

## BAB IV

## MATERI DAN METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik Veteriner, Laboratorium Entomologi dan Protozoologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Penelitian ini dilakukan mulai tanggal 26 Desember 1986 sampai dengan 4 Pebruari 1987.

## MATERI

## 1. Hewan Percobaan dan Makanan

Sebagai hewan percobaan digunakan ayam jantan tipe petelur Harco berumur satu hari yang dibeli dari P.T. CP di Surabaya. Ayam-ayam tersebut ditempatkan dalam kandang yang berukuran 100 x 50 x 30 cm, setelah 14 hari ayam-ayam tersebut ditempatkan secara acak dalam kandang-kandang baterai. Kandang baterai berukuran 25 x 20 x 30 cm (modifikasi dari kandang percobaan Ashadi, 1980) digunakan untuk satu ayam percobaan.

Makanan ayam yang diberikan selama percobaan ini adalah ransum yang dicampur sendiri dan tidak mengandung koksidostat. Ransum tersebut sesuai dengan susunan ransum untuk starter petelur yang ditulis oleh Wahyu (1985), yang susunannya sebagai berikut :

Bahan	Banyaknya (kg)	Protein (%)	Energi Metabolis (Kkal/kg)
Jagung kuning	56	4,81	1.887,20
Dedak halus	8	0,96	130,40
Bungkil kacang kedele	12	5,40	268,80

Bungkil kelapa	10	2,10	241,40
Tepung ikan	12	7,32	369,60
Tepung kerang	1,85	-	-
Vitamin mix (premix A Pfizer)	0,15	-	-
T o t a l :	100,00	20,59	2.897,40

Selama percobaan, makanan dan air minum diberikan secara tidak terbatas (ad libitum).

## 2. Kandang Percobaan

Kandang percobaan dalam penelitian ini ada dua macam. Yang pertama yaitu kandang untuk memelihara anak ayam mulai umur 1 sampai 14 hari, terbuat dari anyaman kawat, berukuran 100 x 50 x 30 cm. Tinggi alas kandang dari lantai 10 cm, tinja ayam bisa jatuh secara langsung di bawah kandang yang diberi penampung seng yang bisa dibersihkan. Tempat makanan digunakan dari bahan seng berbentuk tabung dengan diameter 6 cm dan panjang 40 cm. Tempat air minum digunakan dari bahan plastik berbentuk tabung dengan diameter 10 cm, tinggi 20 cm, air bisa turun ke alas tabung. Alat-alat ini diletakkan di dalam kandang. Sebagai penghangat, di atas masing-masing kandang ditempatkan bola lampu 100 watt yang selalu menyala dan dapat diatur menjauhi atau mendekati kandang.

Kandang yang kedua dibuat dengan sistem baterai yang masing-masing berukuran 25 x 20 x 30 cm dengan ketinggian 25 cm dari lantai. Kandang ini digunakan pada saat ayam berumur 15 hari sampai akhir percobaan. Masing-masing

ayam menempati satu ruangan. Kandang ini dibuat dengan rangka besi beton, atap dari papan triplek yang juga berfungsi sebagai pintu. Alas, dinding samping, belakang dan depan dibuat dari anyaman kawat. Tiap kandang dilengkapi dengan satu pintu, satu tempat makanan dan satu tempat air minum yang ditempatkan di dalam kandang dan diperkuat dengan kawat yang dikaitkan pada dinding. Bagian bawah alas dibuatkan tempat penampungan tinja hewan percobaan, dibuat dari seng yang bisa diangkat dan dipasang lagi. Sebagai penghangat, ditempatkan bola lampu 40 watt di samping atas diantara dua deret kandang dan dapat diatur menjauhi atau mendekati kandang.

Semua kandang dan peralatannya sebelum digunakan didezenfeksi dengan larutan Biocid.

### 3. Ookista

Ookista yang dipakai sebagai bahan infeksi ialah Eimeria tenella galur lokal yang diisolasi pada bulan Desember 1986. Isi sekum ayam yang mengandung isolat E. tenella diletakkan dalam lumpang porselen, diberi larutan kalium bikromat 2,5 % sebanyak lima kali bahan, kemudian digerus dan dihaluskan perlahan-lahan agar tidak sampai merusak ookista. Bagian-bagian yang kasar dibuang kemudian dituangkan ke dalam cawan petri hingga kedalaman kurang lebih 2 mm. Cawan petri ditutup tidak rapat untuk mengurangi penguapan dan agar udara leluasa berhubungan dengan cairan tersebut. Cawan petri tersebut diletakkan di atas meja

pada suhu kamar yang tiap kali diamati. Pada saat tertentu bahan itu diaduk dengan batang pengaduk dari gelas kemudian satu atau dua tetes diletakkan di atas gelas obyektif, ditutup dengan gelas penutup dan diperiksa di bawah mikroskop. Bila hampir semua ookista telah bersporulasi, bahan tersebut disaring dengan "U.S. Standard Sieve Series No. 100" yang memiliki lubang saringan 149 mikron, untuk menahan bahan-bahan yang kasar. Kemudian bahan dimasukkan ke dalam botol dan disimpan dalam lemari es dengan suhu 6<sup>o</sup>-8<sup>o</sup>C.

