

BAB IV
METODOLOGI

BAB IV

METODOLOGI

4.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Gastroenteritis, Tropical Disease Centre (TDC) Kampus C Universitas Airlangga, Surabaya dan Laboratorium Hama Dan Penyakit Balai Budidaya Air Payau (BBAP) Situbondo pada tanggal 14 Agustus sampai dengan 31 Desember 2005.

4.2 Materi Penelitian

4.2.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian ini terdiri dari bahan untuk pembuatan vaksin dan bahan untuk pemeliharaan. Bahan-bahan untuk pembuatan vaksin terdiri dari: bakteri *Vibrio alginolyticus strain* BBPBAP Jepara, Jawa Tengah, *brain heart infusion* (BHI), *phosphate buffer saline* (PBS), akuades, formalin, larutan fenol, kloroform, dan *petroleum*.

Bahan-bahan untuk pemeliharaan terdiri dari: ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus strain* Balai Budidaya Air Payau Situbondo ukuran 10 – 12 cm dengan berat 22 – 26 gram, bakteri *Vibrio alginolyticus*, pakan (ikan rucah), dan alkohol 70 %.

4.2.2 Alat Penelitian

Alat-alat pada penelitian ini terdiri dari: alat-alat untuk pembuatan vaksin, perhitungan bakteri, pengukuran titer antibodi, dan alat-alat untuk pemeliharaan. Alat-alat untuk pembuatan vaksin, perhitungan bakteri, dan pengukuran titer antibodi terdiri dari: petri disk, *Erlenmeyer*, tabung reaksi, gelas ukur, botol

250 ml, pipet, *shaker*, *microcentrifuge tube*, mikroplate, *droupper*, *centrifuge*, *water bath*, inkubator, dan timbangan.

Alat-alat untuk pemeliharaan terdiri dari: akuarium dengan ukuran 50 x 50 x 60 cm³ sebanyak 3 buah, bak fiber 500 liter, aerator, selang aerasi, jaring ikan kecil, termometer, pH meter, *refracto*, DO meter, kain, spuit 1ml, *scalpel*, dan gunting. Alat dan bahan penelitian dapat dilihat pada Lampiran 1.

4.3 Prosedur Kerja

4.3.1 Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan ini bertujuan untuk mengetahui dosis bakteri *Vibrio alginolyticus* yang tepat untuk uji tantang pada ikan kerapu macan. Metode penelitian pendahuluan yang dilakukan terdiri dari pendugaan bakteri *Vibrio alginolyticus*, penyuntikkan ikan kerapu macan dengan bakteri *Vibrio alginolyticus*, dan penghitungan LD 50 bakteri *Vibrio alginolyticus*.

Pendugaan bakteri *Vibrio alginolyticus* dalam larutan dilakukan dengan menggunakan metode pengenceran Mac Farlan menurut Yuasa dkk. (2003). Pendugaan bakteri dilakukan sebagai berikut: Larutan bakteri diencerkan dengan NaCl fisiologis pada tabung reaksi dengan pengenceran kelipatan 10 sampai dengan 10⁻⁶. Larutan bakteri pengenceran 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ diinokulasi pada media TCBS sebanyak 0,1 ml dengan daerah yang terpisah pada agar. Agar diinkubasi pada suhu kamar selama 1 sampai 2 hari. Jumlah koloni pada daerah pengenceran dihitung yang jumlah koloni bakterinya antara 20 – 200 koloni. Pendugaan bakteri dari larutan yang pertama, contoh : terdapat 80 koloni bakteri yang diamati pada daerah pengenceran 10⁻⁵, maka jumlah bakteri pada larutan yang pertama adalah $80 \times 10^5 \text{ sel}/0,1 \text{ ml} = 0,8 \times 10^8 \text{ sel/ml}$.

