

3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat Penelitian

Alat – alat (Lampiran 1.) yang di gunakan untuk penelitian tentang pengaruh pemberian ekstrak buah pare (*M. charantia*) terhadap hematologi ikan mas (*C. carpio*) yang di infeksi bakteri *A. hydrophila* antara lain:

- Toples
- Timbangan digital
- Aerator set
- Selang air
- Nampan
- Pipet tetes
- Pipet Thoma Eritrosit
- Pipet Thoma Leukosit
- Mikroskop cahaya
- Spektrofotometer
- *Haemocytometer*
- Jarum suntik
- *Eppendorf tube*
- Sentrifius mikrohematokrit
- Skala hematokrit
- *Rotary evaporate*
- *Incubator shaker*
- Vortex
- *Cover Glass*
- *Object Glass*
- *Handtally counter*
- Sesar Ikan
- Ember Plastik
- Erlenmeyer
- Botol film
- Thermometer
- pH meter
- DO meter
- Tabung reaksi
- Rak tabung reaksi
- Penggaris
- Spatula



3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan – bahan (Lampiran 2.) yang digunakan untuk penelitian tentang pengaruh pemberian ekstrak buah pare (*M. charantia*) terhadap hematologi ikan mas (*C. carpio*) yang di infeksi bakteri *A. hydrophila* antara lain:

- Ikan Mas (*C. carpio*)
- Buah Pare (*M. charantia*)
- Bakteri *A. hydrophila*
- *Aluminium foil*
- Alkohol
- Gymsa
- Etanol
- Akuades
- Larutan Turk
- Larutan Hayem
- Larutan Na-fis
- Larutan NHCl
- Sarung Tangan
- Kertas Saring
- Tissue
- Kapas
- Kertas label
- *Tryptitone Soy Broth* (TSB)
- *Tryptitone Soy Agar* (TSA)
- *Chlorin*
- Air media

3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian eksperimen. Menurut Syaodih (2010) *dalam* Hamdi dan Bahsruddin (2014), penelitian eksperimental merupakan penelitian yang paling murni kuantitatif. Dikatakan paling murni karena semua prinsip dan kaidah – kaidah penelitian kuantitatif dapat diterapkan pada metode ini. Penelitian eksperimental merupakan penelitian laboratorium, walaupun bisa juga dilakukan di luar laboratorium, tetapi pelaksanaannya menerapkan prinsip – prinsip penelitian laboratorium, terutama dalam pengontrolan terhadap hal – hal yang mempengaruhi jalannya eksperimen. Metode ini bersifat validation atau menguji,

yaitu menguji pengaruh satu atau lebih variable terhadap variable lain. Variable yang mempengaruhi dikelompokkan sebagai variable bebas (*independent variables*) dan variable yang dipengaruhi dikelompokkan variable terkait (*dependent variables*).

Pengambilan data yang digunakan dalam penelitian ini adalah secara 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 (Surakhmad, 1998).

3.3 Rancangan Penelitian

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

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

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

μ = Nilai tengah umum

T_i = pengaruh perlakuan ke i

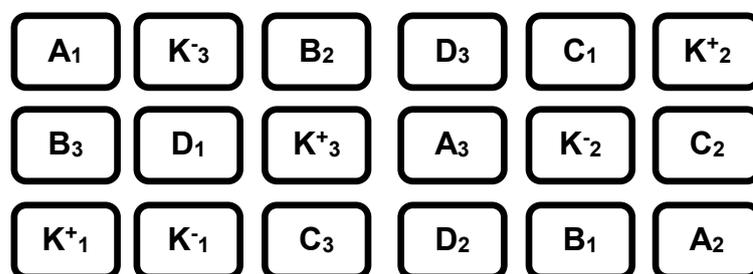
ϵ_{ij} = pengaruh galat percobaan dari perlakuan ke-I dan ulangan ke-j

