

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September sampai dengan Oktober 2013 di Laboratorium Balai Besar Pengembangan Budidaya Laut (BBPBL) Lampung dan juga di Laboratorium Budidaya Perikanan Fakultas Pertanian Universitas Lampung.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Persiapan Penelitian

A. Penganasan VNN

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

- a. Alat : autoklaf, mortar, cool box, ice pack, ember, aerasi, tabung reaksi.
- b. Bahan : spuit dengan needle 26G ukuran 1 ml (ThermoTM), mikrotube, PBS, ikan kerapu tikus yang terserang VNN, alkohol 70%, masker, sarung tangan, millipore (ThermoTM) 0,45 μ m, ikan kakap putih.

B. Persiapan Wadah dan Ikan Uji

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

- a. Alat : bak ukuran 45x30x35cm 4 buah (4 perlakuan dengan 5 kali ulangan), aerator, selang aerasi, dan batu aerasi.
- b. Bahan : ikan kakap putih putih dengan bobot sekitar 15 gr sebanyak 60 ekor, dan pakan buatan (pellet Megami®) terapung.

C. 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 Megami®), kapsul habatussauda//jintan hitam (HPATM) dan putih telur (*binder*).

3.2.2 Tahap Pelaksanaan

A. Pemberian Imunostimulan dan Uji Tantang

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

- a. Alat : spuit dengan needle 26 G ukuran 1 ml (ThermoTM).
- b. Bahan : pakan buatan (Pellet Megami®), kapsul habatussauda/jintan hitam (HPATM), dan virus VNN.

3.2.3 Pengamatan

A. Pengukuran Kadar Hematokrit

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

- a. Alat : tabung hematokrit dengan heparin, sentrifuse
- b. Bahan : lilin, darah ikan kakap putih

B. Pemeriksaan Darah

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

- a. Alat : spuit dengan needle 26 Gukuran 1 ml, tabung eppendorf, *haemocytometer*, kaca penutup, pipet tetes, mikroskop, baki, spidol, dan gelas objek.
- b. Bahan : larutan EDTA 10%, metanol, larutan turk, aquades, dan minyak imersi.

C. Uji Fagositosis

- a. Alat : spuit 1 ml, refrigerator, microdilution plate, mikropipet, eppendorf, dan sentrifuge.
- b. Bahan : ikan kakap putih yang akan diambil sampel darahnya (serum darah), PBS (*phospat buffer saline*) dan antigen-O *Vibrio alginolyticus*.

D. Analisis Kualitas Air

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

- a. Alat : termometer, pH meter, refraktometer dan DO meter
- b. Bahan : sampel air bak pemeliharaan ikan kakap putih.

3.3 Desain Penelitian

Penelitian ini terdiri dari 4 perlakuan. Perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu:

Perlakuan A : Tanpa diberi jintan hitam

Perlakuan B : Penambahan 2,5% konsentrasi jintan hitam /kg pakan

Perlakuan C : Penambahan 5% konsentrasi jintan hitam /kg pakan.

Perlakuan D : Penambahan 7,5% konsentrasi jintan hitam /kg pakan.

3.4 Metode Penelitian

3.4.1 Persiapan Penelitian

A. Pembuatan Isolat VNN

Adapun metode pembuatan isolat VNN adalah sebagai berikut (Lampiran 2):

1. PBS, tabung reaksi dan mortar disterilisasi dalam autoklaf.
2. mata, otak, ginjal, hati dan jantung diambil dari ikan yang terserang VNN.
3. organ digerus dengan menggunakan mortar dan ditambahkan PBS steril 20 ml.
4. air gerusan disaring dengan menggunakan milipore (Thermo™) 0,45 µm dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi untuk mendapatkan virus VNN yang akan diganaskan.

5. air hasil saringan diambil sebanyak 1ml dengan menggunakan Spuit.
6. ikan media disuntikan secara *intra peritoneal* (i.p) dengan dosis 0,1 ml.
7. ikan media dipelihara dan diamati gejala yang timbul untuk mengetahui apakah virus VNN sudah menginfeksi ikan tersebut.
8. jika ikan media pengganasan sudah mati diulangi langkah kerja pembuatan isolat VNN 3.4.1.1 (metode a-metode e) hasil saringan lalu disuntikkan kepada ikan kakap putih sebagai ikan uji.

