

III. MATERI DAN METODE

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Wijaya Kusuma Surabaya. Waktu penelitian ini direncanakan berlangsung pada bulan September 2025 – Januari 2026.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu kandang kelompok, tempat pakan dan minum, timbangan digital, alat bedah (scalpel, blade, gunting bedah, pinset anatomis), kotak kaca, object glass, meja bedah, toples kaca, mikroskop, mikrotom, kaset embedding.

3.2.2 Bahan Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada objek hewan ayam *Day-Old Chick* (DOC) broiler. Bahan yang digunakan untuk penelitian ini antara lain Isolat *Lactobacillus* sp, organ hepar, aquades, BNF 10%, paraffin, dietil eter, alkohol bertingkat (70%, 80%, dan 90%), Hematoxylin, Eosin, Xylol.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik murni (*true experimental design*) dengan perancangan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan pengambilan sampel dilakukan secara random dengan empat perlakuan.

Penelitian ini menggunakan 18 ekor DOC broiler yang dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan, dengan jumlah DOC broiler pada setiap kelompoknya terdiri 6 ekor yang setiap perlakuan memiliki 6 kali pengulangan. Penentuan jumlah ulangan pada penelitian ini dilakukan berdasarkan rumus Federer yaitu $t(n-1) \geq 15$.

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

$$3(n-1) \geq 15$$

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Keterangan :

t = Jumlah perlakuan

n = Jumlah ulangan

3.3.2 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari tiga jenis variabel yaitu, variabel bebas, variabel terikat dan variabel kontrol.

- Variabel bebas : Pemberian isolat *Lactobacillus* sp dengan dosis tinggi.
- Variabel terikat : Perubahan gambaran histopatologi hepar setelah pemberian isolat *Lactobacillus* sp dengan dosis tinggi.
- Variabel kontrol : berat badan DOC broiler, umur DOC dan pakan.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Persiapan Hewan Coba

Pada penelitian ini menggunakan ayam *Day-Old Chick* (DOC) broiler sebagai hewan coba untuk pemberian isolat. Ayam DOC telah berumur 3 hari dan

terdiri dari 18 ekor dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan. Kisaran berat badan DOC antara 50-80 gram dan menjadi berat badan yang ideal untuk dilakukan penelitian. Ayam DOC diperoleh dari hatchery yang sama untuk mencegah terjadinya variasi genetik dan perbedaan status kesehatan ternak. Seluruh DOC ditempatkan dalam kontainer plastik berukuran 40x60 cm yang masing-masing dilengkapi tempat pakan dan minum yang diberikan secara *ad libitum* feeding. Alas kandang menggunakan kertas koran yang di ganti secara berkala dan diberikan pentilasi yang cukup besar untuk mencegah kelembapan dalam kandang. Suhu ruangan kandang dijaga suhu sekitar 32-35°C dengan relatif kelembapan 50-60% untuk menjaga DOC tidak stres. Siklus pencahayaan dibantu dengan pencahayaan tambahan untuk mendukung konsumsi pakan, pertumbuhan optimal dan memberikan rasa hangat dari bantuan cahaya. DOC diberikan waktu selama 24 jam untuk beradaptasi dengan lingkungan laboratorium sebelum dilakukan perlakuan.

3.4.2 Perlakuan Pemberian Isolat

Penelitian ini menggunakan 18 ekor ayam *Day Old-Chick* (DOC) broiler yang dibagi secara acak kedalam 3 kelompok perlakuan, masing-masing kelompok berisi 6 ekor DOC dan ditempatkan ke box pemeliharaan.

Jumlah koloni bakteri yang diperoleh dilakukan perhitungan untuk mendapatkan total bakteri dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$CFU/mL = \frac{\text{Jumlah Koloni} \times \text{Faktor Pengenceran}}{\text{Volume Inokulum (mL)}}$$

(Basarang dkk., 2017)

Setiap kelompok menerima perlakuan sesuai dengan rancangan penelitian sebagai berikut :

1. K (kontrol) : diberikan aquades 0,5 ml/ekor
2. P1 : diberikan isolat sebanyak $0,5 \times 10^{13}$ CFU/ml
3. P2 : diberikan isolat sebanyak 1×10^{13} CFU/ml

Pemberian perlakuan dilakukan secara peroral menggunakan syringe 1ml tanpa needle untuk memastikan ketepatan dosis yang diberikan. Setelah diberikan perlakuan, ayam diamati untuk memantau kondisi klinis yang akan ditimbulkan dari pemberian isolat. Pengamatan dilakukan secara berkala untuk menilai respon fisiologis dan perilaku DOC selama periode berkala selama 24 jam.

