

III. MATERI DAN METODE

3.1 Lokasi dan waktu penelitian

Lokasi pengambilan sampel darah dan sampel hepar kambing dan domba diambil pada saat pemotongan hewan kurban pada bulan Juni 2023 di Masjid Thaybah. Pemeriksaan diferensial sel darah putih (limfosit) dilakukan di Laboratorium Patologi Universitas Wijaya Kusuma Surabaya. Pembuatan preparat Histopatologi dilakukan di Laboratorium Patologi Universitas wijaya kusuma Fakultas Kedokteran hewan. Penelitian ini akan dilakukan pada bulan Desember 2023-Februari 2024.

3.2 Materi penelitian

3.2.1 Sampel penelitian

Sampel penelitian yang digunakan adalah 6 sampel darah kambing, 6 sampel darah domba, 6 hepar kambing, dan 6 hepar domba yang diambil pada saat pemotongan hewan kurban di Masjid Thaybah.

3.2.2 Alat penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kantong plastik, glove, alat tulis, pisau, tissue, timbangan digital, embedding cassette, automatic tissue processor machine, mikrotom, waterbath, slide/object glass, cover glass, rak slide staining, slide staining jare with lids, mikroskop, cool box, tabung EDTA, spuit 3 ce, pipet pasteur. Differential blood cell counter.

3.2.3 Bahan penelitian

Bahan-bahan yang digunakan meliputi 6 hepar kambing, 6 hepar domba, 6 sampel darah kambing dan 6 sampel darah domba yang diambil pada saat pemotongan hewan kurban di masjid thaybah, air, methylene blue 1%, methanol, es batu dan reagen. Bahan pewarnaan hematoksin eosin (he), formalin 10%, alkohol seri(70%, 80%, 90%, 95%, 100%), xylol, parafin, aquades, hcl 0,1 n, larutan turk.

3.3 Metode penelitian

3.3.1 Jenis penelitian

Pada penelitian ini menggunakan jenis penelitian biosurfelen dengan mengambil sampel dilapangan. Nilai normal dengan melihat hasil differential leukosit count (limfosit) pada kambing dan domba dan metode skoring dengan melihat gambaran Histopatologi hepar kambing dan domba.

3.4 Prosedur penelitian

Sampel darah 6 sampel darah kambing dan 6 sampel darah domba dengan mengambil sampel darah pada vena jugularis menggunakan spuit 3 cc. setelah pengambilan sampel darah dimasukan ke dalam tabung EDTA lalu dihomogenkan seperti angka 8 dan diberi kode dan masukan ke dalam *cooling box*. Setelah selesai pengambilan sampel dikirim ke Laboratorium Patologi Universitas Wijaya Kusuma Surabaya untuk di uji pemeriksaan sel limfosit (Yupardi, 2014).

Sampel hepar yaitu 6 hepar kambing dan 6 hepar domba yang diambil pada saat pemotongan hewan kurban di Masjid Thaybah yang dimasukkan ke dalam pot masing-masing diberi formalin 10% dan diberi kode pada tiap pot, kemudian dimasukkan kedalam *cool box* agar sampel tidak rusak dan tidak terkontaminasi dengan organisme lain. Setelah pengambilan sampel, dilanjutkan pembuatan preparate histopatologi di Laboratorium Patologi Universitas wijaya kusuma fakultas Kedokteran hewan, selanjutnya pembuatan preparat histopatologi menggunakan metode fiksasi, trimming, dehidrasi, clearing embedding, blocking, pewarnaan dan pemotongan jaringan untuk melihat adanya sel fibrosis, dan infiltrasi sel radang (Pratiwi, 2015).

3.4.1 Darah

Perhitungan total leukosit dan pemeriksaan differential counting menurut Yunani dkk., (2018) dilakukan sebagai berikut:

a. Perhitungan leukosit

1. Gunakan pipet leukosit untuk mengambil darah sampai pada tanda 0,5 kemudian encerkan dengan larutan turk sampai dengan tanda 11. Kemudian gerakan pipet membentuk angka delapan selama 80 kali.
2. Sebelum di teteskan pada kamar hitung, buang cairan pada tabung eritrosit sebanyak 3 tetes.
3. Teteskan pada cekungan di antara kamar hitung kemudian tutup dengan cover glas.
4. Amati di mikroskop dengan perbesaran 40x