Penelitian dengan menggunakan variable bebas berupa perlakuan pemberian ekstrak buah pare *M. charantia* dengan dosis A (550 ppm), B (650 ppm), C (750 ppm), dan D (850 ppm). Pada penelitian ini digunakan 2 kontrol pembanding yaitu kontrol negatif dan kontrol positif, kontrol negatif sebagai

perlakuan sampel dengan penginfeksi bakteri dan tanpa pemberian ekstrak buah pare, sedangkan kontrol positif sebagai perlakuan sampel dengan penginfeksi bakteri dan pemberian antibiotik kloramfenikol dengan dosis 0,03 mg/L. Dalam penelitian ini dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Dari perlakuan tersebut diperoleh total sampel sebanyak 18 sampel. Adapun perlakuan yang digunakan penelitian ini adalah sebagai berikut:

- A : Perlakuan dengan pemberian ekstrak buah pare (*M. charantia*) 550 ppm
 B : Perlakuan dengan pemberian ekstrak buah pare (*M. charantia*) 650 ppm
 C : Perlakuan dengan pemberian ekstrak buah pare (*M. charantia*) 750 ppm
 D : Perlakuan dengan pemberian ekstrak buah pare (*M. charantia*) 850 ppm
 K(-) : Penginfeksi bakteri *A. hydrophila* dan tanpa pemberian ekstrak buah pare (*M. charantia*)
 K(+) : Perlakuan dengan pemberian antibiotik kloramfenikol 0,03 mg/L

Denah penelitian disajikan pada Gambar 4.



Gambar 4. Denah Rancangan Penelitian

- Keterangan : A, B, C, D = Perlakuan
 K⁺ = Kontrol Positif
 K⁻ = Kontrol Negatif
 1, 2, 3 = Ulangan

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Persiapan Penelitian

a. Persiapan Alat

Alat – alat yang akan di gunakan di cuci dengan menggunakan sabun cuci, di keringkan kemudian di bungkus dengan menggunakan kertas dan di ikat menggunakan benang. Aquades di tuang kedalam autoklaf secukupnya, kemudian alat yang telah di bungkus kertas koran dimasukkan ke dalam autoclave dan di tutup rapat dengan mengencangkan baut secara simetris. Tekan tombol ON, ditunggu sampai suhu mencapai 121°C dan tekanan menunjukkan 1 atm, keadaan ini di pertahankan sampai 15 menit dengan cara membuka atau menutup kran uap yang berada di bagian atas tutup autoclave. Setelah 15 menit tekan tombol OFF, tunggu beberapa saat sampai suhu menunjukkan angka 0 (nol), kemudian di buka kran uap dan penutup autoclave dengan cara simetris. Alat yang telah di sterilkan disimpan dalam kotak penyimpanan.

Wadah yang digunakan dalam ujiantang ini adalah toples bervolume 15 liter sebanyak 23 buah. Toples sebelumnya di cuci dengan sabun cuci dan kemudian di rendam dengan klorin 30 menit. Selanjutnya toples di bilas dan di keringkan selama 1 hari sebelum di isi air tawar. Air di isi sebanyak 10 liter dan dilengkapi dengan aerasi untuk menjaga kandungan oksigen dalam air.

b. Pembuatan Ekstrak Kasar Buah Pare

Metode ekstraksi yang di gunakan dalam penelitian ini adalah metode maserasi. Sebelumnya, Di siapkan serbuk buah pare yang di dapatkan dari Balai Materia Medica Batu sebanyak 1 kg. Setelah di dapatkan serbuk pare di lakukan perendaman (maserasi) dengan perbandingan 1:4 dimana serbuk buah pare (*M. charantia*) sebanyak 500 gram di maserasi menggunakan etanol 70% sebanyak 2 liter. Serbuk pare dibiarkan termaserasi selama 4 hari dalam maserator tertutup

dengan pengadukan setiap hari. Setelah 4 hari, maserat disaring dari ampas dengan corong Buchner yang telah dilapisi kertas saring. Maserat yang terbentuk kemudian di rendam kembali dengan etanol 70% sebanyak 1 liter selama 2 hari dengan metode yang sama. Maserat yang terbentuk kemudian di uapkan menggunakan penguap putar (*Rotary evaporator*) pada suhu 60°C dan didapatkan ekstrak kental sebanyak 71,77 gram.