Vibrio alginolyticus sebanyak 0,1 ml dengan dosis 10^4 , 10^3 , 10^2 disuntikkan pada ikan kerapu macan masing-masing sebanyak 10 ekor dengan berat rata-rata 23 gram. Setelah selesai penyuntikkan, dilakukan pengamatan selama 1 hari untuk mengetahui mortalitas ikan. Pengamatan selama 1 hari didasarkan pada penelitian Murdjani (2003) yang menyatakan bahwa ikan kerapu setelah 3 – 12 jam diinjeksi dengan bakteri *Vibrio alginolyticus*, menimbulkan patogenitas pada organ eksternal dan internal ikan yang diinjeksi hingga terjadi kematian. Penghitungan LD 50 bakteri *Vibrio alginolyticus* dilakukan dengan menggunakan rumus Reed and Munch.

4.3.2 Pembuatan Vaksin

Pembuatan vaksin terdiri dari pembuatan media bakteri *Vibrio alginolyticus*, penanaman bakteri *Vibrio alginolyticus*, pembuatan WCV, dan pembuatan ekstrak LPS. Media untuk penanaman bakteri pada penelitian ini berupa *broth culture* dengan menggunakan *brain heart infusion* (BHI). Pembuatan media tersebut adalah sebagai berikut: BHI padat ditimbang sebanyak 37 gram. BHI sebanyak 37 gram dan *aquadest* 1000 ml dimasukkan kedalam *Erlenmeyer*. BHI diaduk hingga larut kemudian *Erlenmeyer* ditutup dengan *aluminium foil*. Larutan disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu $121\text{ }^{\circ}\text{C}$. selama 60 menit. Media BHI disimpan pada suhu $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ sampai digunakan.

Bakteri *Vibrio alginolyticus* ditanam pada *broth culture* (BHI) selama 24 - 48 jam, kemudian dipanen melalui sentrifugasi dengan kecepatan 7500 rotasi per menit (rpm) selama 10 menit. Supernatan dibuang dan ditambahkan 2 ml PBS, setelah itu dicampur sampai homogen.

Untuk membuat WCV, bakteri yang didapatkan dimatikan dengan formalin 3 % selama 72 jam. Bakteri disentrifugasi dengan kecepatan 7500 rpm selama 10 menit, kemudian supernatannya dibuang dan ditambah PBS 2 ml. Kepadatan bakteri dibuat sebanyak 50 mg/ml, kemudian disimpan pada suhu -4°C sampai digunakan (Suprpto dkk., 1996).

Pembuatan LPS dilakukan dengan metode *hot phenol methods* (Suprpto dkk., 1996) sebagai berikut, bakteri ditanam pada 20 ml *broth culture* selama 24 – 48 jam. Bakteri dipanen melalui sentrifugasi dengan kecepatan 9000 rpm selama 10 menit dan dicuci dengan 2 ml PBS sebanyak 3 kali. *Pellet* yang didapatkan ditambah PBS, kemudian dipanaskan pada *water bath* pada suhu 68°C , setelah itu ditambahkan dengan larutan ekstraksi A (larutan fenol 90 %) dan diaduk selama 20 menit. Bakteri dipisahkan dengan sentrifugasi pada 4500 rpm selama 15 menit. Supernatan yang didapatkan didialisa dengan air selama 24 jam dan dilyophilisasi. Lipopolisakarida dicampur sampai homogen dengan larutan ekstraksi B (kloroform dan petroleum) selama 2–5 menit dalam suhu kamar. Perbandingan dosis larutan ekstraksi A dan B adalah larutan fenol : kloroform : petroleum = 2 : 5 : 8. Kloroform dan petroleum dipisahkan dengan *rotary evaporator*, kemudian diendapkan (presipitasi) dengan air suling. Hasil presipitasi yang didapatkan, dikumpulkan melalui sentrifugasi dengan kecepatan 15000 rpm selama 3 jam, *pellet* yang didapatkan dicuci dengan air dan dilyophilisasi. Lipopolisakarida yang didapatkan disimpan pada suhu -4°C sampai digunakan.

