III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus - Oktober 2013 di Balai Besar Pengembangan Budidaya Laut (BBPBL) Lampung, di Laboratorium Kesehatan Ikan dan Lingkungan. Adapun rincian kegiatan penelitian yaitu persiapan alat dan tempat 3 hari, aklimatisasi ikan 7 hari, pemberian pakan dengan tambahan jintan hitam 38 hari, uji tantang 7 hari, dan pengujian histopatologi ikan 10 hari.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan yaitu bak plastik ukuran 45x35x30 cm sebanyak 5 buah, bak fiber volume 2 ton, selang air, ember, gayung, alat pengukur kualitas air (DO meter, thermometer, refraktometer, dan pH meter), *microtube*, pellet pastel, milipore, spuit, alat bedah lengkap, botol film 26 buah, botol winkler, mikrotom, pisau mikrotom, e*mbeding cassete* 26 buah, mesin *embedding*, *slide glass*, *cover glass*, rak *slide glass*, botol pewarnaan, inkubator, refrigerator, pensil, spidol, stopwatch, mikroskop, komputer dan kamera

Adapun bahan-bahan yang digunakan yaitu ikan kakap putih 60 ekor dengan panjang ±10 cm, air laut, jintan hitam, pakan buatan berupa pelet, isolat VNN, PBS, kaporit, tisu, kertas label, larutan *buffer* formalin, larutan bouin's, alkohol , akuades, *xylol*, parafin, hemaktosilin, eosin, air mengalir, alkohol acid, putih telur dan *entellan.*

3.3 Desain Penelitian

Penelitian terdiri dari 4 perlakuan, dimana setiap bak perlakuan terdapat 15 ekor ikan. Perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu:

Perlakuan A : tanpa penambahan jintan hitam

Perlakuan B : penambahan jintan hitam 25 g/kg pakan

Perlakuan C : penambahan jintan hitam 50 g/kg pakan

Perlakuan D : penambahan jintan hitam 75 g/kg pakan

3.4 Metode Penelitian

3.4.1 Tahap Persiapan

3.4.1.1 Pembuatan Isolat VNN

Adapun metode pembuatan isolat VNN adalah sebagai berikut:

a. PBS, tabung reaksi, *mictotube*, pellet pastel dan mortar di autoklaf.

b. Organ (otak. mata, ginjal, hati) diambil dari sampel ikan yang terserang VNN.

c. Organ digerus dengan menggunakan mortar

d. Organ tersebut dimasukkan ke *microtube* dan ditambahkan PBS steril 1ml.

e. *Microtube* masukkan ke *sentrifuge* dengan kecepatan 12000 rpm selama 10 menit

f. Air gerusan disaring dengan menggunakan milipore (Thermo^{TM}) 0,45 µm dan dimasukan ke *microtube* untuk mendapatkan virus VNN yang akan diganaskan.

g. Air hasil saringan diambil sebanyak 1 ml dengan menggunakan spuit.

h. Ikan disuntikan secara *intra peritoneal*

i. Ikan dipelihara dan diamati gejala yang timbul untuk mengetahui apakah virus VNN sudah menginfeksi ikan tersebut.

j. Jika ikan sudah mati ulangi langkah kerja a,b, c, d, e , f.

k. Isolat VNN dalam *microtuber* disusun pada rak

l. Isolat VNN dimasukkan kedalam refrigator dengan suhu -81 ^{0}C.

3.4.1.2 Persiapan Wadah dan Ikan Uji

a. Bak-bak pemeliharaan ikan dibersihkan dengan kaporit dan air mengalir.

b. Bak-bak pemeliharaan disusun sesuai dengan desain tata letak ruang dan dilengkapi dengan sistem saluran air serta aerator.

c. Ikan kakap putih disiapkan dengan ukuran panjang total 10 cm sebanyak 60 ekor lalu diaklimatisasi selama 7 hari.

d. Ikan dipelihara dan diberi pakan berupa pelet.

