

3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan untuk penelitian tentang Pengaruh Pemberian ekstrak kasar Rosella (*H. Sabdarifa* L.) terhadap histopatologi insang ikan Koi (*C. carpio*) yang diinfeksi bakteri *P. flourescens* antara lain (Lampiran 1.) :

- Akuarium
- Timbangan analitik
- Aerator
- Selang aerasi
- Batu aerasi
- Nampan
- Pipet tetes
- Mikroskop cahaya
- Ember plastik
- Tissue embedding
- Fotomikroskop
- Toples kaca
- Base mold
- Heater akuarium
- Thermometer
- DO meter
- pH meter
- Objek glass
- Cover glass
- Rotary evaporator
- Hot plate
- Sectio set
- Mikrotom
- Tissue processor
- Sambungan T serasi
- Cassett embedding

3.1.2 Bahan Penelitian

Berikut bahan beserta fungsinya yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut (Lampiran 2.):

- Ikan Koi (*C. carpio*)
- Rosella (*H. sabdariffa* L.)
- Bakteri *P. flourescens*
- Eosin
- Entellan
- Pakan Pellet

- Xylene
- Larutan Davidson's
- Pakan Ikan
- Formalin 10%
- Parafin Cair
- Asam Asetat
- Benang Kasur
- Kapas
- Tissue
- Etanaol 95%
- Etanol 70%
- Kertas saring
- Alumunium Foil
- Hematoksilin
- Eosin
- Entellan
- Pakan Pellet

3.2. Media Penelitian

Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah air tawar di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang. Air yang diperoleh dari sumur kemudiann dialirkan lewat pipa menuju akuarium berukuran 40x40x40 cm sebanyak 15 buah dan diberi aerasi sebagai suplai oksigen.

3.3. 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 Jaedun (2011), metode eksperimen merupakan satu- satunya metode penelitian yang dianggap paling dapat menguji hipotesis hubungan sebab - akibat, atau paling dapat memenuhi validitas internal. Metode eksperimen merupakan penelitian yang digunakan untuk mencari pengaruh perlakuan tertentu terhadap dampaknya dalam kondisi yang terkendalkan.

Metode penelitian dalam menganalisa histopatologi insang ikan patin menggunakan metode deskriptif. Menurut Suryana (2010), metode deskriptif

yaitu metode yang digunakan untuk mencari unsur-unsur, ciri-ciri, sifat-sifat suatu fenomena. Metode ini dimulai dengan mengumpulkan data, menganalisis data dan menginterpretasikannya. Metode deskriptif dalam pelaksanaannya dilakukan melalui teknik survey, studi kasus (bedakan dengan suatu kasus), studi komparatif, studi tentang waktu dan gerak, analisis tingkah laku, dan analisis dokumenter.

3.4. Pengambilan Data

Teknik pengambilan data dalam penelitian ini dilakukan dengan cara observasi langsung, yaitu pengamatan langsung ke lokasi penelitian yang dilakukan dengan memperhatikan, mempelajari dan mencatat berbagai hal yang dapat dijadikan objek penelitian serta mengumpulkan data sekunder dari berbagai dokumen .

3.5. Rancangan Penelitian

Menurut Sastrosupadi (2000), rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) untuk percobaan yang mempunyai media atau tempat percobaan yang *seragam* atau *homogen*, sehingga RAL banyak digunakan untuk percobaan di laboratorium, rumah kaca, dan peternakan. Karena lingkungan homogen maka lingkungan atau tempat percobaan tidak memberikan pengaruh pada respon yang diamati dan model untuk RAL adalah sebagai berikut :

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

Keterangan:

Y_{ij} : Respon atau nilai pengamatan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

