

### 3 MATERI DAN METODE PENELITIAN

#### 3.1 Materi Penelitian

##### 3.1.1 Alat

Berikut alat beserta fungsinya yang digunakan dalam penelitian ini terdapat pada Tabel 4. Sedangkan gambar alat dan bahan penelitian dapat dilihat pada Lampiran 1 :

**Tabel 4.** Alat Penelitian

No	Alat	Fungsi
1	Baskom	Sebagai tempat bahan <i>G. verrucosa</i>
2	Gunting	Sebagai alat pemotong bahan
3	Blender	Untuk menghaluskan bahan
4	Timbangan Analitik	Untuk menimbang bahan
5	Timbangan Digital	Untuk menimbang bahan
6	Beaker Glass	Sebagai tempat bahan dalam proses maserasi
7	Gelas Ukur	Sebagai alat dalam mengukur bahan larutan
8	Labu Erlenmeyer	Sebagai tempat pembiakan bakteri
9	Botol Akuades	Sebagai tempat akuades
10	Cawan Petri	Sebagai tempat agar dan bakteri
11	Corong	Sebagai alat pembantu penuangan larutan
12	Autoklave	Sebagai alat sterilisasi
13	Loyang	Sebagai tempat bahan dalam proses waterbath
14	Bunsen	Sebagai alat sterilisasi
15	Magnetik Stirer	Untuk menghomogenkan larutan
16	Tabung Reaksi	Sebagai tempat kultur bakteri
17	Rak Tabung Reaksi	Sebagai tempat tabung reaksi
18	Jarum Ose	Sebagai alat penggoresan bakteri
19	Spektrofotometer	Untuk mengukur panjang gelombang bahan
20	Spatula	Untuk menghomogenkan larutan
21	Hot Plate	Sebagai alat pemanas
22	Lemari Pendingin	Untuk menyimpan bakteri pada suhu rendah
23	Vortex	Untuk menghomogenkan larutan
24	Pipet Volume	Untuk mengambil larutan dalam jumlah banyak
25	Mikropipet	Untuk mengambil larutan dalam jumlah sedikit
26	Bola Hisap	Sebagai alat bantu untuk mengambil larutan
27	Triangle	Sebagai penyangga pada bunsen
28	Mistar	Untuk mengukur zona hambat bakteri
29	Akuarium	Sebagai wadah air media
30	Aerator dan Batu Aerasi	Sebagai alat bantu penghasil oksigen
31	Selang Aerator	Sebagai alat bantu aerasi

Lanjutan Tabel 4. Alat Penelitian

No	Alat	Fungsi
32	Blower	Sebagai alat penghasil oksigen
33	Scoop Net	Untuk memindahkan ikan uji
34	Termometer	Untuk mengukur suhu
35	pH Meter	Untuk mengukur pH air media
36	DO Meter	Untuk mengukur kandungan oksigen terlarut
37	Mikroskop	Sebagai alat mengamati sel makrofag
38	Obyek Glass	Untuk tempat sampel yang diamati di mikroskop
39	Cover Glass	Sebagai penutup obyek glass
40	Jarum Suntik (Sput)	Untuk mengambil suspensi makrofag ikan uji
41	Haemocytometer	Untuk menghitung jumlah sel makrofag
42	Hand Tally Counter	Sebagai alat batu menghitung jumlah sel makrofag
43	Selang Sifon	Untuk membersihkan air media di akuarium
44	Filter	Untuk menyaring air media
45	Oven	Sebagai alat pemanas
46	Kamera Digital	Sebagai alat dokumentasi pengambilan gambar
47	Avendof	Sebagai tempat sampel suspensi makrofag ikan uji
48	Rotary evaporator vacuum	Sebagai alat untuk mendapatkan ekstrak fenol
49	Sentrifuge	Sebagai alat setrifugasi suspensi makrofag

### 3.1.2 Bahan

Berikut bahan beserta fungsinya yang digunakan dalam penelitian ini terdapat pada Tabel 5.

