

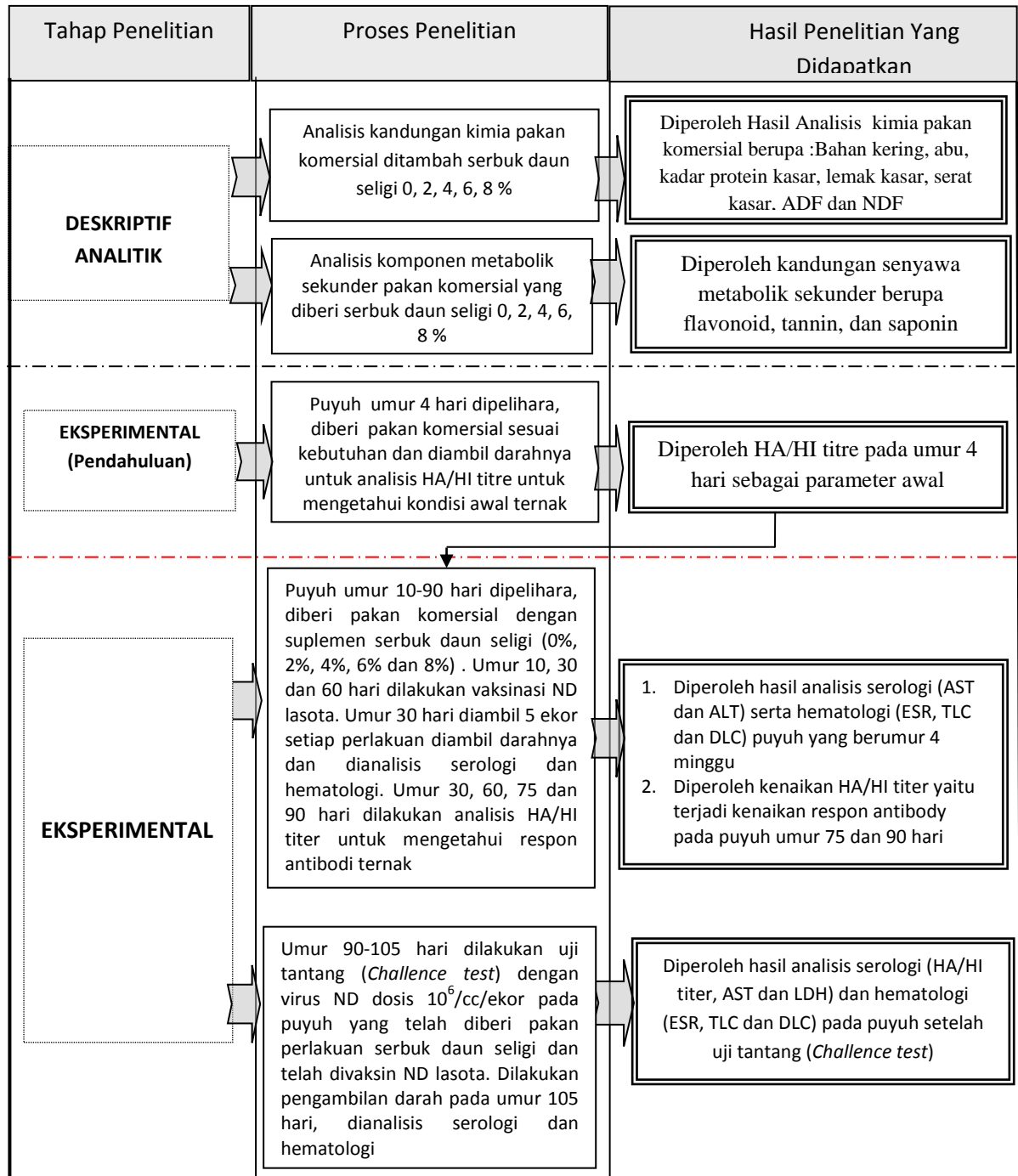
## BAB 4. METODE PENELITIAN

Penelitian terdiri dari 2 metode, yaitu metode penelitian deskriptif analitik dan eksperimental. Penelitian deskriptif difokuskan untuk menetapkan kandungan kimia dan komponen metabolik sekunder pakan komersial yang disuplementasi serbuk daun seligi. Penetapan kandungan kimia pakan yang disuplementasi serbuk daun seligi meliputi protein kasar, lemak kasar, ADF, NDF, selulosa, hemiselulosa dan lignin telah dilakukan di laboratorium nutrisi, Fakultas Peternakan UB. Penetapan senyawa metabolik pakan terdiri dari flavonoid, tanin dan saponin dilakukan di laboratorium milik LPPT-UGM.

