

IV. METODE PENELITIAN

4.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli hingga bulan September 2004 di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Riau.

4.2. Bahan dan Alat

Bahan yang dipakai pada penelitian ini adalah ikan mas dengan ukuran 7 – 10 cm yang telah diinfeksi dengan bakteri *Aeromonas hydrophila*, ekstrak bawang putih, media tumbuh bakteri yaitu media GSP (Pseudomonas-Aeromonas selective Agar), TSB (Trypton Soya Broth). PBS (Phosfat Buffer Salin), alkohol, Aquades.

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah enlemeyer, cawan petri, mikropipet, inkubator, autoclave, refrigerator, hot plate, stirer, vortex, oven, colono counter, stopwatch, timbangan analitik, lampu bunsen, jarum ose, juicer, saringan teh, kertas saring 0.5 μm , filter millipore 0.22 μm , jarum suntik, aluminium foil, kapas, tisu, kertas padi, tangkuk, aerator lengkap dengan peralatannya, 12 buah aquarium dengan ukuran 40 x 30 x 30 cm. Pengukuran kualitas air seperti oksigen terlarut dengan menggunakan alat DO meter, pH meter untuk mengukur pH dan thermometer untuk mengukur suhu.

4.3 Metode Penelitian.

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen yaitu memberi perlakuan pada masing-masing ikan dengan beberapa konsentrasi ekstrak bawang putih

yang berbeda dengan metode penyuntikan dengan padat penebaran 10 ekor per wadah aquarium.

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) satu faktor dengan empat perlakuan dan tiga ulangan. Masing-masing perlakuan tersebut adalah :

1. P0 = tanpa pemberian ekstrak bawang putih
2. P1 = pemberian ekstrak bawang putih dengan konsentrasi 10 ml/L
3. P2 = pemberian ekstrak bawang putih dengan konsentrasi 20 ml/L
4. P3 = pemberian ekstrak bawang putih dengan konsentrasi 30 ml/L

Dari masing-masing konsentrasi tersebut, dosis ekstrak bawang putih yang diberikan adalah 0.1 ml/ekor dengan cara disuntik secara intra muscular.

Adapun model umum rancangan dalam penelitian ini adalah model tetap seperti yang dikemukakan oleh Sujana (1995) yaitu :

$$Y_{ij} = \mu + \delta_i + \Sigma_{ij}$$

Dimana :

i = 123 (perlakuan)

j = 123 (ulangan)

Y_{ij} = nilai pengamatan pada dosis ke- i dan ulangan ke - j

μ = efek nilai tengah atau rata-rata sebenarnya

δ_i = efek dari dosis ke- i yang sebenarnya

Σ_{ij} = efek kesalahan pada dosis ke-i dan ulangan ke-j

Respon yang diukur dalam penelitian ini adalah :

1. Kelulus hidupan ikan mas yang terinfeksi bakteri *Aeromona hydrophila* setelah diberi perlakuan ekstrak bawang putih dengan berbagai konsentrasi dengan menggunakan rumus yang dikemukakan oleh Effendie (1997) :

$$S = N_t / N_o \times 100 \%$$

Dimana : S = Kelangsungan hidup ikan mas (%)

N_t = Jumlah ikan hidup pada akhir penelitian

N_o = Jumlah ikan hidup pada awal penelitian

2. Tingkat keberhasilan ikan mas (*Cyprinus carpio* L) yang sembuh dari penyakit MAS (Motil *Aeromonas* Septisemia) dan dapat bertahan hidup hingga akhir penelitian dihitung dengan menggunakan rumus Relative Percen Survival menurut Ellis (1998) :

$$RPS = 1 - \frac{\% \text{ mortalitas ikan karena perlakuan ekstrak bawang putih}}{\% \text{ mortalitas ikan kontrol}} \times 100 \%$$

3. Pengamatan abnormalitas ikan dicatat gejala klinisnya
4. Perhitungan jumlah koloni bakteri pada ikan kontrol yang terinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* (yang tidak diobati dengan ekstrak bawang putih) dan ikan yang terinfeksi *Aeromonas hydrophila* yang diberi ekstrak bawang putih dengan konsentrasi yang berbeda. Perhitungan koloni bakteri *Aeromonas hydrophila* dilakukan dengan cara pengenceran yang dilakukan pada awal penelitian dan akhir penelitian.