Tabel 5. Bahan Penelitian

No	Bahan	Fungsi
1	Ekstrak fenol <i>G. verrucosa</i>	Sebagai bahan immunostimulan
2	Biakan Murni Bakteri <i>A. hydrophila</i>	Sebagai bahan penginfeksi
3	Spiritus	Sebagai bahan pembakaran pada bunsen
4	Kertas cakram	Bahan zona hambat
5	Alkohol	Sebagai bahan sterilisasi
6	Etanol 80%	Sebagai pelarut dalam ekstraksi
7	Etanol 96%	Sebagai pelarut dalam ekstraksi
8	Aseton 98%	Sebagai pelarut dalam ekstraksi
9	Akuades	Sebagai pelarut dalam ekstraksi
10	Kertas Label	Sebagai penanda
11	Kertas Koran	Sebagai pembungkus dalam sterilisasi
12	Kertas Saring	Untuk menyaring bahan ekstrak
13	Tissue	Sebagai bahan pembersih
14	Kapas	Untuk menutup labu erlemeyer

Lanjutan Tabel 5. Bahan Penelitian

No	Bahan	Fungsi
15	Alumunium Foil	Sebagai penutup tabung reaksi dan erlemeyer
16	Benang	Sebagai pengikat
17	Masker	Sebagai penutup mulut
18	Sarung Tangan	Sebagai penutup tangan
19	NB ( <i>Nutrient Broth</i> )	Sebagai media kultur bakteri (cair)
20	TSA ( <i>Trypton Soya Agar</i> )	Sebagai bahan media tumbuh bakteri
21	Natrium Fisiologis	Sebagai larutan isotonis
22	NA ( <i>Nutrient Agar</i> )	Sebagai bahan peremajaan bakteri
23	Triptan Biru	Sebagai pewarnaan sel makrofag ikan uji
24	Ikan Mas ( <i>Cyprinus carpio</i> )	Sebagai hewan uji
25	Bakteri <i>A. hydrophila</i>	Sebagai bahan perhitungan aktivitas fagositosis
26	Air Media	Sebagai media hidup hewan uji
27	Pakan Ikan	Sebagai nutrisi ikan uji
28	Na Sitrat 3,8%	Sebagai antikoagulan
39	Larutan Giemsa	Sebagai pewarnaan sel makrofag
30	RPMI FBS 2%	Sebagai bahan medium dalam aktivitas fagositosis
31	Chlorin	Untuk bahan diisfektan pada akuarium
32	Na-Thiosulfat	Untuk menghilangkan toksik pada akuarium

### 3.2. Metodologi Penelitian

#### 3.2.1 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimental, dimana metode ini merupakan metode penelitian yang memungkinkan peneliti memanipulasi variabel dan meneliti akibatnya. Menurut Atmodjo (2011), penelitian eksperimen adalah suatu penelitian yang meneliti hubungan sebab akibat dengan memanipulasikan satu (lebih) variabel pada satu (lebih) kelompok eksperimen dan membandingkannya dengan kelompok lain yang tidak mengalami manipulasi.

Teknik pengambilan data dalam penelitian ini dilakukan dengan cara observasi langsung, yaitu penyelidik mengadakan pengamatan terhadap gejala-gejala subyek yang diselidiki baik secara langsung dalam situasi yang

sebenarnya maupun dalam situasi buatan atau dengan perantara sebuah alat, baik alat yang sudah ada maupun yang sengaja dibuat untuk keperluan khusus (Surachmad, 1998).

### 3.2.2 Uji Pendahuluan

Uji pendahuluan dilakukan untuk memperoleh konsentrasi senyawa fenolik dari ekstrak *G. verrucosa* sebagai immunostimulan yang digunakan untuk pengujian selanjutnya. Dosis yang digunakan yaitu 1 ppt, 1.5 ppt dan 2 ppt (Lampiran 2). Kemudian ikan mas (*C. carpio*) diuji tantang dengan menggunakan bakteri *A. hydrophila* dengan konsentrasi  $10^7$  sel/ml (perhitungan konsentrasi bakteri *A. hydrophila* dapat dilihat pada Lampiran 3). Parameter yang diamati yaitu penentuan jumlah sel leukosit pada darah ikan mas (*C. carpio*) lalu data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan uji BNT. Menurut Sahan dan Duman (2010) dalam Samad (2010), sel leukosit dapat diaktivasi oleh substansi kimia seperti immunostimulan sehingga menyebabkan resistensi terhadap virus, bakteri, jamur dan infeksi parasit. Oleh karena itu, jumlah sel leukosit dapat digunakan sebagai parameter awal penentuan konsentrasi immunostimulan.

