

3. METODE PENELITIAN

3.1. Materi Penelitian

3.1.1. Alat-alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada lampiran

1 adalah

- baskom
- nampan
- sectio set
- timbangan digital
- mikroskop
- kamera digital
- *beaker glass*
- gelas ukur
- *rotary evaporator vacuum*
- akuarium
- aerator
- batu aerasi
- corong
- autoclave.
- selang aerator
- blower
- seser
- thermometer
- pH meter
- DO meter
- Spektofotometer
- *tissue processor*
- *Embedding*
- *Machine*
- Mikrotom
- Fotomikroskop
- Labu erlemayer
- botol akuades

3.1.2. Bahan-bahan Penelitian

Bahan – bahan yang digunakan dalam penelitian ini dapat di lihat pada lampiran 2 adalah

- ikan nila (*O. niloticus*).
- Bakteri *A. hydrophila*
- Ekstrak daun cincau (*C. barbata* M.)
- kertas saring
- etanol 90%
- *Xylo*

- parafin cair
- hematoksilin eosin
- benang
- aseton
- TSA (*Trypticase Soy Agar*)
- TSB (*Trypticase Soy Broth*)
- pakan ikan (pellet)
- air tawar.
- Formalin 10%
- kertas label
- alkohol 70%
- tissue
- aquades
- NB (*Nutrient Both*)
- sarung tangan
- masker

3.2. Metode Penelitian

Metode penelitian yang dilakukan pada penelitian ini adalah metode eksperimen. Metode eksperimen adalah metode penelitian yang dilakukan untuk mengetahui hubungan sebab akibat antara dua variable atau lebih yang sudah diatur oleh peneliti, dan seberapa besar hubungan sebab akibat tersebut dengan melakukan perlakuan lain pada objek penelitian itu (Zulnaldi, 2007)

Sedangkan untuk teknik pengambilan data dalam penelitian ini dilakukan dengan cara observasi langsung. Menurut Arikunto (2002), observasi dapat disebut juga pengamatan, yang meliputi kegiatan pemusatan perhatian terhadap suatu obyek dengan menggunakan alat indera yaitu melalui penglihatan, penciuman, pendengaran, peraba dan pengecap, serta mengamati dan berinteraksi langsung dengan objek penelitian. Untuk itu peneliti wajib terlibat langsung dalam kegiatan objek penelitian setiap hari, sehingga nantinya akan dapat memperoleh data yang lebih banyak tentang objek tersebut.

3.3. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). RAL digunakan untuk percobaan yang mempunyai media atau tempat percobaan yang seragam atau homogen,

sehingga RAL banyak digunakan untuk percobaan laboratorium, rumah kaca dan peternakan. Karena media homogen, maka media atau tempat percobaan tidak mempengaruhi pada respon yang diamati (Sastrosupadi, 2000).

$$Y = \mu + T + \epsilon$$

Keterangan:

μ = nilai rata-rata (mean)

T = pengaruh faktor perlakuan

ϵ = pengaruh galat

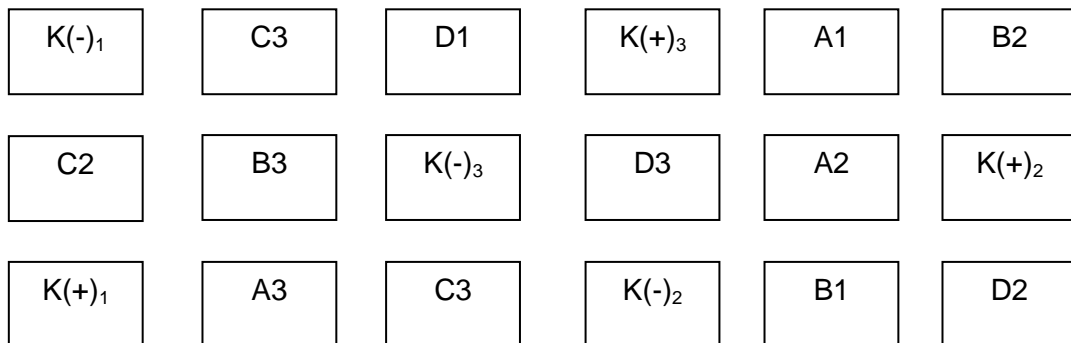
Penelitian ini akan dilakukan dengan menggunakan variabel bebas berupa perlakuan pemberian ekstrak kasar daun cincau dengan dosis 200 ppm, 400 ppm, 600 ppm, dan 800 ppm. Dosis ini berdasarkan dari percobaan *in vitro* ekstrak kasar daun cincau terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila*. Pada penelitian ini digunakan kontrol negatif sebagai perlakuan sampel tanpa penginfeksi bakteri dan tanpa pemberian ekstrak kasar daun cincau, Sedangkan kontrol positif sebagai perlakuan sampel dengan penginfeksi bakteri dan tanpa pemberian ekstrak. Dalam penelitian ini dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Sehingga total sampel yang diamati sebanyak 18 sampel. Rancangan perlakuan dapat dilihat pada tabel 2. sebagai berikut .

