

BAB III

MATERI DAN METODE

BAB III

MATERI DAN METODE

III.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dan pemeriksaan sampel dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga Surabaya. Penelitian dimulai pada tanggal 20 Agustus 2005 hingga 12 September 2005.

III.2 Materi Penelitian

III.2.1 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 30 sampel darah ikan mas (*Cyprinus carpio* L.) yang terdiri dari tiga strain ikan mas yaitu ikan mas Punten, ikan mas lokal dan ikan mas merah dengan ukuran panjang tubuh 15-20 cm masing-masing sebanyak 10 sampel.

III.2.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu larutan Dacies[®], antikoagulan yaitu natrium sitrat (Na-sitrat), minyak emersi, metanol 95 %, dan Giemsa.

III.2.3 Alat Penelitian

Penelitian ini membutuhkan sejumlah alat antara lain pipet leukosit, kamar penghitung *Improved Neubauer*, mikroskop, gelas penutup, *object glass*, label,

tabung mikrohematokrit, tabung penampung darah, label, alat penghitung (*blood cell counter*).

III.3 Metode Penelitian

III.3.1 Perlakuan Sebelum Penghitungan

Sebelum dilakukan pengambilan darah guna penghitungan leukosit maka ikan-ikan yang baru didatangkan terlebih dahulu dilakukan aklimatisasi agar dapat mengurangi stress yang ditimbulkan karena perjalanan. Tindakan aklimatisasi ini dilakukan dengan cara mengubah sedikit demi sedikit kondisinya sehingga menyerupai kondisi lingkungan yang baru.

Apabila tindakan aklimatisasi telah dilakukan maka perlakuan selanjutnya adalah penentuan strain yang dapat dilihat dari perbedaan warna sisik serta bentuk dari ikan tersebut.

III.3.2 Pengambilan Darah

Teknik pengambilan darah pada ikan yang dilakukan pada penelitian adalah dengan cara *punctie cardiac* melalui insang. Prosedur pelaksanaan:

1. Siapkan tabung penampung darah.
2. Siapkan tabung mikrohematokrit.
3. Buka insang kemudian tusukan tabung mikrohematokrit pada jantung.
4. Alirkan darah dengan menggunakan tabung mikrohematokrit menuju tabung penampung darah secara perlahan.
5. Campur dengan antikoagulan Na-sitrat

III.3.3 Pemeriksaan Jumlah Leukosit

Prosedur pelaksanaan:

1. Encerkan darah dengan perbandingan 1 : 50 menggunakan larutan Dacies.
2. Campur darah dengan larutan Dacies dengan perlahan agar tidak merusak sel darah.
3. Ambil sedikit campuran darah dan larutan dacies tersebut di atas, kemudian teteskan dalam kamar penghitung *Improved Neubauer*.
4. Letakkan gelas penutup di atas kamar penghitung *Improved Neubauer*.
5. Hitung jumlah leukosit yang terdapat pada semua kotak leukosit.

Menghitung jumlah Leukosit:

1. Penghitungan jumlah leukosit menggunakan lensa objektif kecil dengan pembesaran 10 kali.
2. Kamar hitung dengan bidang bergarisnya diletakkan dibawah lensa objektif.
3. Penghitungan jumlah leukosit dimulai dari sudut kiri atas terus ke kanan kemudian turun ke bawah dan dari kanan ke kiri. Cara ini dilakukan pada keempat bidang besar.
4. Apabila terdapat sel-sel yang letaknya menyinggung garis batas bidang maka sel yang menyinggung garis batas sebelah kiri atau garis atas harus dihitung. Akan tetapi, sel yang menyinggung garis batas sebelah kanan atau garis bawah tidak boleh dihitung.

III.3.4 Pengecatan Dengan Giemsa

Prosedur pelaksanaan:

1. Satu tetes sampel darah yang telah diberi antikoagulan diambil, kemudian diletakkan pada *slide* yang kering dan bersih untuk membuat sediaan hapusan darah tipis.
2. Hapusan darah dikeringkan, kemudian difiksasi dengan menggunakan metanol 95% selama 1-2 menit.
3. Tambahkan Giemsa diatas hapusan darah yang telah difiksasi dengan metanol hingga menutupi seluruh slide tersebut.
4. Tunggu selama 30 menit.
5. Bilas *slide* dengan menggunakan air yang mengalir kemudian dikeringkan.

III.3.5 Pemeriksaan Nilai Hitung Jenis Leukosit

Prosedur pelaksanaan:

1. Darah yang telah difiksasi dan telah dilakukan pengecatan dengan Giemsa serta *blood cell counter* disiapkan.
2. Teteskan sedikit minyak emersi diatas slide.
3. Lakukan perhitungan nilai hitung jenis leukosit dengan menggunakan mikroskop dengan pembesaran 10 kali.

III.4 Alur Penelitian

