

BAB IV
METODOLOGI PENELITIAN

BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Pendidikan Perikanan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga. Penelitian ini berlangsung mulai 01 September – 30 September 2005. Untuk pembuatan ekstrak daun sambiloto dilakukan di Laboratorium Fitokimia, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga.

4.2 Materi Penelitian

4.2.1 Alat Penelitian

a. Peralatan untuk pembuatan ekstrak daun sambiloto

Peralatan yang digunakan untuk pembuatan ekstrak daun sambiloto antara lain timbangan, mesin giling, toples, corong Buchner, erlenmeyer hisap, kompresor, kertas saring, *rotary vacumm evaporator*.

b. Peralatan untuk perlakuan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah akuarium 20 buah, kran aerator, selang aerasi, batu aerasi, kasa, seser, gayung, ember, bekker glass, erlenmeyer, gelas ukur, pipet ukur, mortar, termometer, pH meter, DO meter.

4.2.2 Bahan Penelitian

a. Bahan untuk pembuatan ekstrak daun sambiloto

Bahan – bahan yang digunakan untuk pembuatan ekstrak daun sambiloto adalah $\frac{1}{2}$ kg daun sambiloto kering yang diperoleh dari Pasar Pabean Surabaya, 5 liter etanol 96 %, dan es batu secukupnya.

b. Bahan untuk perlakuan

Bahan – bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah hewan coba berupa benih ikan lele berukuran 5 – 7 cm atau berumur 2 bulan sebanyak 200 ekor yang diperoleh dari Laboratorium Pendidikan Perikanan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, pakan ikan komersial dalam bentuk pellet, ekstrak daun sambiloto, CmCNa (pelarut ekstrak), aquadest, chlorin, Kalium Permanganat dan isolat bakteri *Aeromonas hydrophila* yang diperoleh dari Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga.

4.3 Metode Penelitian

4.3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental yaitu untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun sambiloto terhadap sintasan ikan lele yang telah diinfeksi *Aeromonas hydrophila*. Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap yang terdiri dari 3 perlakuan dan 1 kontrol dengan 5 kali ulangan. Perlakuan dan kontrol yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- Kontrol (P₀) : Ikan diinfeksi *Aeromonas hydrophila*
- Perlakuan 1 (P₁) : Ikan diinfeksi *Aeromonas hydrophila* kemudian di – rendam dengan ekstrak daun sambiloto dengan dosis 100 ppm.
- Perlakuan 2 (P₂) : Ikan diinfeksi *Aeromonas hydrophila* kemudian di – rendam dengan ekstrak daun sambiloto dengan dosis 200 ppm.
- Perlakuan 3 (P₃) : Ikan diinfeksi *Aeromonas hydrophila* kemudian di – rendam dengan ekstrak daun sambiloto dengan dosis 300 ppm.

4.3.2 Prosedur Kerja

a. Pembuatan ekstrak daun sambiloto

Daun sambiloto kering sebanyak ½ kg dihaluskan dengan cara digiling sampai berbentuk serbuk. Selanjutnya serbuk daun sambiloto dimaserasi menggunakan pelarut etanol selama 3 × 24 jam pada suhu kamar. Kemudian pelarutnya diuapkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental daun sambiloto.

b. Persiapan

Pada tahap persiapan ini, ikan diadaptasikan selama 1 minggu setelah sebelumnya direndam dengan desinfektan dengan tujuan untuk menghindari atau mencegah ikan terkontaminasi penyakit. Setelah itu ikan coba dipilih secara acak untuk dimasukkan dalam kelompok perlakuan dan kontrol,

kemudian ikan dimasukkan ke dalam akuarium, tiap akuarium diisi 10 ekor benih ikan lele. Selama tahap persiapan ini semua ikan coba dikondisikan sama.

c. Penentuan dosis perlakuan

Menentukan dosis dan waktu perendaman yang tidak membahayakan atau mengganggu kehidupan ikan, perlu dilakukan penelitian pendahuluan mengenai toksisitas ekstrak daun sambiloto terhadap ikan lele melalui metode perendaman. Pada penelitian pendahuluan ini dosis yang di ujicobakan yaitu 0 ppm sebagai kontrol, 200 ppm, 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm, dan 1000 ppm kemudian dilakukan pengamatan terhadap tingkat kematian ikan selama 24 jam.

