

### **III. METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Waktu dan Tempat**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus-Oktober 2013 di Laboratorium Pembenihan Kuda Laut serta Laboratorium Kesehatan Ikan dan Lingkungan, Balai Besar Pengembangan Budidaya Laut (BBPBL) Lampung.

#### **3.2. Alat dan Bahan**

##### **3.1.1 Persiapan Penelitian**

##### **3.1.1.1 Penganasan *Vibrio alginolyticus* / Uji Kohabitasi**

Alat dan bahan yang digunakan dalam penganasan *V. alginolyticus* adalah:

- a. Alat : cawan petri, pipet tetes, incubator, spuit dengan needle 26 G ukuran 1 ml (Thermo<sup>TM</sup>), bunsen, spreader, lemari es, paraffin,
- b. Bahan : *Trypticase Soy Broth* (TSB), media TCBS, PBS, isolat bakteri *V. alginolyticus*, alkohol 70%, ikan media penganasan bakteri.

##### **3.1.1.2 Persiapan Wadah dan Ikan Uji**

Alat dan bahan yang digunakan dalam persiapan wadah dan ikan uji adalah:

- a. Alat : Bak pemeliharaan ikan (ukuran 45 x 35 x 30 cm) 4 buah, aerator, selang aerasi, batu aerasi, dan selang siphon.

- b. Bahan : Ikan Kakap Putih (*Lates calcarifer*) dengan panjang 10 cm sebanyak 40 ekor dan pakan buatan (*Megami*®).

### **3.1.1.3 Pencampuran Pakan dengan Jintan Hitam**

Alat dan bahan yang digunakan dalam pencampuran pakan dengan jintan hitam adalah:

- a. Alat : Timbangan digital, mangkok, spatula dan nampan.
- b. Bahan : Pakan buatan (*Megami*®), jintan hitam (*HPA*<sup>TM</sup>), dan putih telur (sebagai *binder*).

### **3.1.2 Tahap Pelaksanaan**

#### **3.1.2.1 Pemberian Jintan Hitam dan Uji Tantang**

Alat dan bahan yang digunakan dalam pemberian vaksin dan imunostimulan adalah:

- a. Alat : Spuit dengan needle 26 G ukuran 1 ml (Thermo<sup>TM</sup>).
- b. Bahan : Pakan buatan (*Megami*®), kapsul habatussauda/jintan hitam (*HPA*<sup>TM</sup>) dan isolat bakteri *V.alginolyticus*.

#### **3.2.2.2 Pembuatan Preparat Histopatologi**

Alat dan bahan yang digunakan dalam pembuatan preparat histopatologi adalah:

- a. Alat : seperangkat alat bedah, botol film, kaset *embedding*, botol *winkler*, mesin *paraffin mold*, mikrotom, *floating bath*, *slide glass*, *cover glass*, rak slide, dan refrigerator.

- b. Bahan : sampel ikan uji, *buffer* formalin, larutan *bouine*, alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 95%, alkohol 100%, akuades, formalin, *xylol*, parafin, *hematoxylin*, *eosin*, dan *entellan*.

### **3.1.3 Pengamatan**

#### **3.2.3.1 Pengamatan Preparat Histopatologi**

Alat dan bahan yang digunakan dalam analisa kualitas air adalah:

- a. Alat : Mikroskop binokuler, kamera, dan komputer.
- b. Bahan : Preparat histopatologi yang sudah jadi.

#### **3.2.3.2 Analisa Kualitas Air**

Alat dan bahan yang digunakan dalam analisa kualitas air adalah:

- a. Alat : Termometer suhu, pH meter, dan DO meter.
- b. Bahan : Sampel air dalam pemeliharaan ikan kakap putih.

### **3.3. Desain Penelitian**

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan penambahan jintan hitam 0 gr/kg pakan sebagai perlakuan A, 25 gr/kg pakan sebagai perlakuan B, 50 gr/kg pakan sebagai perlakuan C, dan 75 gr/kg pakan sebagai perlakuan D dan jumlah ikan sebagai ulangan. Penentuan perlakuan dilakukan secara acak menggunakan tabel acak.