#### 4. Penentuan Jenis Eimeria

Jenis Eimeria ditentukan berdasarkan panjang dan lebar ookista, waktu sporulasi yang telah dikerjakan pada saat pengumpulan ookista. Habitat utama parasit dan kerusakan yang ditimbulkannya, gejala klinis dan masa prepaten yang ditentukan dalam percobaan ini. Untuk keperluan ini empat ekor ayam jantan tipe petelur Harco berumur 4 minggu yang belum pernah menderita koksidiosis diinfeksi secara per oral langsung ke dalam tembolok dengan 10.000 ookista E. tenella yang telah bersporulasi. Gejala klinis yang timbul diamati. Tiap hari dilakukan pemeriksaan tinja untuk menentukan waktu antara infeksi hingga permulaan ditemukan ookista (masa prepaten). Pada hari ketujuh pasca infeksi ayam-ayam tersebut dibunuh, dilakukan pemeriksaan organ yang ditimbulkannya.

Hasil pemeriksaan 100 ookista hasil isolasi yang diukur panjang dan lebarnya, disamping diperhatikan bentuk serta morfologinya menunjukkan bahwa ukuran panjang yang diperoleh berkisar antara 18,4 hingga 25,6 mikron dengan rata-rata  $22,5 \pm 2,8$  mikron. Lebarnya berkisar antara 15,6 hingga 23,5 mikron dengan rata-rata  $18,7 \pm 1,7$  mikron. Bentuk ookista sesuai dengan gambar 7 dan 8 adalah bulat telur (ovoid). Pada suhu kamar yang berkisar antara  $28^{\circ}$  dan  $31^{\circ}\text{C}$ , beberapa ookista telah mulai bersporulasi pada 22 jam setelah sediaan ini dibuat.

Gejala klinis yang timbul mulai tampak pada hari kelima pasca infeksi dengan ditemuinya darah dalam tinja penderita, ayam tampak lesu, mengantuk, sayapnya terkulai, bulunya kusut, dan dikotori oleh darah terutama disekitar dubur, nafsu makan turun sampai hilang sama sekali. Habitat utama parasit dan kerusakan yang ditimbulkannya terutama terjadi pada sekum.

##### 5. Penghitungan Ookista Sebagai Bahan Infeksi

Ookista yang telah bersporulasi dalam larutan kalium bikromat 2,5 %, dicuci dengan air suling dengan bantuan sentrifugasi 1.500 rpm selama 15 menit untuk setiap kali pencucian. Pencucian dilakukan sampai supernatan yang berwarna kuning menjadi jernih. Endapan yang didapat diencerkan dengan air suling. Jumlah ookista tiap mililiter dihitung dengan hemositometer Thoma.

Penghitungan ookista dilakukan dalam 4 empat persegi 1, 2, 3, dan 4 (gambar 10). Volume keempat empat persegi itu ialah  $4 \times 0,1 \text{ cmm} = 0,4 \text{ cmm}$ . Jadi jumlah ookista tiap mililiter adalah  $1/0,4 \times 1.000 \times N = 2.500 N$ .  $N$  adalah jumlah ookista yang terdapat dalam keempat empat persegi.

Hasil penghitungan sebanyak empat kali didapatkan rata-rata  $N = 40,5$ . Jadi jumlah ookista tiap mililiter adalah  $2.500 \times 40,5 = 101.250$ .

#### 6. Penyediaan Larutan Sulfaquinoxaline, Amprolium maupun Kombinasi Sulfaquinoxaline-Amprolium

Dalam penelitian ini digunakan larutan Noxal yang dikeluarkan oleh pabrik obat Pfizer Indonesia, tiap 100 ml berisi sulfaquinoxaline 344 mg. Dosis yang dianjurkan untuk pengobatan koksidirosis sekum adalah 45 ml dilarutkan dalam 3,8 l air atau sebesar 0,00407 %.

