuk membebaskan alat dan bahan dari mikroorganisme kontaminan. Alat dan bahan yang akan digunakan dalam penelitian dimasukkan ke dalam autoklaf, sebelumnya alat-alat tersebut dibungkus dengan kertas kopi yang bertujuan untuk mencegah alat-alat tersebut terkena air. Sterilisasi dimulai pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$ , tekanan 1 atm dengan waktu 15-20 menit.

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

Wadah budidaya yang akan digunakan untuk uji *in vivo* adalah akuarium dengan ukuran 50cm x 40cm x 40cm. Akuarium disusun dan diberi label secara acak, kemudian diisi air sampai ketinggian 15 cm (30 liter) dan diaerasi kuat selama 24 jam. Sebelum digunakan, akuarium dicuci dengan sabun dan didesinfeksi dengan menggunakan kalium permanganat (PK) kemudian dikeringkan.

Ikan uji yang digunakan adalah ikan yang berukuran 10 cm. Sebelum dimasukkan ke dalam 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.

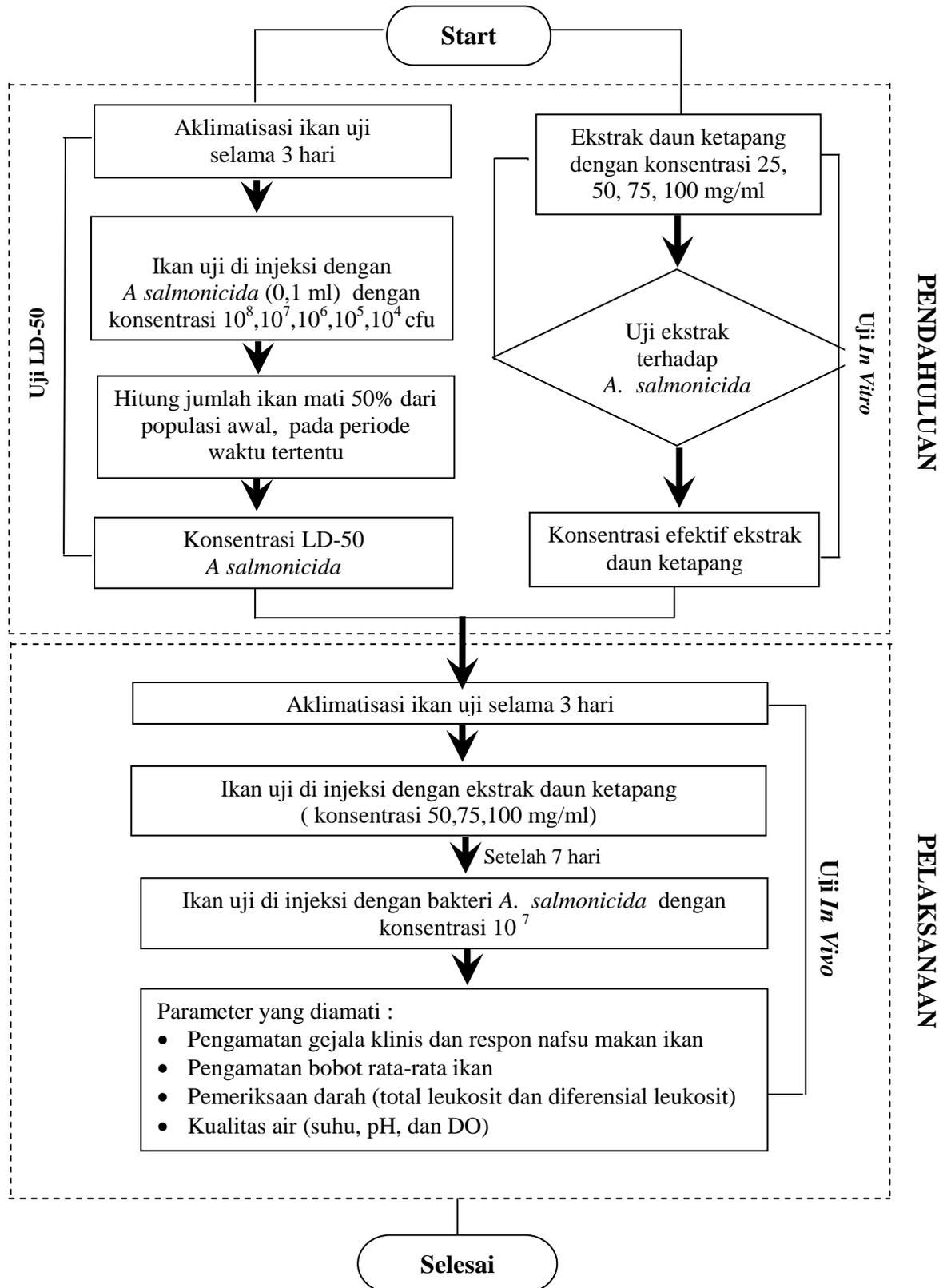
Setelah itu, ikan dipindahkan ke akuarium. Masa pemeliharaan diawali dengan mengadaptasikan ikan terhadap pakan dan lingkungannya yang baru

selama 3 hari. Ikan uji diberi pakan buatan berupa pellet terapung sebanyak 2 kali sehari pada pagi dan sore secara adlibitum.