c. Pembuatan Media

- **Media Padat TSA (*Tryptitone Soy Agar*)**

Media TSA di gunakan sebagai media untuk reinokulasi bakteri *A. hydrophila*. Adapun proses pembuatannya adalah sebagai berikut. Pertama media TSA di timbang sebanyak 2,4 gr menggunakan timbangan digital. Kemudian media di masukkan ke dalam erlenmeyer. Setelah itu media di larutkan dengan aquades sebanyak 20 ml. kemudian media di pindahkan ke tabung reaksi, masing – masing tabung berisi 5 ml TSA. Tabung reaksi kemudian ditutup dengan kapas dan alumunium foil lalu di ikat dengan benang. Setelah itu media di sterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit. Media dibiarkan dingin hingga mencapai suhu ruang. Pada saat proses pendinginan media, tabung reaksi di letakan dengan kemiringan 30° agar TSA menjadi agar miring. Setelah media menjadi agar miring, disimpan didalam kulkas (nurin, 2014).

- **Media Cair TSB (*Tryptitone Soy Broth*)**

Media TSB di gunakan sebagai pengencer dalam pengembangbiakan bakteri dan sebagai media untuk uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentrarion*). Adapun proses pembuatan media TSB adalah sebagai berikut, media TSB ditimbang sebanyak 0,32 gram dengan menggunakan timbangan digital, kemudian dimasukkan ke dalam erlenmayer. Media dilarutkan dalam 10 ml

aquades. Setelah itu, erlenmeyer ditutup kapas dan aluminium foil kemudian media dihomogenkan pada kondisi hangat diatas hotplate sampai tercampur rata. Kemudian media di sterilkan dalam autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit (Rusmawanto, 2016).

d. Pemiakan Bakteri *A. hydrophila*

Bakteri *A. hydrophila* yang di gunakan berasal dari Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau Jepara. Sebelum bakteri di gunakan, bakteri di remajakan terlebih dahulu dengan cara larutan TSB di siapkan sebanyak 6 gram dalam erlenmeyer sebanyak 200 ml. kemudian panaskan jarum osse di atas bunsen sampai berpijar, setelah dingin jarum osse di sentuhkan ke biakan murni bakteri *A. hydrophila* kemudian di celupkan pada TSB sebanyak 1 osse. Larutan TSB dibiarkan 12 -24 jam dalam incubator pada suhu 37°C. Setelah TSB menjadi keruh, kemudian di siapkan tabung reaksi yang berisi media TSA / agar miring. Lalu jarum osse yang sudah di pijarkan dan dingin dicelupkan ke TSB dan digoreskan ke permukaan TSA. Di goreskan ke dalam media TSA secara zigzag dengan metode goresan sinabung, T atau kuadran. Media TSA di inkubasi di dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam (Nurin, 2014).

e. Persiapan Hewan Uji

Ikan uji yang di gunakan adalah ikan mas (*C. carpio*) yang didapatkan dari petani ikan di daerah Kediri, Jawa Timur. Ikan yang di gunakan dalam penelitian berukuran 8 – 12 cm (panjang total), dan bobot ikan 7,45 – 10,55 gram dengan padat tebar ikan uji pada setiap akuarium sebanyak 10 ekor / 10 liter. Sesuai dengan Lukisetyowati *et al.*, 2007 menyatakan ikan uji yang digunakan yakni ikan mas berukuran 8 – 12 cm. masing – masing akuarium diisi 10 ekor. Wu *et al.*, 2010, menyatakan kepadatan ikan untuk uji in vivo eksperimen dapat dilakukan dengan jumlah 10 ekor / akuarium. Selanjutnya dilakukan aklimatisasi selama 3 hari pada akuarium. Selama aklimatisasi ikan mas diberi pakan pellet secara

adlibitum sebanyak 2 kali sehari, dan dilakukan penyiponan apabila air pemeliharaan sudah kotor.