Amprolium-20 soluble powder yang dikeluarkan pabrik obat Wonder Indonesia, tiap 1 g mengandung amprolium 200 mg. Dosis yang dianjurkan untuk pengobatan koksidirosis sekum 3 g dilarutkan dalam 2,5 l air atau sebesar 0,024 %.

Kombinasi sulfaquinoxaline 0,00407 % dengan amprolium 0,024 %.

Pengobatan diberikan mulai hari kedua pasca infeksi, selama lima hari berturut-turut. Dosis yang digunakan dalam penelitian ini sesuai dengan dosis yang dianjurkan pabrik.

## METODE PENELITIAN

Empat ekor ayam jantan tipe petelur Harco umur empat minggu, digunakan untuk menentukan jenis, mengetahui keganasan, dan memperbanyak E. tenella yang telah diisolasi pada bulan Desember 1986. Seratus ekor ayam jantan tipe petelur Harco umur satu hari ditempatkan dalam dua buah kandang yang masing-masing berukuran 100 x 50 x 30 cm sampai berumur 14 hari. Pada hari ke 15 ayam-ayam tersebut secara acak dibagi dalam empat kelompok yang masing-masing terdiri dari 25 ekor. Tiap kelompok dibagi lagi dalam lima subkelompok yang masing-masing berisi lima ekor, dipelihara dalam kandang baterai.

Penelitian ini dimulai pada saat ayam berumur empat minggu, masing-masing ayam diinfeksi dengan 100.000 oookista E. tenella kecuali subkelompok kontrol ayam sehat. Empat kelompok ayam tersebut adalah sebagai berikut :

- I. Kelompok ayam yang diperiksa pada hari keempat pasca infeksi (p.i.).
- II. Kelompok ayam yang diperiksa pada hari keenam p.i.
- III. Kelompok ayam yang diperiksa pada hari kedelapan p.i.
- IV. Kelompok ayam yang diperiksa pada hari kesepuluh p.i.

Sedangkan lima subkelompok pada masing-masing kelompok tersebut adalah sebagai berikut :

- A. Subkelompok kontrol ayam sehat.
- B. Subkelompok kontrol ayam yang diinfeksi dan tidak diobati.

- C. Subkelompok ayam yang diinfeksi dan diobati dengan kombinasi sulfaquinoxaline-amprolium.
- D. Subkelompok ayam yang diinfeksi dan diobati dengan sulfaquinoxaline.
- E. Subkelompok ayam yang diinfeksi dan diobati dengan amprolium.

Pengambilan darah tepi melalui vena sayap (v. cutaneus ulnaris) dengan semprit 2,5 ml sebanyak 1 ml dan ditampung dalam botol-botol kecil yang mengandung antikoagulan EDTA sebanyak 1 mg dan ditempatkan dalam termos yang berisi es batu. Pengambilan darah dilakukan sesuai dengan jadwal pengambilan di atas. Sediaan darah diperiksa terhadap hematokrit dengan menggunakan kapiler mikrohematokrit, kadar hemoglobin, dan jumlah eritrosit.

#### 1. Pengukuran Hematokrit (Siswadi dkk., 1977)

Sediaan darah dalam botol dikocok pelan-pelan kemudian kapiler mikrohematokrit dimasukkan ke dalam botol sehingga terisi darah. Kapiler mikrohematokrit tersebut ditutup dengan malam kemudian disentrifugasi 16.000 rpm selama 5 menit kemudian dibaca dengan mencocokkan pada microhematocrit reader dan dinyatakan dalam %.

#### 2. Pemeriksaan Kadar Hemoglobin (Siswadi dkk., 1977)

Menggunakan hemoglobinometer Sahli-Adam. Tabung hemometer diisi dengan larutan HCl 0,1 N sampai tanda 2 g %. Sediaan darah dikocok pelan-pelan, dihisap dengan pipet



Sahli sampai tepat pada tanda "20 Cmm", bagian luar pipet tersebut dibersihkan dengan kapas kering. Pipet dalam pipet Sahli tersebut segera ditiup ke dalam larutan HCl dalam tabung hemometer dengan hati-hati sehingga tanpa menimbulkan gelembung udara. Sebelum dikeluarkan pipet Sahli dibilas dulu dengan menghisap dan meniup HCl yang ada di dalam tabung hemometer beberapa kali, bagian luar pipet dibilas dengan beberapa tetes HCl 0,1 N. Ditunggu 10 menit untuk pembentukan asam hematin (95%) kemudian asam hematin ini diencerkan dengan air suling tetes demi tetes sambil diaduk sampai mendapatkan warna yang sama dengan warna standar. Miniskus dari larutan dibaca dengan dinyatakan dalam g %.