Dari hasil pengamatan diperoleh hasil bahwa pada dosis 0 ppm dan 200 ppm tidak menimbulkan kematian pada ikan selama perlakuan, pada dosis 400 ppm kematian total terjadi setelah 18 jam perendaman, pada dosis 600 ppm kematian terjadi 15 jam setelah perendaman, pada dosis 800 ppm kematian terjadi setelah 7 jam perendaman, dan pada dosis 1000 ppm kematian sudah terjadi 3 jam setelah perlakuan.

Mengacu pada hasil penelitian pendahuluan tersebut, maka pada penelitian yang sesungguhnya digunakan dosis perlakuan antara 0 – 300 ppm, karena pada tingkat dosis tersebut belum menimbulkan kematian pada ikan setelah perendaman dengan ekstrak daun sambiloto selama 24 jam

d. Perlakuan

Setelah masa adaptasi selama 1 minggu, semua kelompok diinfeksi dengan bakteri *Aeromonas hydrophila* dengan konsentrasi 10^5 cfu/ml selama 7 hari. Menurut Angka *et al.*, (2000) LD_{50} *Aeromonas hydrophila* strain virulen adalah $10^{5.4}$ cfu/ml. Bakteri diberikan melalui air media pemeliharaan yang menggunakan satuan ukuran volume (liter) maka konsentrasi bakteri yang diberikan dalam air adalah 10^5 cfu/ml. Setelah ikan di infeksi, dilakukan pengamatan terhadap ikan sampai timbul gejala klinis berupa warna tubuh menjadi lebih gelap, nafsu makan menurun, gerakan renang tidak teratur, gerakannya lambat, lebih suka berada di permukaan dan tampak sulit bernapas (Kordi, 2004).

Memastikan bahwa gejala – gejala tersebut adalah akibat infeksi *Aeromonas hydrophila* maka dilakukan isolasi terhadap bakteri tersebut dengan cara mengambil sampel olesan dari permukaan tubuh, kemudian dilakukan uji identifikasi bakteri *Aeromonas hydrophila* dengan menanam bakteri pada media *McConkey Agar* dan selanjutnya koloni yang tumbuh tersebut dibiakkan pada *Triptyc Soy Broth*. Selanjutnya, dilakukan uji biokimia dengan menggunakan media *Sulfid Indole Motility (SIM)*, *Triple Sugar Iron Agar (TSIA)*, *Urease* dan *Cytrate*.

Penggunaan media *Sulfid Indole Motility (SIM)* bertujuan untuk motilitas bakteri, reaksi indol dan H_2S (Hidrogen Sulfida). *Aeromonas hydrophila* menunjukkan reaksi positif terhadap media tersebut. *Triple Sugar Iron Agar (TSIA)* digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri

memfermentasikan glukosa, laktosa dan sukrosa. *Aeromonas hydrophila* menunjukkan reaksi positif terhadap glukosa dan sukrosa serta negatif terhadap laktosa. Penggunaan media *Urease* bertujuan untuk mengetahui apakah bakteri menghasilkan enzim urease yang dapat menghidrolisis amonia. Media *Cytrate* digunakan untuk mengetahui apakah bakteri menggunakan unsur karbon dari cytrate atau tidak. *Aeromonas hydrophila* menunjukkan reaksi negatif terhadap kedua media tersebut.

