

III. METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu

Penelitian sampel darah dilakukan di Laboratorium Hematology Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Sidoarjo. Ekstraksi bunga kamboja dan perlakuan hewan coba dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Wijaya Kusuma Surabaya. Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari-Maret 2023.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: mikroskop, mortar, stamper, timbangan, pipet tetes, blender, evaporator, akuarium, filter akuarium, jam, *object glass*, dan rak pewarnaan.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: Ikan mas oranda sebanyak 60 ekor, bunga kamboja, alkohol 70%, isolat murni *A. salmonicida*, *tissue*, spidol, masker, kapas steril, buku tulis, minyak cengkeh, pakan ikan *hikary fancy*, pewarna Giemsa 10%, methanol, aquades, spuit 1cc, dan tabung EDTA.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), pengelompokan perlakuan dengan metode *Random Sampling* dan pengambilan sampel di akhir periode penelitian. Terdapat enam kelompok perlakuan empat pengulangan menggunakan rumus perhitungan Frederer:

$$t(n-1) \geq 15$$

Keterangan:

$$6(n-1) \geq 15$$

n = besar pengulangan

$$6n-6 \geq 15$$

t = jumlah kelompok

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 21:6$$

$$n \geq 3,5 (4)$$

Ikan mas oranda yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 24 ekor dan 36 ekor ikan cadangan untuk menghindari resiko kematian hewan coba.

3.3.2 Variabel Penelitian

Variabel pada penelitian ini terdiri dari tiga variabel, yaitu variabel bebas, variabel terikat, variabel kontrol:

1. Variabel Bebas: konsentrasi ekstrak bunga kamboja, konsentrasi ciprofloxacin.

2. Variabel Terikat: jumlah heterofil, monosit, dan limfosit ikan mas oranda.
3. Variabel Kontrol: jenis ikan, isolat bakteri *Aeromonas salmonicida*, umur ikan, kualitas air, lama imersi.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Persiapan Hewan

Penelitian menggunakan ikan mas oranda sebanyak 60 ekor yang terbagi menjadi 6 kelompok perlakuan. Sebelum dilakukan penelitian, ikan diadaptasi selama 7 hari dalam 6 akuarium yang masing-masing berisi 10 ekor ikan yang siap digunakan penelitian. Semua akuarium diberikan perlakuan yang sama mulai dari media filter (kapas dan *bioball*), suhu air 28°C, pH air 7,0 dan kadar garam 0,1%.

3.4.2 Pembuatan Ekstrak Bunga Kamboja

Proses pembuatan bahan standar atau maserasi sebagai ekstrak bunga kamboja yaitu bahan yang telah dicuci kemudian dipotong dan dikeringkan. Pengeringan bunga dilakukan menggunakan oven dengan suhu 80°C selama satu jam. Bunga kering dihaluskan menggunakan blender dan direndam dalam alkohol 70% (1:4 bunga kering : alkohol 70% artinya 1 bagian bahan serbuk kering bunga kamboja dicampur dengan 4 bagian pelarut). Lalu, diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 69°C dan ekstrak disimpan pada suhu 4°C (Prakoso dan Kurniasih, 2018).

3.2.1.1 Pengenceran Konsentrasi Ekstrak Bunga Kamboja

Pengenceran larutan ekstrak bunga kamboja sebesar 1000 ppm dilakukan dengan melarutkan 1000 mg ekstrak ke dalam 1000 ml air. Pembuatan larutan ekstrak bunga kamboja sebesar 2000 ppm dilakukan dengan melarutkan 2000 mg ekstrak ke dalam 1000 ml air. Pembuatan larutan ekstrak bunga kamboja sebesar 4000 ppm dilakukan dengan melarutkan 4000 mg ekstrak ke dalam 1000 ml air.

3.4.3 Pengenceran Isolat *A. salmonicida* dan Induksi Furunkulosis

Kultur murni *Aeromonas salmonicida* dibuat suspensi dalam media cair. Suspensi diinkubasi selama 24 jam dan setelah itu disetarakan dengan larutan Mc Farland 0,5. Suspensi yang telah setara dengan Mc Farland 0,5 digunakan untuk menginfeksi ikan mas oranda. Ikan dianastesi dalam air dingin selama 5 menit. Ikan diambil dengan posisi rebah dorsal. Posisi abdomen lebih tinggi dari anterior tubuh. Suspensi diinjeksi sebanyak 0,1 ml pada midline ventral tubuh pada posisi anterior kloaka.