### 3. Penghitungan Jumlah Eritrosit (Siswadi dkk., 1977)

Kamar penghitung Thoma dan larutan Hayem digunakan untuk menghitung jumlah eritrosit. Sediaan darah dalam boto dikocok pelan-pelan, dihisap ke dalam pipet eritrosit sampai tanda "0,5". Bagian luar pipet tersebut dibersihkan dengan kapas kering untuk menghilangkan darah yang melekat di situ. Segera larutan Hayem dihisap sampai tepat mencapai tanda "101". Kedua ujung pipet ditutup dengan ibu jari dan jari tengah, kemudian dikocok dengan gerakan tegak lurus pada sumbu memanjangnya selama dua menit. Larutan Hayem yang terdapat di dalam bagian kapiler dan yang tidak mengandung darah dibuang dengan mengeluarkan isi pipet tiga tetes.

Tabel 1. Skema Perlakuan Ayam

!Kelompok! !( plot )!	!Perla- kuan !(Split)!	! Ulangan					! jumlah
		! I	! II	! III	! IV	! V	
! I	! A	!	!	!	!	!	!
	! B	!	!	!	!	!	!
	! C	!	!	!	!	!	!
	! D	!	!	!	!	!	!
	! E	!	!	!	!	!	!
	!Jumlah	!	!	!	!	!	!
! II	! A	!	!	!	!	!	!
	! B	!	!	!	!	!	!
	! C	!	!	!	!	!	!
	! D	!	!	!	!	!	!
	! E	!	!	!	!	!	!
	!Jumlah	!	!	!	!	!	!
! III	! A	!	!	!	!	!	!
	! B	!	!	!	!	!	!
	! C	!	!	!	!	!	!
	! D	!	!	!	!	!	!
	! E	!	!	!	!	!	!
	!Jumlah	!	!	!	!	!	!
! IV	! A	!	!	!	!	!	!
	! B	!	!	!	!	!	!
	! C	!	!	!	!	!	!
	! D	!	!	!	!	!	!
	! E	!	!	!	!	!	!
	!Jumlah	!	!	!	!	!	!
!	!	!	!	!	!	!	

Keterangan :

I. Kelompok ayam yang diperiksa pada hari keempat pasca infeksi (p.i.).

Larutan darah dimasukkan ke dalam kamar penghitung Thoma dengan menempatkan ujung pipet pada tepi gelas penutup, karena daya kapiler maka larutan darah akan mengalir masuk diantara gelas penutup dengan kamar penghitung dan mengisi daerah penghitung. Kamar penghitung yang sudah terisi ini diletakkan di bawah mikroskop dan penghitungan dilakukan dengan menggunakan lensa obyektif 45 X.

Cara penghitungan : Dihitung jumlah eritrosit yang terdapat 5 empat persegi (A, B, C, D, dan E), masing-masing empat persegi mempunyai volume  $1/250$  cmm, sehingga volume kelima empat persegi adalah  $5/250$  cmm. Misalkan jumlah eritrosit yang terdapat dalam 5 empat persegi adalah N. Pengenceran larutan darah adalah 200 kali, maka jumlah eritrosit per cmm adalah  $\frac{1}{5/250} \times 200 \times N = 10.000 N$ .

- II. Kelompok ayam yang diperiksa pada hari keenam p.i.
- III. Kelompok ayam yang diperiksa pada hari kedelapan p.i.
- IV. Kelompok ayam yang diperiksa pada hari kesepuluh p.i.
  
- A. Subkelompok kontrol ayam sehat.
- B. Subkelompok kontrol ayam yang diinfeksi dan tidak diobat.
- C. Subkelompok ayam yang diinfeksi dan diobati dengan kombinasi sulfaquinoxaline-amprolium.
- D. Subkelompok ayam yang diinfeksi dan diobati dengan sulfaquinoxaline.
- E. Subkelompok ayam yang diinfeksi dan diobati dengan amprolium.

#### 4. Rancangan dan Analisis Statistik

Rancangan penelitian ini berupa rancangan eksperimen petak terbagi (split-plot), sebagai petak induk (plot) adalah kelompok (waktu pemeriksaan hari keempat, keenam, kedelapan, dan kesepuluh p.i.), sedangkan anak petaknya (split) adalah perlakuan (A, B, C, D, dan E) dan mendapat ulangan sebanyak lima kali.

Data yang diperoleh diselesaikan dengan analisis statistik menurut prosedur Steel dan Torrie (1981). Dengan  $\alpha = 0,01$  dan  $0,05$ .