

### 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Materi Penelitian

##### 3.1.1 Alat Penelitian

Alat-alat (Lampiran 1) yang digunakan dalam penelitian adalah :

- Toples kapasitas 10 liter
- *Aerator set*
- *Heater*
- Colokan kabel
- Sesor
- Akuarium besar
- Autoklaf
- Nampan
- Timbangan digital
- *Beaker glass*
- Botol film
- Botol kaca kapasitas 1 liter
- *Haemocytometer*
- Mikroskop
- Sputit
- Pipet kapiler
- *Handtally counter*
- Selang
- DO meter
- pH meter
- Termometer
- Inkubator
- Rak tabung reaksi
- Tabung reaksi
- Apendorf kecil
- Kulkas
- Pipet bulir
- Pipet thoma
- Pipa kapiler
- Pipet sahli
- Box sterfoam
- Lap
- *Sentrifuge*
- Oven
- Rotary evaporator
- Blender
- Penggaris
- Ember

### 3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan (Lampiran 1) yang digunakan dalam penelitian adalah:

- Ikan Patin (*Pangasius sp.*)
- Daun Jambu Biji (*P. guajava*)
- Bakteri *A. hydrophila*
- Aluminium foil
- Kertas label
- Plastik hitam
- Air
- Etanol 96%
- Pakan buatan
- NA (Nutrien Agar)
- NB (Nutrien Broth)
- Akuades
- Solatip
- Kertas HVS
- Benang Kasur
- Plastik klip kecil
- Alkohol 70%
- Kantong plastic
- Sampel darah ikan Patin
- Tisu
- Kapas
- Na sitrat 3,8%
- Larutan Hayem
- Kertas saring

### 3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini yaitu metode eksperimental. Sukmadinata (2005) menjelaskan penelitian eksperimental atau *experimental research* merupakan penelitian yang bertujuan untuk menguji suatu hubungan sebab-akibat. Hampir secara keseluruhan penelitian yang dilakukan dalam bidang fisika, kimia, maupun biologi menguji hubungan sebab-akibat dari beberapa hal atau variabel. Hipotesis atau dugaan hubungan sebab-akibat serta variabel satu dengan variabel lainnya secara langsung diuji oleh penelitian eksperimental. Metode pemberian ekstrak yang digunakan menggunakan metode imunostimulan, yaitu pemberian ekstrak dilakukan sebelum ikan Patin diuji tantang oleh bakteri *A. hydrophila* sebagai upaya pencegahan penyakit yang disebabkan bakteri *A. hydrophila*.

### 3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan Acak Lengkap (RAL) menurut Hanafiah (2013), Rancangan Acak Lengkap (RAL) dapat dikatakan rancangan paling sederhana jika dibandingkan dengan model rancangan lainnya. Rancangan ini tidak terdapat *local control*, maka untuk sumber keragaman yang dapat diamati hanya perlakuan dengan galat. Kondisi rancangan acak lengkap ini hanya dapat dicapai di ruangan-ruangan terkontrol seperti laboratorium. Adapun Rancangan Acak Lengkap yang secara umum dinyatakan dalam model matematika adalah sebagai berikut.

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

Keterangan :

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

$\mu$  = nilai rerata umum (mean)

$T_i$  = pengaruh faktor perlakuan ke-i

$\varepsilon_{ij}$  = pengaruh galat

#### 3.3.1 Penelitian Pendahuluan

- Uji Imunostimulan

Uji imunostimulan bertujuan untuk mengetahui dosis terbaik pada pemberian imunostimulan ekstrak kasar daun jambu biji (*P. guajava*) yang ditinjau dari kenaikan sel darah putih ikan Patin. Dontriska, *et al.* (2014) bahwa sel darah putih bertanggung jawab terhadap sistem imun tubuh dan bertugas untuk memusnahkan benda-benda yang dianggap asing dan berbahaya oleh tubuh, misal bakteri atau virus.

Uji imunostimulan dilakukan melalui pemberian imunostimulan ekstrak kasar daun jambu biji sebesar 2%, 6%, dan 10% dari pakan ikan Patin (*Pangasius sp.*) dengan 2 kali ulangan. Dosis tersebut mengacu pada penelitian

Sutama (2002) yang menggunakan 2 gram ekstrak daun jambu biji per 100 gram pakan pellet atau sebesar 2% dari pakan, dalam upaya pencegahan penyakit yang disebabkan oleh bakteri *A. hydrophila*.