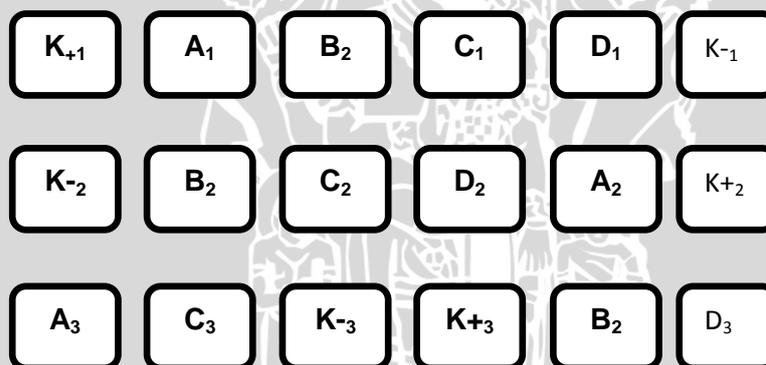
μ : Nilai tengah umum

T_i : Pengaruh perlakuan ke-i

ε_{ij} : Pengaruh gallet percobaan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

Pada penelitian ini, sebagai perlakuan menggunakan Ikan Koi (*C. carpio*) dengan ukuran 7-11 cm sedangkan untuk bahan ekstrak yang digunakan yaitu Bunga Rosella (*H. sabdariffa* L.) berasal dari batu. Variabel bebas berupa perlakuan pemberian ekstrak Bunga Rosella (*H. sabdariffa* L.) dengan konsentrasi 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, dan 200 ppm sebagai pengaruh kerusakan insang. Untuk mempermudah dalam menganalisa diperlukan kontrol sebagai pembanding yaitu kontrol positif perlakuan sampel dengan penginfeksi bakteri tanpa pemberian ekstrak Bunga Rosella (*H. sabdariffa* L.) sedangkan kontrol negatif yaitu ikan sehat tanpa perlakuan. Setiap perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Sehingga total sampel yang diamati sebanyak 18 sampel.

Untuk denah penelitian disajikan pada gambar berikut :



Gambar 3. Denah Penelitian

Keterangan:

- K : kontrol tanpa perlakuan
- A : perlakuan dengan dosis ekstrak 50 ppm
- B : perlakuan dengan dosis ekstrak 100 ppm
- C : perlakuan dengan dosis ekstrak 150 ppm
- D : perlakuan dengan dosis ekstrak 200 ppm
- 1, 2, 3 : Ulangan

3.6. Prosedur Penelitian

3.6.1. Persiapan Penelitian

a. Sterilisasi Alat Dan Bahan

- Alat yang dicuci, dikeringkan kemudian dibungkus dengan koran dan iikat,

- Akuades dimasukkan ke dalam ruang sterilisasi autoklaf sampai menutup sistem pemanas untuk mencegah penimbunan kapur pada elemen pemanas,
- Keranjang yang berisi bahan atau alat yang akan disterilkan dimasukkan ke dalam autoklaf, kemudian tutup autoklaf,
- Pada saat menutup, selang dimasukkan ke posisi yang tepat. Tanda panah pada penutup sejajar dengan garis . tuas ditutup secara diagonal agar seimbang kekuatan pada saat menutup autoklaf,
- Klep keluaranya uap diposisikan berdiri atau tegak dan tombol ditekan ke arah ON,
- Thermostat diputar pada posisi maximal di angka 10,
- Ditunggu hingga keluar uap air dari klep lalu tutup atau arahkan ke samping dan jarum menunjukkan suhu sterilisasi, temperatur diturunkan sampai lampu pada sterilisasi berwarna kuning dengan waktu pada posisi 15 menit ,
- Alarm berbunyi tanda sterilisasi berakhir, diturunkan temperatur pada posisi minimal , matikan autoclaf pada posisi kebawah (OFF) dan
- Klep dibuka secara perlahan sampai jarum menunjukkan angka 0, tutup autoklaf dapat dibuka.

b. Persiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan yaitu ikan Koi (*C. carpio*) sebanyak 150 ekor dengan panjang 7-11 cm. Masing - masing akuarium diisi ikan diisi 10 ekor ikan uji. Menurut Lengka, Kedis, Manoppo, dan Magdalena (2013), ikan dipindahkan ke dalam akuarium kaca berukuran 80 cm x 40 cm x 40 cm (p x l x t) dengan kepadatan 15 ekor/akuarium, namun sebelumnya dilakukan penimbangan berat awal. Setiap akuarium dilengkapi dengan aerator. Selanjutnya dilakukan aklimatisasi selama 7 hari pada akuarium. Selama aklimatisasi ikan Koi (*C. carpio*) diberi pakan secara ad libitum sebanyak 2 kali sehari dan dilakukan penyiponan apabila air pemeliharaan sudah kotor.

3.6.2. Pembiakan Bakteri *P. fluorescens*

a. Media Padat TSA (*Tryptic Soya Agar*)

- TSA merk OXOID dengan dosis 40gram/L,
- TSA sebanyak 2,4 gram dilarutkan ke dalam 60 ml akuades pada erlemenyer,
- Media dipanaskan di atas hotplate hingga homogen dan erlemenyer ditutup dengan kapas dan kertas perkamen/ aluminium foil lalu ditali dengan benang,
- Media sterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121 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 dan
- Media dituang pada cawan petri lalu ditunggu hingga dingin dan digunakan atau disimpan pada lemari pendingin dengan diberi label.

b. Media Cair TSB (*Tryptitone Sot Broth*)

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

c. Pembiakan Bakteri *P. fluorescens*

- Larutan TSB disiapkan sebanyak 6 gram dalam erlemenyer sebanyak 220 ml,
- Jarum osse dipanaskan diatas bunsen sampai berpijar, setelah dingin jarum osse disentuhkan ke biakan murni *P. fluorescens* kemudian dicelupkan pada TSB sebanyak 2 osse,
- Larutan TSB dibiarkan 12-24 jam dalam inkubator pada suhu 37°C dan disiapkan cawan petri yang berisi media TSA,

- Setelah TSB menjadi keruh, jarum osse dicelupkan ke TSB dan digoreskan ke permukaan TSA secara zig zag dengan metode goresan sinambung, T, atau kuadran dan
- Media TSA di inkubasi di dalam inkubator dengan suhu 37 C selama 24 jam.

3.6.3. Pembuatan Ekstrak Kasar Bunga Rosella (*H.sabdariffa L.*)

Pembuatan ekstrak Bunga Rosella (*H.sabdariffa L.*), dilakukan maserasi selama 3 hari dengan takaran perbandingan 1gram rosella : 5ml etanol. Dalam melakukan evaporator, suhu yang dipakai adalah 40°C selama satu jam. Menurut Rostinawati (2009), bunga rosella kering dihaluskan sampai menjadi serbuk kemudian dimaserasi 3 x 24 jam dengan etanol 95 %, selanjutnya dilakukan pemekatan dengan evaporator sampai diperoleh ekstrak bunga Rosella (*H.sabdariffa L.*).

3.6.4. Pelaksanaan Penelitian

a. Sterilisasi Akuarium Penelitian

- Akuarium ukuran 40x40x40 cm yang akan dipergunakan dipersiapkan terlebih dahulu,
- Akuarium dicuci dengan ka[orit], didiamkan selama sehari kemudian dibilas dengan air bersih sampai bersih,
- Akuarium dikeringkan dan disusun berdasarkan denah percobaan dan masing-masing akuarium diisi air

b. Penginfeksi Bakteri *P. fluorescens*

Bakteri *P.flourescens* diperoleh dari Balai Perikanan Budidaya Air Payau (BPBAP) Jepara dengan kepadatan 10^8 sel/ml , pada pengukuran bakteri dengan metode makrofag diketahui kepadatan 12×10^8 sel/ml, untuk mendapatkan kepadatan 10^7 sel/ml dilakukan pengenceran dengan menggunakan rumus :

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

Dimana :

N_1 : Kepadatan populasi bakteri dalam media TSB (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