Tabel 2. Rancangan Perlakuan Uji

Perlakuan	Ulangan		
	1	2	3
A	A ₁	A ₂	A ₃
B	B ₁	B ₂	B ₂
C	C ₁	C ₂	C ₃
D	D ₁	D ₂	D ₄

Keterangan:

- A : Pemberian ekstrak kasar daun cincau (*C. barbata* M.) 200 ppm
B : Pemberian ekstrak kasar daun cincau (*C. barbata* M.) 400 ppm
C : Pemberian ekstrak kasar daun cincau (*C. barbata* M.) 600 ppm
D : Pemberian ekstrak kasar daun cincau (*C. barbata* M.) 800 ppm
Penempatan perlakuan disajikan pada gambar berikut:



Gambar 1. Denah Perlakuan

Keterangan:

A,B,C,D : Perlakuan

K(-) : Kontrol Negatif

K(+): : Kontrol Positif

1, 2, 3 : Ulangan

3.4. Prosedur Penelitian

3.4.1. Persiapan Penelitian

a) Persiapan Ikan

- Disiapkan ikan nila sebanyak 300 ekor dengan panjang 7-9 cm. (ikan nila diperoleh dari petani ikan nila di kota batu)
- Kemudian Ikan nila diaklimatisasi selama 7 hari pada akuarium.(Proses aklimatisasi ini bertujuan untuk mengkondisikan ikan agar ikan benar-benar sehat dan telah beradaptasi dengan lingkungan barunya.)
- Selama proses aklimatisasi diberi pakan pelet sebanyak 2 kali sehari pada pagi hari pukul 09.00 WIB dan sore hari pukul 15.00 WIB dan

dilakukan penyiponan apabila kondisi air pada aquarium pemeliharaan telah kotor karena sisa pakan dan feses.

b) Pembuatan Ekstrak Kasar Daun Cincau (*C. barbata Miers.*)

Daun cincau kering didapatkan di Balai Penelitian Tanaman Obat (Medica) kota Batu.

- Kemudian 1 kg daun cincau hijau kering tersebut diblender hingga menjadi serbuk. Dihasilkan serbuk daun cincau hijau sebanyak 400g.
- Kemudian Serbuk cincau tadi dicampur dengan pelarut etanol 70% (dengan perbandingan 1:5. Serbuk daun cincau kering 150 gram dimasukkan ke dalam toples dan diberi pelarut etanol 70% sebanyak 750 ml)
- kemudian dihomogenkan dengan diaduk menggunakan spatula.
- Toples ditutup dengan *aluminium foil* agar etanol tidak menguap (Proses maserasi ini didiamkan selama 2 hari pada tempat yang gelap).
- Setelah 3 hari hasil maserasi disaring menggunakan kertas saring (disaring untuk memisahkan larutan dengan endapannya)
- Setelah terpisah, larutan hasil saringan kemudian di uapkan selama kurang lebih 11 jam untuk mendapatkan ekstrak murni dari daun cincau (Proses penguapan ini menggunakan alat yang disebut *rotary evaporator*)
- Setelah diuapkan maka akan dihasilkan ekstrak murni yang kental berwarna kehitaman.
- Kemudian dilakukan pengenceran menggunakan DMSO 10% untuk perlakuan dosis yang diinginkan.

c) Persiapan Alat Penelitian

Wadah yang digunakan dalam uji tantang ini adalah

- Toples 10 liter sebanyak 18 buah.

