

BAB III. METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Laboratorium Fisiologi, dan Imunologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. Penelitian dimulai pada bulan Mei sampai dengan pertengahan bulan November 2009.

3.2. Materi dan Disain Penelitian

Ikan Uji

Ikan uji yang digunakan adalah ikan jambal siam (*Pangasius hypophthalmus*) berukuran 8 - 10 cm, sebanyak 300 ekor, berasal dari salah satu panti pembenihan di daerah Bogor. Ikan uji dipelihara dalam akuarium berukuran 60 x 40 x 40 cm, diisi air setinggi 15 cm. Padat tebar ikan uji 20 ekor per akuarium, selanjutnya diberi aerasi. Ikan uji diberi pakan komersil tiga kali sehari secara *ad libitum*. Untuk mempertahankan kualitas air maka setiap dua hari sekali dilakukan penyiponan, dan dilakukan pengantian air sebanyak jumlah air yang berkurang.

Pembuatan Vaksin

Metode pembuatan vaksin mengikuti prosedur Sakai, 1984, caranya adalah dengan menginaktifkan sel theron secara pemanasan, di alat penganas air dengan suhu 47 °C selama 30 menit. Untuk melihat apakah theron memang sudah tidak aktif maka diambil larutan vaksin tersebut satu tetes dengan pipet Pasteur lalu diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 40x. Theron dinyatakan tidak aktif apabila pada waktu pengamatan tidak ada yang bergerak, setelah itu dihitung

kepadatan theron dalam satu tetes larutan vaksin. Untuk mengetahui kepadatan theron dalam 1 ml larutan vaksin adalah jumlah theron yang terhitung x 40, angka 40 didapatkan dari 1 ml larutan = 40 tetes pipet Pasteur (Syawal *et al.* 2008).

Pemberian Vaksin ke Ikan Uji

Pemberian vaksin ke ikan uji dengan cara perendaman. Dosis vaksin yang diberikan adalah 3 ml/l, dengan kepadatan 8000 sel theron /ml, sedangkan lama waktu perendaman adalah 15 menit. Ikan uji direndam di dalam wadah berisikan 5 liter larutan vaksin, selama perendaman tetap diberi aerasi agar ikan tidak mengalami stres. Setelah dilakukan perendaman ikan dipindahkan ke akuarium dan dipelihara selama 30 hari mengikuti prosedur (Syawal *et al.* 2008).

Pemeliharaan Ikan Uji

Ikan uji yang telah diberi vaksin dipelihara dalam akuarium berukuran 60 x 40 x 40 cm, dengan ketinggian air 15 cm, kepadatan ikan 20 ekor/ akuarium, dipelihara selama 30 hari. Penyiponan dilakukan dua hari sekali sedangkan penambahan air sebanyak air yang terbuang. Untuk mempertahankan suhu air maka di setiap akuarium dipasang heater dan diset sesuai perlakuan. Agar suhu air pemeliharaan ikan uji tidak berubah akibat pengaruh suhu udara di luar akuarium, maka semua wadah pemeliharaan (akuarium) ikan uji sesuai perlakuan di tempatkan pada ruangan ber AC (suhu 18 °C).

3.3. Rancangan Percobaan

Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap satu faktor dengan tiga taraf perlakuan, yang menjadi faktor adalah suhu media pemeliharaan. Adapun ketiga taraf perlakuan tersebut adalah; 24, 28, dan 32 °C. Untuk mengurangi kekeliruan maka setiap perlakuan dilakukan ulangan tiga kali. Adapun

model umum rancangan acak lengkap dengan satu faktor menurut Gasperst $Y_{ij} = \mu + \sigma_i + \epsilon_{ij}$

Parameter yang diamati adalah; pemeriksaan antibodi di mukus, kadar glukosa darah, nilai hematokrit, hemoglobin, total eritrosit, leukosit, jenis leukosit, dan sintasan hidup ikan uji, serta kualitas air sebagai data pendukung. Pengukuran terhadap peubah tersebut dilakukan tiga kali yaitu di awal, pertengahan dan diakhir penelitian.

