

IV. METODE PENELITIAN

4.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilaksanakan mulai bulan April sampai dengan akhir September 2007, di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Riau Pekanbaru.

4.2. Bahan dan Alat

4.2.1. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah; ikan lele ukuran dewasa (20 – 30 cm) untuk mendapatkan serum dan kaldu sebagai bahan baku media, benih ikan bawal, lele, dan ikan mas koki, masing-masing berukuran 3 – 5 cm sebagai ikan stok untuk mendapatkan Ich stadia trophozoid, selain itu juga benih ikan bawal yang sehat berukuran 2 – 3 cm untuk uji patogenitas. Adapun bahan lain untuk pembuatan media adalah; Na₂HPO₄, Pepton, Glukosa, Agar dan akuabides. Jenis antibiotik yang digunakan adalah Penisilin G dan Streptomycin. Bahan kimia untuk pembuatan preparat histologi seperti, Farapin, Alkhohol absolut, Xylol, Formaldehid, Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin, minyak emersi, metanol, safranin untuk pewarnaan theron, dan lain-lain yang berhubungan dengan penelitian.

4.2.2. Alat

Peralatan yang digunakan adalah akuarium, wadah plastik berukuran 10 L, serok, aerator lengkap dengan asesorisnya, alat seksio, cawan petri, timbangan analitik, erlemeyer, magnetik stirer, autoclaf, hot plate, spuit (syrenge), evendroff,

tabung reaksi, mikrotom, staining jar, kaca objek, mikroskop, pipet pasteur, sentrifuse, blender, dan lain-lain.

4.3. Metode Penelitian

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode eksperimen, yaitu pertama: mengkultur Ich stadia trophozoid di dalam media dengan komposisi kaldu yang berbeda, ke dua mempertahankan stadia theron dalam media dengan komposisi serum yang berbeda. Ke tiga uji patogenitas yaitu theron yang sudah dipertahankan diinfeksi ke benih ikan sehat, selanjutnya hasil uji patogenitas diamati histopatologinya. Adapun rancangan penelitiannya adalah membedakan komposisi media kultur seperti yang disajikan pada Tabel 1 dan 2 berikut ini,

Tabel 1. Komposisi Media Kelompok I

Media	Komposisi								
	Kaldu Ikan	Na ₂ HPO ₄	Pepton	Glukosa	Agar	Serum Ikan	Akuabides	Sreptomycin	Pene silin G
A	0,3 ml	0,025 g	1 g	1 g	0,07 g	1 ml	200ml	100 IU/ml	100 IU/ml
B	0,5 ml	0,025 g	1 g	1 g	0,07 g	1 ml	200ml	100 IU/ml	100 IU/ml
C	0,7 ml	0,025 g	1 g	1 g	0,07 g	1 ml	200ml	100 IU/ml	100 IU/ml

Tabel 2. Komposisi Media Kelompok II

Media	Komposisi								
	Kaldu Ikan	Na ₂ HPO ₄	Pepton	Glukosa	Agar	Serum Ikan	Akuabides	Sreptomycin	Pene silin G
A	0,3 ml	0,025 g	1 g	1 g	0,07 g	1,0 ml	100ml	100 IU/ml	100 IU/ml
B	0,3 ml	0,025 g	1 g	1 g	0,07 g	1,5 ml	100ml	100 IU/ml	100 IU/ml
C	0,3 ml	0,025 g	1 g	1 g	0,07 g	2,0 ml	100ml	100 IU/ml	100 IU/ml

4.4. Respon yang Diukur

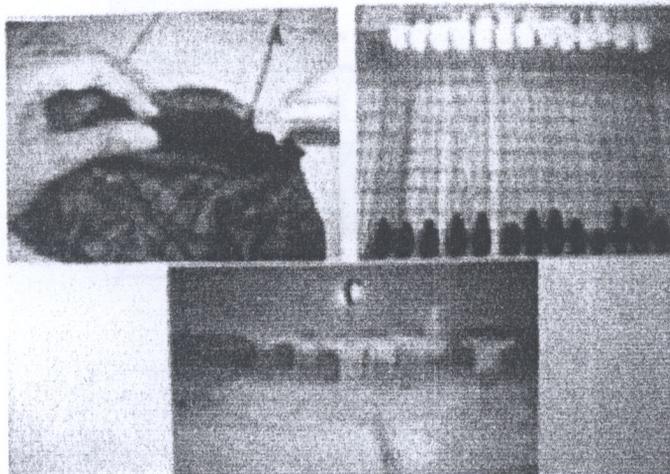
Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah:

