

III. MATERI DAN METODE

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari-Februari 2024 di Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner dan Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Wijaya Kusuma Surabaya. Pengambilan sampel dari pasar hidup di kota Surabaya.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi cawan petri steril, bunsen, korek api, erlenmayer, rak tabung reaksi tabung reaksi, pinset, ose runcing, ose bulat, *cover glass*, *object glass*, *cool box*, penjepit kayu, *catton swab*, batang pengaduk, timbangan, sendok, panci, kompor, alat tulis, kertas label, kapas, pisau, masker, *gloves*, mikroskop, *autoclave*, dan *vortex*. Alat yang digunakan pada pemeriksaan histopatologi antara lain glove, masker, mikroskop binokuler, label, *objek glass*, *cover glass*, kapas, *microtome*, dan *watter bath*.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *Buffer Pepton Water* (BPW), media *MacConkey Agar* (MCA) (HIMEDIA MH081), *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) (HIMEDIA M021), *Simmons Citrate Agar* (SCA) (HIMEDIA M099), *Sulfide Indole Motility* (SIM) (HIMEDIA M181), media *Methyl Red* (MR) (HIMEDIA M070), *Voges-Proskauer* (VP) (HIMEDIA M070). Bahan pewarnaan gram terdiri dari lugol, safranin, kristal violet, Alkohol 96%, *oil emersi*, NaCl

Fisiologis, dan Alkohol 70%, dan media untuk mengetahui bakteri pathogen yaitu *Blood Agar* (BA). Bahan yang digunakan pada pemeriksaan histopatologi antara lain sampel usus halus jejunum ayam broiler, xylol, aquadest, larutan BNF 10%, pewarnaan giemsa, mayer albumin, Alkohol 70%, 80%, 90%, 95%, dan etanol absolute 96%.

3.2.3 Persetujuan Etik

Persetujuan etik hewan di peroleh dari komisi Etik penelitian pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Wijaya Kusuma Surabaya, Indonesia no etik : 148-KKE.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian yang bersifat deskriptif yaitu yang berfungsi untuk mengidentifikasi penyakit kolibasilosis dan gambaran histopatologi jejunum ayam broiler yang terinfeksi bakteri *Escherichia coli* di pasar hidup Surabaya. Dengan teknik pengambilan sampel yang dilakukan secara *purposive sampling* dari pasar hidup Surabaya.

3.3.2 Sampel

Pengambilan sampel dilakukan di pasar hidup kota Surabaya. Penelitian ini menggunakan sample feses dari kloaka dan jejunum dengan jumlah dua ekor ayam broiler yang terdiri dari satu ekor ayam broiler yang terinfeksi penyakit kolibasilosis (ayam sakit) dan satu ekor yang tidak terinfeksi penyakit kolibasilosis (ayam sehat). Sampel feses diambil dengan metode *purposive sampling*, dengan penentuan

sampel dilakukan dengan mempertimbangkan kriteria tertentu yang sesuai dengan gejala klinis penyakit kolibasilosis pada ayam broiler kemudian di swab di dalam kloaka unggas hingga kedalaman ± 2 cm dan menempatkannya pada *pepton water*. Sampel feses yang terkumpul dari pasar hidup di Surabaya segera dibawa ke Laboratorium Kesmavet dan laboratorium Patologi FKH Universitas Wijaya Kusuma Surabaya untuk meminimalisir terjadinya cemaran.

3.3.3 Teknik Pengambilan Sampel Ayam Broiler

Pengambilan sampel dalam penelitian ini menggunakan metode *purposive sampling* yaitu dengan melihat gejala klinis kolibasilosis yang terjadi pada ayam broiler. Gejala klinis tidak spesifik dan biasanya ayam mati secara mendadak setelah timbul gejala yang singkat seperti anoreksia dan lemah. Umumnya ayam yang terinfeksi kolibasilosis menunjukkan tanda-tanda klinis seperti kekurangan berat badan, bulu terlihat kusam, nafsu makan menurun, pertumbuhan terhambat, bulu disekitar kloaka yang kotor atau melekat, serta konsistensi feses cair dan berwarna kecoklatan (Besung dkk., 2019).