Adapun rancangan uji imunostimulan yaitu sebagai berikut,

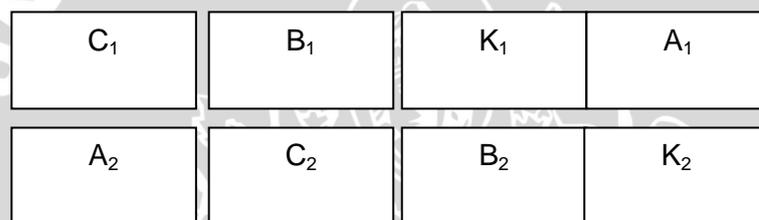
K = Ikan kontrol, tidak diberi perlakuan imunostimulan ekstrak kasar daun jambu biji 0%;

A = Perlakuan pemberian imunostimulan ekstrak kasar daun jambu biji 2%;

B = Perlakuan pemberian imunostimulan ekstrak kasar daun jambu biji 6%;

C = Perlakuan pemberian imunostimulan ekstrak kasar daun jambu biji 10%.

Denah uji imunostimulan disajikan pada Gambar 5 berikut ini.



**Gambar 5.** Denah Uji Imunostimulan

Keterangan :

A - B - C : Perlakuan penelitian      1 - 2 : Ulangan

K : Kontrol

- **Uji LD<sub>50</sub> Bakteri *A. hydrophila***

Uji LD<sub>50</sub> bertujuan untuk mengetahui tingkat virulensi bakteri *A. hydrophila* yang didapat dari Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan. Bakteri *A. hydrophila* diujikan pada ikan Patin dan ditunggu hingga ikan Patin mati sebanyak 50% dari total ikan yang dipelihara. Total ikan yang dipelihara sebanyak 6 ekor/akuarium.

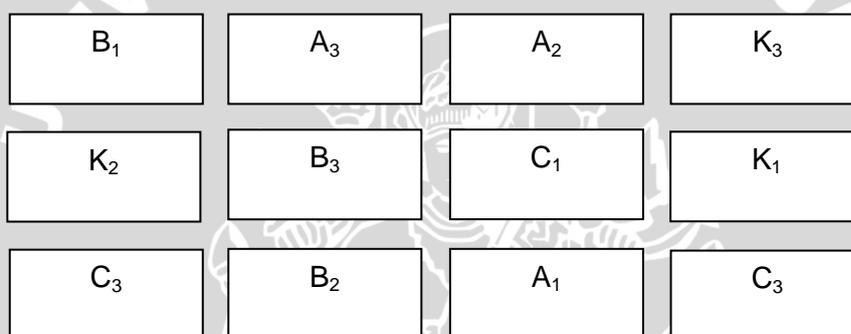
Uji LD<sub>50</sub> menggunakan bakteri *A. hydrophila* dengan kepadatan 10<sup>7</sup> sel/ml dan 10<sup>8</sup> sel/ml dengan 2 kali ulangan.

Adapun rancangan uji LD<sub>50</sub> Bakteri *A. hydrophila* yaitu sebagai berikut,



- K = Ikan kontrol, tidak diberi perlakuan imunostimulan ekstrak kasar daun jambu biji 0% dan diuji tantang bakteri *A. hydrophila*;
- A = Pemberian imunostimulan ekstrak kasar daun jambu biji sebanyak 2% dan diuji tantang bakteri *A. hydrophila*;
- B = Pemberian imunostimulan ekstrak kasar daun jambu biji sebanyak 4% dan diuji tantang bakteri *A. hydrophila*;
- C = Pemberian imunostimulan ekstrak kasar daun jambu biji sebanyak 6% dan diuji tantang bakteri *A. hydrophila*.

Denah penelitian utama disajikan pada Gambar 7 berikut ini.