B. Persiapan Wadah dan Ikan Uji

Adapun metode persiapan penelitian adalah sebagai berikut:

1. bak ukuran 45x30x35cm sebanyak 4 buah dibersihkan dengan air tawar lalu dicuci kembali dengan menggunakan kaporit diamkan selama 24 jam.
2. bak dibilas lalu diisi air diamkan selama 24 jam, setelah itu dibilas lagi sebanyak 2x, lalu diisi air didiamkan selama 24 jam.
3. ikan kakap putih dipersiapkan dengan bobot sekitar 15 gr sebanyak 60 ekor dalam 4 bak yang masing-masing diisi dengan 15 ekor ikan lalu diadaptasikan di dalam bak selama 7 hari.
4. ikan dipelihara dan diberi pakan berupa pelet.
5. selama masa pemeliharaan atau adaptasi dilakukan manajemen kualitas air dengan dilakukan penyiponan setiap pagi.

C. Pencampuran Pakan

Adapun metode pencampuran pakan adalah sebagai berikut (Lampiran 3):

1. pakan buatan yang digunakan berupa pellet terapung. Pakan buatan ditimbang sebanyak 1 kg.
2. imunostimulan ditimbang sesuai dosis lalu dicampurkan pada pakan dengan bantuan spatula, ditambahkan putih telur sebagai binder dan diaduk dengan spatula.
3. pellet dikeringkan dengan cara diangin-anginkan.

3.4.2. Tahap Pelaksanaan

A. Uji Tantang dan Pemberian Imunostimulan

Adapun metode uji tantang dan pemberian imunostimulan adalah sebagai berikut:

1. ikan disuntik pada bagian *intra peritoneal* (i.p) dengan dosis pemberian virus 0,1 ml/ikan.
2. imunostimulan dicampurkan merata ke dalam pakan, dan dosis imunostimulan yang digunakan pada penelitian ini yaitu: 2,5%, 5%, 7,5%.
3. pakan bercampur imunostimulan diberikan pada ikan kakap putih setiap hari selama 30 hari masa pemeliharaan dengan frekuensi pemberian pakan sebanyak 2 kali sehari yaitu pada pukul 08.00 dan 16.00.
4. pakan yang diberikan sesuai perlakuan pada masing-masing akuarium dengan nilai FR 4% (FAO, 2007).

3.4.3 Pengamatan

A. Pengukuran kadar hematokrit

Pengukuran kadar hematokrit biasa disebut *Packed cell volume*. Pengukuran kadar hematokrit ini dilakukan untuk mengetahui jumlah volume eritrosit/sel

darah merah di dalam tubuh. Adapun metode pengukuran kadar hematokrit adalah sebagai berikut (Lampiran 4):

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

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

Keterangan: A (nilai plasma darah),
B (nilai eritrosit),
C (nilai leukosit).

B. Pemeriksaan darah

- Total Leukosit.

Perhitungan total leukosit dilakukan untuk menentukan jumlah total sel leukosit/mm³ dalam tubuh ikan. Perhitungan total sel leukosit ini dilakukan menurut Blaxhall dan Daisley (1973) adalah (Lampiran 5):

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*.

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

- Pengamatan Diferensial Leukosit

Pengamatan diferensial leukosit (Lampiran 6) dilakukan untuk menentukan persentase tiap-tiap jenis leukosit yang ada di dalam darah ikan.

➤ Pembuatan sediaan apus darah

1. kaca obyek dibersihkan dengan alkohol 70%. Kemudian diletakkan setetes darah ikan uji kira-kira 1 cm dari ujung sebelah kiri kaca obyek.
2. sisi kiri kaca obyek dipegang dengan ibu jari dan telunjuk tangan kiri. Kaca pemulas dipegang dengan tangan kanan dan diletakkan di depan tetesan darah membentuk sudut kira-kira 30° dari kaca obyek membuka ke kanan.
3. kaca pemulas disentuhkan pada tetesan darah kemudian digeser ke arah kanan sehingga darah tersebut akan menyebar sepanjang sisi kaca pemulas, selanjutnya dikeringkan.

➤ Cara pewarnaan giemsa

1. sediaan apus darah diletakkan di baki dengan sediaan apus darah di sebelah atas.