**c. Pembuatan Ekstrak Daun Ketapang (*Terminalia cattapa* L.)**

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 air 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 supaya didapat ekstrak berupa cairan yang siap digunakan.



PENDAHULUAN

PELAKSANAAN

**Gambar 7.** Tahapan Penelitian

## 2. Tahap pelaksanaan (Uji)

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

Uji pendahuluan yaitu uji LD<sub>50</sub> dilakukan untuk mengetahui konsentrasi 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. Masing-masing sebanyak 10 ekor ikan tiap perlakuan. Konsentrasi tiap bakteri yang akan digunakan dengan teknik pengenceran berseri. Sebagai pembandingan 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 aktivitas anti bakteri dari ekstrak daun ketapang terhadap bakteri *A. salmonicida* uji ini dilakukan dengan menggunakan metode *Dilussion 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 patogen. Sedangkan MBC adalah konsentrasi antibiotik yang dapat membunuh bakteri. Sehingga 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 *Dilution tube* dilakukan dengan menggunakan tabung reaksi dengan konsentrasi 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 konsentrasi terendah yang menunjukkan tidak ada pertumbuhan bakteri (jernih).

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

### c. Uji *In vivo*

Pengujian *in vivo* dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun ketapang terhadap respon kekebalan tubuh ikan patin setelah diinfeksi *A. salmonicida*. Sehingga dari uji ini dapat dilihat potensi ekstrak daun ketapang sebagai imunostimulan. Perlakuan yang diberikan terdiri dari kontrol negatif, kontrol positif dan 3 perlakuan konsentrasi yaitu konsentrasi ekstrak daun ketapang diatas dan dibawah konsentrasi terbaik. Konsentrasi terbaik ekstrak daun ketapang didapatkan dari uji *in vitro* yang merupakan konsentrasi optimum ekstrak daun ketapang yang efektif untuk menghambat atau membunuh bakteri *A. salmonicida*. Pada kontrol negatif setiap ikan uji tidak disuntik dengan bakteri *A. salmonicida* tetapi disuntik dengan PBS secara intramuskular sebanyak 0,1 ml/ekor. Sedangkan, pada kontrol positif setiap ikan uji disuntik dengan bakteri *A. salmonicida* dengan konsentrasi kepadatan yang dihasilkan dari uji LD-50 sebanyak 0,1 ml/ekor.

Ikan uji diinjeksi dengan ekstrak daun ketapang secara intramuskular sebanyak 0,1 ml/ekor yang sebelumnya ikan uji tersebut diaklimatisasi di dalam akuarium selama 3 hari. Kemudian ikan dipelihara selama 7 hari dan dilakukan ujiantang dengan bakteri *A. salmonicida* dengan konsentrasi kepadatan yang dihasilkan dari uji LD-50 sebanyak 0,1 ml/ekor.

Masing-masing perlakuan dilakukan sebanyak 3 kali ulangan dan diamati selama 14 hari, dari ikan diinjeksi ekstrak daun ketapang hingga 7 hari setelah ujiantang dengan parameter yang diamati meliputi respon makan ikan,

pengamatan bobot rata-rata ikan, gejala klinis dan pemeriksaan darah ikan (total leukosit dan diferensial leukosit) dan kualitas air.

### 3. Parameter Utama Yang Diamati

#### 1) Penghitungan Total Leukosit

- Bilik hitung *haemocytometer* dan kaca penutupnya dibersihkan dengan ethanol kemudian kaca penutup dipasang pada *haemocytometer*.
- Sampel darah dihisap dengan pipet hingga skala 0,5 dilanjutkan dengan menghisap larutan Asam asetat 10% sampai sampai tanda 11 (pengenceran 1 : 20), pipet tersebut dipegang sehingga kedua ujung pipet terletak diantara ibu jari dan telunjuk tangan kanan, kemudian dikocok selama 3 menit agar semua eritrosit hemolisis.
- Empat tetesan pertama dibuang dan tetesan selanjutnya diteteskan ke dalam *haemacytometer* dengan meletakkan ujung pipet pada bilik hitung tepat batas kaca penutup dan biarkan selama 3 menit agar leukosit mengendap dalam bilik hitung.
- Bilik hitung tersebut diletakkan di bawah mikroskop menggunakan pembesaran lemah. Kemudian sel-sel leukosit yang terdapat pada empat kotak besar pada sudut-sudut bilik hitung dimana setiap kotak besar terbagi menjadi 16 kotak kecil.
- Perhitungan dilakukan pada 4 kotak besar *haemocytometer*.