3.4.4 Perlakuan pada Hewan Coba

Kelompok Kontrol Negatif (P0): Terdiri dari sepuluh ekor ikan mas oranda sehat.

Kelompok Kontrol Positif (P1): Terdiri dari sepuluh ekor ikan mas oranda yang diinfeksi *A. salmonicida* tanpa terapi.

Kelompok Perlakuan (P2): Terdiri dari sepuluh ekor ikan mas oranda yang diinfeksi *A. salmonicida* dan diterapi imersi ciprofloxacin 55 ppm.

Kelompok Perlakuan (P3): Terdiri dari sepuluh ekor ikan mas oranda yang diinfeksi *A. salmonicida* dan diterapi imersi ekstrak bunga kamboja 1000 ppm.

Kelompok Perlakuan (P4): Terdiri dari sepuluh ekor ikan mas oranda yang diinfeksi *A. salmonicida* dan diterapi imersi ekstrak bunga kamboja 2000 ppm.

Kelompok Perlakuan (P5): Terdiri dari sepuluh ekor ikan mas oranda yang diinfeksi *A. salmonicida* dan diterapi imersi ekstrak bunga kamboja 4000 ppm.

3.4.5 Koleksi Sampel Darah

Pengambilan darah ikan dilakukan pada hari ke- 6 pasca perlakuan. Sebelum darah ikan diambil, ikan dianestesi dengan cara memasukkan pada air dingin (suhu 4-5°C), suhu air yang rendah dapat menurunkan aktifitas dan tingkat konsumsi oksigen ikan sehingga menimbulkan efek pemingsanan (Hermawan *et al.*, 2014), dibiarkan 5 menit sampai ikan teranestesi, bagian kepala ditutup serbet basah sambil ikan diposisikan rebah lateral. Pengambilan darah ikan dilakukan secara intravena pada vena lateralis dan disimpan dalam tabung EDTA. Setelah sampel darah semua ikan diambil, kemudian dilakukan euthanasia pada ikan dengan cara merendam ikan dalam larutan minyak cengkeh dosis 400mg/liter air. Pemberian minyak cengkeh dengan dosis berlebih mengakibatkan kematian pada ikan (Rahman *et al.*, 2013). Sampel dibawa menuju laboratorium dalam *cooling box* suhu 4° C dengan waktu kurang dari 12 jam.

3.4.5.1 Pembuatan Preparat Apus Darah Tepi (*blood smear*)

Homogenkan darah pada tabung EDTA agar plasma darah bercampur dengan sel-sel darah. Selanjutnya ambil darah menggunakan pipet tetes dan teteskan menuju *object glass*.

Selanjutnya miringkan *object glass* pada sudut 25° - 30° pada tetesan darah, kemudian didorong lurus sampai ujung (Zilvanhisna, 2017). Kriteria preparat apus darah yang baik adalah lebar dan panjangnya tidak memenuhi seluruh *object glass*, secara gradual penebalannya berangsur-angsur menipis dari kepala ke ekor, tidak berlubang, tidak terputus-putus, tidak terlalu tebal dan mempunyai pengecatan yang baik.