**Gambar 7.** Denah Penelitian Utama

Keterangan :

A - B - C : Perlakuan penelitian 1 - 2 - 3 : Ulangan

K : Kontrol

### 3.4 Prosedur Penelitian

#### 3.4.1 Persiapan Penelitian

##### a. Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi alat dan bahan dilakukan dengan menggunakan Autoklaf, adapun prosedurnya adalah sebagai berikut,

- Alat dicuci kemudidan dikeringkan lalu dibungkus dengan kertas koran dan diikat menggunakan benang kasar;

- Akuades dimasukkan ke dalam ruang sterilisasi autoklaf sampai batas sistem pemanas dari autoklaf tersebut,
- Alat dan bahan yang hendak disterilisasi dimasukkan kedalam keranjang autoklaf, selanjutnya keranjang tersebut dimasukkan kedalam autoklaf lalu autoklaf ditutup;
- Saat menutup autoklaf, semua tuas ditutup secara diagonal, agar seimbang kekuatannya pada saat menutup autoklaf, klep untuk keluarnya uap dipastikan pada posisi berdiri / tegak;
- Autoklaf dinyalakan pada posisi ON (Keatas), lampu power berwarna kuning;
- Suhu diputar pada posisi maksimal, sehingga warna lampu *heating* berwarna hijau;
- Uap air dari klep dibiarkan hingga keluar, lalu ditutup atau diarahkan ke samping
- Ditunggu suhu hingga suhu sterilisasi mencapai 121°C,
- Temperatur diturunkan sampai lampu pada *sterilizing* berwarna kuning,
- *Timer* diatur pada posisi 15 menit (waktu sterilisasi);
- Alarm berbunyi tanda sterilisasi berakhir, temperatur diturunkan pada posisi minimal;
- Autoklaf dimatikan pada posisi kebawah (OFF);
- Klep dibuka secara perlahan sampai jarum menunjukkan angka 0;
- Autoklaf dapat dibuka;
- Alat dan bahan diambil dari autoklaf.

#### **b. Persiapan Ikan**

Ikan uji merupakan ikan Patin (*Pangasius sp.*) berasal dari Laboratorium Reproduksi Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, sebanyak 72 ekor dengan panjang per ekor 10-12 cm, bobot per ekor 5-7 gr, dan

padat tebar ikan yaitu 1 ikan per liter. Ikan diambil dengan menggunakan seser, lalu diadaptasikan ke dalam toples berkapasitas 10 L selama 3 hari berturut-turut. Adaptasi berfungsi agar ikan Patin menyesuaikan diri dengan lingkungan barunya selain itu untuk mengetahui kondisi kesehatan dari ikan Patin tersebut. Selama ikan diadaptasikan, ikan diberi makan 3 kali sehari, pagi pukul 08:00 WIB, siang pukul 13:00 WIB dan sore pukul 16:00 WIB. Pakan yang diberikan sebanyak 3% dari bobot tubuhnya. Selain itu penyiponan dilakukan jika air keruh akibat sisa pakan dan feses dari ikan tersebut.

### c. Persiapan Alat Penelitian

Akuarium kapasitas 10 liter dicuci dengan detergen lalu dijemur, setelah kering toples dipasang plastik hitam hingga menutupi seluruh permukaan toples tersebut, hal tersebut dilakukan untuk menghindarkan ikan Patin dari cahaya secara langsung serta mencegah terjadinya fluktuasi suhu. Setelah itu, toples dipasang *Aerator set* dan diisikan air sebanyak 10 Liter serta dipasang *heater* pada masing-masing toples untuk menyesuaikan suhu air yang baik bagi ikan Patin (*Pangasius sp.*).

### d. Bakteri *A. hydrophila*

#### 1) Media Cair NB (*Nutrien Broth*)

- NB ditimbang 6 gram dilarutkan dalam 200 ml akuades dalam erlemneyer kemudian diaduk hingga larut sempurna berwarna kuning
- Erlemneyer ditutup kapas dan aluminium foil lalu diikat menggunakan benang
- Media sterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121<sup>0</sup>C, tekanan 1 atm selama 15 menit
- Media dibiarkan dingin hingga mencapai suhu ruang karena bakteri akan mati apabila diinokulasi pada media yang masih panas