3.4.1.2 Pembuatan Pakan

a. Pakan ditimbang sebanyak 1 kg.

b. Jintan hitam ditimbang sesuai dosis lalu dicampurkan ke dalam pakan yang ditambahkan putih telur ayam sebagai binder dan diaduk dengan spatula.

c. Pellet dikeringkan dengan cara diangin-anginkan, kemudian didinginkan pada suhu kamar dan dikemas dalam plastik.

Tabel 2. Formulasi Pakan

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

3.4.2 Pelaksanaan Penelitian

3.4.2.1 Pemberian Pakan Ikan dengan Tambahan Jintan Hitam

Pakan bercampur jintan hitam diberikan pada ikan kakap putih setiap hari selama pemeliharaan dengan frekuensi pemberian pakan sebanyak 2 kali sehari, yaitu pada pagi hari pukul 08.00 WIB dan sore hari pukul 16.00 WIB. Pemberian pakan harian disesuaikan dengan *feeding rate* ikan kakap putih sebesar 4% dari biomassa. Setiap pagi dan sore dilakukan penyiponan. Penyiponan dilakukan sebelum permberian pakan.

3.4.2.2 Pengukuran Kualitas Air

Parameter kualitas air yang diamati adalah oksigen terlarut, pH, salinitas, dan suhu. Pengukuran oksigen terlarut diamati setiap hari. Pengukuran oksigen terlarut harian dilakukan setiap hari pada pagi dan sore hari. Pengukuran pH dan salinitas diamati secara berkala pada setiap hari kamis.

3.4.2.3 Uji tantang VNN

Metode Uji tantang yang digunakan adalah penginjeksian secara *intra peritoneal* dengan dosis pemberian virus 0,1 ml/individu.

3.4.3 Pengamatan

3.4.3.1 Penyediaan Preparat Histopatologi

Cara kerja yang dilakukan untuk pembuatan sediaan preparat jaringan yaitu:

a. Nekropsi

Proses pemeriksaan makroskopis yang dilakukan untuk melihat kelainan-kelainan yang terjadi pada organ tubuh ikan. pemeriksaan dilakukan pada ikan yang sudah mati baik dalam yang dengan sengaja dimatikan ataupun mati secara wajar. Syarat ikan sebelum dinekropsi harus hidup atau sudah mati maksimal 2 jam dan tidak boleh dibekukan karena dapat merubah struktur sel. Tubuh ikan bagian luar diamati ada tidaknya perubahan patologis. Kemudian dilakukan pembedahan pada bagian perut ikan untuk mengamati organ dalam ikan. Organ tubuh ikan yang akan diamati yaitu otak, mata. ginjal, dan hati.

b. Fiksasi

Proses pengawetan bertujuan untuk menghentikan proses enzimatis pada jaringan dan menjaga bagian-bagian sel terfiksasi pada tempatnya melalui proses perendaman dengan larutan fiksasi. Fiksasi dilakukan dengan perendaman organ otak, hati dan ginjal dalam larutan *buffer* formalin selama 24 jam, lalu organ mata direndam dalam larutan bouin selama 4 jam.

c. Dehidrasi

Dehidrasi bertujuan untuk mengeluarkan air pada jaringan dengan menggunakan bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan yaitu alkohol, karena alkohol memiliki kemampuan untuk mengeluarkan air dari jaringan. Proses dehidrasi dilakukan dengan cara organ ikan direndam dalam larutan alkohol bertingkat (Tabel.3)

Tabel 3. Proses dehidrasi

No	Larutan	Waktu
1	Alkohol 70% I	2 jam
2	Alkohol 70% II	2 jam
3	Alkohol 80% I	2 jam
4	Alkohol 80% II	2 jam
5	Alkohol 95% I	2 jam
6	Alkohol 95% II	2 jam
7	Alkohol *absolute* I	2 jam
8	Alkohol *absolute* I	2 jam

d. Clearing (penjernihan)

Proses ini dilakukan dengan cara merendam organ dalam larutan xylol (Tabel.4). Proses ini merupakan upaya untuk mengeluarkan cairan dehidran yang digunakan untuk dehidrasi.