1. Waktu yang diperlukan oleh trophozoid berubah menjadi theron
2. Kelulusan hidup dari theron di dalam media
3. Pergerakan theron dalam media
4. Waktu yang diperlukan untuk menimbulkan gejala klinis akibat uji patogenitas
5. Histopatologi akibat uji patogenitas

4.5. Prosedur Penelitian

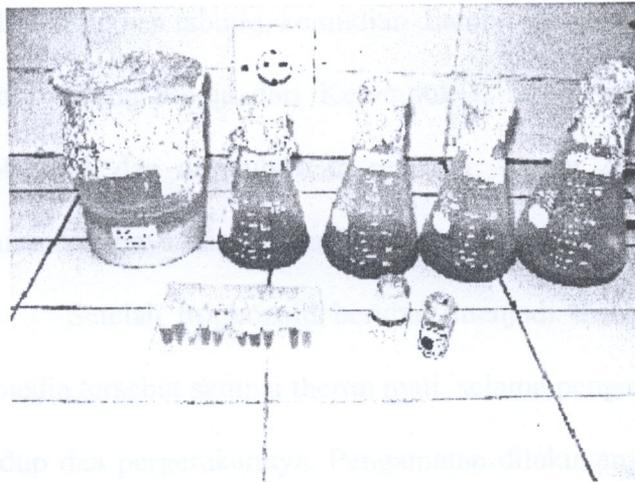
4.5.1. Persiapan pengambilan serum dan pembuatan kaldu

Pertama-tama mempersiapkan peralatan dan ikan lele ukuran dewasa (20 – 30 cm), kemudian dilakukan pengambilan darah dari ikan lele tersebut dengan menggunakan jarum spuit 2,5 ml, setelah didapatkan darah ditampung dalam tabung reaksi dan di letakan dalam posisi miring agar darah membeku sehingga keluar cairan bening yang dinamakan serum, selanjutnya serum diambil dengan pipet pasteur dan ditampung di dalam tabung evendroff. Setelah diambil darahnya maka ikan tersebut dipotong dan diambil dagingnya seberat 1 kg, terus dicuci dan diblender, kemudian daging ikan hasil blender ditambahkan akuabides dengan perbandingan 1 : 1 lalu dimasak dengan api kecil setelah matang disaring dengan kain kasa agar daging dengan kaldu terpisah. Gambar pengambilan darah dan serum yang dihasilkan disajikan pada Gambar 1 berikut ini.