Persamaan yang digunakan adalah:

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

Keterangan :  $Y_{ij}$  : Pengaruh perlakuan ke-I dan ulangan ke-j

$\mu$  : Rataan Umum

$\tau_i$  : Pengaruh dosis jintan hitam ke-i

$\epsilon_{ij}$  : Galat Percobaan

### **3.4. Persiapan Penelitian**

#### **3.4.1. Wadah**

Wadah yang digunakan adalah bak plastic ukuran 60 x 40 x 40 cm<sup>3</sup>. Persiapan wadah dimulai dengan pencucian dan sterilisasi bak menggunakan kaporit serta diaerasi selama 24 jam. Pengisian air dilakukan 1 hari setelah pengeringan bak kemudian diaerasi kembali selama  $\pm 3$  hari.

#### **3.4.2. Hewan Uji**

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah kakap putih dengan panjang  $\pm 10$  cm yang diperoleh dari BBPBL Lampung. Ikan diaklimatisasi selama satu minggu.

#### **3.4.3. Media Uji**

Media uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah air laut dengan salinitas 30 ppt. Persiapan media uji dilakukan dengan penyaringan menggunakan filter fisik yang terdiri dari arang batok, arang kayu dan pasir. Hasil penyaringan ini ditampung dalam bak tandon besar yang selanjutnya akan digunakan sebagai stok air ketika sudah dilakukan penyiponan secara rutin.

### 3.4.4. Pencampuran Ekstrak Jintan Hitam Dalam Pakan

Pencampuran jintan hitam dalam pakan dilakukan menggunakan perekat (*binder*) berupa putih telur. Formulasi pakan dengan jintan hitam yang diberikan selama penelitian disajikan dalam Tabel 1.

Tabel 1. Formulasi campuran pakan dengan jintan hitam

No	Perlakuan	Pakan (gram)	Jintan Hitam (gram)	Jumlah
1.	A	1000	0	1000 gram
2.	B	975	25	1000 gram
3.	C	950	50	1000 gram
4.	D	925	75	1000 gram

### 3.5. Pelaksanaan Penelitian

#### 3.5.1. Pemberian Perlakuan

Pemberian pakan dilakukan sebanyak 2 kali sehari yaitu pada pukul 08.00 dan 16.00. Pemberian pakan tiap harinya disesuaikan dengan feeding rate ikan kakap putih yaitu 4% dari bobot biomassa. Penyiponan dilakukan sebanyak 50% dari volume awal dan diganti dengan air baru dari bak tandon.

#### 3.5.2. Uji Kohabitasi bakteri *Vibrio alginolyticus*

Uji Kohabitasi bakteri dilakukan untuk mendapatkan isolat murni bakteri aktif yang selanjutnya digunakan pada ujiantang. Bakteri *V. alginolyticus* berasal dari laboratorium kesehatan ikan BBPBL Lampung. Pada uji kohabitasi bakteri dilakukan 2 tahap injeksi agar memperoleh isolat yang mampu membuat ikan sakit. Tahap-tahap uji kohabitasi bakteri adalah:

- 1) Isolat murni *V. alginolyticus* diinokulasi pada 2 tabung TSB

- 2) *V. alginolyticus* diinjeksikan pada 3 ekor ikan stok dengan dosis 0,1 ml/ikan. Ikan diamati hingga menunjukkan gejala infeksi bakteri *V. alginolyticus*.
- 3) Bakteri *V. alginolyticus* diambil dari ikan sakit kemudian diinokulasi pada media TCBS, dan diinkubasi selama 18-24 jam.
- 4) *V. alginolyticus* pada media TCBS diinokulasi ke media TSB, kemudian diinkubasi selama 18-24 jam.
- 5) Bakteri *V. alginolyticus* pada media TSB diencerkan dengan larutan PBS hingga diperoleh kepadatan  $24 \times 10^7$  sel/ml menggunakan standar Mc. Farland.
- 6) Tahap 2 hingga 5 dilakukan sekali lagi hingga bakteri *V. alginolyticus* dapat digunakan pada ujiantang.