### 3.2.3 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).

Model untuk RAL adalah sebagai berikut :

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

Keterangan:

$Y_{ij}$  = respon atau nilai pengamatan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

$\mu$  = nilai rata-rata

$T_i$  = pengaruh perlakuan ke-i

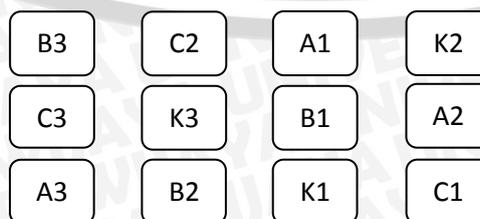
$\epsilon_{ij}$  = pengaruh kesalahan (galat) percobaan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

Dalam penelitian ini, variabel bebas berupa perlakuan pemberian ekstrak fenol *G. verrucosa* dengan dosis 1 ppt (perlakuan A), 1,5 ppt (perlakuan B) dan 2 ppt (perlakuan C) media sebagai imunostimulan pada ikan yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila*. Untuk mempermudah dalam menganalisis diperlukan kontrol sebagai pembanding yaitu kontrol (K) tanpa pemberian ekstrak fenol *G. verrucosa* dengan penginfeksi bakteri. Setiap perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali, sehingga total sampel yang diamati sebanyak 12 termasuk kontrol. Sebagai perlakuan, menggunakan ikan mas yang berumur 4-5 bulan dengan berat 25-35 gram dan panjang 8-10 cm (Laelawati, 2008). Rancangan perlakuan dapat dilihat pada Tabel 6. berikut :

**Tabel 6.** Rancangan Perlakuan

Perlakuan	Ulangan		
	1	2	3
A	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>
B	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>
C	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>
K	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	K <sub>3</sub>

Untuk denah penelitian dapat dilihat pada Gambar 6.



**Gambar 6.** Denah Penelitian

Keterangan:

K : Kontrol infeksi/kontrol negatif (tanpa pemberian ekstrak fenol *G. verrucosa* dengan penginfeksi bakteri).

A, B, C : Perlakuan

1,2,3 : Ulangan

### 3.3 Prosedur Penelitian

#### 3.3.1 Persiapan Penelitian

Persiapan penelitian yang akan dilakukan meliputi ekstraksi senyawa fenolik *G. verrucosa*, pengukuran kadar ekstrak fenol *G. verrucosa*, pembiakan bakteri *A. hydrophila*, persiapan alat dan persiapan hewan uji. Gambar ukuran benih ikan mas (*C. carpio*) sebagai hewan uji dapat dilihat pada Lampiran 4.

##### a. Ekstraksi senyawa fenolik *G. verrucosa*

###### ➤ Pembuatan ekstrak fenol *G. verrucosa*

- Disiapkan bahan *G. verrucosa* dalam keadaan kering
- Dibersihkan dan dipisahkan dari kotoran-kotoran yang menempel
- Dipotong kecil-kecil dan diblender hingga halus
- Ditimbang sebanyak 1000 gram
- Dimasukkan ke dalam plastik dan diberi kertas label
- Disiapkan 5 buah beaker glass
- Dimasukkan bahan ke dalam masing-masing beaker glass sebanyak 200 gram dengan ditambahkan pelarut sebanyak 600 ml (perbandingan 1:3) menggunakan pelarut etanol 96 % (sesuai dengan hasil penelitian pendahuluan, dapat dilihat pada Lampiran 5)
- Didiamkan selama 48 jam (sesuai dengan hasil penelitian pendahuluan, dapat dilihat pada Lampiran 6) untuk mendapatkan ekstrak polifenol *G. verrucosa*.

- Untuk mendapatkan ekstrak fenol disajikan dalam bentuk bagan yang dapat dilihat pada Lampiran 7.

