

**BAB 3**

**MATERI DAN METODE**

## **BAB 3 METODE PENELITIAN**

### **3.1 Tempat dan Waktu Penelitian**

Tempat penelitian dilakukan di Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga Surabaya, yaitu Laboratorium Bakteriologi dan Mikologi untuk isolasi dan identifikasi bakteri serta Laboratorium Patologi Veteriner untuk proses infeksi sampai pengamatan hasil penelitian. Waktu penelitian berlangsung selama satu bulan dimulai dari bulan Juli sampai bulan Agustus 2014.

### **3.2 Materi Penelitian**

#### **3.2.1 Hewan Coba**

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan lele dumbo sebanyak 20 ekor dengan berat sekitar 100 gr, ukuran 15-20 cm, umur 2-3 bulan.

#### **3.2.2 Bahan dan Peralatan Penelitian**

Bahan untuk isolasi dan identifikasi bakteri *Aeromonas hydrophila* adalah media TSA, kristal violet, lugol, safranin, media TSIA, media SIM, media Urea, media SCA, media Gula-gula, kloroform, reagen kovach.

Bahan yang digunakan untuk menginfeksi ikan lele dumbo adalah isolat bakteri *Aeromonas hydrophila*  $3 \times 10^5$  sel/ml,  $3 \times 10^6$  sel/ml,  $3 \times 10^7$  sel/ml, standar McFarland no.1, NaCl fisiologi. Isolat bakteri didapatkan dari ikan lele dumbo, lihat Lampiran 1.

Bahan untuk pembuatan preparat histopatologi usus ikan lele dumbo antara lain larutan formalin 10%, alkohol 70%, 80%, 90%, 96%, xylol, parafin

blok, hematoxylin-eosin, gliserin, aquades, minyak emersi. Bahan untuk pemeliharaan ikan lele dumbo adalah air PDAM, pakan ikan.

Peralatan yang digunakan untuk isolasi dan identifikasi bakteri adalah petri disk, *object* dan *cover glass*, tabung reaksi, inkubator, autoklaf. Peralatan untuk pengenceran bakteri adalah vortex, tabung reaksi, rak tabung, spuit. Alat untuk pembedahan adalah *scalpel*, gunting, pinset, kertas label, pot salep, ember. Peralatan untuk pembuatan preparat adalah cetakan blok paraffin, *tissue processor*, *embedding machine*, mikrotom, *hot plate*, bak *staining*, *object glass*, *cover glass*, mikroskop cahaya. Alat untuk pemeliharaan ikan lele dumbo adalah akuarium dan filter air.

### 3.3 Metode Penelitian

#### 3.3.1 Penentuan Dosis Infeksi *Aeromonas hydrophila*

Menurut penelitian Irianto (2003) infeksi *Aeromonas hydrophila* yang melebihi  $3 \times 10^4$  sel/ml dapat menjadi patogen. Dosis infeksi *Aeromonas hydrophila* untuk empat perlakuan masing-masing dengan lima ulangan. Satu akuarium berisi 15 liter air. Tiga kelompok perlakuan diinfeksi bakteri dengan dosis yang ditingkatkan masing-masing  $3 \times 10^5$  sel/ml,  $3 \times 10^6$  sel/ml,  $3 \times 10^7$  sel/ml, diinfeksi dengan dimasukkan 1 ml bakteri *Aeromonas hydrophila* peroral menggunakan spuit. Setelah 7 hari dilakukan pembedahan untuk mengambil organ usus lalu dibuat preparat histopatologi dan dilakukan uji biokimia pada ikan perlakuan untuk memastikan bahwa ikan lele dumbo terinfeksi *Aeromonas hydrophila*. Skema pengenceran bakteri dapat dilihat di Lampiran 2.

Satu kelompok yang dijadikan kontrol direndam dalam air tidak diinfeksi *Aeromonas hydrophila*. Setelah satu minggu semua ikan lele dumbo diamati satu per satu terhadap gejala klinis yang muncul (Asniatih dkk., 2013).

### 3.3.2 Penentuan Jumlah Sampel

Rumus besaran sampel adalah  $t(n-1) \geq 15$  dengan  $t$  adalah banyaknya perlakuan,  $n$  adalah ulangan (Kusriningrum, 2010). Dalam penelitian ini digunakan 4 perlakuan dan 5 ulangan. Total jumlah sampel adalah 20 ekor ikan lele dumbo.