2) Penanaman Bakteri *A. hydrophila*

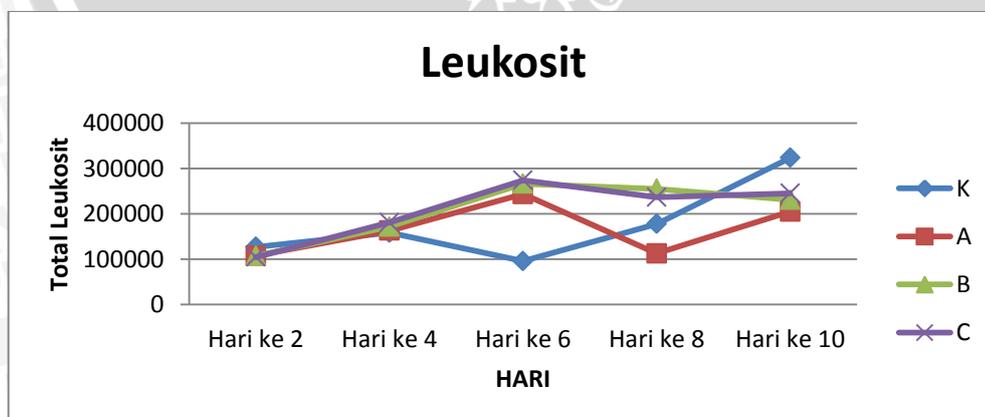
- 200 ml larutan NB, dimasukkan isolat bakteri *A. hydrophila* kedalam larutan NB dengan Oose sebanyak 2 Oose
- Lalu Diinkubator pada suhu 37°C hingga 48 jam
- Di cocokkan dengan Tabung Mc. Farland kepadatan 10<sup>8</sup> sel/ml

**e. Pembuatan Ekstrak Kasar Daun Jambu Biji (*P. guajava*)**

Daun jambu biji sebanyak 1 kg, dicuci air bersih, dikering anginkan, setelah itu dicacah, dan dioven dengan suhu 50 °C selama 11 Jam, setelah itu daun tersebut dihaluskan. Adapun hasil serbuk kering setelah dihaluskan yaitu 424,2 gr. Serbuk kering daun jambu biji kemudian dimaserasi selama 2 x 24 jam, dengan melarutkan serbuk daun jambu biji sebanyak 424,2 gr kedalam etanol 96% sebanyak 2400 ml. Setelah itu dilakukan pemisahan ekstrak dengan pelarut tersebut oleh *rotary evaporator* dengan suhu 45° C, kecepatan 80 rpm, didapatkan hasil ekstrak kasar daun jambu biji berupa pasta yaitu 38,7 gr.

**f. Penentuan Dosis Ekstrak Kasar Daun Jambu Biji (*P. guajava*)**

Hasil uji imunostimulan (Gambar 8) menunjukkan kenaikan leukosit tertinggi pada masing-masing perlakuan ada di hari ke 6 dengan nilai, perlakuan (A) (Dosis 2%) sebanyak 24,3x10<sup>4</sup> sel/mm<sup>3</sup>, perlakuan (B) (Dosis 6%) sebanyak 26,62x10<sup>4</sup> sel/mm<sup>3</sup> dan perlakuan (C) (Dosis 10%) sebanyak 27,37x10<sup>4</sup> sel/mm<sup>3</sup>.



**Gambar 8.** Grafik Total Leukosit

Total leukosit yang diberi perlakuan (A), (B) dan (C) memiliki kedekatan jumlah leukosit yang dihasilkan, sehingga perlakuan (A) dan perlakuan (B) dapat digunakan untuk pemberian imunostimulan ekstrak kasar daun jambu biji. Dari hasil total leukosit ini juga dapat ditentukan bahwa ujiantang bakteri *A. hydrophila* dapat dilakukan di hari ke 6, karena di hari ke 6 total leukosit mengalami total leukosit tertinggi.

#### g. Penentuan Kepadatan Bakteri *A. hydrophila*

Uji LD<sub>50</sub> dilakukan untuk melihat tingkat virulensi bakteri *A. hydrophila*, didapatkan hasil bahwa ikan mati mencapai 50% dari total populasi terdapat pada perlakuan B yakni perlakuan penginfeksi bakteri dengan kepadatan 10<sup>8</sup> sel/ml di hari ketiga tepatnya di jam ke 56, maka ujiantang bakteri untuk penelitian utama menggunakan kepadatan 10<sup>8</sup> sel/ml dengan pengambilan darah di hari ke 3 sebelum diujiantang dan hari ke 3 post diujiantang.