- Toples kemudian dicuci dengan detergen
- kemudian direndam dengan khlorin selama 30 menit
- kemudian diberi Na-Thiosulfat untuk menetralkan
- Selanjutnya toples dibilas dan dikeringkan selama 2 hari sebelum diisi dengan air tawar
- Setelah 2 hari toples diisi air sebanyak 5 liter
- Dan diletakkan sesuai denah penelitian
- diberi aerasi untuk menjaga kandungan oksigen dalam air.

d) Pengenceran Bakteri

Bakteri *Aeromonas hydrophyla* diperoleh dari Balai Budidaya Air Payau Jepara, Jawa tengah. Bakteri yang diperoleh adalah bakteri dengan kepadatan 6×10^9 sel/ml. Sedangkan bakteri yang akan digunakan adalah bakteri dengan kepadatan 10^7 sel/ml. Untuk itu dilakukan pengenceran agar mendapatkan kepadatan 10^7 sel/ml, dilakukan dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$$

Keterangan :

N_1 : Kepadatan populasi bakteri dalam media NB (sel/ml)

N_2 : Kepadatan populasi bakteri yang dikehendaki (sel/ml)

V_1 : Volume suspense bakteri dalam NB yang dibutuhkan

V_2 : Volume yang diinginkan

Peremajaan bakteri 10^9 sel/ml dilakukan dengan penanaman bakteri pada media TSB (*Trypticase Soy Broth*) dan diinkubasi selama 1 hari pada inkubator. Bakteri 10^9 sel/ml tersebut kemudian diencerkan menggunakan air pada media infeksi dengan perbandingan yang dihitung menggunakan rumus

kepadatan populasi. Bakteri yang digunakan sebanyak 1 ml sehingga dibutuhkan aquadest larutan pengencer sebanyak 99 ml.

3.4.2. Pelaksanaan Penelitian

a) Penginfeksi Bakteri Pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)

Penginfeksi dilakukan dengan lama waktu maksimal 24 jam. Penginfeksi dilakukan menggunakan bakteri *A. hydrophila* dengan metode perendaman. Pada perendaman ikan nila dengan bakteri *A. hydrophila* dengan kepadatan 10^7 sel/ml menggunakan satu akuarium berukuran berukuran $80 \times 40 \times 50$ cm³ yang sudah dilengkapi aerasi. Perendaman ini dilakukan menggunakan kapasitas air 30 liter, sehingga dapat digunakan rumus pengenceran:

$$\begin{aligned} V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\ V_1 \times 10^9 &= 30.000 \times 10^7 \\ V_1 &= \frac{30.000 \times 10^7}{10^9} \\ &= 300 \text{ ml} \end{aligned}$$

Hasil tersebut dapat diketahui bahwa kebutuhan bakteri yang digunakan sebanyak 300 ml dan air tawar 29.700 ml. Setelah itu, ikan nila dengan ukuran 7-9 cm sebanyak 180 ekor dimasukkan kedalam akuarium direndam selama 21 jam dikarenakan penelitian pendahuluan LD₅₀ (*lethal dosis*) ikan yang diinfeksi dengan bakteri *A. hydrophila* dengan kepadatan 10^8 sel/ml sudah mati 100% selama 10 jam, sehingga bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah 10^7 sel/ml dengan perendaman 21 jam, selanjutnya ikan dipindahkan ke dalam air tawar. Selama waktu penginfeksi diamati gejala klinis yang ada pada ikan (warna tubuh pucat, sisik mengelupas, dan sering berenang ke permukaan). Setelah itu ikan dipindahkan ke dalam akuarium berisi air tawar. Selama penginfeksi ikan tidak diberi pakan.

a. Pemberian Ekstrak Kasar Daun Cincau (*C. Barbata Miers*) pada Ikan Nila

Berdasarkan penelitian pendahuluan pemberian ekstrak kasar daun cincau dengan dosis 800 ppm menunjukkan kematian 100% pada jam ke 84, sehingga pemberian dosis ekstrak sebesar (200 ppm, 400 ppm, 600 ppm dan 800 ppm) dengan lama waktu 24 jam.