3.4.2 Pelaksanaan Penelitian

a. Penentuan *Minimum Inhibitor Concentration* (MIC)

Uji MIC merupakan suatu cara untuk menentukan konsentrasi terkecil bahan obat – obatan (ekstrak buah pare) sehingga dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme (bakteri *A. hydrophila*) secara makroskopis. Indikator pengamatan uji MIC yaitu kondisi campuran TSA yang sudah diinokulasi dengan bakteri *A. hydrophila* dengan ekstrak buah pare perlakuan: 1000 ppm, 750 ppm, 500 ppm, 250 ppm, dan 125 ppm. Tahap pelaksanaan uji MIC di mulai dengan penyiapan 14 tabung reaksi yang sudah berisi media TSB steril sebanyak 4,5 ml. Kemudian ekstrak buah pare diberikan pada 10 tabung reaksi dengan dosis yang diinginkan, pada 4 tabung reaksi sisa dijadikan kontrol positif dan kontrol negative. Setiap tabung reaksi diberi suspense bakteri sebanyak 0,1 ml yang telah disetarakan dengan Mc. Farland. Kemudian media diinkubasi dengan suhu 33°C selama 24 jam. Setelah 24 jam dilakukan pengamatan seluruh tabung reaksi terhadap kekeruhan media menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540nm dan pengamatan secara visual. Nilai absorbansi antara perlakuan dicocokkan dengan nilai absorbansi kontrol positif. Nilai absorbansi yang mendekati kontrol positif artinya memberikan pengaruh sehingga dapat digunakan untuk penentuan dosis pada MIC selanjutnya (Rusmawanto, 2016). Dari hasil ini, didapatkan bahwa dosis 500 ppm ekstrak buah pare sudah bisa menghambat bakteri *A. hydrophila*. Sehingga untuk perlakuan yang digunakan selama penelitian yaitu perlakuan A (550 ppm), B (650 ppm), C (750 ppm), dan D (850 ppm).

b. Perendaman Ekstrak Buah Pare (*M. charantia*) pada Ikan Mas (*C. carpio*)

Perendaman ekstrak buah pare (*M. charantia*) di lakukan dengan cara toples diisi sebanyak 10 liter dan di tambahkan ekstrak buah pare sesuai dosis yang telah di tentukan. Sebelum perendaman, ikan di ambil sampel darah untuk perhitungan total eritrosit, leukosit, hemoglobin, dan hematokrit sebagai sampel darah ikan normal. Setelah ikan diambil sampel darah, kemudian ikan di masukkan ke dalam air rendaman selama 1 jam. setelah di rendam selama 1 jam ikan di pindahkan ke air media pemeliharaan. Setelah 7 hari, ikan di rendam kembali dengan ekstrak buah pare dengan cara yang sama pada saat perendaman pertama selama 1 jam. Setelah direndam selama 1 jam ikan di pindahkan ke air media pemeliharaan.

Setelah 24 jam dari perendaman kedua, di lakukan proses pengambilan darah sebagai sampel darah pasca perendaman dengan ekstrak buah pare. Selain pengambilan darah, di lakukan pula pengamatan perilaku ikan. Setelah 8 hari, ikan di uji tantang dengan pemberian bakteri *A. hydrophila*. Selama pengamatan, media ikan diamati parameter penunjang seperti suhu, DO dan pH setiap pagi dan sore pukul 08:00 dan 16:00 WIB.