Menurut hasil uji pendahuluan yang telah dilakukan, kepadatan bakteri 10^7 yang akan digunakan untuk penelitian. Karena pada saat melakukan uji pendahuluan, dengan pemberian bakteri kepadatan 10^8 ikan koi mengalami kematian dalam waktu kurang dari 3 jam. Sehingga pengenceran biakan bakteri sebanyak 10 ml dengan kepadatan 10^8 sel/ml menjadi 10^7 sel/ml menggunakan rumus pengenceran yakni :

$$\begin{aligned} V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\ 10 \times 10^8 &= V_2 \times 10^7 \\ V_2 &= \frac{10 \times 10^8}{10^7} \\ &= 100 \text{ ml} \end{aligned}$$

Bakteri yang digunakan sebanyak 10 ml sehingga diketahui kebutuhan aquadest (larutan pengencer) sebanyak 90 ml.

c. Perendaman Ikan Uji

Pada perendaman ikan uji dengan bakteri *P. fluorescens* kepadatan 10^7 sel/ml yakni menggunakan 2 akuarium yang masing-masing berukuran $40 \times 40 \times 40$ cm³ dengan kapasitas air 15 liter. Sehingga menggunakan rumus pengenceran :

$$\begin{aligned} V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\ V_1 \times 10^8 &= 15000 \times 10^7 \\ V_1 &= \frac{15000 \times 10^7}{10^8} \\ V_1 &= 1500 \text{ ml} \end{aligned}$$

Hasil perhitungannya tersebut dapat diketahui kebutuhan bakteri yang digunakan sebanyak 1500 ml dan air tawar 13500 ml yang dimasukkan dalam akuarium untuk penginfeksi yang telah diberi aerasi. Setelah itu ikan koi

ukuran 7-11 sebanyak 75 ekor dimasukkan ke dalam akuarium dan direndam 2 jam karena menurut penelitian penduluan LD₅₀ (lethal dosis) ikan yang diinfeksi dengan bakteri *P.flourescens* dengan kepadatan 10⁸ sel/ml sudah mati 100% selama 3 jam, sehingga kepadatan bakteri yang digunakan pada penelitian yakni 10⁷ sel/ml dengan lama perendaman 1 jam 30 menit. Setelah itu ikan dipindahkan ke dalam akuarium berisi air tawar. Selama penginfeksian ikan tidak diberi pakan

d. Perlakuan Menggunakan Ekstrak Kasar Bunga Rosella (*H.sabdariffa* L.)

Berdasarkan penelitian pendahuluan LC₅₀ (letal concentration) dengan menggunakan dosis 0 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm dan 200 ppm menunjukkan bahwa ikan yang diberi larutan ekstrak rosela dengan dosis 200 ppm menunjukkan ikan mati 100% pada jam ke 84, dimana lethal concentrate 50 adalah konsentrasi yang menyebabkan kematian pada 50% binatang percobaan, sehingga dosis yang digunakan untuk pengobatan dengan ekstrak kasar 0 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm dan 200 ppm dengan lama waktu 62 jam, karena pada dosis 200 ppm ikan mati sebanyak 50% pada jam ke 62. Setelah ikan diobati dengan larutan rosela, dimasukkan ke dalam akuarium dengan ukuran 40 x 40 x 40 cm masing-masing 10 ekor. Pemeliharaan ikan dilakukan selama 2 minggu. Menurut Agus, Yusufi dan Nafi (2010), wadah yang digunakan dalam penelitian ini adalah akuarium dengan ukuran 30 x 25 x 25 cm yang berjumlah 9 buah, dengan padat tebar 8 ekor ikan/akuarium dan volume air sebanyak 16 L. Setiap perlakuan dosis diulang sebanyak 3 kali. Saat pemeliharaan ikan diberi pakan 2 kali yakni pagi dan sore hari secara abilitum dan dilakukan pengukuran suhu, pH dan DO setiap hari pagi dan sore hari.

