

BAB 3

MATERI DAN METODE

BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada tanggal 31 Oktober - 29 November 2011, bertempat di Laboratorium Virologi dan Imunologi Departemen Mikrobiologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan adalah : telur ayam berembrio (TAB) yang berumur 9 hari yang berasal dari peternak ayam di daerah Mojokerto sebanyak 110 buah, larutan ion perak (Ag^+) 15 ppm produksi PT. Yoris Ami Jaya Jakarta, natrium klorida (NaCl) fisiologis steril, virus ND strain La Sota yang berasal dari vaksin aktif produksi Medion Bandung, eritrosit ayam, kapas dan aluminium foil.

3.2.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : *mikrosentrifuge tube*, Erlenmeyer, inkubator, tabung venoject, botol 100 ml, pipet 1 ml, pipet 10 ml, pinset, spuit 1 ml, *egg tray*, mikroplate, mikropipet, sentrifus, pelubang telur, isolasi kertas, gunting, *autoclave* dan *bulb*.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Perbanyak Virus ND

Virus yang diperbanyak adalah virus ND strain La Sota. Perbanyak virus dilakukan dengan cara menyuntikkan suspensi virus ke dalam 10 TAB dengan dosis 0,1 ml/TAB. Kemudian TAB di inkubasi selama 5 hari dalam inkubator dengan suhu 37°C.

3.3.2 Titrasi Virus ND

Titrasi virus dilakukan untuk mengetahui jumlah virus ND yang terkandung dalam tiap ml suspensi virus yang akan digunakan pada penelitian ini. Titrasi virus dilakukan dengan cara pengenceran kelipatan 10, yaitu dimulai dari 10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} dan seterusnya sampai pada pengenceran 10^{-11} .

Sebanyak 0,3 ml suspensi virus tersebut diencerkan dengan 2,7 ml NaCl fisiologis dalam tabung venoject dan dicampur hingga homogen, kemudian 0,3 ml suspensi dari tabung tersebut diencerkan dengan 2,7 ml NaCl fisiologis pada tabung selanjutnya. Cara ini dilakukan berturut-turut mulai dari 10^{-1} hingga pengenceran 10^{-11} seperti gambar 1 pada lampiran 1.

Setelah selesai pengenceran, dilakukan inokulasi virus pada TAB dimulai dari pengenceran 10^{-4} sampai dengan pengenceran 10^{-11} . Setiap pengenceran diinokulasikan pada 5 butir TAB dengan dosis 0,1 ml / TAB dengan penyuntikan melalui cairan allantois lalu diinkubasi. Inkubasi dilakukan selama 5 hari dalam inkubator pada suhu 37°C,

kemudian apabila ada embrio yang mati maka embrio tersebut akan disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu 4°C. Selanjutnya dilakukan uji HA untuk mengetahui embrio terinfeksi atau tidak terinfeksi. Perhitungan titer virusnya dilakukan dengan menggunakan rumus Reed and Muench (Ernawati dkk, 1989).

3.3.3 Prosedur Penelitian

3.3.3.1 Persiapan Penelitian

Pengujian efektivitas larutan ion perak (Ag^+) terhadap virus ND di bagi dalam lima kelompok yaitu dua kelompok kontrol dan tiga kelompok perlakuan. Masing-masing perlakuan terdapat 4 ulangan dan setiap ulangan di tunggu selama 6 menit sebelum di inokulasikan pada 3 butir TAB dengan cara penyuntikkan melalui cairan allantois dengan dosis 0,1 ml. Masing-masing perlakuan menggunakan konsentrasi larutan ion perak yang berbeda yaitu 1ppm, 5 ppm dan 10 ppm dengan waktu kontak selama 6 menit. Adapun bentuk perlakuannya adalah sebagai berikut :

- Kontrol 1 (P0) : Virus ND 10^7 EID₅₀ / ml
Diinokulasikan pada TAB setelah 6
menit.
- Kontrol 2 (P1) : Larutan Ion Perak (15 ppm)

Diinokulasikan pada TAB setelah 6 menit.

Perlakuan 1 (P2) : Virus ND + Larutan Ion Perak (1 ppm)
Diinokulasikan pada TAB setelah 6 menit.

Cara memperoleh konsentrasi 1 ppm Larutan Ion Perak yaitu dengan cara : 1 ml Virus ND + 0,072 ml Larutan Ion Perak (15 ppm) seperti pada lampiran 3.

Perlakuan 2 (P3) : Virus ND + Larutan Ion Perak (5 ppm)
Diinokulasikan pada TAB setelah 6 menit.

Cara memperoleh konsentrasi 5 ppm Larutan Ion Perak yaitu dengan cara : 1 ml Virus ND + 0,5 ml Larutan Ion Perak (15 ppm) seperti pada lampiran 3

Perlakuan 3 (P4) : Virus ND + Larutan Ion Perak (10 ppm)
Diinokulasikan pada TAB setelah 6 menit.

Cara memperoleh konsentrasi 10 ppm Larutan Ion Perak yaitu dengan cara : 1 ml Virus ND + 2 ml Larutan Ion Perak (15 ppm) seperti pada lampiran 3.

3.3.3.2 Uji HA

Setelah TAB diinokulasi, TAB kemudian diinkubasi selama 5 hari dalam inkubator pada suhu 37°C. Selanjutnya

dilakukan uji HA mikroteknik untuk mengetahui ada tidaknya pertumbuhan virus ND dalam TAB. Prosedur uji HA mikroteknik dapat di lihat pada lampiran 2. Uji HA dinyatakan positif jika titer antigen $\geq 2^3$, dan dinyatakan negatif jika titer antigen $< 2^3$.

Teknik skor uji HA pada 3 buah TAB adalah sebagai berikut :

- ✓ Skor 1 : Apabila 3 dari 3 buah TAB menunjukkan hasil positif.
- ✓ Skor 0,67 : Apabila 2 dari 3 buah TAB menunjukkan hasil positif.
- ✓ Skor 0,33 : Apabila 1 dari 3 buah TAB menunjukkan hasil positif.
- ✓ Skor 0 : Apabila 3 dari 3 buah TAB menunjukkan hasil negatif.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah Larutan Ion Perak (Ag^+) dengan berbagai dosis yaitu 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm dan 15 ppm.

3.4.2 Variabel Tergantung

- Hasil uji HA Mikroteknik

3.4.3 Variabel Kendali

- Virus ND Strain La Sota
- Umur TAB

3.5 Rancangan Penelitian dan Analisis Data

Penelitian ini bersifat eksperimental yang terdiri dari lima kelompok perlakuan dan 4 ulangan. Data yang diperoleh nantinya akan dibuat dalam bentuk tabel kemudian dianalisis dengan uji Kruskal Wallis, dimana bila ada perubahan yang sangat nyata ($p < 0,05$) maka diuji lanjut dengan dengan uji Mann-Whitney test untuk membedahkan perbedaan diantara perlakuan (Sunarjo,1991). Seluruh proses analisis tersebut dikerjakan dengan program SPSS 18 *for Windows*.

3.6 Skema Penelitian