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Persiapan Penelitian

Sebelum penelitian dilakukan, peralatan yang akan digunakan dibersihkan secara menyeluruh, untuk peralatan yang terbuat dari kaca, seperti cawan petri, objek glass, dan tabung reaksi setelah dicuci kemudian dikeringkan dan dimasukkan kedalam autoklaf dan disterilisasi selama kurang lebih 30 menit dengan tekanan dua atmosfer dan pada suhu 121°C (Sari dkk., 2019).

3.4.2 Isolasi Bakteri *Escherichia coli*

Sampel swab kloaka ayam broiler yang telah diambil dan dimasukkan kedalam BPW sebagai media enrichment dan media pengenceran. Sampel swab kloaka kemudian dikultur pada media *MacConkey Agar* (MCA), yaitu media kultur yang bersifat selektif dan dirancang untuk menumbuhkan bakteri *Escherichia coli* dengan metode streak kuadran. Sampel selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama \pm 24 jam yang berguna untuk mengidentifikasi karakteristik bakteri *Escherichia coli*. Koloni bakteri *Escherichia coli* pada pemeriksaan mikroskop dengan pembesaran 1000x di media *MacConkey Agar* (MCA) akan tampak berwarna merah muda, berbentuk bulat sempurna, dan memiliki batas yang jelas. Koloni *Escherichia coli* yang murni dapat dilakukan dengan mengkultur sebanyak dua kali. Biakan kemudian diinkubasi selama sekitar 24 jam dengan suhu 37°C. Isolat selanjutnya diidentifikasi dengan melakukan pewarnaan Gram (Khoiriyah dkk., 2022).

3.5 Pewarnaan Gram

Bakteri Gram positif dan negatif dapat dikenali melalui pewarnaan gram, suatu metode yang dilakukan untuk melihat mikroorganisme secara jelas di bawah mikroskop. Proses pewarnaan gram dimulai dengan membersihkan objek glass menggunakan alkohol 70%. Setelah dibersihkan, objek glass kemudian ditetesi dengan larutan NaCl fisiologi. Panaskan ose diatas api bunsen. Koloni bakteri diambil dengan menggunakan ose bulat, kemudian dihomogenkan dengan NaCl fisiologis diatas *object glass* hingga suspensi bakteri berbentuk lingkaran dengan diameter \pm satu cm. Sediaan kemudian dikeringkan dengan cara dianginkan (*air*

dry), fiksasi dengan cara melewati object glass kurang lebih dua sampai lima kali diatas api bunsen (Wardani dan Tanikolan, 2021).

Preparat diwarnai dengan pewarnaan kristal violet selama dua menit, kemudian sediaan dicuci dibawah air mengalir. Setelah itu dikeringkan dan dilanjutkan dengan Lugol selama satu menit, setelah itu inokulum dicuci dengan aseton 96% selama 30 detik sampai zat warna ungu tidak terlihat lagi, selanjutnya dilakukan pencucian dibawah air mengalir. Sediaan direndam dalam safranin dan didiamkan selama satu menit (Ulfah dkk., 2017). Preparat lalu dicuci dengan posisi miring, dan dibiarkan kering dengan cara dianginkan, setelah itu ditetesi dengan *oil emersi* selanjutnya dilihat dibawah mikroskop dengan pembesaran 1000x. Amati bentuk dan warna sel, jika positif bakteri *Escherichia coli*, sel bakteri akan berwarna pink dan berbentuk batang pendek, hal ini dapat terjadi dikarenakan bakteri *Escherichia coli* mempunyai susunan dinding sel yang kaya akan lipopolisakarida dibandingkan dengan bakteri kelompok Gram positif, karena itu bakteri tidak dapat mempertahankan warna kristal violet, namun ketika diberi warna dengan safranin bakteri dapat menahan warna safranin sehingga terjadi perubahan warna menjadi warna pink (Ummamie dkk., 2017).

3.6 Uji Biokimia

3.6.1 Uji Biokimia *Sulfid Indol Motility* (SIM)

Media SIM digunakan untuk pengujian ini. Isolat bakteri *Escherichia coli* yang ditanam pada media SIM menunjukkan poliferasi bakteri di luar garis tusukan. *Escherichia coli*, bakteri motil dengan mempunyai flagella peritricus adalah penyebab proliferasi bakteri diluar garis tusukan (Pelt dkk., 2016).

