

BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

Cipta Karya

(031) 5941926

BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan pada tanggal 14 Agustus – 15 Desember 2005, di Laboratorium Gastroenteritis Tropical Disease Center (TDC) Universitas Airlangga, Laboratorium Kesehatan Ikan dan Lingkungan Balai Budidaya Air Payau (BBAP) Situbondo, Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan Laboratorium Biokimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya.

4.2 Materi Penelitian

Materi Penelitian ini berupa alat dan bahan yang dibutuhkan dalam penelitian, yaitu :

4.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi cawan petri, erlenmeyer, *autoclave*, sentrifus, *freezer*, inkubator, ose, mikroplate dan mikropipet, sonikator, filter 0,45 mikron, *sput disposable* 1 ml, mikroskop, *object glass*, *cover glass*, diluter, alat elektroforesis, dan akuarium volume 60 liter sebanyak 3 buah.

4.2.2 Bahan

a. Ikan coba

Ikan coba yang digunakan adalah ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) sehat ukuran 13 – 15 cm dengan berat rata-rata 25 gram berasal

dari PT. Mutiara Biru, Situbondo. Ikan coba berjumlah 30 ekor yang dibagi kedalam 2 kelompok perlakuan dan 1 kelompok kontrol.

b. Media kultur

Media kultur yang digunakan untuk membiakkan bakteri yaitu *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB) dan isolat bakteri *Vibrio anguillarum* didapat dari Laboratorium Penyakit Ikan Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara.

c. Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan antara lain *Phosphate Buffer Saline* (PBS), *ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA), aquadest.

4.3 Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental untuk mengetahui gambaran respon imun ikan kerapu macan dengan membandingkan antara perlakuan dan kontrol. Menurut Azwar (2004) penelitian eksperimental dilakukan untuk meneliti kemungkinan adanya hubungan sebab akibat di antara variabel dengan cara menghadapkan kelompok eksperimental pada beberapa macam kondisi perlakuan dan membandingkan dengan kelompok kontrol tanpa perlakuan. Perlakuan pada penelitian ini, yaitu pemberian antigen berupa komponen intraseluler dan protein membran luar bakteri *Vibrio anguillarum* secara oral.

4.4 Prosedur Penelitian

4.4.1 Pembuatan Komponen Intraseluler

Pembuatan komponen intraseluler menurut prosedur Suprpto *et al.*, (1996). Bakteri *Vibrio aguilorum* ditanam pada media *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB) selama 24 – 48 jam, kemudian dipanen, kedalam petri yang berisi bakteri ditambahkan 2 ml *Phosphate Buffer Saline* (PBS), dicuci sebanyak 3 kali selama 10 menit. Bakteri yang sudah bersih dipecah dengan sonikator sampai 80 – 90 persen sel pecah. Vibrasi sonik dapat digunakan sebagai metode mekanik penghancuran bakteri, sehingga bahan intraseluler dan dinding sel dapat dipisahkan (Volk dan Wheeler, 1993). Pecahan sel bakteri disentrifus dan supernatannya difilter dengan filter 0,45 μm steril. Sterilitas dicek dengan menumbuhkan pada media NA selama 24 – 48 jam pada suhu 25° C. Komponen intraseluler yang didapatkan disimpan pada suhu -4° C sampai digunakan.

4.4.2 Pembuatan Protein Membran luar

Pembuatan protein membran luar menurut prosedur Suprpto *et al.*, (1996). Bakteri ditanam pada kultur broth dan ditumbuhkan semalam, kemudian bakteri dipanen dengan sentrifugasi 6000 x g selama 10 menit, dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali selama 10 menit. Tambahkan pada pellet bakteri 2 ml dari 10 mM EDTA dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 45° C. Membran luar dinding bakteri gram negatif bisa dirusak dengan *ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA) (Brooks *et al.*, 2001). Sel bakteri dipecah dengan sonikasi selama 60 detik dan sel dipisahkan dengan sentrifugasi 6000 x g selama 30 menit. Supernatan yang mengandung protein membran luar diambil dengan hati-hati dan didialisis dengan PBS.

4.4.3 Ikan coba

Ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) ditempatkan pada bak fiber ukuran 1000 liter. Ikan diadaptasikan dengan dipelihara selama 2 hari, kemudian diambil secara acak untuk ditempatkan pada akuarium percobaan yang telah ditutup dengan plastik hitam. Penggunaan plastik hitam sebagai penutup untuk menghindari stres pada ikan dan menjaga suhu agar tetap stabil. Ikan dipelihara di akuarium selama 3 hari, setelah itu dilakukan vaksinasi dengan pemberian antigen berupa komponen intraseluler dan protein membran luar bakteri *Vibrio anguillarum*.

4.4.4 Immunisasi kerapu

Ikan divaksin dengan 0,1 ml (Suprpto *et al.*, 1996) komponen intraseluler dan protein membran luar secara oral menggunakan spuit. Pada ikan sebagai kontrol, diberikan PBS dengan dosis yang sama. Chitosan digunakan sebagai bahan pelapis antigen terhadap suasana asam pada saluran pencernaan ikan. Chitosan dicampurkan pada antigen dengan perbandingan Chitosan : antigen sebanyak 1 : 10 (Suprpto, *pers comm.*). Ikan dipelihara selama 10 hari untuk mendapatkan respon imun ikan terhadap antigen yang diberikan.