4.3.3 Adaptasi Ikan

Sebanyak 45 ekor ikan kerapu macan ukuran 10 – 12 cm dengan berat 22 – 26 gram dimasukkan ke dalam bak fiber ukuran 500 liter, kemudian dipelihara

selama 1 hari. Setelah itu ikan dimasukkan pada 3 aquarium (A=kontrol, B=WCV, C=LPS) dengan jumlah masing-masing 15 ekor. Semua ikan di dalam aquarium percobaan diadaptasikan selama 2 hari sebelum dilakukan vaksinasi.

4.3.4 Aplikasi Vaksin

Sebelum dilakukan vaksinasi, lendir pada kulit ikan dihilangkan dengan menggunakan alkohol 70 %. Tujuan menghilangkan lendir pada kulit ikan adalah supaya vaksin yang disuntikkan tidak terhambat akibat banyaknya lendir yang ada pada lapisan kulit.

Pemberian vaksin dilakukan dengan cara penyuntikan melalui *intramuscular* pada punggung ikan yang diberikan dua kali, yaitu pada hari ke-1 dan ke-3. Pada penggunaan WCV, dosis yang diberikan sebesar 2 mg/ikan dengan berat rata-rata 23 gram, sedangkan pada LPS sebesar 0,1 ml/ikan dengan berat rata-rata 23 gram (Suprpto dkk., 1996).

4.3.5 Uji Tantang dengan *Vibrio alginolyticus*

Uji tantang dilakukan pada hari ke 8 (7 hari setelah vaksinasi), dengan cara menyuntikkan bakteri *Vibrio alginolyticus* 0,1 ml/ikan (berat rata-rata 23 gram) dengan dosis $9,6 \times 10^6$ sel/ikan melalui bagian *intramuscular* pada punggung ikan.

4.3.5 Pengukuran Titer Antibodi

Pengukuran titer antibodi ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) dilakukan 2 kali yaitu sebelum dilakukan vaksinasi dan sesudah dilakukan vaksinasi. Sebelum pengukuran titer antibodi, terlebih dahulu dilakukan pengambilan darah. Darah ikan kerapu macan diambil melalui bagian pangkal

ekor ikan dengan menggunakan spuit 0,1 ml. Untuk mendapatkan serumnya dilakukan sentrifugasi satu kali selama 10 menit kemudian dilakukan penyimpanan pada suhu - 4 °C selama 2 hari.

Pengukuran titer antibodi dilakukan dengan uji aglutinasi (Suprpto dkk., 1996). Uji aglutinasi dilakukan sebagai berikut: 0,025 ml 0,01 M PBS dimasukkan ke dalam mikropate pada lubang 1 – 12. Antiserum dimasukkan pada lubang 1 kemudian dititrasi menggunakan diluter pada lubang 1 – 11. Antigen 0,025 ml diteteskan pada lubang 1 – 12. Mikropate digoyang selama 10 menit dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit, kemudian dilakukan pembacaan titer antibodi. Aglutinasi positif terjadi pada tabung yang terlihat butiran-butiran gumpalan antigen dan antibodi, sedangkan aglutinasi negatif ditunjukkan dengan adanya endapan di dasar tabung.

4.3.6 Pencatatan *Survival Rate* (SR)

Pencatatan SR dilakukan setelah ujiantang terhadap bakteri *Vibrio alginolyticus* dan setelah pengamatan selama 7 hari.