Isolasi dilakukan dengan uji indol yang melibatkan inokulasi dalam media cair pepton dan selanjutnya di inkubasi dalam waktu 24 jam pada suhu 37°C. tujuan dari pengujian indol adalah untuk mengidentifikasi kemampuan suatu organisme dalam mendegradasi asam amino triptofan dan menghasilkan indol. Reagen *kovac* diberikan secara perlahan-lahan pada dinding tabung, maka akan tampak garis pemisah antara media dan reagen. Hasil positif dari uji indol pada isolat *Escherichia coli* akan menunjukkan adanya cincin yang berwarna merah setelah penambahan reagen *kovac* dimana menunjukkan kemampuan bakteri tersebut dalam memproduksi enzim tryptophan, dan hasil negatif akan dilambangkan dengan tidak adanya cincin merah antara media dan reagen (Puspita dkk., 2020).

3.6.2 Uji Biokimia *Simmon's Citrate Agar* (SCA)

Isolat dinokulasikan pada media SCA untuk dilakukan uji sitrat. Eksperimen ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memanfaatkan sitrat sebagai satu-satunya sumber energi. Hasil positif ditandai dengan adanya koloni bakteri dan perubahan warna media dari hijau menjadi biru, karena bakteri melepaskan asam dari biakan ketika mereka menggunakan sitrat, pH akan meningkat dan merubah warna pada media dari hijau menjadi biru (Bambang dkk., 2014).

3.6.3 Uji Biokimia *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA)

Media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) dapat terbagi menjadi tiga jenis yang berdasarkan karakteristiknya yakni, media diferensial, media semisintetik, dan media padat. Media padat digunakan secara luas untuk memisahkan kultur murni dan menganalisis morfologi koloni. Elemen alami dan sintetis dicampur untuk

membuat media semi-sintetik. Media diferensial adalah media kultur yang digunakan untuk menumbuhkan dan mempelajari mikroorganisme tertentu. Pertumbuhan bakteri berfungsi sebagai media diferensial dengan membentuk koloni yang berbeda untuk setiap spesies berdasarkan perubahan kimia (Ubaidillah, 2020).

3.6.4 Uji Biokimia *Methyl Red* (MR)

Larutan berwarna merah menunjukkan hasil uji *Methyl Red* (MR) positif terhadap isolat bakteri *Escherichia coli*, sedangkan larutan yang berwarna kuning menunjukkan hasil negatif (Kartikasari dkk., 2019). Menurut Ulfa dkk., (2016) untuk mengetahui apakah bakteri dapat memfermentasi metilen glikon dilakukan uji MR. Glukosa fosfat berfungsi sebagai media, *Methyl Red* 1% ditambahkan ke media setelah diinkubasi. Pemberian tambahan *Methyl Red* 1%, menunjukkan hasil yang positif apabila terdapat perubahan warna pada media menjadi merah, sedangkan apabila hasil negatif akan menunjukkan dengan tidak adanya perubahan warna.

3.6.5 Uji Biokimia *Voges Proskauer* (VP)

Bakteri *Escherichia coli* dapat memfermentasi karbohidrat menjadi senyawa asam dan tidak menghasilkan produk netral seperti asetonin, hal ini dapat diartikan bahwa bakteri *Escherichia coli* menunjukkan hasil yang negatif (Kartikasari dkk., 2019). Substrat untuk uji ini adalah glukosa fosfat. Tujuan percobaan ini adalah untuk memastikan apakah bakteri mampu mengubah glukosa menjadi asetoin (*acetyl methyl carbinol*), setelah di inkubasi kemudian media ditambahkan dengan 40% KOH dan 5% α naphthol. Menurut Ulfa dkk., (2016) jika media menjadi merah setelah diberi tambahan 5% α naphthol dan 40% KOH, maka

bakteri dapat menghasilkan asetoin, namun apabila hasilnya negatif, warna pada media tetap akan sama.