4.4.5 Uji Tantang Ikan Kerapu Macan

Uji tantang dilakukan secara injeksi intra muscular dengan bakteri *V. anguillarum* dengan dosis $6,4 \times 10^6$ CFU/ml untuk mengetahui tingkat proteksi vaksin terhadap ikan. LD₅₀ ikan kerapu macan diketahui melalui uji pendahuluan sebesar 10^4 CFU/ml. LD₅₀ ikan Chum Salmon (*Oncorhyncus keta*) terhadap *Vibrio anguillarum* sebesar $9,0 \times 10^4 - 3,6 \times 10^5$ sel/ml (Kamiso, 1990). Ikan

dipelihara dalam aquarium selama 14 hari dan dicatat mortalitasnya. Ikan yang mati diadakan reisolasi dari hati untuk memastikan bahwa kematian ikan disebabkan oleh *Vibrio anguillarum*.

4.4.6 Pengambilan serum darah kerapu

Pengambilan darah ikan kerapu dilakukan sebelum vaksinasi, hari ke-10 sesudah vaksinasi dan hari ke-14 setelah uji tantang. Pengambilan darah dilakukan dengan cara memotong ekor ikan kerapu dan darah yang keluar ditampung pada tabung *ependorf* sebanyak kurang lebih 1 ml. Tabung *ependorf* diletakkan miring, untuk memperluas permukaan, sehingga terbentuk cairan berwarna jernih. Cairan jernih tersebut adalah serum dan diambil dengan menggunakan mikropipet, kemudian disimpan pada lemari es.

4.4.7 Pengukuran titer antibodi

Antiserum kerapu dipergunakan untuk uji aglutinasi. Antigen adalah bakteri *Vibrio* sp. yang telah dimatikan dengan formalin (*Formalin Killed Cell* = FKC) dan dicuci dengan PBS. Pengukuran tersebut dilakukan sebagai berikut. Dua puluh lima mikroliter dari 0,01 M PBS dimasukkan dalam setiap lubang mikroplate. Diluter dipanaskan sampai merah menyala untuk mencegah kontaminasi. Antiserum dimasukkan dan diencerkan mulai dari lubang pertama sampai lubang terakhir. Dua puluh lima mikroliter dari 50 mg/ml antigen dimasukkan dalam setiap lubang, kemudian dikocok selama 5 menit dan diinkubasikan pada suhu 37° C selama 2 jam. Kontrol dilakukan sama dengan diatas, antiserum yang digunakan diganti dengan PBS. Titer antibodi dilihat dari aglutinasi adalah sebagai berikut :

[4 (lubang kesatu), 8 (lubang kedua).....4096 (lubang kesebelas)]

4.4.8 Sintasan (*survival rate*)

Setelah ujiantang, ikan dipelihara selama 14 hari dan diamati adanya perubahan tingkah laku dan timbulnya gejala klinis akibat infeksi bakteri *Vibrio anguillarum*. Adanya mortalitas dicatat, sehingga bisa dihitung sintasan (*survival rate*) ikan hingga akhir masa percobaan, dengan rumus :

$$SR = \frac{\text{Jumlah ikan yang hidup}}{\text{Jumlah ikan awal}} \times 100\%$$

4.4.9 *Relative Percent Survival* (RPS)

Hasil vaksinasi dapat dievaluasi dengan menggunakan rumus *Relative Percent Survival* (RPS). RPS menggambarkan persentase ikan yang mati karena penyakit seandainya tidak diberikan kekebalan terhadapnya. Hal ini berarti proporsi ikan yang selamat karena vaksinasi. Vaksinasi dikatakan berhasil dan diterima secara ekonomis bila tingkat RPS mencapai 70% (Varvarigos, 2003).

Penghitungan *Relative Percent Survival* menurut Varvarigos (2003), adalah :

$$RPS = 1 - \frac{\% \text{ mortalitas ikan yang divaksin}}{\% \text{ mortalitas ikan yang tidak divaksin}} \times 100\%$$

4.4.10 Elektroforesis

Uji elektroforesis dilakukan untuk mengkarakterisasi antigen yang digunakan sebagai vaksin berdasarkan berat molekul proteinnya. *Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (PAGE) adalah standar metode pengujian terhadap berat molekul protein, struktur sub unit dan kemurnian protein (Rantam, 2003). Metode

yang digunakan adalah *Sodium Dodecyl Sulphonat Poly Acrylamide Gel Electrophoresis* (SDS – PAGE). SDS-PAGE merupakan suatu metode yang dapat digunakan untuk mendeteksi fraksi protein berdasarkan berat molekulnya. Prinsip dasar metode ini adalah denaturasi protein oleh *Sodium Dodecyl Sulphate* dilanjutkan dengan separasi molekul molekul berdasarkan berat molekulnya dengan metode elektroforesis yang menggunakan gel, dalam hal ini adalah *polyacrylamide*. Metode ini dapat mengikat atau mendeteksi protein berdasarkan berat molekulnya tetapi tidak spesifik terhadap jenis protein tertentu (Sahrial *dkk.*, 2001).

4.5 Parameter

Parameter dari penelitian ini terdiri dari parameter utama yaitu titer antibodi, sintasan (*survival rate*), dan *Relative Percent Survival* (RPS) ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). Parameter penunjang berupa histopatologi hati ikan kerapu macan, uji elektroforesis terhadap antigen, dan data kualitas air berupa suhu, pH, salinitas, dan kandungan oksigen terlarut.

4.6 Analisis Data

Data hasil penelitian meliputi titer antibodi dan sintasan (*survival rate*) ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) akan disajikan secara deskriptif, sehingga didapatkan kesimpulan berupa gambaran respon imun ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) terhadap komponen intraseluler dan protein membran luar dari bakteri *Vibrio anguillarum*. Penyajian hasil analisis deskriptif berupa frekuensi dan persentase, tabulasi silang, grafik atau *chart* (Azwar, 2004).