## 3.4 Pelaksanaan Penelitian

### 3.4.1 Kelompok Perlakuan

Ikan lele dumbo diambil 20 ekor secara acak. Setiap kelompok perlakuan dipelihara di dalam akuarium. Berdasarkan pernyataan Irianto (2003) bahwa *Aeromonas hydrophila* diperairan yang melebihi  $10^4$  sel/ml dapat menjadi patogen. Rincian jenis perlakuan yang direncanakan pada penelitian adalah sebagai berikut :

- P0 : Kelompok perlakuan kontrol negatif. Ikan di akuarium 0 tidak diinfeksi *Aeromonas hydrophila*.
- P1 : Ikan di akuarium 1 diinfeksi *Aeromonas hydrophila* dosis  $3 \times 10^5$  sel/ml.
- P2 : Ikan di akuarium 2 diinfeksi *Aeromonas hydrophila* dosis  $3 \times 10^6$  sel/ml.
- P3 : Ikan di akuarium 3 diinfeksi *Aeromonas hydrophila* dosis  $3 \times 10^7$  sel/ml.

### 3.4.2 Pemberian Perlakuan

Semua kelompok perlakuan dalam akuarium diberi pakan yang sama sebanyak dua kali sehari setiap pagi dan sore, diadaptasi selama tiga hari

(Sukenda dkk., 2008), setelah itu diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* selama seminggu (Asniatih dkk., 2013) untuk P1, P2, dan P3 sedangkan P0 sebagai kontrol. Setelah itu mengamati gejala pada ikan yang muncul. Pada hari ketujuh dilakukan pembedahan untuk melihat kerusakan pada usus ikan lele dumbo.

### **3.5 Teknik Pembuatan Preparat Histopatologi**

Pembuatan preparat histologi dapat dilihat di Lampiran 3.

### **3.6 Pemeriksaan Preparat Histopatologi**

Pemeriksaan histopatologi usus ikan lele dumbo melalui dua tahap yaitu makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan makroskopis ikan lele dumbo dilakukan setelah ikan lele dumbo yang diinfeksi diambil dari akuarium kemudian dilakukan pengamatan pada permukaan tubuh ikan lele dumbo lalu dilakukan pembedahan pada organ dalam untuk melihat perubahan

Pemeriksaan mikroskopik usus ikan lele dumbo bagian pars anterior dilakukan melalui pembuatan preparat sampel usus ikan lele dumbo yang telah diinfeksi *Aeromonas hydrophila*. Pemeriksaan histopatologi dilakukan terhadap preparat jaringan usus ikan lele dumbo pada berbagai derajat infeksi dan preparat usus ikan lele dumbo normal yang tidak diinfeksi. Setiap preparat diamati lima lapang pandang, hasil penilaian tiap lapang pandang dalam satu preparat dijumlah dan dirata-rata.

### 3.7 Variabel Penelitian

Variabel bebas : Dosis bakteri *Aeromonas hydrophila*  $3 \times 10^5$  sel/ml,  $3 \times 10^6$  sel/ml,  $3 \times 10^7$  sel/ml.

Variabel tergantung : Gambaran histopatologi usus ikan lele dumbbo yang terdiri dari ruptur, hemoragi.

Variabel terkendali : Jenis ikan lele dumbbo, ukuran ikan lele dumbbo, berat badan ikan lele dumbbo, akuarium, air dan pakan.

### 3.8 Definisi Operasional

*Aeromonas hydrophila* : bakteri gram negatif oportunistik, tidak berspora, motil dengan satu flagel di salah satu kutubnya.

Hemoragi : akumulasi eritrosit di luar pembuluh darah.

Ruptur : sel epitel terlepas dari vili usus.

Ulser : sel epitel terlepas dari vili usus sampai lapisan muskularis mukosa.