- Disiapkan aquarium berukuran 40x40x40 sebanyak 4 buah.
- Aquarium diisi air sebanyak 15 liter dan ditambahkan ekstrak kasar daun cincau hijau (*C. barbata Miers*) sesuai dengan dosis (200 ppm, 400 ppm, 600 ppm dan 800 ppm).
- Aquarium diberi aerasi untuk meningkatkan kandungan oksigen terlarut.
- Direndam ikan nila masing-masing 30 ekor/aquarium selama 24 jam
- Dipindahkan ke toples yang berisi air tawar dan dipelihara selama 2 minggu.

b. Pemeliharaan ikan

- Setelah ikan diobati dengan ekstrak kasar daun cincau,
- ikan dimasukkan ke dalam toples dengan kapasitas 10 liter masing-masing 10 ekor. Menurut Mawan (2009), kepadatan ikan untuk uji *invivo* eksperimen dapat disesuaikan sesuai kebutuhan penelitian.
- Toples yang digunakan telah diberi aerasi (bertujuan untuk meningkatkan kandungan oksigen terlarut).
- Pemeliharaan ikan dilakukan selama 2 minggu
- setiap dosis dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali.
- Saat pemeliharaan ikan diberi makan 2 kali yakni pada pagi dan sore hari secara *ad libitum*
- dilakukan sifon sedikitnya dua hari sekali dan dilakukan pengukuran suhu, pH dan DO setiap hari pada pagi dan sore.

- Kemudian diamati ikan setiap hari (untuk melihat apakah ikan ada yang mati)

c Pengambilan Jaringan hati

Pengambilan hati dilakukan pada penelitian minggu kedua. Ikan diambil hatinya dengan cara dibedah pada bagian *sirip dorsal* dengan menggunakan alat *sectio set* untuk diamati histopatologi hatinya. Sampel hati yang sudah diambil dimasukkan ke dalam botol film dan diberi larutan formalin kemudian dibawa ke fakultas kedokteran untuk diamati, dilanjutkan dengan pembuatan preparat untuk histopatologi dan pengamatan preparat hasil histopatologi.

d Pembuatan Histopatologi Hati Ikan Nila (*O. niloticus*)

Setelah masa adaptasi selesai, hati ikan diambil sebagai sampel untuk diamati histopatologinya. Sampel hati dimasukkan ke dalam botol film dan diberi bahan pengawet yaitu larutan davidson's, dilanjutkan dengan pembuatan dan pengamatan preparat hasil histopatologi (Wardani, 2015). Tahapan-tahapannya yaitu:

• Tahap Fiksasi

Sampel hati ikan yang akan diamati jaringannya diambil. Jaringan tersebut kemudian direndam dalam larutan davidson's selama 24 jam.

• Tahap Dehidrasi

Tahap dehidrasi dilakukan dengan penarikan air secara bertahap menggunakan alat *auto technicon* selama 20 jam. Tabung auto technicon terdiri atas alkohol 70% selama 1 jam, alkohol 80% selama 1 jam, alkohol 90% selama 2 jam, alkohol 96% selama 2 jam, alkohol absolute 1 selama 2 jam dan alkohol absolute 2 selama 2 jam.

- **Tahap Clearing**

Tahap clearing untuk mentransparankan serta menggantikan larutan alkohol dari jaringan. Dilakukan dengan mencelupkan kedalam larutan xylol 1 selama 1 jam, xylol 2 selama 2 jam dan xylol 3 selama 2 jam.

- **Tahap Impregnasi**

Tahap impregnasi bertujuan untuk menyamakan keadaan jaringan dengan bahan pengeblokan (*embedding*). Dilakukan dengan mencelupkan bahan ke parafin cair dengan suhu 56-60⁰C selama 2 jam, kemudian dilanjutkan dengan mencelupkan kembali ke dalam parafin cair dengan suhu 56-60⁰C selama 2 jam.

- **Tahap *Embedding* (pengeblokan)**

Tahapan ini bertujuan untuk memudahkan penyayatan dengan menggunakan mikrotom. Setelah penyayatan bahan yang sudah diblok selesai, langkah berikutnya adalah memasukkan hasil sayatan ke dalam *waterbath* (suhu 40⁰ C), kemudian pilih hasil sayatan yang terbaik dan siapkan obyek glass (untuk persiapan pewarnaan HE (*Hemotocyn Eosin*), sebelumnya obyek glass harus diolesi dengan perekat polyisin. Berikutnya, keringkan pada oven dengan suhu 50-60⁰C kurang lebih selama 30 menit.

- **Teknik pewarnaan jaringan dengan menggunakan HE (*Hemotocyn Eosin*)**

Pewarnaan dengan menggunakan HE dilakukan dengan beberapa tahapan yaitu deparafinisasi, hidrasi, cat utama, dehidrasi, dan clearing.