4.4. Prosedur Penelitian

4.4.1. Persiapan penelitian

Wadah yang digunakan untuk penelitian ini adalah aquarium yang berukuran 40 x 30 x 30 cm sebanyak 12 buah yang dilengkapi dengan perlengkapan aerasi. Sebelum digunakan terlebih dahulu dibersihkan dengan larutan Kalium Permanganat (PK/ KMnO_4) selama 24 jam. Selanjutnya dibilas dengan air bersih dan dikeringkan. Setelah itu dimasukkan air ke masing-masing aquarium dan diberi aerasi, aquarium siap dipergunakan untuk penelitian.

4.4.2. Penyediaan bakteri

Penyediaan bakteri *Aeromonas hydrophila* dilakukan dengan cara mengisolasi kembali bakteri tersebut dari isolat yang berasal dari IPB (Institut Pertanian Bogor) pada media GSP secara aseptik kemudian diinkubasikan didalam inkubator dengan suhu 28°C selama 24 jam. Setelah mendapatkan koloni yang berwarna kuning maka koloni tersebut dikultur ulang pada media TSB kemudian diinkubasikan kembali didalam inkubator dengan suhu yang sama selama 24 jam.

Setelah mendapatkan kultur cair, bakteri tersebut diencerkan hingga 10^7 guna dilakukan uji LD₅₀ (uji patogenitas bakteri pada ikan dengan cara menginfeksi bakteri tersebut bila 50 % ikan mati dalam kurun waktu kurang lebih 7 hari maka bakteri tersebut patogen). Setelah uji LD₅₀ tercapai bakteri patogen tersebut siap digunakan untuk menginfeksi ikan mas dengan cara perendaman, kemudian ikan dikembalikan ke wadah yang airnya bersih dan diberi aerasi dan dipelihara dan diberi pakan secara adlibitum.

Setelah ikan menunjukkan gejala penyakit MAS (Motil *Aeromonas* Septisemia) (setelah hari ke 6), dilakukan pengacakan dan dilakukan penyuntikan ekstrak bawang putih secara intramuscular sesuai dengan konsentrasi yaitu P0 (kontrol), P1 (10ml/l), P2 (20ml/l) dan P3 (30ml/l) dengan dosis masing masing perlakuan adalah 0.1 ml/ekor. Masing masing perlakuan setiap wadahnya berisi 10 ekor.

Kemudian ikan dipelihara selama 14 hari dan dilakukan pengamatan terhadap gejala klinis dan kematian ikan. Selama penelitian ikan diberi pakan secara adlibitum dengan frekwensi 3 kali sehari (pagi, siang dan sore hari)

4.4.3. Perhitungan koloni bakteri

Perhitungan koloni dilakukan pada ikan kontrol, ikan yang terinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* dan ikan yang telah diobati dengan ekstrak bawang putih, dengan cara mengisolasi kembali bakteri *Aeromonas hydrophila* dari organ ginjal yang ditumbuhkan pada media GSP, kemudian diinkubasi pada inkubator dengan suhu 28 °C selama 24 jam, kemudian koloni yang berwarna kuning diambil dan ditumbuhkan pada media TSB kemudian diinkubasi kembali pada inkubator dengan suhu yang sama selama 24 jam dan siap dilakukan pengenceran guna menghitung koloni bakterinya.

Perhitungan jumlah koloni bakteri dengan cara pengenceran yaitu mengambil 9 ml larutan PBS kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi sebanyak 10 tabung, (tabung 1 – 10) kemudian mengambil 1 ml kultur bakteri dari media TSB sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke tabung pertama, kemudian dihomogenkan dengan menggunakan vortex setelah homogen diambil 1 ml kemudian dimasukkan ke tabung ke dua dan seterusnya hingga tabung 10. (lihat lampiran 1)

Setelah pengenceran selesai maka pada pengenceran 8, pengenceran 9 dan pengenceran 10, kemudian dilakukan pengambilan kultur cair tersebut dengan menggunakan mikropipet sebanyak 25 μ l kemudian ditanam pada media GSP, diinkubasikan kedalam inkubator dengan suhu 28^o C selama 24 jam dan koloni bakteri siap untuk dihitung dengan menggunakan alat koloni konter.

Selam penelitian dilakukan pengamatan gejala klinis, abnormalitas dan kematian ikan dicatat untuk melengkapi data penelitian.