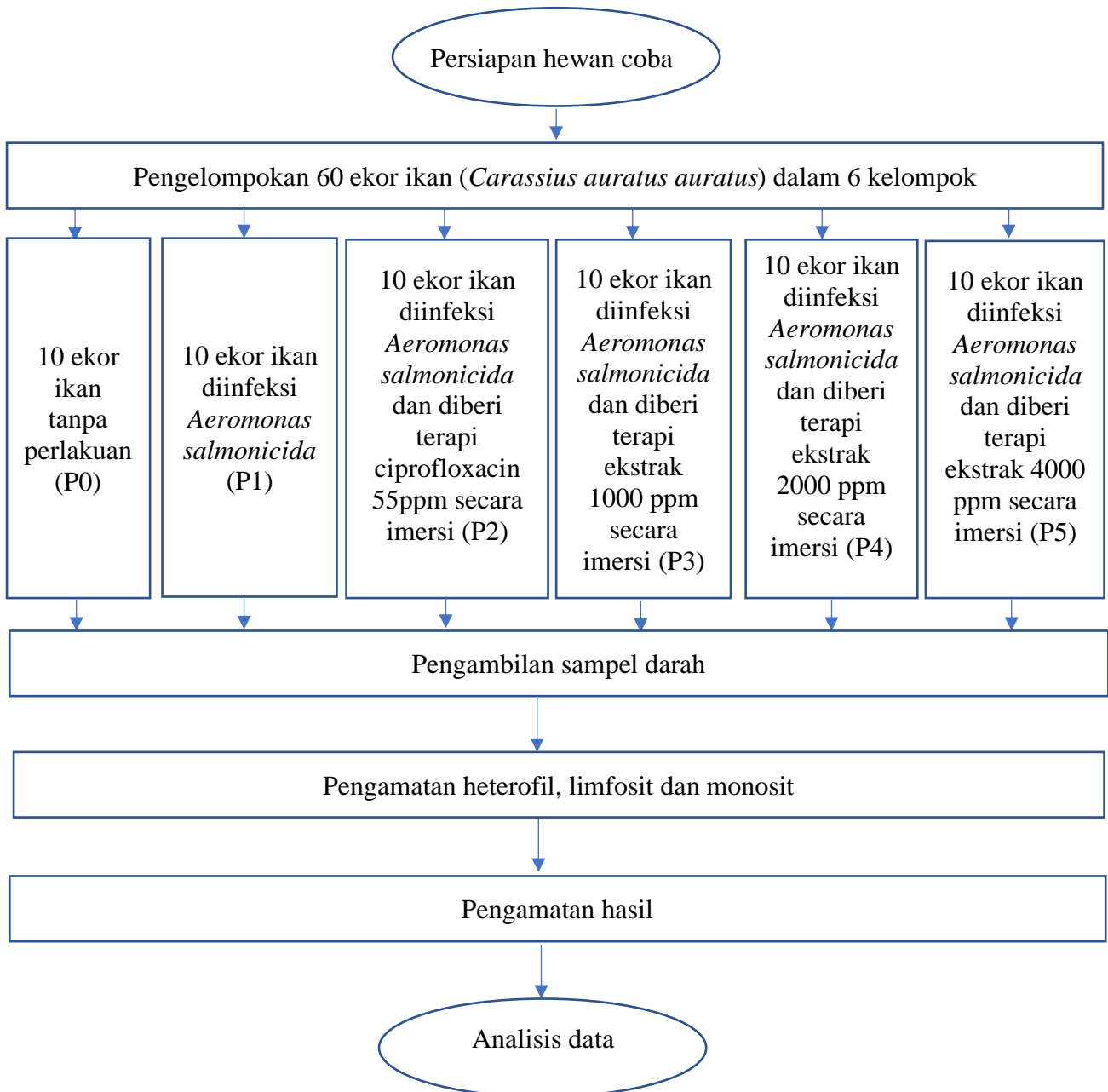
3.4.5.2 Pewarnaan Preparat

Pewarnaan apusan darah menggunakan pewarnaan giemsa 10%. Proses pewarnaan giemsa yaitu metanol diteteskan ke dalam sediaan, dibiarkan selama 5 menit, dan sisa metanol dibuang. Teteskan pewarna giemsa 10% sampai semua sampel terendam dan biarkan selama 15 menit. Preparat dibilas air dan kemudian dikeringkan dengan udara (Ardina dan Rosalinda, 2018).

3.4.6 Pemeriksaan Jumlah Heterofil, Monosit dan Limfosit

Pemeriksaan jumlah darah dilakukan menggunakan cara manual apusan darah tepi diamati dibawah mikroskop dengan metode analisis persentase diferensial leukosit (DLC). Pemeriksaan dilakukan pada apusan darah dengan menghitung semua sel yang terlihat hingga 100 sel. Hasil hitung berupa satuan persen (nilai relatif) yang selanjutnya data hasil akan dianalisis secara statistik.

3.5 Kerangka Operasional Penelitian



3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dari pengamatan dianalisis secara statistik menggunakan SPSS versi 26 dengan uji *One Way ANOVA* dikarenakan skala variabel penelitian adalah skala numerik, data tidak berpasangan dan lebih dari dua kelompok. Adapun syarat dari uji *One Way ANOVA* adalah skala numerik, homogen, dan sebaran data normal. Jika uji *One Way ANOVA* menunjukkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$) maka dilanjutkan dengan *LSD Post Hoc Test*. Untuk data yang tidak homogen, dilakukan tes non parametrik Kruskal Wallis dan Mann Whitney.