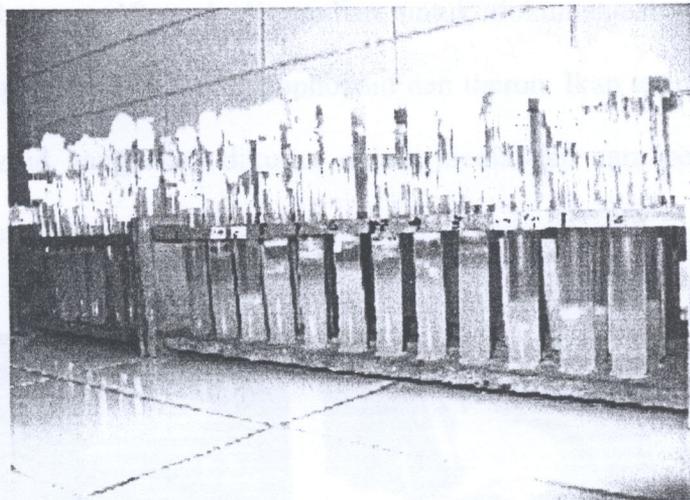
Gambar 1. Pengambilan darah dan serum

Setelah didapatkan kaldu maka dilakukan pembuatan media sesuai dengan komposisi yang telah ditetapkan. Kelompok I volume kaldu dibedakan yang digunakan untuk kultur stadia trophozoid. Sedangkan Kelompok II volume serum dibedakan, media ini digunakan untuk mempertahankan stadia theron. Setelah semua bahan dipersiapkan dimasukkan ke dalam erlemeyer, kecuali serum dan antibiotik. Ke dalam erlemeyer juga di masukan magnetik stirer yang berfungsi untuk menghomogenkan media, kemudian di letakan di atas hot plate dan dibiarkan sampai mendidih, selanjutnya ditutup dengan kapas dan disterilkan di dalam autoclaf dengan suhu 121°C , tekanan 1 ATM selama 15 menit. Setelah disterilkan media dikeluarkan dan dibiarkan sampai suhu sekitar 50°C kemudian dipindahkan ke dalam tes tube sebanyak 10 ml. Apabila media akan digunakan untuk mengkultur trophozoid atau mempertahankan theron maka ditambahkan serum dan antibiotik, serta diukur pH, pH yang diinginkan adalah 6,7 - 7. Gambar media kultur ditampilkan pada Gambar 2 a dan b di bawah ini.



a

Gambar 2 a. Persiapan Media



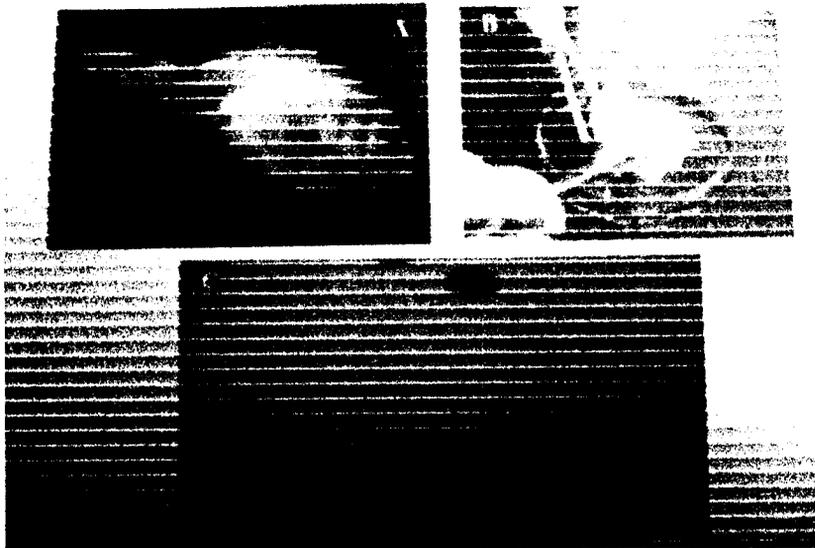
b

Gambar 2 b. Media kultur trophozoid dan mempertahankan theron

4.5.2. Kultur Ich Stadia Trophozoid dalam Media Buatan

Stadia trophozoid didapatkan dari stok ikan yang terinfeksi Ich, kemudian dikerik lendir dari seluruh permukaan tubuh serta sirip. Selanjutnya hasil kerikan ditampung dalam cawan petri yang terlebih dahulu telah diisi dengan akuades, untuk memisahkan trophozoid dari lendir dan kontaminasi dengan jenis parasit lain maka

dilakukan sentrifuse dengan kecepatan 6000 rpm selama 5 menit. Setelah disentrifuse trophozoid akan berada di permukaan tabung, kemudian diambil dengan pipet pasteur dan di masukan ke dalam tabung media dari Kelompok I, untuk masing-masing tabung diisi 10 sel trophozoid, dan diinkubasi di ruangan (Suhu 27° - 30° C). Kemudian diamati kelulusanhidupnya dan pergerakan, serta kapan terjadi perubahan stadia menjadi theron. Setelah trophozoid berubah menjadi theron kemudian dipertahankan di dalam media tersebut sampai theron mati, selama pengamatan setiap hari diamati kelulusanhidup dan pergerakannya. Pengamatan dilakukan dengan cara mengambil 1 tetes media kemudian diletakan di atas kaca objek dan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 10 x 4. Kemudian untuk dokumentasi dilakukan pemotretan guna mendapatkan bentuk dari trophozoid dan theron. Ikan terinfeksi Ich sebagai sumber trophozoid yang akan dikultur dalam media dan cara pengerikan dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Prosedur pengambilan trophozoid
 A ikan terinfeksi Ich b. Pengerikan lendir c. trophozoid