### 3.9 Rancangan Penelitian dan Analisis Data

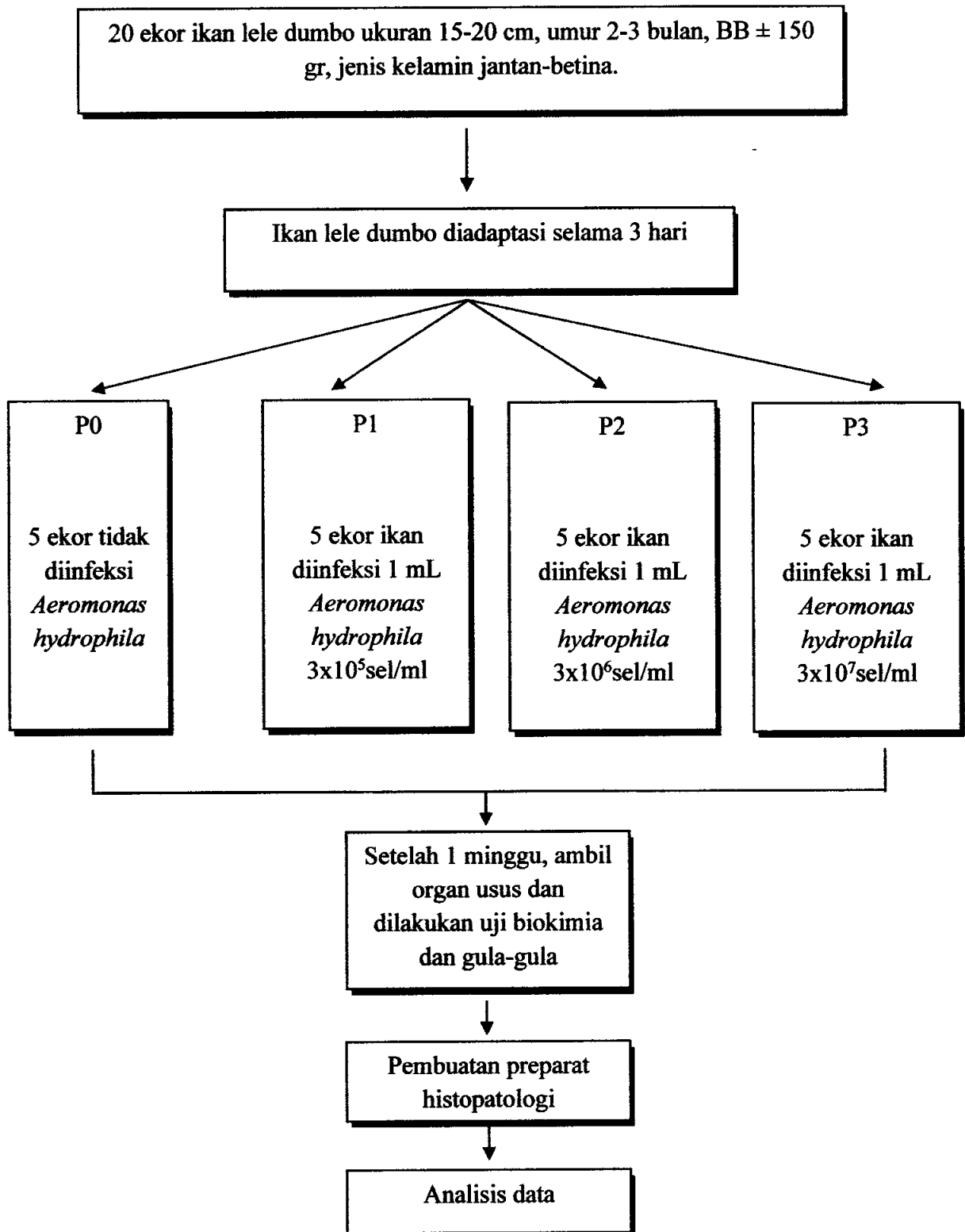
Penelitian ini bersifat eksperimental dengan empat perlakuan ( $t=4$ ), tiap perlakuan terdiri dari lima ulangan ( $n=5$ ). Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah gambaran usus ikan lele dumbbo.

Rancangan percobaan yang digunakan adalah RAL (Rancangan Acak Lengkap). Data yang diperoleh dalam bentuk skoring gambaran tingkat kerusakan vili usus ikan lele dumbbo dan dianalisis menggunakan program SPSS 16

menggunakan uji Kruskal Wallis dan jika ada perbedaan nyata dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney (Daniel, 1989). Berikut skoring kerusakan vili usus menurut Mahasri (2009)

Tabel 3.1. Skoring Vili Usus

0	tidak ada vili usus yang rusak
1	1/3 bagian atas vili usus mengalami ruptur (kerusakan ringan)
2	2/3 bagian atas vili usus mengalami ruptur (kerusakan sedang)
3	semua bagian vili usus mengalami ruptur (kerusakan berat)



Gambar 3.1. Diagram Alir Penelitian