**b. Pembiakan bakteri *A. hydrophila***

Bakteri *A. hydrophila* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dengan kepadatan  $10^9$  sel/ml sebanyak 1000 ml. Bakteri yang digunakan untuk menginfeksi ikan mas yaitu dengan kepadatan  $10^7$  sel/ml (Selvaraj *et al.*, 2009 dalam Samad, 2010), sehingga untuk mendapatkan kepadatan bakteri tersebut harus dilakukan perhitungan pengenceran dapat dilihat pada Lampiran 6, dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

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

Dimana :

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

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

$V_1$  : Volume suspensi bakteri dalam NB yang dibutuhkan

$V_2$  : Volume media air dalam wadah pemeliharaan ikan

**c. Persiapan alat**

- Pencucian akuarium
- Persiapan alat-alat pendukung (aerasi, termometer, timbangan, seser dan lain-lain)
- Pengisian air pada akuarium (ukuran akuarium 30x30x30 cm)

**d. Persiapan hewan uji**

Hewan uji yang digunakan yaitu ikan mas (*C. carpio*) sebanyak 15 ekor untuk masing-masing akuarium. Berikut langkah-langkah persiapan hewan uji :

- Masing-masing akuarium diisi air dengan sebanyak 20 liter
- Sebelum ikan mas dimasukkan dalam akuarium terlebih dahulu dipasang aerasi untuk meningkatkan kandungan oksigen terlarut

- Masing-masing akuarium diberi 15 ekor ikan mas

### 3.3.2 Pelaksanaan Penelitian

#### a. Perlakuan Pemberian Senyawa Fenolik

Ikan mas (*C. carpio*) diadaptasikan (aklimatisasi) selama 1 minggu. Media (air) sebelum digunakan telah di *treatment* terlebih dahulu dengan pemberian 2 ml chlorin dalam masing-masing akuarium (volume air 20 liter), selama 1 hari sebagai disinfektan dan membersihkan akuarium dari bakteri dan kotoran-kotoran yang menempel. Kemudian diberikan 2 ml Na thiosulfat untuk menghilangkan toksik dari efek perlakuan chlorin selama 1 hari. Langkah selanjutnya, akuarium dibersihkan menggunakan air bersih dan didiamkan selama 1 hari, akuarium siap untuk digunakan. Setelah dilakukan *treatment*, masing-masing akuarium diisi air sebanyak 20 liter (2/3 volume akuarium) dan diberi aerasi. Kemudian dilakukan pemberian ekstrak fenol *G. verrucosa* sebagai immunostimulan dengan cara perendaman dengan dosis yang berbeda yaitu 1 ppt, 1,5 ppt dan 2 ppt selama 10 jam (sesuai hasil penelitian pendahuluan, dapat dilihat pada Lampiran 8).

#### b. Penginfeksian Bakteri *A. hydrophila*

Penginfeksian dilakukan setelah perlakuan pemberian ekstrak. Penginfeksian menggunakan bakteri *A. hydrophila* dengan metode perendaman pada akuarium yang berbeda selama 10 jam dengan kepadatan bakteri  $10^7$  sel/ml, kemudian ikan mas dimasukkan kembali ke dalam akuarium pemeliharaan. Pengambilan sampel ginjal ikan mas dilakukan pada pra infeksi dan hari pertama setelah infeksi/post infeksi (Samad, 2010), kemudian dilakukan pengamatan jumlah sel makrofag dan aktifitas fagositosis. Selain itu, pengamatan yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi gejala klinis ikan dan kualitas air selama penginfeksian sebagai parameter penunjang.

### 3.4 Parameter Uji

#### 3.4.1 Parameter Utama

##### a) Perhitungan Jumlah Sel Makrofag

Adapun cara dalam perlakuan pengisolasian sel makrofag menurut Irianto (2005), sebagai berikut :

- 1) Ikan dibedah, selanjutnya digunting mulai dari anus ke depan hingga pangkal overkula
- 2) Organ dalam dikeluarkan dan ginjal diambil dengan menggunakan spatula aseptis
- 3) Ginjal ditimbang
- 4) Ginjal dihancurkan dengan menggunakan *tissue grinder*
- 5) Ginjal diencerkan dengan perbandingan 1 : 10 menggunakan RPMI FBS 2%
- 6) Didapatkan suspensi makrofag
- 7) Suspensi makrofag diambil menggunakan spuit lalu dimasukkan ke dalam appendof

Makrofag yang sudah diisolasi kemudian dihitung jumlahnya dengan cara sebagai berikut :

- 1) Suspensi makrofag diteteskan melalui lekukan atau *groove* hingga memenuhi bilik hitung
- 2) Suspensi diberi triptan biru
- 3) Perhitungan total makrofag dilakukan dengan cara memeriksa bilik hitung dengan mikroskop perbesaran sedang (400x) dan makrofag dihitung dalam 4 kotak kecil. Makrofag akan terlihat biru dan dilakukan penghitungan.