4.5.3. Mempertahankan Stadia Theron dalam Media

Stadia theron yang digunakan untuk dipertahankan dalam media, berasal dari stadia trophozoid yang diambil dari ikan kemudian di kultur dalam akuabides di cawan petri. Setelah 24 jam trophozoid telah berubah menjadi stadia theron, kemudian theron di pindahkan sebanyak 3000 sel ke dalam 10 ml media dari Kelompok II. Cara mendapatkan 3000 sel yaitu dengan mengambil 1 tetes akuades dari kultur trophozoid kemudian dihitung di bawah mikroskop (rata-rata 150 sel / tetes), selanjutnya theron dari kultur trophozoid di dalam akuades tadi diambil 1 ml dan dimasukkan ke dalam media. Setelah itu dipertahankan dan diamati kelulusanhidup dan pergerakannya setiap hari. Prosedur pengamatan kelulusanhidup yaitu dengan cara mengambil satu tetes sampel dari setiap media kultur kemudian diletakan di atas kaca objek lalu diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 10 x 4. Untuk menetapkan jumlah kelulusan tertinggi (sangat banyak) ditetapkan dengan skor 4, skor 3 untuk kategori banyak , skor 2 untuk kategori sedikit, sedangkan skor 1 sangat sedikit, dan skor 0 tidak ditemukan lagi sel theron dalam media. Penetapan angka skor di atas berdasarkan empat orang panelis, demikian juga untuk pengamatan pergerakan, skor 4 ditetapkan pergerakan sangat aktif, skor 3 pergerakannya aktif, skor 2 pergerakannya tidak aktif, sedangkan skor 1 tidak bergerak atau mati.

4.5.4. Uji Patogenitas Stadia Theron pada Benih Ikan

Uji patogenitas dilakukan untuk melihat apakah stadia theron yang sudah dipertahankan di dalam media masih mampu menginfeksi ikan, sehingga nantinya didapatkan lagi stadia trophozoid. Theron yang digunakan untuk uji patogenitas

adalah theron yang telah dipertahankan selama satu bulan dalam media. Untuk uji patogenitas ini digunakan benih ikan bawal air tawar berukuran 2 – 3 cm sebanyak 30 ekor (kepadatannya 2 ekor/ L air dalam wadah pemeliharaan). Prosedur uji patogenitas adalah sebagai berikut, pertama disiapkan tiga buah wadah plastik berukuran 10 L dan diisi air masing-masing 5 L, lalu dimasukkan benih ikan bawal air tawar sebanyak 10 ekor per wadah, kemudian diaerasi dan setelah adaptasi selama 3 hari dilakukan penginfeksian dengan cara memasukan theron yang sudah dipertahankan selama satu bulan dalam media ke dalam wadah pemeliharaan ikan (Jumlah theron diperkirakan 2500 sel). Setelah penginfeksian diamati kapan mulai muncul gejala klinis ikan tersebut seperti adanya perubahan pergerakan, nafsu makan, munculnya bintik putih di tubuh, dan terjadinya mortalitas.

4.5.5. Pembuatan Preparat Histologi

Preparat histologi yang dibuat adalah sampel dari ikan yang telah terinfeksi. Ich hasil uji patogenitas, tujuan pembuatannya adalah untuk melihat kerusakan yang disebabkan oleh serangan theron. Organ yang dijadikan untuk pembuatan preparat histologi adalah insang, kulit, dan sirip. Pembuatan preparat histologi dimulai dengan melakukan fiksasi dengan formalin 10 % selama 24 jam, kemudian sampel dipindahkan ke formalin 4 %, selanjutnya dilakukan dehidrasi dalam alkohol bertingkat mulai dari 70 % sampai 100 %, masing-masing selama 1 jam, kemudian dilakukan clearing di dalam larutan xylol guna menghilangkan alkohol dan dilanjutkan ke proses embeding dan pembuatan blok sediaan dengan parafin. Pemotongan dilakukan dengan mikrotom dengan ketebalan 5 μ m, setelah didapatkan sediaan histologi kemudian dilakukan deparafinasi, dehidrasi, pemberian warna

dengan menggunakan Hematoksin dan Eosin, rehidrasi dan terakhir dilakukan mounting. Hasil yang didapatkan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 10 x 40, kemudian difoto. Ikan hasil uji patogenitas setelah difiksasi sebagai sediaan untuk pembuatan histologi (Gambar 4).



Gambar 4. Sediaan untuk histologi (ikan hasil uji patogenitas)