

BAB III

MATERI DAN METODE PENELITIAN

Materi penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni sampai dengan bulan Agustus 2007 di Laboratorium Mikrobiologi dan Patologi Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan mas yang berukuran 8–12 cm dengan berat rata-rata 10 g dan panjang rata-rata 8,5 cm sebanyak 50 ekor yang berasal dari Balai Benih Cangkringan Yogyakarta. Rimpang kunyit yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari daerah Wates, Kulon Progo, Yogyakarta. Bakteri yang digunakan adalah biakan *Aeromonas salmonicida* isolat Yogyakarta. Pakan ikan yang diberikan produksi Charoen Pokpand FF 999.

Kultur bakteri yang digunakan berbagai jenis media agar seperti TSA (*Tryptic Soy Agar*), TSB (*Tryptic Soy Broth*), GSP (*Pseudomonas Aeromonas Selective Agar*), PBS (*Phosphate Buffer Saline*), akuades,

Alat-alat yang digunakan adalah 5 buah akuarium dengan ukuran 50 x 30 x 30 cm, lengkap dengan peralatan lainnya seperti aerator serta tangguk, timbangan analitik dengan ketelitian 0,1 mg, pipet tetes dan pipet ukur (1 dan 10 ml), spuit, jarum ose, *dissecting kit* (alat bedah), *colony counter*, portal, cawan petri, gelas ukur volume 100 ml, 500 ml dan 1.000 ml, tabung reaksi, lampu bunsen, tabung Erlenmeyer, mikroskop binokuler, *vortex*, inkubator, oven, *autoclave*, kertas, aluminium foil, kertas saring Whatman, kertas padi, *disk blank*, *laminar flow*, casset (3 x 4 cm), *stirrer*, kulkas dan kamera digital.

Peralatan untuk pengukuran kualitas air di akuarium adalah thermometer dengan ketelitian 0,1°C untuk mengukur suhu, *water quality checker* (WQC-20) untuk mengukur oksigen terlarut (O₂) dan Nitrit (NO₂), pH *electric* dengan ketelitian 0,1.

Metode penelitian

Penelitian ini terdiri dari dua tahap yaitu: 1) uji pendahuluan dan 2) uji utama. Pada uji pendahuluan meliputi uji sensitivitas kunyit terhadap ikan mas, uji *Lethal Concentration* (LC₅₀).

Uji Pendahuluan

1. Pembuatan perasan kunyit

Rimpang kunyit yang digunakan dalam penelitian di beli di pasar Bringharjo Yogyakarta, selanjutnya kunyit dibawa ke laboratorium. Rimpang kunyit terlebih dahulu dibersihkan dengan kertas tissue dan ditimbang sebanyak 100 g. Kemudian kunyit dipotong-potong kecil dan dihaluskan dengan menggunakan blender dan diperas dengan kain berukuran 0,5 mikron. Hasil perasan ini kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditutup rapat dan siap digunakan untuk penelitian.

2. Uji sensitivitas kunyit terhadap *Aeromonas salmonicida*

Pengujian sensitivitas kunyit terhadap *Aeromonas salmonicida* dilakukan dengan metode *disk diffusion* Kirby-Bauer dengan menggunakan 4 konsentrasi kunyit yaitu: 100%, 50%, 10% dan 0,1% yang diletakkan pada media *Muller Hilton Agar* (MHA) yang telah ditanami *Aeromonas salmonicida*. Untuk mengetahui konsentrasi yang mempunyai aktivitas terhadap *Aeromonas salmonicida* ditunjukkan dengan adanya zona hambatan yang luas.