Tabel 4. Proses penjernihan (*clearing*)

No	Larutan	Waktu
1	Xylol	2 jam
2	Xylol	2 jam

e. Impregnasi

Impregnasi merupakan proses menyusupkan parafin dengan tujuan dapat menggantikan xylol pada jaringan (Tabel.5). Jika proses ini tidak dilakukan dengan sempurna, maka akan menyisakan larutan pembening dalam jaringan yang akan mengkristal dalam sel dan pada saat pemotongan jaringan akan rusak.

Tabel 5. Proses impregnasi

No	Larutan	Waktu
1	Parafin I	2 jam
2	Parafin II	2Jam

f. Embedding

Embedding merupakan cara menanam organ dalam *block* parafin. Proses ini dilakukan untuk memudahkan saat pemotongan jaringan dengan mikrotom. Pada saat pencetakan hindari terbentuknya gelembung udara supaya pada saat pemotongan tidak mudah robek.

Cara kerja yang dilakukan yaitu :

1. Organ dicetak *(embedding)* dengan parafin cair dan didinginkan hingga beku. Proses ini dikerjakan di dekat sumber panas dengan alat yang telah dihangatkan terlebih dahulu untuk mencegah pembekuan parafin sebelum proses selesai.
2. Setelah membeku, cetakan disimpan dalam refrigerator.

g. Pemotongan

Cetakan organ dilakukan *trimming* untuk meratakan bagian pinggir yang tidak terdapat organ. Cara kerja yang dilakukan :

1. Cetakan organ dilakukan *slicing* dengan mikrotom untuk menghasilkan preparat tipis dengan ukuran 5 milimikron.
2. Hasil diletakkan pada permukaan air di dalam *water bath* yang bersuhu 45^0 C. Proses ini dilakukan untuk merengangkan lembaran preparat sehingga tidak terjadi penumpukan pada titik tertentu.
3. Preparat diangkat dan ditempelkan pada gelas objek yang telah diolesi putih telur. Pengolesan putih telur bertujuan untuk merekatkan penempelan jaringan pada *slide glass.*
4. Preparat dikeringkan dalam inkubator pada suhu 60^0 C selama 45 menit agar melekat erat pada gelas objek.

h. Pewarnaan

1. Preparat dilakukan pewarnaan dengan pewarnaan ganda Hematoksilin-Eosin.
2. Hasil pewarnaan dibersihkan dari sisa-sisa larutan lalu dikering anginkan dalam keadaan terbalik. Hal ini dilakukan untuk mendapatkan preparat yang bersih, tidak terkena kotoran dan debu.
3. Setelah preparat kering, dilakukan penempelan *cover glass* dengan menggunakan perekat (*entellan*). Saat penempelan diusahakan agar semua preparat dapat tertutup *cover glass* dan tidak terdapat gelembung udara

Hematoksilin bersifat basa yang akan mewarnai basofilik jaringan. Hematoksilin dapat mewarnai inti dan struktur asam dari sel. hematoksili akan memberikan warna biru pada preparat histopatologi. Sedangkan eosin bersifat asam yang mewarnai asidofilik jaringan. Eosin akan mewarnai mitokondria, granula, sitoplasma dan kolagen. Eosin akan memberikan warna merah mudah pada preparat histolopatologi.

3.4.3.2 Analisa Preparat Histopatologi

Analisis histopatologi dilakukan di bawah mikroskop binokuler. Mikroskop yang digunakan merupakan mikroskop yang dilengkapi dengan kamera yang tersambung otomatis ke komputer. Pengamatan dilakukan pada bagian-bagian jaringan yang rusak dengan perbesaran 40, 100, 400, hingga 1000 kali.

3.5 Analisa Data

Dari penelitian ini akan diperoleh data gejala klinis infeksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN), tingkat *prevalence* infeksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN) dan data kualitas air. Data tersebut dianalisis secara deskriptif.