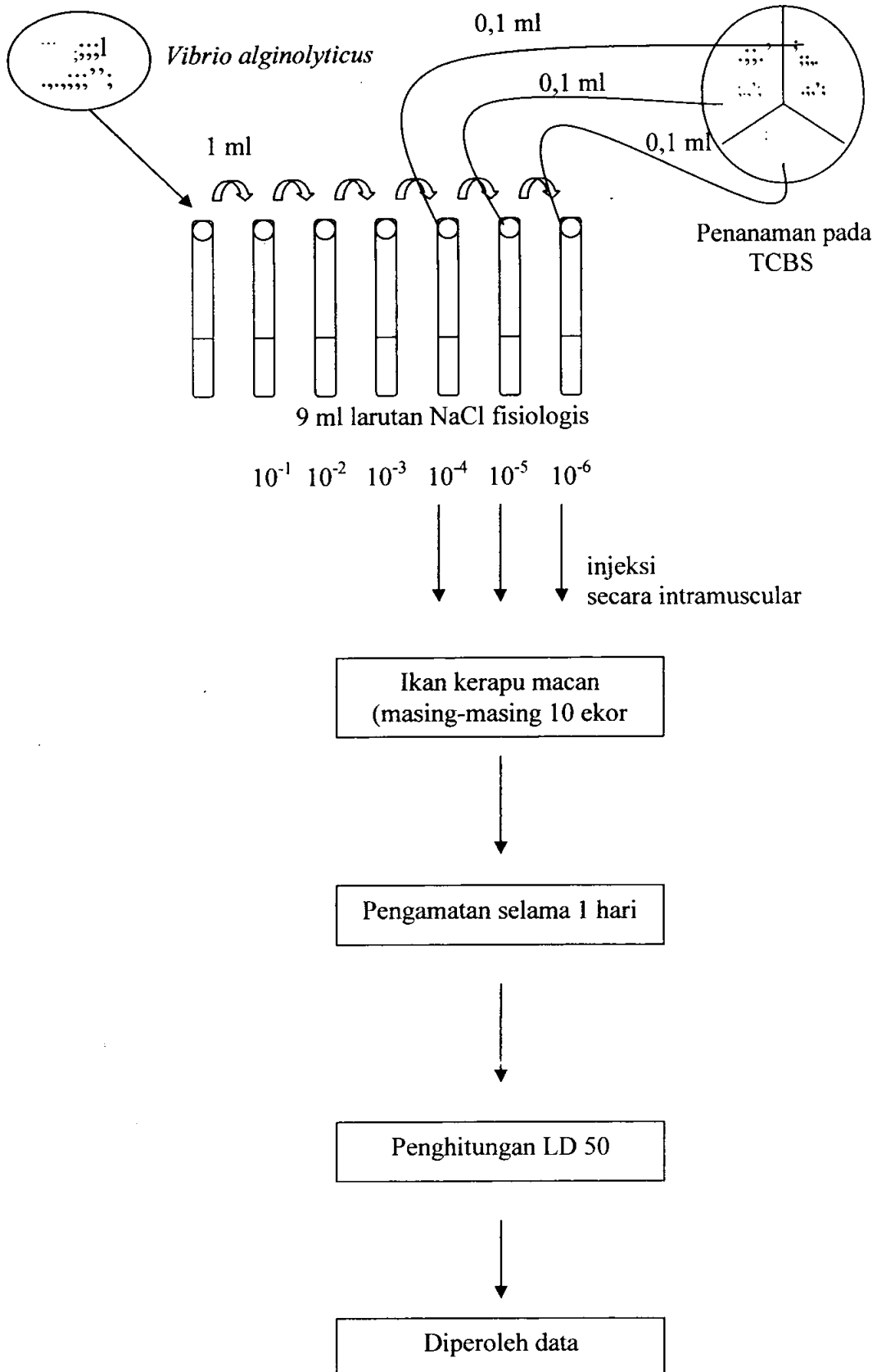
4.4 Parameter

Parameter pada penelitian ini terdiri dari titer antibodi dan tingkat kelangsungan hidup (SR) ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*).