Penelitian eksperimental difokuskan untuk menguji aktivitas immunomodulator serbuk daun seligi (*P. buxifolius*) sebagai antivirus pada puyuh yang terinfeksi virus *Newcasstle disease* (ND) telah dilaksanakan di kandang percobaan milik fakultas MIPA Univ. PGRI Adi Buana Surabaya selama 3 bulan, mulai bulan April sampai dengan awal Agustus 2016. Sedangkan Uji Tantang (*Challenge test*) dilakukan di kandang percobaan milik FKH Univ. Airlangga, mulai 8-21 Agustus 2016. Untuk menemukan pakan dengan suplementasi serbuk daun seligi yang optimum dapat mempengaruhi efek serologi dan hematologi dilakukan di Laboratorium Immunologi dan Virology FKH Univ. Airlangga dan laboratorium Faal Fak. Kedokteran Univ. Brawijaya. Efek serologi terdiri dari uji penentuan inhibisi haemogglutinasia titer (HA/HI titre), aspartat amino transferase (AST) dan laktat dehidrogenase (LDH), sedang efek hematologi terdiri dari uji penentuan laju sedimen eritrosit (ESR), hitungan total leukosit (TLC) dan deferensial leukosit (DLC) pada darah puyuh.

Penelitian eksperimental telah dilakukan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) yang diulang 15 kali. Perlakuan penambahan serbuk daun seligi sebanyak 0%, 2%, 4%, 6% dan 8% per kg pakan komersial, apabila terdapat perbedaan diantara perlakuan dilanjutkan dengan uji beda nyata jujur.

Sebanyak 75 ekor puyuh umur 4 hari ditempatkan dalam kandang kelompok secara acak masing-masing berisi 15 ekor. Kandang sudah dilengkapi dengan tempat pakan, tempat minum dan lampu penerangan. Puyuh percobaan berasal dari hasil penetasan peternakan rakyat yang berlokasi di desa Kalipucung Kecamatan Sanankulon Kabupaten Blitar. Puyuh diberi pakan jadi produksi pabrik pakan ternak. Untuk mengetahui kondisi awal ternak, diambil secara acak sebanyak 5 ekor puyuh umur 4 hari dilakukan pemeriksaan HA/HI titre menggunakan metode ELISA dengan cara dispet dibagian sayap dan ditampung darahnya lalu dipisahkan serumnya. Pada umur 10 hari semua puyuh di vaksin ND lasota yang dicampurkan pada air minum. Puyuh diberi pakan pellet yang berasal dari campuran pakan komersial ditambah serbuk daun seligi dengan takaran 0, 2, 4, 6 dan 8% per kg pakan. Pakan perlakuan diberikan 3 kali sehari sesuai kebutuhan sedangkan air minum diberikan secara ad libitum. Vaksinasi diulang pada umur 21 hari melalui air minum, sedangkan pada umur 60 hari dilakukan vaksinasi ulang (booster) ND lasota melalui injeksi intramuscular dengan dosis 2 cc/ekor. Pada umur 30, 60, 75 dan 90 hari juga dilakukan analisis HA/HI titre untuk mengetahui respon antibody setelah ternak divaksin dan diberi perlakuan suplemen serbuk daun seligi. Analisis HA/HI titre dilakukan di lab Immunologi dan Virologi FKH Univ. Airlangga. Sedangkan uji serologi dan hematologi awal dilakukan pada umur 30 hari di lab. Faal FK-UB. Uji serologi dan hematologi terdiri dari uji aspartat transaminase (AST) dan Alanin transaminase (ALT), penentuan laju sedimen eritrosit (ESR), hitungan total leukosit (TLC) dan deferensial leukosit (DLC) pada darah puyuh. Tahapan penelitian yang merupakan kerangka operasional penelitian disajikan pada Gambar 4.1 berikut.