3.4. Analisis Data

Data yang didapatkan dari hasil pengukuran peubah ditabulasikan ke dalam tabel dan diuji secara statistik. Apabila terdapat perbedaan yang nyata dari setiap perlakuan maka dilanjutkan dengan uji Duncan.

3.5. Prosedur Penelitian

Pembuatan anti catfish pada kelinci.

Anti catfish diperlukan untuk pemeriksaan antibodi dalam mukus. Bahan-bahan yang diperlukan; 2 ekor kelinci Newzeland berkelamin jantan masing-masing berat 2 kg, ikan catfish 6 kg, Freund's Adjuvant Complete dan Incomplete, PBS, larutan fisiologis, Agarose, Akuabides, NaAcid.

Prosedur pembuatannya adalah pertama dipersiapkan serum berasal dari ikan catfish sebagai antigen, kemudian antigen ini disuntikan ke kelinci, selang waktu dua minggu setelah suntikan pertama di ulang lagi penyuntikan. Pada penyuntikan kedua ini serum/ antigen ditambah dengan adjuvant (Freund Adjuvant Complete), setelah tiga minggu diambil darah kelinci dan dilakukan uji AGPT, kemudian disuntik lagi kelinci dengan antigen ditambah adjuvant incomplete agar didapatkan anti catfish, setelah dua minggu darah kelinci kembali

diambil dan dilakukan lagi uji AGPT. Booster ini dilakukan agar hasil uji AGPT positif. Dari dua kelinci yang diperlakukan hanya satu kelinci yang positif mengandung anti catfish setelah dilakukan uji AGPT. Hasil uji AGPT ditampilkan pada Gambar 2.

Deteksi antibodi pada mukus dengan teknik ELISA

Persiapan pengambilan mukus, mukus yang telah dikerik dari seluruh permukaan tubuh ikan dibasahkan dengan 0,1 ml ice-cold PBS (PBS: 135 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄ [pH 7,5]), kemudian dikeluarkan. Larutan PBS mukus disentrifuse 14.000 x g selama 5 menit suhu 4 °C dan supernatan diambil sebagai sampel mukus. Sampel mukus dinormalkan hingga konsentrasi 100 µg/ml, ditambahkan 1% BSA (Bovine Serum Albumin) dan disimpan pada suhu - 80 °C. Antigen absorpsi pada plate, masing-masing sumur plate ELISA (Falcon 3911 Microtest III; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) diisi dengan 50 µl purifikasi i-antigen (20 µg/ml) dalam 25 mM sodium acetat buffer (pH 7,5) dan diinkubasi semalaman (overnight) suhu 4 °C. Sumur kontrol dikoting dengan 2% (wt/vol) BSA (Bovine Serum Albumin). Protein non-spesifik binding diblok dengan cara inkubasi semalaman suhu 4 °C dengan 100 µl dari 5% (Wt/vol) BSA dalam Tris buffer saline dengan Tween 20 (TBST : 20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 0,05% [vol/vol] Tween 20 [pH 7,5]). Sampel mukus (50 µl per sumur) diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang. Selanjutnya dicuci 3 x dengan TBST, mouse anti-catfish Ig Mab (Mab MAF 13) berikatan dengan alkaline phosphatase (1:1.000 dalam larutan 2% [wt/vol] BSA dalam TBST) ditambahkan 50 µl/ sumur, inkubasi selama 1 jam pada suhu ruang. Setelah dicuci 3 x dengan TBST, ditambahkan *p*- nitrophenil phosphate (sehingga

berwarna hijau bersinar kekuningan) sebagai substrat, dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang (tempat gelap). Reaksi dihentikan dengan 4 N NaOH, dan plate dibaca pada 405 nm dengan ELISA (Wang dan Dickerson 2002).

Kadar Glukosa dalam Darah

Darah diambil dari bagian linea lateralis arah caudalis dengan jarum spuit 1ml, sebelum darah diambil terlebih dahulu spuit dibasahi dengan larutan Na sitrat 3,8 %. Selanjutnya disentrifuse pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit untuk mendapatkan plasma (Alishahi dan Buchmann 2006). dan diambil plasmanya sebanyak 50 µl. kemudian dimasukkan ke dalam evendorf. Selanjutnya plasma yang diperoleh dideproteinisasi lalu diukur kadar gula darah dengan menggunakan tes kolorimetri enzimatik dengan spektrofotometer.