$$\text{Total Leukosit/m}^3 = \sum \text{ sel hitung yang dihitung dalam 4 kotak besar } \times \text{ Pengenceran}$$

## 2) Perhitungan Diferensial Leukosit

### Pembuatan sediaan apus darah

- Kaca obyek dibersihkan dengan ethanol. Kemudian diletakkan setetes darah ikan uji kira-kira 1 cm dari ujung sebelah kiri kaca obyek.
- Sisi kiri kaca obyek di pegang dengan ibu jari dan telunjuk tangan kiri. Kaca pemulas di pegang dengan tangan kanan dan diletakkan di depan tetesan darah dan membentuk sudut kira-kira  $30^0$  dari kaca obyek membuka ke kanan.
- Kaca pemulas disentuhkan pada tetesan darah kemudian digeser ke arah kanan sehingga darah tersebut akan menyebar sepanjang sisi kaca pemulas.
- Sudut antara kedua kaca obyek harus dijaga agar tetap  $30^0$  kemudian kaca pemulas tersebut didorong dengan mantap dan cepat sepanjang kaca obyek, selanjutnya dikeringkan di udara. Setelah kering siap diwarnai.

### Cara pewarnaan giemsa

- Sediaan apus darah diletakkan dibaki dengan sediaan di sebelah atas.
- Sediaan tersebut digenangi dengan methanol secukupnya selama 5-10 menit, kemudian kelebihan methanol yang terdapat pada sediaan di buang, selanjutnya digenangi dengan giemsa selama 25 menit.
- Dibilas dengan aquades dan dikering-anginkan.

### ➤ **Pemeriksaan darah**

Pengambilan darah dilakukan melalui vena caudalis yang berada di bawah vertebre. Sebelumnya, jarum suntik dan tabung *effendorf* dibilas dengan larutan EDTA 10% untuk mencegah pembekuan darah. Darah disimpan ke dalam tabung.

Pengambilan darah dilakukan sebelum ikan diinfeksi (hari ke 0), pada hari ke 3 dan hari ke 7 pasca infeksi. Sampel ikan diambil dari tiap ulangan sebanyak 1 ekor pada semua perlakuan. Nilai dari tiap parameter darah merupakan hasil rata-rata dari ulangan pada masing-masing perlakuan.

### **Cara pemeriksaan**

- Minyak immersi diteteskan pada bagian sediaan yang eritrositnya tidak saling menumpuk kemudian diamati dengan pembesaran kuat (obyektif 100x).
- Macam-macam bentuk leukosit dihitung sepanjang sediaan apus darah. Perhitungan dihentikan bila jumlahnya telah mencapai 100 sel leukosit. Hasilnya dihitung dalam %.

#### **4. Parameter Pendukung Yang Diamati**

##### **a. Gejala Klinis**

Pengamatan terhadap gejala klinis dilakukan setiap hari setelah ikan uji diinfeksi bakteri *A. salmonicida* yaitu berupa adanya seperti mata menonjol, radang, hemoragi, tukak, dan mati (Angka dalam Sopiana, 2005).

##### **b. Respon makan ikan**

Pengamatan respon makan ikan dilakukan selama percobaan berlangsung. Pemberian makan dimulai pada saat perlakuan pencegahan sampai hari ke 14 setelah infeksi. Pengamatan respon nafsu makan dilakukan dengan melihat banyaknya pakan yang dimakan oleh ikan tiap akuarium.

##### **c. Pengamatan bobot rata-rata ikan**

Pengukuran bobot rata-rata dilakukan pada awal (pada saat ikan diinjeksi ekstrak daun ketapang) dan akhir (hari ke-7 pasca infeksi) dengan menggunakan timbangan dengan ketelitian 1 gr. Ikan pada masing-masing akuarium ditimbang bobot biomasnya kemudian dihitung nilai rata-rata bobot setiap perlakuan.

**d. Analisis Statistik**

Data hasil penelitian diuji dengan uji statistik yaitu uji t yang terdiri dari 3 tahapan waktu pengamatan dan 5 perlakuan (perlakuan konsentrasi ekstrak daun ketapang yang dihasilkan dari uji in vitro, berupa nilai yang berada diatas dan di bawah, kontrol negatif dan kontrol positif), masing-masing perlakuan dibuat dalam 3 kali ulangan pada selang kepercayaan 95%, dengan mengamati jumlah leukosit dalam darah.