

MATERI DAN METODE

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian tentang "pengaruh pemberian deterjen terhadap daya infektivitas ookista Eimeria tenella" dilaksanakan di Laboratorium Protozoologi dan Entomologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Penelitian ini berlangsung selama 45 hari dimulai tanggal 6 Agustus 1990 sampai tanggal 16 September 1990.

3.2. Materi Penelitian

3.2.1 Kandang percobaan

Untuk pemeliharaan ayam umur satu hari (DOC) sampai 14 hari digunakan kandang starter yang berukuran 100 X 100 X 50 cm. Pada kandang ditempatkan 32 ekor ayam dan sebagai penghangat digunakan lampu 60 watt.

Untuk pemeliharaan ayam umur 15 hari sampai penelitian ini selesai digunakan kandang dari kayu yang berukuran 200 X 100 X 50 cm. Pada kandang ditempatkan lampu 60 watt. Alas kandang dari lantai tingginya kurang lebih 30 cm. Sebagai tempat makanan dan minuman digunakan tempat khusus yang dibeli dari poultry shop. Sebelum digunakan kandang, tempat makan dan minum disuci hamakan dengan larutan biocid.

### 3.2.2 Hewan percobaan dan makanan

Untuk keperluan percobaan ini digunakan ayam pedaging CP 707 yang dikeluarkan oleh PT Charoen Pokphand Jaya Farm. Ayam dibeli dari salah satu poultry shop di Surabaya pada saat berumur satu hari (DOC). Tiga puluh dua ekor ayam digunakan dalam penelitian ini, sedangkan untuk perbanyakannya digunakan empat ekor ayam lain yang berumur empat minggu. Setelah berumur 14 hari (dua minggu) ayam percobaan dipindahkan ke kandang percobaan secara acak. Pada tiap kotak yang berukuran 100 X 50 X 40 cm ditempatkan 8 ekor ayam.

Selama percobaan ayam-ayam tersebut diberi makan dan minum secara berlebihan. Air minum yang diberikan berasal dari PDAM sedangkan makanan dicampur sendiri berdasarkan susunan ransum untuk ayam pedaging (Budiono, 1988). Susunan ransum ayam pedaging dapat dilihat pada Lampiran 6.

### 3.2.3. Ookista

#### a. Isolasi ookista

Ookista yang dipakai sebagai infeksi adalah Eimeria tenella, didapatkan dari sekum ayam yang menderita koksidiosis sekum. Ayam penderita didapat dari peternakan di desa Gelang, Pandaan, Pasuruan, Jatim. Tanda-tanda hewan yang terserang, sekum mengalami pembengkakan 2-3 kali lipat dari normal, isi sekum berupa darah yang membeku maupun setengah membeku. Isi sekum ayam penderita dikeluarkan, kemudian dilakukan pemeriksaan natif di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali. Bila positif terdapat ookista, isi sekum diletakkan dalam mortir dan

digerus, kemudian ditambahkan larutan kalium bikromat 2,5 persen (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) secukupnya. Suspensi tersebut dituangkan kedalam cawan petri, kemudian ditutup setengah terbuka dan diinkubasi pada suhu kamar. Setiap 24 jam dilakukan pemeriksaan, suspensi diaduk dan ditambahkan larutan bikromat bila berkurang.

#### b. Identifikasi koksidiosis

Jenis (spesies) koksidia ditentukan berdasarkan bentuk, ukuran panjang dan lebar ookista, waktu sporulasi serta predileksinya (Reid, 1972). Untuk penentuan ukuran lebar dan panjang ookista diukur 10 ookista kemudian diambil rata-ratanya. Dari hasil pengukuran didapatkan panjang rata-rata 20,12 mikron, lebar rata-rata 16,68 mikron dan berbentuk bulat telur. Sekum yang diambil untuk isolasi menunjukkan pembengkakan tiga kali lipat lebih besar dari normal. Ookista yang disporulasikan sebagian besar sudah bersporulasi pada 48 jam setelah inkubasi. Dengan memperhatikan kriteria di atas dapat dipastikan ookista yang diisolasi adalah ookista Eimeria tenella.

#### c. Pembuatan dan Penghitungan bahan infeksi

Ookista yang telah bersporulasi didalam larutan kalium bikromat 2,5 persen, dibersihkan dari reruntuhan sel epitel dan dari kalium bikromat. Suspensi disaring dengan saringan "US standart sieve series no 100". Filtrat yang didapatkan dibersihkan dari kalium bikromat, dengan jalan pemusingan pada kecepatan 1.500 rpm selama 5 menit. Selanjutnya supernatannya dibuang dan endapannya

ditambahkan air suling secukupnya sambil diaduk-aduk kemudian disentrifus lagi dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit. Pembilasan ini dilakukan berulang-ulang sampai didapatkan supernatan yang jernih tidak berwarna kuning (Ashadi, 1979).