### **3.5.3. Ujiantang dengan bakteri *Vibrio alginolyticus***

Ujiantang dilakukan pada hari ke-39 setelah perlakuan. Kepadatan bakteri *V. alginolyticus* yang digunakan adalah  $24 \times 10^7$  sel/ml. Metode ujiantang yang digunakan adalah penyuntikan secara *intra peritorial* (i.p.) dengan dosis 0,1 ml/ikan

### **3.5.4. Parameter pengamatan**

#### **1) Kualitas air**

Pengujian kualitas air dilakukan di laboratorium uji kualitas air BBPBL Lampung. Sampel air diambil setiap minggu sebanyak 100 ml. Parameter kualitas air yang diamati yaitu pH, amoniak dan salinitas. Oksigen terlarut dan suhu dilakukan setiap hari pada pagi pukul 08.00 dan sore pukul 16.00, masing-masing menggunakan DO-meter dan termometer.

## 2) Gejala klinis

Pengamatan gejala klinis dilakukan setelah ujiantang selama 7 hari. Gejala yang diamati mulai dari nafsu makan, cara berenang, produksi lendir, dan luka-luka yang terjadi di permukaan tubuh ikan.

## 3) Profil histologi

Sampel ikan yang akan diamati profil histologinya berjumlah 13 ekor. Masing-masing perlakuan diambil 3 ekor secara acak dan 1 ekor dipilih yang paling sehat secara visual sebagai kontrol positif. Organ yang digunakan untuk pengamatan profil histologi adalah mata, otak, hati, ginjal dan insang. Organ hati ginjal dan insang yang menjadi pusat pengamatan karena ketiga organ ini yang lebih efektif diamati untuk serangan bakteri. Organ mata dan otak sebagai pembanding untuk organ-organ lain dan menjadi data pendukung. Hasil pengamatan dibawah mikroskop didokumentasikan dalam bentuk gambar. Hasil pengamatan tiap perlakuan dapat dilihat perbedaannya berdasarkan tingkat *prevalence*. Hasil utama yang ingin diperoleh adalah perbandingan perlakuan jintan hitam dengan penambahan jintan hitam 2,5%, 5%, dan 7,5% terhadap perlakuan 0% (kontrol negatif) dan ikan yang paling sehat (kontrol positif). Jenis kerusakan jaringan yang diamati adalah perubahan ukuran sel (*hiperplasia* dan *hipoplasia*), penumpukan zat besi (Fe) pada pembuluh darah (*hemosiderin*), nekrosis, *hipertropi*, degenerasi sel, dan *infiltrasi leukosit*.

#### 4) **Relative Percent Survival (RPS)**

Relative percent survival (RPS) diamati pada akhir penelitian. Tiap perlakuan dihitung jumlah ikan yang masih hidup dan yang mati, baik karena perlakuan atau akibat faktor lain. Perhitungan RPS adalah

$$\text{Relative Percent Survival (RPS)} = \frac{\text{Jumlah ikan hidup}}{\text{Jumlah ikan awal penelitian}} \times 100\%$$

### 3.5.5. Pembuatan preparat ulas

#### 1) **Nekropsi**

Nekropsi adalah pembedahan ikan dan pengambilan organ-organ dalam berupa hati, ginjal, mata, insang, dan otak (Lampiran 3). Pengambilan organ dilakukan menggunakan alat bedah secara aseptik.

#### 2) **Fiksasi**

Larutan fiksatif yang digunakan ada 2 jenis yaitu larutan *buffer* formalin 10% (Lampiran 4) dan larutan *bouin* (Lampiran 5). Larutan *buffer* formalin digunakan untuk organ hati, otak dan ginjal, sedangkan larutan *bouin* digunakan untuk organ insang dan mata. Perendaman organ dalam larutan fiksatif dilakukan dalam botol film dengan perbandingan larutan dan organ adalah 9 : 1 (Lampiran 3).