#### h. Pengenceran Bakteri

Bakteri dengan kepadatan 3x10<sup>9</sup> sel/ml diencerkan menjadi 10<sup>8</sup> sel/ml dan 10<sup>7</sup> sel/ml untuk uji LD<sub>50</sub>, sedangkan untuk penelitian utama bakteri yang digunakan adalah bakteri dengan kepadatan 10<sup>8</sup> sel/ml, untuk mendapatkan kepadatan 10<sup>7</sup> sel/ml dan 10<sup>8</sup> sel/ml dilakukan pengenceran. Perhitungan suspensi bakteri dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

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

Dimana :

N<sub>1</sub> : Kepadatan populasi bakteri dalam media NB (sel/ml)

N<sub>2</sub> : Kepadatan populasi bakteri yang dikehendaki (sel/ml)

V<sub>1</sub> : Volume suspensi bakteri dalam NB yang dibutuhkan

V<sub>2</sub> : Volume media air dalam wadah pemeliharaan ikan

Peremajaan bakteri  $3 \times 10^9$  sel/ml dilakukan dengan penanaman bakteri pada media NB (*Nutrien Broth*) dan diinkubasi selama 3 hari pada inkubator. Bakteri  $3 \times 10^9$  sel/ml tersebut kemudian diencerkan menggunakan air pada media infeksi dengan perbandingan yang dihitung menggunakan rumus di atas. Berdasarkan rumus di atas didapatkan bahwa untuk mendapatkan bakteri kepadatan  $10^7$  sel/ml dan  $10^8$  sel/ml pada air sebanyak 6 liter (6000 ml) adalah dengan memasukkan bakteri kepadatan  $3 \times 10^9$  sel/ml sebanyak 20 ml (Kepadatan  $10^7$  sel/ml) dan 200 ml (kepadatan  $10^8$  sel/ml) ke dalam air sebanyak 6000 ml.

### 3.4.2 Pelaksanaan Penelitian

#### a. Pembersihan Toples

Toples dengan kapasitas 10 liter, dicuci dengan detergen sebagai desinfektan, lalu toples dengan kapasitas 10 liter dibilas dengan air bersih dan dijemur untuk dikeringkan, setelah kering, toples dipasang plastik hitam agar ikan Patin terhindar dari cahaya langsung. Toples lalu disusun dan dipasang *aerator set* yang berfungsi sebagai masukan oksigen terlarut dan *heater* yang berfungsi sebagai perekayasa suhu.

#### b. Pemberian Ekstrak Kasar Daun Jambu Biji (*P. guajava*)

Ekstrak kasar daun jambu biji (*P. guajava*) diberikan pada ikan Patin (*Pangasius* sp.) melalui pakan pellet dengan menggunakan metode imunostimulan yaitu pemberian ekstrak dilakukan sebelum ikan Patin diuji tantang oleh bakteri *A. hydrophila* sebagai upaya pencegahan penyakit yang disebabkan bakteri *A. hydrophila*. Ekstrak kasar daun jambu biji ditimbang yakni sebanyak 2%, 6% dan 10% dari total pakan untuk Penelitian Pendahuluan, sedangkan untuk Penelitian Utama sebanyak 2%, 4% dan 6%. Setelah itu ekstrak kasar tersebut dicampur dengan putih telur (sebagai perekat) dan pakan pellet. Pakan yang mengandung ekstrak kasar daun jambu biji dikering anginkan

selama 1 hari, selanjutnya pakan dengan kandungan ekstrak kasar daun jambu biji diberikan pada ikan Patin sebanyak 3% dari bobot tubuh per harinya. Frekuensi pemberian pakan dilakukan sebanyak 3 kali yaitu, pagi hari pukul 08:00 WIB, siang hari pukul 13:00 WIB, dan sore hari pukul 16:00 WIB.

### c. Uji Tantang Bakteri pada Ikan Patin (*Pangasius sp.*)

Uji Tantang dilakukan menggunakan bakteri *A. hydrophila* dengan metode perendaman. Perendaman ikan dengan bakteri *A. hydrophila* dilakukan dengan kepadatan  $10^7$  sel / ml dan  $10^8$  sel / ml (uji LD<sub>50</sub>) dan  $10^8$  sel / ml (penelitian utama). Perendaman ini dilakukan menggunakan kapasitas air 10 liter, sehingga dapat digunakan rumus pengenceran:

$$\begin{array}{ll}
 \text{a) } V_1 \times N_1 & = V_2 \times N_2 \\
 V_1 \times (3 \times 10^9) & = 6000 \times 10^7 \\
 V_1 & = \frac{6000 \times 10^7}{3 \times 10^9} \\
 & = 20 \text{ ml}
 \end{array}
 \qquad
 \begin{array}{ll}
 \text{b) } V_1 \times N_1 & = V_2 \times N_2 \\
 V_1 \times (3 \times 10^9) & = 6000 \times 10^8 \\
 V_1 & = \frac{6000 \times 10^8}{3 \times 10^9} \\
 & = 200 \text{ ml}
 \end{array}$$