Menurut Irianto *et al.* (2004), jumlah sel makrofag dihitung dengan rumus:

$$\text{Jumlah sel makrofag (sel/ml)} = \frac{N \times fp}{V}$$

Keterangan :

N : Rata-rata jumlah makrofag tiap perlakuan

Fp : Faktor pengenceran (10)

V : Volume cairan haemocytometer ( $4 \times 10^6$ )

Gambar isolasi dan perhitungan jumlah sel makrofag dapat dilihat pada Lampiran 9.

#### b) Perhitungan Aktivitas Fagositosis

Metode yang digunakan berdasarkan metode modifikasi oleh Irianto dan Austin (2002), uji fagositosis makrofag adalah dengan cara:

- 1) Suspensi makrofag dimasukkan ke tabung eppendorf kemudian disentrifuge dengan kecepatan 1000 rpm selama 5 menit sehingga terbentuk endapan pellet
- 2) Pellet makrofag ditetaskan pada objek glass dan diratakan. Diinkubasi selama 60 menit pada suhu  $26^{\circ}\text{C}$ .
- 3) Objek glass kemudian dicuci 100  $\mu\text{L}$  medium RPMI FBS 2% untuk menghilangkan sel yang tidak melekat, ditambahkan mikroba yaitu mikroba berupa bakteri *A. hydrophilla* dengan kepadatan  $10^6$  sebanyak 250  $\mu\text{L}$
- 4) Diinkubasi selama 60 menit pada suhu  $36^{\circ}\text{C}$
- 5) Kemudian objek glass dicuci 3 kali dengan RPMI FBS 2% lalu difiksatif methanol/ethanol absolut dan dibiarkan selama 3-5 menit pada suhu ruang.
- 6) Larutan dikeringkan dan ditetesi dengan larutan giemsa, dibiarkan selama 20-30 menit, selanjutnya dicuci dengan air mengalir
- 7) Obyek glass diamati dengan pembesaran mikroskop 1000x dan dihitung untuk determinasi perbandingan sel yang menelan mikroba.

Aktivitas fagositosis dirumuskan sebagai berikut :

$$\text{Aktivitas fagositosis (\%)} = \frac{\text{Total makrofag yang menelan mikroba}}{100 \text{ makrofag}} \times 100 \%$$

Gambar isolasi dan perhitungan aktivitas fagositosis dapat dilihat pada Lampiran 9.

### 3.4.2 Parameter Penunjang

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

### 3.5 Analisis Data

Analisis data makrofag dan aktifitas fagositosis dilakukan secara statistik mempergunakan program SPSS 16 *for Windows*. Data yang didapatkan terlebih dahulu di uji kenormalannya menggunakan uji normalitas (*kolmogorov-smirnov*). Data yang tidak normal perlu dilakukan transformasi. Apabila  $\text{sig} > 0,01$  maka dilanjutkan analisis keragaman menggunakan ANOVA sesuai dengan rancangan yang dipergunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL). Data hasil penelitian diharapkan rataannya berbeda antar perlakuan (meningkat atau menurun) sedangkan standar deviasinya diharapkan tidak begitu berbeda antar perlakuan (homogen). Analisis Ragam dilakukan untuk menguji pengaruh dosis ekstrak fenol terhadap parameter uji, apakah ada pengaruhnya atau tidak terhadap parameter uji. Sedangkan uji setelah analisis ragam diperlukan untuk mengetahui apa ada perbedaan *mean* (rataan) parameter uji antara perlakuan dosis ekstrak, yaitu dengan Uji Tukey atau BNT (Beda Nyata Terkecil) untuk menentukan perbedaan antar dua perlakuan. Analisis Regresi dilakukan untuk mencari bentuk hubungan antara dosis ekstrak fenol ( $X$ ) dengan parameter uji (sel makrofag dan aktifitas fagositosis) ( $Y$ ). Perlakuan dosis ekstrak bersifat kuanditatif dengan 4 macam dosis, jadi perlu dilakukan Analisis Regresi dengan derajat polinom maksimum  $4-1=3$ , dengan praduga Persamaan Garis Regresi kurva linier  $Y = c + b_1x$ , kurva kudratik  $Y = c + b_1x + b_2x^2$  dan kurva kubik  $Y = c + b_1x + b_2x^2 + b_3x^3$ .