#### 3) **Dehidrasi, clearing, dan impregnasi**

Dehidrasi jaringan dilakukan dalam larutan alkohol bertingkat dengan konsentrasi 70%, 80%, 95% dan alkohol absolut. Sebelum dilakukan dehidrasi, organ dipotong kecil-kecil dan diletakkan di kaset (Lampiran 3).



Tujuan dehidrasi adalah mengeluarkan air yang ada pada jaringan untuk mempermudah pengamatan sampel. Proses dehidrasi dilakukan dengan memasukkan jaringan yang sudah difiksasi kedalam larutan alkohol berturut-turut dari kadar 70% sampai 100% dengan lama perendaman tiap larutan 2 x 2 jam.

Proses *clearing* dilakukan menggunakan larutan xylol yang bersifat mendesak alkohol keluar. Selain itu larutan xylol juga dapat berikatan dengan parafin pada tahap imregnasi. Perendaman dalam larutan xylol dan parafin masing-masing dilakukan selama 2 x 2 jam.

#### **4) Embedding**

Proses embedding dilakukan setelah rangkaian proses dehidrasi, clearing dan imregnasi. Jaringan diletakkan pada cetakan parafin (*paraffin mold*) dengan posisi sesuai tujuan pemeriksaan. Paraffin cair dituang ke cetakan kemudian ditutup menggunakan *cassete embedding* (Lampiran 3). Bersamaan dengan proses ini parafin cair akan membeku dan membungkus jaringan.

#### **5) Pemotongan**

Proses pemotongan dilakukan dengan menggunakan *mikrotome* dengan ketebalan 5  $\mu\text{m}$  (Lampiran 3). Sebelum dipotong hasil cetakan dirapihkan agar dalam proses pemotongan hasilnya lebih baik. Proses ini disebut *trimming*. Hasil pemotongan diregangkan pada permukaan air *floating bath* yang bersuhu 42°C. Jaringan yang telah selesai dipotong diletakkan pada gelas objek.

## 6) Staining

Pewarnaan jaringan (*staining*) bertujuan untuk memperjelas jaringan serta sel-selnya sehingga mempermudah pengamatan di bawah mikroskop (Lampiran 3). Teknik pewarnaan dilakukan menggunakan standar SNI.

Tahap-tahap pewarnaan terdiri dari:

- a) Sampel di rendam Larutan xylol 2 x 5 menit
- b) Sampel di rendam dalam Alkohol 100% dan 95% masing-masing 2 x 2 menit.
- c) Sampel di rendam Hematoxyline 10 menit (Lampiran 6)
- d) Sampel di celupkan dalam Akuades 4-10 celup
- e) Sampel di celupkan dalam Alkohol acid 1% 4-10 celup
- f) Sampel di rendam dalam air mengalir selama 15 menit
- g) Sampel di rendam dalam eosin 10 menit (Lampiran 7)
- h) Sampel di rendam dalam Alkohol 95% dan 100% masing-masing 2 x 1 menit
- i) Sampel di rendam Larutan xylol 3 x 2 menit

## 7) Mounting

Sampel yang telah diwarnai dibersihkan dari kotoran yang menempel kemudian ditetaskan entellan dan ditutup dengan *cover glass*. Ketika penutupan menggunakan cover glass diusahakan tidak terbentuk gelembung udara karena akan mempengaruhi pembacaan analisa di mikroskop.

### **8) Analisa histopatologi**

Analisis histopatologi dilakukan di bawah mikroskop elektrik. Pengamatan dilakukan pada bagian-bagian jaringan yang rusak dengan perbesaran 40, 100, dan 400 kali (Lampiran 3). Hasil pengamatan ini didokumentasikan dalam bentuk gambar yang kemudian akan menjadi data akhir pengamatan.

### **3.6. Analisis Data**

Analisis data tingkat kerusakan jaringan dari tiap perlakuan dan organnya dilakukan menggunakan uji annova.