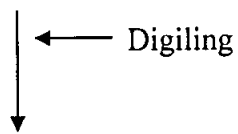
Perlakuan pengobatan akan dilakukan setelah diketahui bahwa ikan tersebut positif terinfeksi *Aeromonas hydrophila* sesuai dengan kelompok perlakuan yaitu perendaman dengan ekstrak daun sambiloto dengan dosis 100 ppm, 200 ppm dan 300 ppm. Perendaman dilakukan selama 24 jam.

e. Penghitungan sintasan

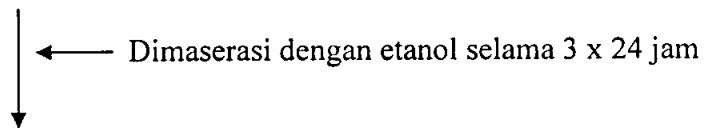
Penghitungan prosentase sintasan (jumlah ikan yang hidup setelah perlakuan) dilakukan setelah 7 hari pemeliharaan ikan pasca pengobatan. Memastikan bahwa ekstrak daun sambiloto mempunyai daya antibakterial terhadap *Aeromonas hydrophila* maka dilakukan isolasi dan uji identifikasi kembali.

Bagan Prosedur kerja**a. Prosedur Kerja Pembuatan Ekstrak Daun Sambiloto**

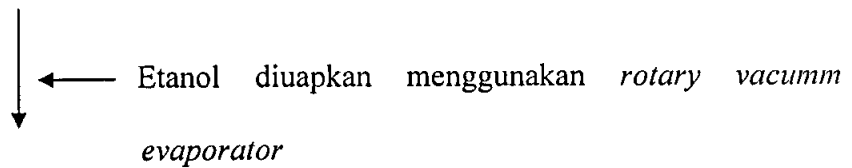
Daun Sambiloto kering sebanyak $\frac{1}{2}$ kg



Serbuk daun sambiloto



Maserat (sari daun sambiloto)



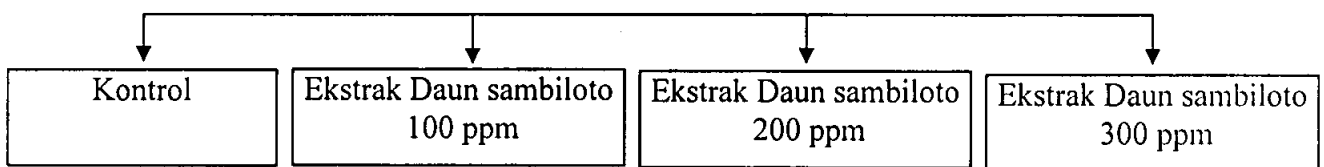
Ekstrak kental daun sambiloto

b. Prosedur Kerja Penelitian

Benih ikan lele diaklimatisasi selama 1 minggu dan diukur parameter kualitas air (suhu, oksigen terlarut, pH)

↓
Tiap bak percobaan berisi 10 ekor ikan, terdiri dari 3 perlakuan, 1 kontrol dan ulangan sebanyak 5 kali

↓
Infeksi *Aeromonas hydrophila* dengan konsentrasi 10^5 cfu / ml selama 7 hari



Perendaman selama 24 jam

↓
Ganti air segar, kemudian ikan dipelihara kembali selama 7 hari dan diukur parameter kualitas air (suhu, oksigen terlarut, pH)

↓
Penghitungan sintasan

↓
Diperoleh data

4.3.3 Parameter Pengamatan

Parameter utama yang diamati dalam penelitian ini adalah sintasan yaitu jumlah ikan yang hidup dan mati setelah perlakuan. Setelah itu dilakukan penghitungan sintasan yang dinyatakan dalam persen dengan rumus :

$$\text{Sintasan} = \frac{\text{Jumlah ikan yang hidup setelah perlakuan}}{\text{Jumlah ikan pada awal perlakuan}} \times 100\%$$

Sebagai parameter penunjang juga diamati gejala klinis yang timbul setelah infeksi *Aeromonas hydrophila* dan kualitas air media pemeliharaan meliputi suhu, oksigen terlarut, dan pH pada masa adaptasi, perlakuan dan setelah perlakuan.

4.3.4 Analisis Data

Data hasil penelitian dianalisis secara statistik dengan Analisis Varian, apabila terdapat perbedaan antar perlakuan dilanjutkan dengan uji Jarak Berganda Duncan (*Duncan's Multiple Range Test*) (Kusriningrum, 1990).