Parameter yang diamati meliputi (Krysiak *et al.*, 2021):

1. Kondisi umum : tingkat aktivitas, nafsu makan, dan penampilan fisik
2. Gangguan motorik : antalgik dan inkoordinasi gerak
3. Gangguan saraf : tremor, tortikolis, dan sempoyongan
4. Gangguan fisik : tampak lesu atau kurang responsif
5. Gangguan pencernaan : diare dan vomit
6. Gangguan respirasi : dispnea dan panting

3.4.3 Pengambilan Sampel dan Preparasi Sampel

Pengambilan sampe organ hepar untuk prepare histopatologi dilakukan setelah 1 x 24 jam pemberian isolat *Lactobacillus* sp dengan dosis tinggi. *Day-Old Chick* (DOC) broiler di euthanasia dengan melakukan metode dislokasi servicalis secara cepat dan tepat. Selanjutnya dilakukan pembedahan laparotomi pada ayam DOC yang kemudian dilakukan nekropsi (Rizky, 2024).

Sampel organ yang dikoreksi adalah hepar. Organ hepar yang diambil kemudian dimasukkan kedalam pot organ yang berisi *Buffer Formalin Neutral* (BNF) 10% untuk fiksasi, kemudian dilanjutkan dengan pembuatan preparat histopatologi di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Wijaya Kusuma Surabaya.

Proses pembuatan preparate histologi (Wati, 2020) :

1. Pemotongan jaringan organ

Jaringan organ yang berada di dalam pot organ berisi larutan fiksasi diambil kemudian ditiriskan pada saringan selanjutnya dipotong menggunakan pisau scalpel dengan ketebalan 0,3-0,5 mm dan disusun ke dalam *tissue cassette*, kemudian *tissue cassette* dimasukkan ke dalam keranjang khusus (basket).

2. Proses dehidrasi

Jaringan yang berada dalam keranjang kemudian dimasukkan ke dalam mesin *processor* otomatis yang selanjutnya jaringan mengalami proses dehidrasi bertahap; ethanol 70% (2 jam), ethanol 80% (2jam), ethanol 90% (2 jam), ethanol absolute (2 jam), xylol (2 jam), paraffin cair (2 jam) kemudian keranjang yang berisi *tissue cassette* dikeluarkan untuk dilakuakn proses berikutnya.

3. Vacuum

Setelah dilakukan proses dehidrasi, dilanjutkan dengan menghilangkan udara dari jaringan dengan menggunakan mesin vakum yang di dalamnya terdapat tabung untuk menyimpan keranjangyang berisi paraffin cair dengan temperatur 60°C untuk sementara waktu sebelum pencetakan dilakukan dengan paraffin cair.

4. Mencetak blok paraffin

Cetakan ini berasal dari bahan *stainless steel* dihangatkan di atas tepi api bunsen, lalu kedalam setiap cetakan dimasukkan jaringan sambil diatur dan sedikit ditekan. Sementara itu dipersiapkan paraffin cair dalam temoat khusus, sehingga dicapai suhu 60°C. paraffin cair tersebut dituangkan ke dalam jaringan sampai seluruh jaringan terendam paraffin. Blok paraffin kemudian dilepas dari cetakan dan disimpan didalam *freezer* (-20°C) sebelum dilanjutkan dengan pemotongan.

5. Pemotongan blok jaringan

Jaringan yang mengandung blok paraffin, kemudian dipotong dengan menggunakan mesin mikrotom dengan ketebalan berkisar 3-5 µm. Pemotongan tersebut diletakkan secara hati-hati di atas permukaan air dalam waterbath bersuhu 46°C, pada tahap ini irisan di rapikan, kemudian diletakkan di atas *object glass* yang telah diolesi ewith yang berfungsi sebagai bahan perekat. *Object glass* dengan jaringan diatasnya disusun di dalam rak khusus dan dimasukkan kedalam inkubator bersuhu 60°C sampai preparat siap untuk diwarnai dengan pewarna *Hematoxyline Eosin* (HE) (Solfaine dkk.,2021).