3.7 Blood Agar (BA)

Menurut Sanatang dan Lio (2021) *Blood Agar* (BA) adalah media yang digunakan untuk melihat kemampuan dari bakteri dalam melisis darah. Bakteri yang menghasilkan enzim ekstraseluler bisa menghasilkan lisis (pemecahan) sel darah merah pada media, yang dikenal sebagai hemolisis. aktivitas ini dapat dikenali dari adanya zona bening di sekitar koloni (β hemolisis), warna hijau (α hemolisis), atau tidak adanya perubahan warna disekitar koloni bakteri (non hemolisis) bagi bakteri yang tidak memiliki kemampuan untuk menghancurkan darah. Inkubasi selama 24 jam tidak akan menunjukkan adanya zona hemolisis, tetapi dalam masa inkubasi 48 jam maka akan terbentuk zona hemolisis. Diameter pada zona hemolisis tidak dapat diukur karena terlalu lebar dan menyatu antara satu sama yang lain.

3.8 Teknik Pengambilan Sampel Jejunum

Sampel Ayam broiler yang telah ditemukan adanya bakteri patogen pada jejunum kemudian di euthanasia dengan cara dislokasi servikalis. Lakukan sampai ayam mati, setelah itu dilakukan pembedahan secara laparatomi pada ayam broiler yang sudah mati dan kemudian dilakukan proses nekropsi. organ jejunum kemudian diambil untuk dilakukan pembuatan preparat. Sampel jejunum yang diambil dipotong menjadi ukuran 1x1x1 cm, selanjutnya direndam kedalam *larutan Buffer Neutral Formalin* (BNF) 10%. Sampel yang telah direduksi kemudian ditempatkan kedalam *tissue cassette*, setelah proses fiksasi dengan larutan BNF, dilakukan

dehidrasi dan clearing dengan larutan alkohol yang bertingkat dimulai dari alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 90%, alkohol 96%, alkohol absolut, toluene, dan parafin yang dilakukan masing-masing selama 2 jam.

Sampel organ kemudian diblocking dengan *embedding set* yang dituangkan parafin cair selanjutnya didinginkan. Blok yang sudah didinginkan kemudian dipotong menggunakan mikrotom dengan ketebalan sekitar 4 hingga 5 mikron. Proses selanjutnya adalah pewarnaan dengan metode *Hematoksilin-eosin* (HE) dan *Mounting media*.

3.8.1 Pemeriksaan Preparat Histopatologi

Analisis histopatologi adalah prosedur pemeriksaan yang dilakukan untuk memeriksa jaringan yang di kirim ke laboratorium patologi anatomik. Kualitas dari pengolahan jaringan dipengaruhi oleh berbagai faktor terutama pada tahapan pengolahan jaringan itu sendiri. Fiksasi merupakan langkah pertama dalam pengolahan jaringan yang sangat penting untuk menghasilkan sediaan slide histopatologi yang sesuai untuk interpretasi. Pengolahan sampel histopatologi melibatkan beberapa tahapan, dimulai dari pengiriman status dan jaringan ke laboratorium patologi anatomi, pemotongan jaringan, fiksasi jaringan, pembuatan blok parafin, dan terakhir perwarnaan (Musyarifah dan Agus, 2018).

Menurut Solfaine dkk., (2021) Metode skorning yang dapat diamati dalam perubahan histopatologi dapat diamati dari tingkat kerusakan yang terjadi pada berbagai jenis lesi. Kerusakan tersebut kemudian diberikan skor dari 0 hingga 10. Data ini diperoleh melalui pengamatan menggunakan mikroskop binokuler dengan pembesaran 400x. Lesi-lesi yang diamati yang dapat diamati berdasarkan parameter

antara lain infiltrasi sel radang, hemoragi dan nekrosis yang dikelompokkan kedalam lima skala, yaitu:

Tabel 3.1 Skoring Infiltrasi Sel Radang, Hemoragi, Nekrosis

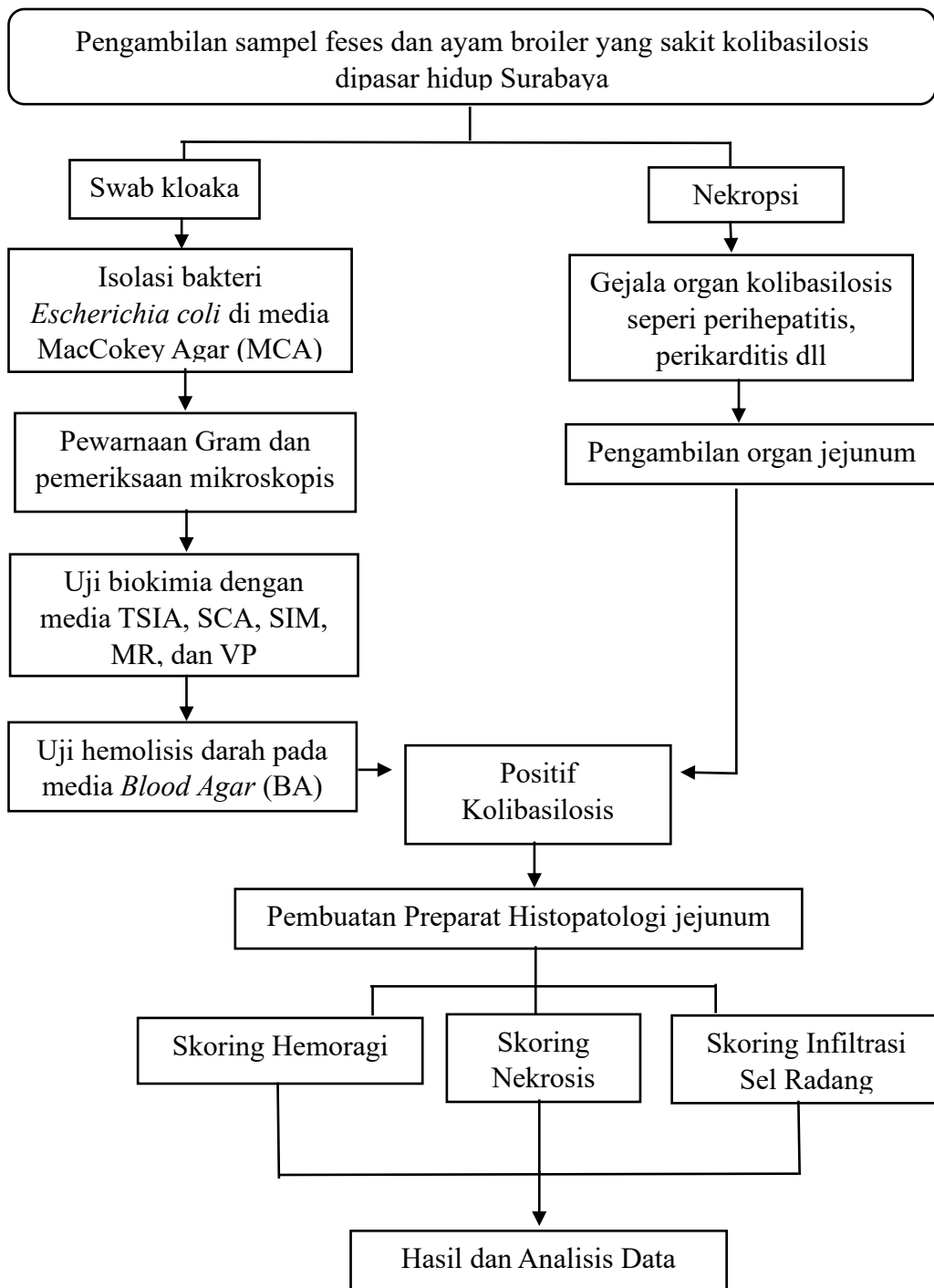
No	Skor	Keterangan	Kategori
I.	0	Tidak terdapat perubahan patologi	<i>No change</i>
II.	1	Lesi pada 1%-25% jaringan	<i>Minimal</i>
III.	2	Lesi pada 26%-50% jaringan	<i>mild</i>
IV.	3	Lesi pada 51%-75% jaringan	<i>Moderate</i>
V.	4	Lesi pada 76%-100% jaringan	<i>Severe</i>

Sumber: Gibson-Corley *et al* (2013).

3.9 Analisis Data

Proses selanjutnya spesimen dibawah mikroskop dengan pembesaran 100-400x untuk setiap sampel yang diamati. Parameter hasil pemeriksaan histologi jejunum dapat dilihat berdasarkan panjang dan jarak antar vili jejunum, yang dilanjutkan dengan analisis menggunakan metode uji *Independent Sampel T-test*. Jika nilai signifikan $\geq 0,05$ maka tidak terdapat perbedaan antara dua kelompok berbeda. Jika nilai signifikan $\leq 0,05$ maka terdapat perbedaan antara dua kelompok berbeda. Derajat keputusan yang digunakan adalah 95%.

3.10 Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka operasional penelitian