- **Tahap *Mounting***

Tahapan ini merupakan prosedur akhir dalam pembuatan preparat sebelum diamati secara makroskopik dan mikroskopik bertujuan untuk mempermudah saat pengamatan. Preparat dilem dengan menggunakan DPX mounting medium, kemudian ditutup dengan *cover glass* jangan sampai terjadi

gelembung. Preparat dibiarkan dalam suhu ruangan sampai lem mengering kemudian diamati dibawah mikroskop. Dengan pewarnaan HE, inti yang bersifat asam akan berwarna ungu tua oleh Haematoksilin yang bersifat basa, sedangkan sitoplasma yang bersifat basa akan berwarna merah oleh eosin yang bersifat asam.

3.5. Parameter Uji

3.5.1. Parameter Utama

Parameter utama yang diamati dalam penelitian ini adalah histopatologi hati ikan nila (*Oreochromis niloticus*). Pengamatan ini dilakukan untuk melihat gambaran jaringan hati pada ikan yang tanpa perlakuan larutan dan infeksi, ikan yang di infeksi dan diobati yang di pelihara selama 14 hari

3.5.2. Parameter Penunjang

Parameter penunjang dalam penelitian ini adalah gejala klinis ikan dan kualitas air yang meliputi suhu, pH dan oksigen terlarut.

3.6. Analisis Data

Data yang diperoleh dilakukan analisis secara statistik dengan mempergunakan analisis keragaman atau uji F (ANOVA) sesuai dengan rancangan yang dipergunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hal ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh perlakuan (variabel bebas) terhadap respon parameter yang diukur atau uji F. Apabila nilai uji F berbeda nyata atau berbeda sangat nyata maka dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) untuk menentukan perbedaan antar dua perlakuan.

Analisis regresi mempelajari bentuk hubungan antara satu atau lebih peubah/variable bebas (X) dengan satu peubah tak bebas (Y). Dalam penelitian peubah bebas (X) biasanya peubah yang ditemukan oleh peneliti secara bebas misalnya dosis obat, lama penyimpanan, kadar zat pengawet, umur ternak dan sebagainya. Disamping itu peubah bebas bisa juga berupa peubah tak

bebasnya, misalnya dalam pengukuran panjang badan dan berat badan, karena panjang badan lebih mudah diukur maka panjang badan dimasukkan peubah bebas (X). sedangkan peubah tak bebas (Y) dalam penelitian berupa respon yang diukur akibat perlakuan/peubah bebas (X), misalnya jumlah sel darah merah akibat pengobatan dengan dosis tertentu, jumlah mikroba daging setelah disimpan beberapa hari berat pada umur tertentu dan sebagainya.

Hasil uji histopatologi Hati ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) menggunakan analisis secara deskriptif. Untuk mengetahui tingkat kerusakan jaringan hati ikan nila yang telah diberi ekstrak, dilakukan analisis statistik pemberian skoring dengan metode semi kuantitatif menurut Kakkilaya (2002), yang digunakan untuk menghitung jumlah area yang terwarnai dan dilakukan secara manual dengan menghitung persentasenya. Pembacaan dimulai dari tepi kiri (sesuai dengan posisi ekor preparat) ke arah kepala kemudian turun ke bawah dan bergeser ke arah ekor kembali (gerak zig zag) dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 2. Alur Perhitungan Skoring (Gerak Zig Zag)

Pada metode semi kuantitatif dilihat dari lima luas bidang lapang pandang sehingga mendapatkan hasil yang maksimal pada tingkat kerusakan jaringan. Setiap bidang lapang pandang diamati tingkat kerusakan jaringannya dengan kriteria kongesti, melanomakrofak, dan nekrosis. Persentase kerusakan setiap luas bidang lapang pandang dihitung berdasarkan jumlah sel yang mengalami kerusakan menurut KIM (2006) dalam Raza'i (2008) dengan rumus:

$$\text{Persentase Kerusakan} = \frac{\text{Jumlah sel yang rusak}}{\text{Jumlah sel analisis}} \times 100\%$$

Kemudian persentase yang telah didapatkan diberi scoring dari angka 1 sampai 4. Angka 1 mempunyai tingkat persentase kerusakan jaringan 0 - 6%, angka 2 tingkat persentase kerusakan jaringan 6 - 25%, angka 3 tingkat persentase kerusakan jaringan 25 - 50% dan angka 4 tingkat persentase kerusakan jaringan >50%.