Pewarnaan preparat histopatologi (Rizky, 2024) :

1. Larutan hematoksilin

Timbang serbuk hematoksilin 1 gram, potassium aluminium sulfat sebanyak 50 gram dan sodium iodate (Na 103) sebanyak 0,2 gram dilarutkan dalam 1 liter aquades menggunakan alat pengaduk dan sedikit dipanaskan, kemudian disimpan satu malam dalam temperatur ruangan. Keesokan hariya larutan tersebut ditambahkan asam sitrat (C6 H8 O7) sebanyak 50 gram. Larutan dipanaskan dan

diaduk selama 15 menit, kemudian didinginkan dan disaring. Larutan akan stabil selama 1-2 tahun dalam botol berwarna gelap pada temperatur ruangan.

2. Larutan eosin

Serbuk eosin Y ditimbang sebanyak 7,5 gram, erythosin sebanyak 7,5 gram dan calcium chloride sebanyak 2,5 gram dilarutkan dalam aquades sebanyak 1 liter kemudian disaring. Larutan akan stabil selama 6-12 bulan dalam botol gelap temperatur ruangan.

3. Larutan pembiru

Sebanyak 1,5 gram larutan pembiru lithium carbonat yang kemudian dilaurtkan dengan 1 liter aquades dan diaduk hingga homogen.

3.4.4 Pembacaan Slide dan Analisis Skoring

Slide atau prepare hasil penelitian diperiksa di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x. Pengamatan perubahan histopatologi (infiltrasi sel radang dan degenerasi melembak) dilakukan secara deskriptif pada satu potong jaringan (sediaan) dari setiap hepar DOC. Dilakukan pengamatan pada 5 lapang pandang (LP) yang dipilih secara acak, kemudian dihitung jumlah perubahan yang ditemukan pada preparat. Metode skoring yang diamati dalam perubahan histopatologi dilihat dari derajat kerusakan pada jumlah dari semua jenis lesi yang terdapat pada prepare, kerusakan tersebut diberikan skor dari 0 hingga 5. Data tersebut diperoleh dari gambaran histopatologi pada mikroskop cahaya yang dilakukan oleh peneliti (Solfaine dkk., 2019).

Tabel 3.1 Skoring infiltrasi sel radang dan degenerasi melemak

No.	Skor	Nilai
1.	0	0 dari LP
2.	1	<10 dari LP
3.	2	11-50 dari LP
4.	3	51-100 dari LP
5.	4	>100 dari LP

Keterangan :

1. Skor 0 : jika tidak ditemukan sel radang dan degenerasi melemak pada seluruh bagian hepar.
2. Skor 1 : jika jumlah sel radang dan degenrasi melemak <10 pada seluruh bagian hepar .
3. Skor 2 : jika jumlah sel radang dan degenerasi melemak antara 11-50 pada seluruh bagian hepar.
4. Skor 3 : jika jumlah sel radang dan degenerasi melemak antara 50-100 pada seluruh bagian hepar.
5. Skor 4 : jika jumlah sel radang dan degenerasi melemak >100 pada seluruh bagian hepar
6. LP : Lapang pandang