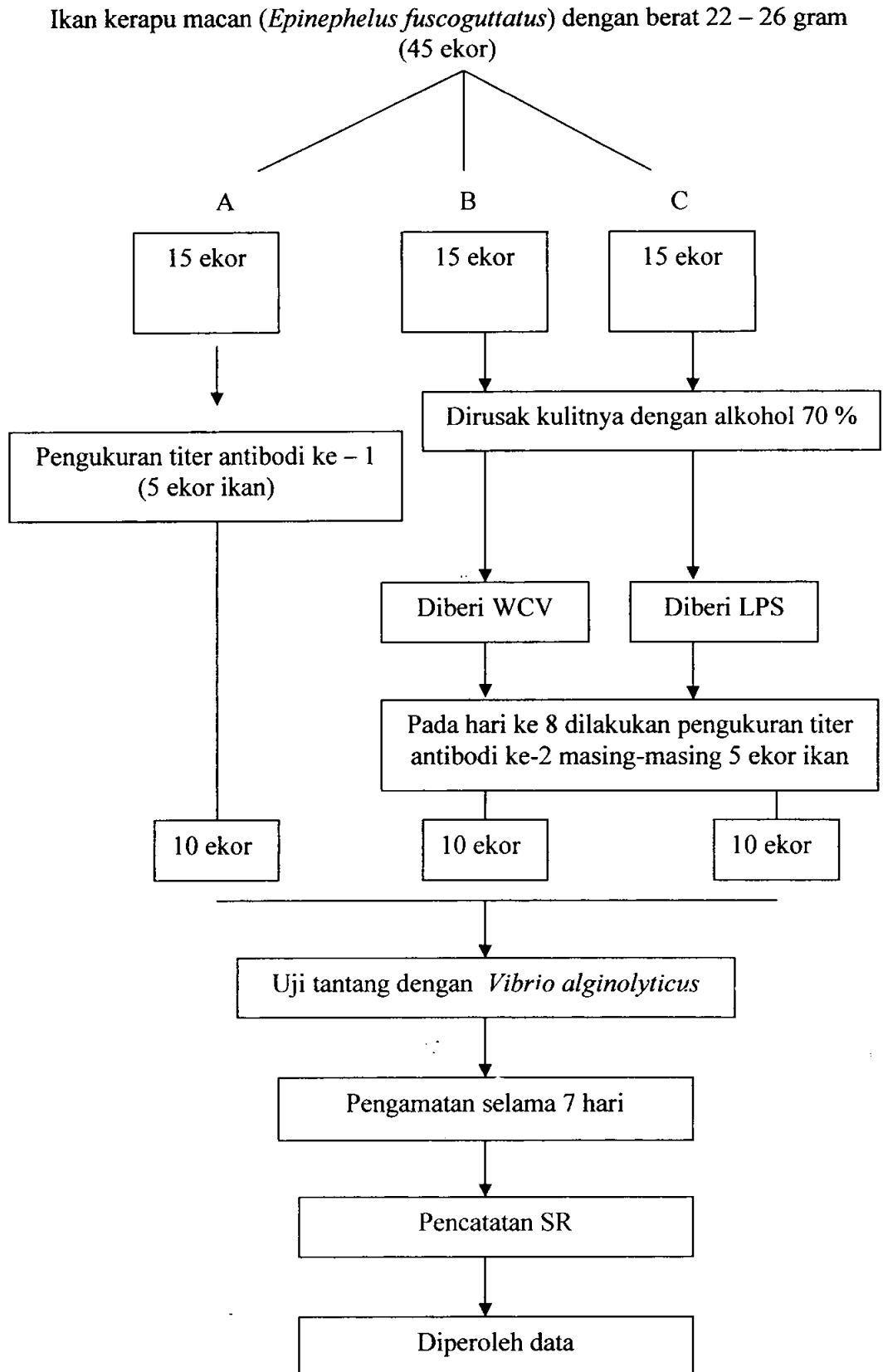
4.5 Rancangan Penelitian dan Analisis Data

Jenis penelitian ini termasuk penelitian deskriptif, yang menggambarkan tentang titer antibodi dan tingkat kelangsungan hidup ikan kerapu macan setelah divaksin dengan WCV dan LPS.

Penyajian data pada penelitian ini dilakukan secara deskriptif. Data primer yang akan ditampilkan adalah berupa tabel titer antibodi dan tabel tingkat kelangsungan hidup (SR) ikan kerapu macan. Data penunjang yang diperlukan adalah gambaran histopatologi organ dalam ikan kerapu macan, tabel data perubahan morfologi dan fisiologi ikan kerapu macan, serta tabel data kualitas air yang meliputi suhu, pH, oksigen terlarut dan salinitas.



Gambar 4.1 Skema prosedur kerja penelitian pendahuluan.



Gambar 4.2 Skema prosedur kerja penelitian.