Penetapan Nilai Hematokrit (PCV)

Pengukuran nilai hematokrit adalah dengan cara menghisap darah yang telah dikoleksi dalam evendorf dengan tabung kapiler mikrohematokrit heparin kemudian salah satu ujungnya ditutup dengan kristosil, setelah itu disentrifuse dengan kecepatan 6000 rpm selama 5 menit. Selanjutnya diukur perbandingan tinggi plasma dengan endapan eritrosit kali 100%.

Penetapan Kadar Hemoglobin

Darah yang sudah diambil kemudian di tambahkan reagen, untuk hemoglobin selanjutnya dibaca dengan bantuan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Konsentrasi hemoglobin = absorbance x 36,8 Hb/100 ml.

Penghitungan Total Eritrosit

Penghitungan total sel eritrosit, caranya adalah darah dari koleksi yang ada dalam evendorf dihisap dengan pipet haemositometer warna merah

ditambahkan larutan Hayem sampai skala 101, kemudian dihomogenkan dengan cara menggoyang-goyangkan membentuk angka 8 selama 3 menit, sebelum ditetaskan ke *improved neubauer haemositometer* dibuang 2 tetes, selanjutnya dihitung di bawah mikroskop dengan perbesaran 40x. Untuk penghitungan eritrosit adalah dengan menggunakan ruang kecil ditengah-tengah *improved neubauer* sebanyak 25 ruang, dari 25 ruang kecil yang dihitung adalah pada ruang keempat sudut ditambah ruang tengah (Klontz 1994 *dalam* Johnny *et al.* 2003).

Penghitungan Total Leukosit

Penghitungan sel leukosit (darah putih), caranya adalah darah diambil dari koleksi yang ada di dalam evendrof dihisap dengan pipet haemositometer warna putih sampai skala 0,5 dan ditambahkan larutan Turk sampai skala 11, kemudian dihomogenkan dengan cara menggoyang-goyang membentuk angka 8 selama 3 menit, sebelum dihitung terlebih dahulu dibuang 2 tetes baru ditetaskan ke haemositometer lalu diamati dengan mikroskop perbesaran 40x. Selanjutnya dihitung jumlah sel yang ada pada empat kotak besar di sebelah luar ruang kecil pada *improved neubauer* yang berjumlah 16 ruang pada satu lokasi, dari 4 lokasi, total ruang besar adalah sebanyak 64 ruang dan penghitungan leukosit dilakukan pada semua ruang besar (Klontz, 1994 *dalam* Johnny *et al.* 2003).

Penghitungan Jenis Leukosit

Penghitungan jenis leukosit adalah pertama dengan cara membuat preparat ulas darah pada kaca objek kemudian dikering anginkan selanjutnya difiksasi dengan metanol selama 5 menit lalu dikering anginkan setelah itu diwarnai dengan pewarna Giemsa selama 30 menit, kemudian dikeluarkan dan dibilas

dengan air mengalir, lalu dikeringkan. Selanjutnya dihitung sampai 100 sel di bawah mikroskop dengan pencahayaan kuat.

Kualitas Air

Kualitas air selama penelitian diukur dua kali yaitu di awal sebelum diberi perlakuan dan pertengahan, parameter yang diukur adalah pH, oksigen terlarut, dan amoniak.