Penghitungan jumlah ookista tiap mililiter larutan dihitung dengan menggunakan Haemositometer Improve-Neubuer. Endapan yang didapat ditambahkan air suling kemudian dikocok perlahan-lahan sampai homogen. Suspensi diambil dengan pipet selanjutnya diteteskan pada lekuk kamar hitung yang sebelumnya ditutup dengan cover glas. Kemudian diperiksa dibawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali. Ookista yang dihitung yaitu yang terdapat di empat kotak besar bagian pojok kamar hitung (Gambar 3), sedang perkiraan jumlah ookista tiap mililiter adalah sebagai berikut. Misalnya dari penghitungan empat kotak kamar hitung didapatkan jumlah ookista adalah = N, maka jumlah tiap ml  $\frac{N}{0,4} \times 1000$   
 Jumlah ookista tiap ml larutan = N X 2500

Keterangan :

N = jumlah ookista yang dihitung dari kamar hitung

0,4 = volume empat kotak kamar hitung (satu kotak mempunyai panjang dan lebar 1 mm, kedalaman 0,1 mm )

X 1000 = penyetaraan dari ml ke mm<sup>3</sup>

d. Perbanyak dan penyimpanan ookista

Untuk memenuhi dosis infeksi perlu dilakukan perbanyak ookista yaitu dengan menggunakan 4 ekor ayam berumur 4 minggu yang diinfeksi dengan ookista yang telah

bersporulasi. Setiap hari diamati gejala klinis yang timbul serta dilakukan pemeriksaan terhadap tinjanya. Delapan hari setelah infeksi ayam-ayam tersebut disembelih dan sekumnya diambil. Tiga perempat bagian bawah sekum dipotong kemudian isinya dikeluarkan dan dipindahkan ke dalam mortir. Kemudian digerus dan ditambahkan kalium bikromat 2,5% sebanyak lima kali bahan. Suspensi disaring dengan saringan "US standart sieve series no 100" filtrat yang diperoleh dituangkan kedalam cawan petri kemudian ditutup tidak rapat dan diinkubasi pada suhu kamar. Setiap hari dilakukan pemeriksaan mikroskopis, bila sebagian besar ookista telah bersporulasi suspensi dituangkan kedalam pot dan disimpan dalam almari pendingin dengan suhu  $6^{\circ} - 8^{\circ}$  C. Suspensi ookista ini bila akan digunakan sebagai bahan infeksi maka terlebih dahulu dilakukan pembersihan dan penghitungan.

#### 3.2.4. Alat-alat dan bahan-bahan lain

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari mikroskop, satu set haemositometer, seperangkat alat seksi, mortir, cawan petri, pipet, tabung centrifuge, saringan "US standart sieve series no 100", counter, pot plastik, sentrifuge dan lain-lain.

Bahan-bahan lain yang dipakai adalah larutan garam dapur jenuh (NaCl), larutan kalium bikromat (KCr2O7), disinfektans (biocid), vaksin (ND), air suling dan lain-lain.

### 3.3. Metode Penelitian

#### 3.3.1. Persiapan hewan percobaan

Pertama disiapkan kandang untuk 32 ekor anak ayam (DOC) dimana kandang tersebut telah didesinfeksi sebelumnya dengan biocid. Sebelum percobaan, semua ayam divaksinasi terhadap ND (New Castle Disease) melalui tetes mata. Setelah berumur 14 hari ayam tersebut ditempatkan dalam kandang dengan ukuran 200 X 100 X 50 cm.

Memasuki hari ke 35 ayam tersebut dibagi secara acak menjadi empat kelompok yakni A, B, C dan D masing-masing kelompok terdiri dari 8 ekor. Selanjutnya tiap kelompok ayam akan mendapat perlakuan sebagai berikut:

- Kelompok I : diinokulasi dengan 5000 ookista E.tenella yang bersporulasi tanpa memperoleh perendaman dengan deterjen (sebagai kontrol).
- Kelompok II : diinokulasi dengan 5000 ookista E.tenella bersporulasi yang diperoleh dari perendaman dengan deterjen 0,2 mg/liter.
- Kelompok III : diinokulasi dengan 5000 ookista E.tenella bersporulasi yang diperoleh dari perendaman dengan deterjen 0,4 mg/liter.
- Kelompok IV : diinokulasi dengan 5000 ookista E.tenella bersporulasi yang diperoleh dari perendaman dengan deterjen 0,6 mg/liter.

Perhitungan 5000 ookista pada Lampiran 1.

Dari keseluruhan ayam percobaan dilakukan pemeriksaan terhadap kenaikan berat badan, skor perlukaan sekum dan jumlah ookista per gram (OPG) isi sekum. Pemeriksaan

dilakukan pada hari ke 8 setelah infeksi 5000 ookista bersporulasi dan perendaman ookista dalam deterjen selama tiga hari.

Untuk penilaian skor perlukaan usus buntu terhadap koksidiossis dipakai cara Johnson dan Reid (1970) dikutip oleh Ashadi (1979) sebagai berikut.

- 0 = tidak didapatkan luka dalam dinding lumen sekum.
- +1 = pada dinding lumen sekum disana sini didapatkan beberapa petikhie, tebal dinding dan isilumen sekum normal.
- +2 = didapatkan banyak luka pada dinding lumen sekum, isi sekum bercampur dengan darah, dinding sekum sedikit menebal.
- +3 = banyak darah yang telah membeku atau setengah membeku didalam sekum, dinding sekum sangat menebal, sedikit atau sama sekali tidak didapatkan isi sekum yang berupa tinja.
- +4 = sekum sangat membesar dengan dinding yang sangat merentang, isi sekum terdiri dari darah yang telah membeku atau telah mulai mengalami proses perkapuran, sedangkan isi sekum yang berupa tinja sangat sedikit. Ayam mati karena koksidiossis yang dinilai positif empat.

### 3.3.2. Analisis data

Dalam penelitian ini rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Data kenaikan berat badan dan jumlah ookista per gram tinja (OPG) dianalisis dengan

sidik ragam (Anava) dengan Uji F. Apabila didapatkan perbedaan yang nyata, maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) menurut Steel dan Torrie (1989). Skor perlakuan sekum diolah dengan penilaian peringkat (rank) berdasarkan uji Kruskal Wallis. Apabila ada perbedaan dilanjutkan uji pasangan berganda menurut Daniel (1989).