2. sediaan tersebut digenangi dengan methanol secukupnya selama 5-10 menit, kemudian kelebihan methanol yang terdapat pada sediaan dibuang, selanjutnya digenangi dengan giemsa selama 25 menit.
3. dibilas dengan aquades dan dikering anginkan.

➤ Cara pemeriksaan

1. minyak imersi ditetaskan pada bagian sediaan yang leukositnya tidak saling menumpuk, diamati dengan perbesaran 1000x.
2. macam-macam bentuk leukosit dihitung sepanjang sediaan apus darah, perhitungan dihentikan bila jumlahnya telah mencapai 100 sel leukosit, hasilnya dihitung dalam persen (%).

C. Uji Aktivitas Fagositosis

Uji aktifitas fagositosis ini dilakukan untuk mengetahui respon sel-sel fagosit terhadap benda asing yang masuk ke dalam tubuh. Adapun pengujian aktifitas fagositosis adalah sebagai berikut (Lampiran 7):

1. *Vibrio alginolyticus* dikultur pada TSA, dan diinkubasi pada 37°C selama 24 jam.
2. kultur *V. alginolyticus* dipanen dengan penambahan PBS dan dimatikan dengan 2% formalin selama 24 jam.
3. *V. alginolyticus* dicuci dengan menggunakan PBS sebanyak 3 kali dengan sentrifugasi pada 3000 rpm selama 15 menit.
4. kepadatan *V. alginolyticus* diestimasi dengan spektrofotometer.
5. tabung kapiler hematokrit diisi dengan sampel darah+EDTA dan disentrifus dengan cara yang sama seperti pada uji leukokrit dan hematokrit.

6. tabung kapiler hematokrit kemudian dipotong pada batas antara eritrosit dan leukosit, bagian leukosit ditampung pada mikrotube (*effendorf*).
7. leukosit sebanyak 100 μ l dimasukkan dalam *microplate well*, kemudian ditambah dengan *V. alginolyticus* (kepadatan 10^7 sel/ml) dengan volume yang sama.
8. kemudian *V. alginolyticus* dicampur dengan leukosit secara *pipetting* dan diinkubasi selama 20 menit.
9. berikutnya sampel dari *microplate well* diambil sebanyak 5 μ l dan diletakkan pada objek *glass*, dibuat preparat ulas, dan didiamkan dengan cara dikeringanginkan.
10. objek *glass* difiksasi dengan etanol (95%) selama 5 menit, dan dikeringanginkan.
11. kemudian preparat diwarnai dengan safranin (0,15%) selama 10 menit dan diamati dengan mikroskop perbesaran 1000x, minimal 100 sel.
12. sel dengan aktifitas fagositosis dan sel yang tidak beraktifitas fagositosis dihitung minimal 100 sel.
13. kemudian aktifitas fagositosis (AF), dihitung dengan rumus :

$$AF (\%) = \frac{\sum \text{fagosit yang aktif}}{\sum \text{fagosit yang diamati}} \times 100\%$$

D. Perhitungan *Relative Percent Survival* (RPS)

Relative Percent Survival (RPS) merupakan pengamatan jumlah kematian ikan dari masing-masing perlakuan. Pengamatan tingkat kelangsungan hidup dilakukan setiap hari selama 7 hari hingga akhir penelitian dengan mencatat jumlah ikan

kakap putih yang mati pada setiap perlakuan. Kemudian RPS dihitung dengan rumus:

$$RPS = [1 - \frac{\text{Kematian ikan karena perlakuan}}{\text{Kematian ikan kontrol}}] \times 100\%$$

E. Pengukuran Kualitas Air

Pengukuran kualitas air ini dilakukan untuk mengetahui dan mengontrol lingkungan perairan tempat hidup ikan uji saat penelitian berlangsung. Parameter kualitas air yang diamati adalah pengukuran oksigen terlarut (DO) dan suhu yang dilakukan setiap hari pada pagi dan sore juga pH dan salinitas yang diukur setiap seminggu sekali. Pengukuran parameter kualitas air menggunakan alat ukur kualitas air. Kualitas air dijaga dengan melakukan penyiponan setiap pagi dan dilakukan pergantian air setiap hari.

3.5 Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini, yaitu parameter hematologi, *Relative Percent Survival* (RPS) dan parameter kualitas air dianalisis secara deskriptif.