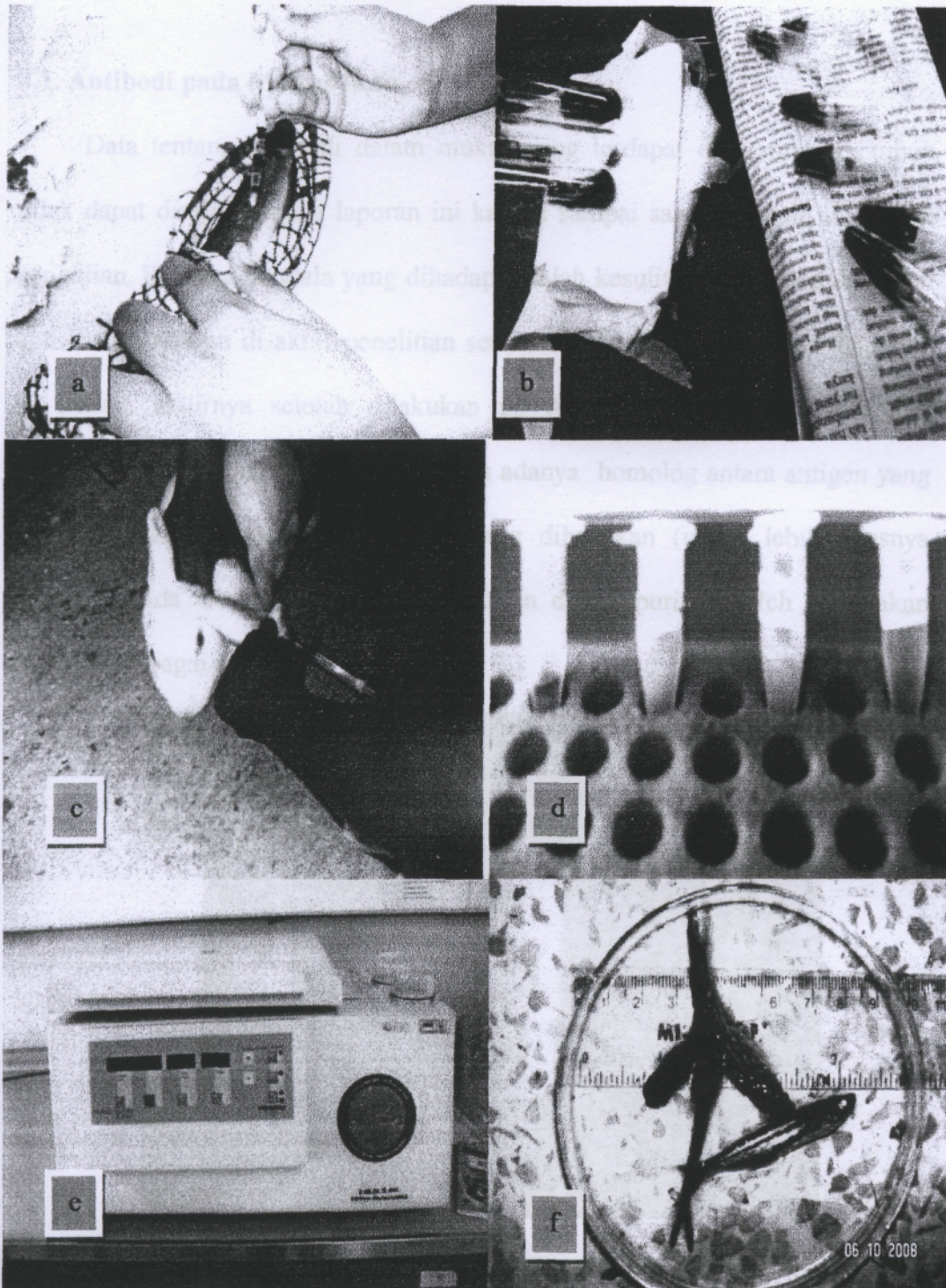
FOTO- FOTO KEGIATAN PENELITIAN



Keterangan Gambar 1. a. akuarium wadah pemeliharaan dalam ruang ber AC, (b) ikan uji dalam akuarium lengkap dengan heater, (c - f) kelinci dan bahan-bahan untuk uji AGPT untuk mendapatkan anticatfish.

Keterangan Gambar 2. (a) Pengambilan darah ikan catfish (b) Serum ikan catfish sebagai antigen yang disuntikkan kekelinci (c) Pengambilan darah kelinci (d) Serum kelinci (e) Sentrifus untuk memisahkan darah dan serum (f) ikan terinfeksi ich sebagai sumber antigen untuk dijadikan vaksin.

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN



Keterangan Gambar 2. (a) Pengambilan darah ikan catfish (b) Serum ikan catfish sebagai antigen yang disuntikan kekelinci (c) Pengambilan darah kelinci (d) Serum kelinci (e) Sentrifus untuk memisahkan darah dan serum (f) ikan terinfeksi ich sebagai sumber antigen untuk dijadikan vaksin.