3. Uji LC_{50} *Aeromonas salmonicida* terhadap ikan mas (*Cyprinus carpio*)

Uji LC_{50} *Aeromonas salmonicida* terhadap ikan mas dilakukan untuk mengetahui dosis infeksi yang dapat mematikan 50% dari jumlah ikan uji. Konsentrasi bakteri yang digunakan dalam membuat suspensi ditentukan dengan metode *Mc Farland*. Uji LC_{50} dilaksanakan dengan cara perendaman dimana menggunakan 4 buah akuarium dengan volume air 10 liter dan kepadatan ikan 10 ekor pada setiap perlakuan. Konsentrasi *A. salmonicida* dimulai dari 0 (kontrol), 10^5 , 10^9 , 10^{11} , 10^{13} , 10^{15} , dan 10^{17} sel/ml. Pengamatan terhadap adanya perubahan atau gejala ikan sakit pada ikan dilakukan setiap 6 jam post infeksi selama 48 jam. Penentuan dosis infeksi *A. salmonicida* mengacu kepada Priyatna (2004).

4. Uji LC_{50} kunyit terhadap ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang diberikan secara rendaman

Penentuan konsentrasi kunyit yang aman untuk diperlakukan pada ikan mas dapat dilakukan dengan metoda LC_{50} (Ellis, 1988). LC_{50} ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi kunyit yang dapat menyebabkan kematian ikan sebanyak 50%. Uji LC_{50} dilakukan dengan menggunakan ikan sebanyak 80 ekor dengan kepadatan 10 ekor pada setiap akuarium dan diamati selama 24 jam. Konsentrasi kunyit yang digunakan adalah 0 ppm, 5.000 ppm, 10.000 ppm, 15.000 ppm, 20.000 ppm, 25.000 ppm, 30.000 ppm, 35.000 ppm. Pengamatan dilakukan selama 24 jam dan apabila sampai pada konsentrasi yang paling tinggi tidak ada ikan yang mati, berarti antibakteri tersebut tidak berbahaya bagi ikan dan aman untuk digunakan dalam penelitian. Perhitungan LC_{50} kunyit terhadap ikan mas dilakukan dengan metoda *Reed Muench* (Hubert, 1980).

5. Uji Utama

Uji efektivitas dilakukan untuk mengetahui kemampuan kunyit dalam menghambat pertumbuhan bakteri *A. salmonicida* pada ikan mas. Dalam uji utama, ikan yang digunakan sebanyak 50 ekor dengan kepadatan 10 ekor. Adapun cara kerja dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: setelah ikan mas ditulari *A. salmonicida* dan ditunggu sampai ikan menunjukkan gejala klinis terinfeksi *A. salmonicida*. Setelah ikan menunjukkan gejala terinfeksi *A. salmonicida*, ikan direndam dalam air yang telah diberi kunyit. Konsentrasi pengobatan dengan kunyit adalah 500 ppm, 750 ppm, 1000 ppm dan kelompok diinfeksi dengan *A. salmonicida* tanpa diobati dengan kunyit (kontrol +) dan kelompok tanpa diinfeksi *A. salmonicida* dan tanpa diobati dengan kunyit (kontrol -). Pengobatan dilakukan selama 4 jam perhari selama 5 hari (Herwig, 1979). Perubahan gejala klinis, Daya Kelangsungan Hidup (DKH) ikan, perubahan makroskopis dan mikroskopis diamati dan dianalisa.

Selama penelitian dilakukan pengamatan parameter kualitas air meliputi suhu, oksigen terlarut (DO), pH, dan nitrit (NO₂).

6. Analisis Data

Nilai daya kelangsungan hidup ikan mas (*Cyprinus carpio*) dihitung dengan rumus berdasarkan Effendy (1979) sebagai berikut:

$$DKH = \frac{NT}{NO} \times 100\%$$

Dimana: DKH = Daya Kelangsungan Hidup

NT = Jumlah individu akhir (ekor)

NO = Jumlah individu awal (ekor)

Hasil pemeriksaan gejala klinis ikan mas yang diinfeksi bakteri *A. salmonicida* dan diobati dengan kunyit konsentrasi yang berbeda dianalisa secara deskriptif.

Efektivitas pengobatan dihitung dengan menggunakan rumus *Relative Percent Survival* (RPS) (Ellis, 1988) dengan rumus sebagai berikut:

$$Ep = 1 - \frac{Mtp}{Mtk} \times 100\%$$

Keterangan: Ep = Efektivitas Pengobatan

Mtk = Persen mortalitas kontrol

Mtp = Persen mortalitas perlakuan