5. Terdapat 9 kotak besar pada kamar hitung perhitungan leukosit di lakukan pada 4 kotak besar dimasing-masing ujung.
 6. Jumlah leukosit adalah total jumlah leukosit di 4 kotak di kalikan 50.
- b. Pemeriksaan differential counting
1. Gunakan hapusan darah yang telah di warnai.
 2. Pilihlah lokasi di mana sel tidak tumpang tindih tetapi terdistribusi dengan baik, hal tersebut dapat di lakukan pada bagian hapusan yang tipis, bukan di posisi awal hapusan.
 3. Periksa perbesaran lemah (10x), kemudian sedang (40x) lalu perbesaran 100x menggunakan oil emersi.
 4. Hitung sampai sejumlah 100 leukosit, dalam hal ini yaitu limfosit.
 5. Hasil yang di dapatkan berupa prosentase (%)

3.4.2 Nilai normal

Nilai normal hasil pemeriksaan total leukosit dan limfosit pada kambing dan domba. Analisis jumlah leukosit dengan metode perhitungan total leukosit menggunakan metode manual atau menggunakan pipet leukosit dan analisis hasil limfosit dengan metode DLC (*differential leukosit count*). Persentase limfosit pada kambing dan domba yaitu dalam prosentase (%) . limfosit kambing dalam keadaan normal adalah antara 50–70% (Adawiyah, 2019). Jumlah limfosit normal Domba berada diantara 40-75% (Fardiki *et al.*, 2022).. dan jumlah leukosit pada darah kambing antara 6000-16.000/mm³ (Adawiyah, 2019). Jumlah leukosit normal pada domba berkisar antara 4.000-12.000/mm³ (Fardiki *et al.*, 2022).

Tabel 3 1 Nilai normal total leucosit dan limfosit pada darah kambing dan domba (Rahayu, 2017)

	Leukosit (/mm ³)	Limfosit (%)
kambing	6000-16.000/mm ³	50–70%
Domba	4.000-12.000/mm ³	40-75%

3.4.3 Preparat histopatologi

Organ hepar diambil dan dipotong menjadi ukuran 1x1x1 cm, kemudian difiksasi dalam NBF 10% selama 24 jam. Setelah di-streaming, kemudian dimasukkan ke dalam tissue cassette. Tissue cassette dimasukkan ke dalam tissue processor untuk tahap dehidrasi, clearing, dan embedding. Sementara itu, tahap bloking dilakukan dengan paraffin blok, selanjutnya cutting dengan mikrotom dalam ketebalan 5-6 μ . Selanjutnya, preparat diwarnai dengan pewarnaan hematoksilin eosin (HE). Setelah dikeringkan dan ditutup dengan cover glas, preparat siap diperiksa di bawah mikroskop (Makiyah dan Khumaisah, 2018).

3.4.4 Cara skoring histopatologi

Penelitian ini pada masing-masing preparat dibaca dalam 5 lapangan pandang yaitu kanan atas - kiri atas - kiri bawah - kanan bawah - tengah preparat dengan perbesaran 400x, serta dianalisis menggunakan mikroskop cahaya untuk dinilai tingkat kerusakan pada hepar. Derajat kerusakan hepar ditentukan dengan dilihat dari 2 parameter yaitu kelompok fibrosis dan infiltrasi sel radang.