c. Penginfeksian Ikan Uji dengan Bakteri *A. hydrophila*

Penginfeksian ikan uji dengan bakteri *A. hydrophila* di lakukan pada masing – masing media pemeliharaan yaitu perendaman. Hal ini mengacu pada Mariyono dan Sundana (2002), bakteri dapat di berikan dengan metode perendaman pada ikan. Metode perendaman untuk bakteri uji akan dapat diserap dalam jumlah banyak oleh insang, tetapi ikan akan mengalami stress karena waktu perendaman relatif singkat. Adapun jumlah kepadatan bakteri yang di gunakan untuk menginfeksi ikan yakni sebesar 10^7 per mL. sesuai dengan pernyataan Haditomo *et al.*, (2014), Konsentrasi *A. hydrophila* pada media budidaya yang dapat menyebabkan Motile Aeromonas Septicemia (MAS) pada

ikan mas berkisar antara $10^7 - 10^8$ cfu/ml, dan apabila ikan berada dalam kondisi stres maka semakin besar kemungkinan terjadinya kematian. Dengan demikian untuk memperoleh bakteri dengan kepadatan yang di inginkan maka di lakukan pengenceran dengan rumus sebagai berikut:

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

Keterangan:

N_1 : Kepadatan populasi bakteri dalam media TSB (sel/mL)

N_2 : Kepadatan populasi bakteri yang di kehendaki (sel/mL)

V_1 : Volume suspense bakteri dalam TSB yang dibutuhkan

V_2 : Volume yang diinginkan

Perhitungan:

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

$$V_1 \times 10^{11} = 180.000 \times 10^7$$

$$V_1 = \frac{18 \times 10^{11}}{10^{11}}$$

$$V_1 = 18 \text{ mL}$$

Jumlah bakteri yang di gunakan untuk menginfeksi ikan yaitu sebesar 18 mL untuk 10 akuarium yang berisi air 10 liter (10.000 mL). Bakteri 10^{11} diambil dari media TSA kemudian diremajakan pada media TSB dan di inkubasi selama 24 jam. Setelah 24 jam, bakteri siap digunakan untuk penginfeksian. Dari rumus tersebut dapat diketahui bahwa untuk mendapatkan bakteri dengan kepadatan 10^7 sel/mL untuk air sebanyak 180 liter (180.000 mL) adalah dengan memasukkan bakteri dengan kepadatan 10^{11} dari media TSB sebanyak 1 mL menggunakan mikropipet ke dalam akuarium yang berisi 10.000 mL air. kemudian Ikan di infeksi dengan bakteri selama kurang lebih 24 jam sampai ikan terlihat mulai gelisah. Setelah 24 jam ikan di infeksi dengan bakteri, ikan di ambil darahnya sebagai sampel setelah di infeksi.

d. Pengambilan Sampel Darah

Pengambilan sampel darah dilakukan dengan cara mengisi spuit ukuran 0,5 mL dengan Na sitrat sebagai anti koagulan agar darah yang diambil tidak menggumpal atau membeku. Selanjutnya diambil sampel darah melalui caudal peduncle dengan posisi spuit 45° dan di tarik perlahan – lahan sampai di dapatkan darah ikan. Proses pengambilan darah di lakukan pada saat pra perendaman dengan ekstrak buah pare, setelah di rendam ekstrak buah pare dan setelah di infeksi dengan bakteri *A. hydrophila*. Sampel darah yang di dapat di letakkan pada tabung appendorf. Setelah darah di tempatkan pada tabung appendorf langsung di siapkan untuk di hitung jumlah eritrosit, leukosit, hemoglobin, dan hematokrit.

3.5 Uji Hematologi

3.5.1 Eritrosit

Total eritrosit di hitung berdasarkan Blaxhall dan Daisley (1973). Darah di hisap dengan pipet bulir merah sampai skala 0,5. Kemudian di tambahkan larutan hayem's dengan cara di hisap sampai skala 1, lalu campuran tersebut di homogenkan dengan cara pipet di gerakan membentuk angka delapan selama 3 – 5 menit. Setelah itu tetesan pertama dari dalam pipet dibuang, dan tetesan selanjutnya di keluarkan di atas haemacytometer kemudian di tutup dengan cover glass. Selanjutnya di lakukan perhitungan sel darah merah pada 5 lapangan pandang di kotak kecil pada kamar hitung haemocyctometer. Total sel darah merah didapatkan berdasarkan rumus berikut:

$$\text{Total Eritrosit} = \sum n \times 10^4 \text{ sel/mm}^3$$

3.5.2 Leukosit

Total leukosit di hitung berdasarkan Blaxhall dan Daisley (1973). Darah di hisap dengan pipet bulir putih sampai skala 0,5. Kemudian di tambahkan larutan

turk dengan cara di hisap sampai skala 1, lalu campuran tersebut di homogenkan dengan cara pipet di gerakkan membentuk angka delapan selama 3 – 5 menit. Setelah itu tetesan pertama dalam pipet dibuang, dan tetesan selanjutnya dikeluarkan di atas haemocytometer kemudian ditutup dengan cover glass. Selanjutnya di lakukan perhitungan sel darah putih pada 4 lapangan pandang di kotak besar pada kamar hitung haemocytometer. Total sel darah putih di dapatkan berdasarkan rumus sebagai berikut:

$$\text{Total Leukosit} = \sum n \times 50 \text{ sel/mm}^3$$

3.5.3 Kadar Hemoglobin

Kadar hemoglobin di ukur melalui metode Sahli dengan menggunakan Sahlinometer (Wedemeyer dan Yasutake, 1977). Darah di hisap dengan pipet Sahli sampai skala 20 mm³ atau 0,2 ml, kemudian darah di dalam pipet di masukkan ke dalam tabung Hb-meter yang telah diisi HCl 0,1 N sampai skala 10 (skala merah), sedikit demi sedikit sampai warna campuran darah dan HCl sama dengan warna larutan standar yang ada di dalam Hb-meter. Selanjutnya kadar hemoglobin di baca dengan melihat permukaan cairan dan di cocokkan dengan angka pada skala yang berwarna kuning. Kadar hemoglobin yang terbaca menunjukkan banyaknya hemoglobin dalam satuan gram per 100 ml darah.

3.5.4 Kadar Hematokrit

Kadar hematokrit di ukur berdasarkan Anderson dan siwicki (1993). Sampel darah di masukkan kedalam tabung mikrohematokrit sampai $\frac{3}{4}$ bagian tabung. Lalu ujung tabung di sumbat dengan crytoseal. Setelah itu tabung di sentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Kemudian di lakukan pengukuran panjang darah yang mengendap (a) dan panjang total volume darah (b) di dalam tabung mikro hematokrit. Kadar hematokrit di nyatakan sebagai % volume padatan sel darah yang dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Hematokrit} = \frac{a}{b} \times 100\%$$

3.6 Parameter Uji

3.6.2 Parameter Utama

Parameter utama yang dilakukan pada penelitian ini adalah pengamatan terhadap sel darah yang terdapat pada ikan mas (*C. carpio*) yang meliputi perhitungan sel darah merah (eritrosit), sel darah putih (leukosit), kadar hemoglobin dan kadar hematokrit. Pengamatan ini dilakukan untuk mengetahui perbedaan ikan mas yang sehat, ikan mas yang telah diberikan ekstrak buah pare dan ikan mas yang diuji tantang dengan bakteri *A. hydrophila* dengan melihat jumlah eritrosit, leukosit, kadar hemoglobin, dan kadar hematokrit.

3.6.3 Parameter Penunjang

Parameter pendukung yang diambil dalam penelitian ini adalah kualitas air yang meliputi suhu, pH, dan kandungan oksigen terlarut. Pengukuran parameter menggunakan alat pengukur berupa DO meter untuk mengukur kandungan oksigen terlarut, dan suhu, serta pH pen untuk mengukur pH pada media pemeliharaan selama penelitian. Pengukuran parameter dilakukan setiap pagi dan sore pukul 08:00 dan 16:00 WIB.

3.7 Analisa Data

Data yang diperoleh dianalisa secara statistik dengan menggunakan analisa keragaman atau uji F (ANOVA) sesuai dengan rancangan yang dipergunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hal ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh perlakuan (variable bebas) terhadap respon parameter yang diukur atau uji F. Apabila Uji F hasilnya berbeda nyata maka dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan. Sedangkan untuk mengetahui regresi atau bentuk hubungan antar perlakuan dengan parameter dilakukan uji polynomial orthogonal.