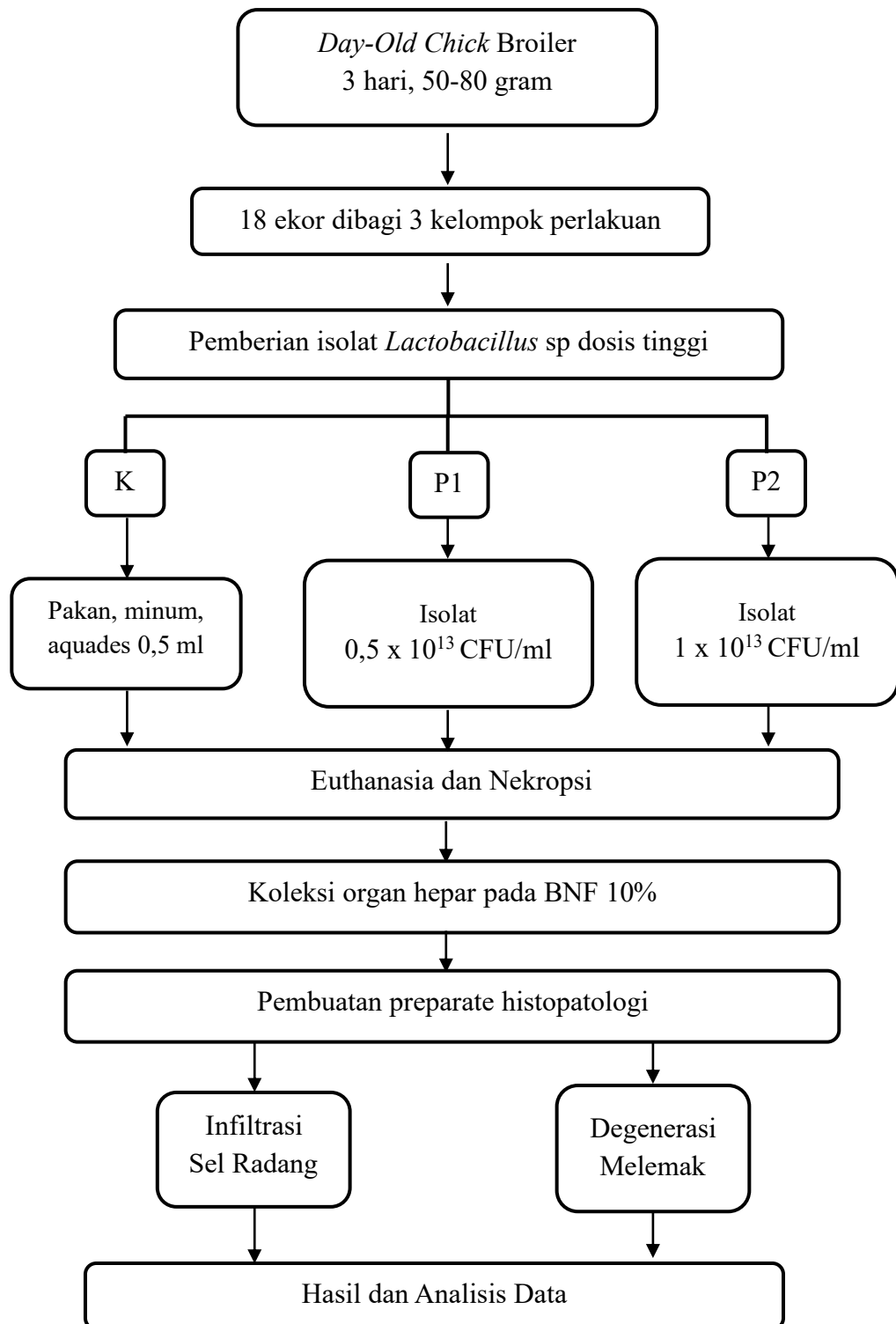
(Solfaine dkk., 2019)

3.4.5 Analisis Data

Data hasil pengamatan prepare histopatologi organ hepar merupakan data primer yang bersifat non-parametrik. Data primer adalah data yang dikumpulkan

dengan memeriksa histologi hepar di bawah mikroskop. Data yang terkumpul akan diberi skor sesuai dengan karakteristiknya untuk mengubahnya dari data kualitatif menjadi kuantitatif dengan metode skoring. Data hasil skoring ini masih berupa semi kuantitatif atau semi parametik. Untuk memperoleh data kuantitatif pada pengamatan lesi infiltrasi sel radang, hemoragi, dan degenerasi melemak maka dianalisis menggunakan uji statistik yaitu uji *Kruskal-Wallis*. Jika terdapat nilai yang berbeda nyata ($\text{nilai } P < 0,05$) maka dapat dilakukan dengan uji *Man-Whitney* kemudian digunakan untuk memastikan perbedaan antara masing-masing perlakuan jika temuan terbukti berbeda secara substansial.

3.5 Kerangka Penelitian



Gambar 2.1 Kerangka Penelitian