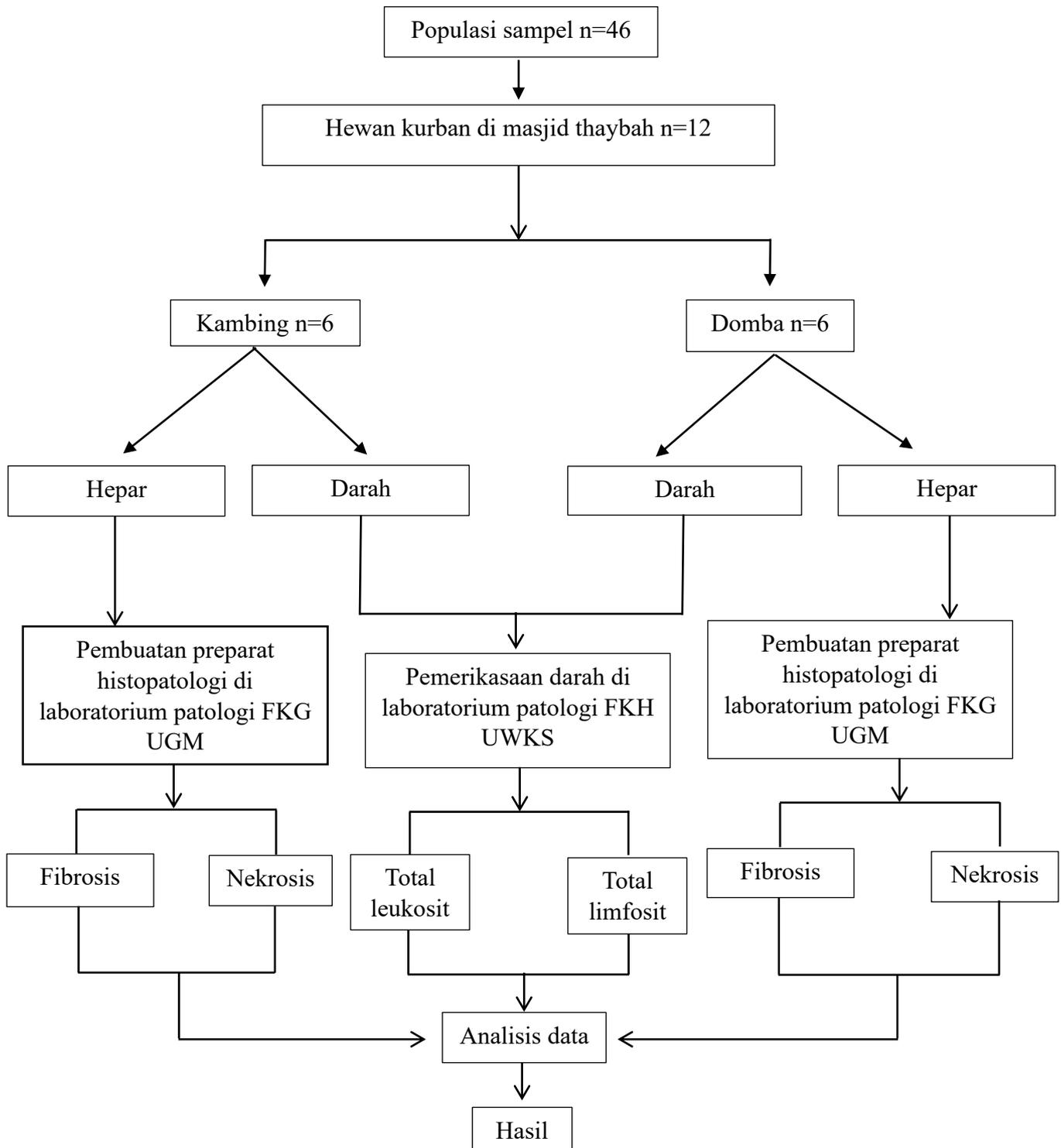
Tabel 3.2 Standar metode skoring infiltrasi sel radang (Solfaine R, *et al.*,2019).

skor	Infiltrasi sel radang
0	Jika tidak ditemukan sel radang pada seluruh LP
1	Jika ditemukan adanya sel radang sebanyak <10 dari seluruh LP
2	Jika ditemukan adanya sel radang sebanyak 11-50 dari seluruh LP
3	Jika ditemukan adanya sel radang sebanyak 51-100 dari seluruh LP
4	Jika ditemukan adanya sel radang sebanyak >100dari seluruh LP

Tabel 3.3 Standar metode skoring fibrosis (Nallagangula, et al., 2017).

skor	Fibrosis
0	Jika ditemukan adanya jumlah fibrosis sebanyak 0% dari seluruh LP
1	Jika ditemukan adanya jumlah fibrosis sebanyak <10% dari seluruh LP
2	Jika ditemukan adanya jumlah fibrosis sebanyak 11%-30% dari seluruh LP
3	Jika ditemukan adanya jumlah fibrosis sebanyak 31% – 50% dari seluruh LP
4	Jika ditemukan adanya jumlah fibrosis sebanyak 51% - 60% dari seluruh LP
5	Jika ditemukan adanya jumlah fibrosis sebanyak 61% - 75% dari seluruh LP
6	Jika ditemukan adanya jumlah fibrosis sebanyak >75% dari seluruh LP

3.5 Kerangka penelitian



3.6 Analisis data

Data yang diperoleh dari hasil total leukosit dan limfosit pada kambing dan domba disusun dalam bentuk tabel untuk dianalisis menggunakan metode one way anova dan data skoring nilai histopatologi yang meliputi fibrosis dan infiltrasi sel radang pada hepar kambing dan domba, disusun dalam bentuk tabel untuk dianalisis menggunakan metode non-parametrik. Kemudian data dianalisis statistik menggunakan Statistical Program for Social Science (SPSS) dengan uji Kruskal Wallis Test untuk mengetahui perbedaan dan dilanjutkan dengan uji MannWhitney Test, untuk menentukan perbedaan masing-masing kelompok (Winiastri,2021).