Hasil dari perhitungan tersebut menyatakan kebutuhan bakteri yang digunakan yaitu sebanyak 20 ml (kepadatan  $10^7$  sel/ml) dan 200 ml (kepadatan  $10^8$  sel/ml).

### d. Pengambilan Darah

- Total Eritrosit

Eritrosit ikan menurut Putra (2015) memiliki inti yang terletak di tengah-tengah, berbentuk oval, berwarna merah keunguan dan mempunyai kromatin yang kompak yang berfungsi mengikat oksigen. Menurut Yanto, *et al.* (2015), perhitungan total eritrosit berdasarkan metode Klonzt (1994) yaitu sampel darah diambil dari tabung *ependorf* dengan menggunakan alat hisap reitrosit berupa kapiler dengan batu kecil berwarna merah di dalamnya hingga garis menunjukkan 0,5 ml, selanjutnya ditambahkan dengan larutan hayem hingga

mencapai 101 ml, setelah itu larutan dihomogenkan dengan cara menggoyangkan dengan bentuk angka delapan. Darah dibuang dua tetes untuk membuang gelembung udara, lalu diteteskan pada kamar hitung yang ditutup dengan *cover glass* dan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 100 kali dengan 5 lapang pandang di kotak kecil pada kamar hitung *haemocytometer* dan dilakukan perhitungan dengan rumus :

$$\text{Jumlah eritrosit} = n \times 10^4 \text{ sel / mm}^3$$

Keterangan rumus:

- $n$  = jumlah sel eritrosit yang ada pada 5 kotak kecil kamar hitung  
 $10^4$  = faktor pengenceran

- Hematokrit

Ikan diambil darahnya dengan menggunakan jarum suntik di vena caudalis sebanyak 0,3 ml. Darah ikan ditampung dalam *ependorf*, kemudian dimasukkan ke dalam kapiler hematokrit, ditutup dengan *vitrex* (penutup lilin). Kapiler hematokrit yang berisi darah kemudian sentrifuge dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit, setelah itu endapan sel darah merah diukur menggunakan pembaca hematokrit (Lukistyowati dan Henny, 2013).

- Hemoglobin

Tabung hemoglobin diisi HCL 0,1 N sampai dengan skala 2. Tetesan darah dihisap dengan menggunakan pipet hemoglobin yang telah dipasang aspirator sampai dengan skala 0,02 mL. Darah dimasukkan ke dalam tabung hemoglobin, usahakan darah benar-benar masuk semua pada tabung hemoglobin, ditunggu beberapa saat hingga terjadi reaksi asam hematin. Darah diencerkan dengan aquades setetes demi setetes sambil diaduk dan disesuaikan dengan warna larutan yang terdapat pada blok komparator (warna standar),

setelah warna sama dengan larutan standar, maka pengenceran dihentikan.

Tinggi larutan dalam tabung hemoglobin dibaca dan dicatat (Patria *et al.*, 2013).

### 3.5 Parameter Uji

Parameter utama pada penelitian ini adalah total eritrosit, hematokrit dan hemoglobin ikan Patin (*Pangasius sp.*). Parameter penunjang dalam penelitian ini adalah mortalitas dan kualitas air yang meliputi, suhu, pH air, oksigen terlarut.

### 3.6 Analisis Data

Penelitian ini menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap) dengan 3 kali ulangan. Analisis keragaman atau uji F digunakan untuk mengetahui pengaruh perlakuan, apabila nilai F berbeda nyata atau berbeda sangat nyata dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil), uji BNT digunakan untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan. Uji *polinomial orthogonal* digunakan untuk mengetahui bentuk regresi atau hubungan antara perlakuan dengan parameter. Uji T berpasangan digunakan untuk mengetahui perbedaan perlakuan antara pra dan post diuji tantang bakteri *A. hydrophila*.