e. Pengambilan Insang

Pengambilan jaringan insang dilakukan 1-3 hari setelah penginfeksian bakteri. Pengambilan selanjutnya dilakukan pada minggu kedua pemeliharaan,

dilakukan pembedahan ikan menggunakan sectio set. Insang yang diambil bagian samping kanan dan kiri di mana agar diketahui kerusakan yang terjadi didaerah mana. Setelah itu insang ikan dibilas dengan aquades agar menghilangkan darahnya, setelah itu insangnya dimasukkan ke dalam wadah yang berisi larutan davidson.

f. Pembuatan Preparat Histopatologi

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

- **Tahap Fiksasi**

Sampel insang ikan yang akan diamati jaringannya diambil. Jaringan tersebut kemudian direndam dalam larutan buffer yaitu formalin 10% 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 ke dalam 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 56-60°C selama 2 jam, kemudian dilanjutkan dengan mencelupkan kembali ke dalam parafin cair dengan suhu 56-60°C 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 40°C), kemudian pilih hasil sayatan yang terbaik dan siapkan obyek glass (untuk persiapan pewarnaan HE), sebelumnya obyek glass harus diolesi dengan perekat polyisin. Berikutnya, keringkan pada oven dengan suhu 50-60°C kurang lebih selama 30 menit.

- **Teknik pewarnaan jaringan dengan menggunakan HE**

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

- **Tahap Mounting**

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.

3.6.5. Pengambilan Jaringan Insang

Pengambilan sampel insang ikan dilakukan pada penelitian minggu kedua. Ikan diambil insangnya untuk diamati histologi insangnya. Sampel insang dimasukkan kedalam botol kaca dan diberi pengawet yaitu larutan davidson

dilanjutkan pembuatan preparat untuk histopatologi dan pengamatan preparat hasil histopatologi.

3.7. Parameter Uji

3.7.1 Parameter Utama

Parameter utama yang diamati dalam penelitian ini adalah histopatologi insang ikan Koi (*C. carpio*). Pengamatan ini dilakukan untuk melihat gambaran jaringan insang pada ikan yang tanpa perlakuan larutan dan infeksi, ikan yang diinfeksi dan diobati yang dipelihara selama 2 minggu.

3.7.2 Parameter Penunjang

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

3.8 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.

Hasil uji histopatologi insang ikan Koi (*C. carpio*) menggunakan analisis secara deskriptif. Untuk mengetahui tingkat kerusakan jaringan insang ikan koi yang telah diberi ekstrak, dilakukan analisis statistik pemberian skoring dengan metode semi kuantitatif. Analisa data dengan menggunakan modifikasi metode dari Pantung, Helander, Helander and Cheevaporn (2008) dalam Putri, Abdulgani dan Trisnawati (2014) yaitu metode *skoring (semikuantitatif)* perubahan histopatologis. Untuk melihat kerusakan jaringan pada tiap filamen dilakukan perbesaran sampai 400x. Kemudian dibagi menjadi beberapa luasan

bidang pandang dimana pada satu bidang pandang dihitung persentase tingkat kerusakan jaringan insang tergantung pada tingkat dan luasan perubahan : persentase yang telah didapatkan diberi skoring dari angka 1 sampai 4. Angka 1 mempunyai tingkat persentase kerusakan jaringan 0-5%, angka 2 tingkat persentase kerusakan jaringan 6-25%, angka 3 tingkat persentase kerusakan jaringan 26-50% dan angka 4 tingkat persentase kerusakan jaringan >50%.

Setiap bidang lapang pandang diamati tingkat kerusakan jaringannya dengan kriteria hiperplasia, fusi, dan nekrosis. Persentase kerusakan setiap luas bidang lapang pandang dihitung berdasarkan jumlah sel yang mengalami kerusakan dengan rumus:

$$\text{Presentase Kerusakan} = \frac{\text{Jumlah Sel Yang Rusak}}{\text{Jumlah Sel Analisis}} \times 100\%$$