Gambar 4.1 Kerangka Operasional Penelitian

## **Pengambilan darah**

Secara hati-hati bagian badan dan kaki puyuh dipegang sehingga tidak meronta. Pengambilan darah pada 5 ekor dari setiap kelompok perlakuan puyuh dilakukan dengan cara disembelih atau di spet pada bagian sayap. Sampel darah dari setiap puyuh dikumpulkan dalam dua botol. Salah satu botol diisi dengan EDTA (2,5 mg/5 ml darah) yang akan digunakan untuk uji hematologi yaitu ESR, TLC dan DLC. Sampel darah tanpa antikoagulan disimpan selama 1-2 jam dan selanjutnya disentrifuge pada 2500 rpm selama 10 menit. Bagian sera dipisahkan dan dimasukkan dalam vial plastic steril untuk selanjutnya disimpan pada suhu 20°C sampai akan digunakan.

## **Analisis Serologi**

Uji inhibisi haemogglutinasasi (HA/HI titre) dilakukan sesuai dengan yang dijelaskan oleh Hashmi (1999). Sebanyak 8 ml darah puyuh sehat tanpa antikoagulan disentrifuge pada 2000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil dengan pipet steril dan dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 5 ml normal saline. Tabung kemudian disentrifuge pada 2000 rpm selama 10 menit, pekerjaan tersebut diulang sebanyak 3 kali sehingga menjadi supernatant RBC. Pada vial vaksin virus ND dengan dosis 100 ditambahkan 1 ml normal saline . Selanjutnya sebanyak 50 µl normal saline dipipet ke dalam 1-12 well plate dan ditambahkan 50 µl antigen pada setiap well dan dihomogenkan. Setelah homogen ditambahkan 50 µl suspense RBC 1% dan dicampur. Well plate diinkubasi pada suhu ruang dan dilakukan pengamatan setiap 10-15 menit. Dilusi virus yang tinggi akan menyebabkan haemogglutinasasi.

Penentuan haemogglutinasasi titer (HA/HI titer) seperti yang dijelaskan oleh Alan *et al.* (1978). Sebelum dilakukan pengujian sampel serum di thawing pada waterbath pada suhu 56<sup>0</sup>C selama 30 menit untuk menghancurkan agglutinin nonspesifik. Dengan menggunakan multichanell dispenser, 50 ml normal saline didispensi pada 1-12 plete

mikrotitre dan ditambahkan sebanyak 50 µl sampel serum pada setiap plate dan dilakukan pengenceran sebanyak 2 kali. Selanjutnya 50 ml antigen (vaksin) ditambahkan pada well plate kecuali 1 plate dan ditambahkan 50 µl suspensi RBC. Plate diinkubasi pada suhu ruang selama 15-30 menit sampai pada bagian bawah terbentuk formasi. Aktivitas LDH dianalisis melalui penentuan Analisis aspartate amino transferase (AST) dan Analisis alanine amino transferase (ALT).

Analisis aspartate amino transferase (AST) dilakukan sesuai dengan diagnostic kit catalogue No. E ASTR 100 (EnzyChrom Aspartate Transaminase Assay Kit 100 T). Sebanyak 1000 µL Reagen A (L-aspartate dan NADH) dimasukkan ke dalam kuvet. Sampel serum sebanyak 100 µL yang telah disentrifugasi, dimasukkan dalam kuvet dan diinkubasi pada suhu 37°C selama satu menit. Selanjutnya reagen B (2-Oxaloglutarat dan LDH) sebanyak 250µL ditambahkan, dicampur dan diinkubasi selama satu menit pada suhu ruang. Hasilnya dibaca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) 340 nm dan penurunan absorbansi setelah 3 menit.

Analisis alanine amino transferase (ALT) juga dilakukan sesuai dengan diagnostic kit catalogue No. E ALTR 100 (EnzyChrom Alanine Transaminase Assay Kit 100 T). Sebanyak 1000 µL Reagen A (L-alanin dan NADH) dimasukkan ke dalam kuvet. Sampel serum sebanyak 100 µL yang telah disentrifugasi, dimasukkan dalam kuvet dan diinkubasi pada suhu 37°C selama satu menit. Selanjutnya reagen B (2-Oxaloglutarat dan LDH) sebanyak 250µL ditambahkan, dicampur dan diinkubasi selama satu menit pada suhu ruang. Hasilnya dibaca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) 340 nm dan penurunan absorbansi setelah 3 menit.

## **Analisis Hematologi**

### **Analisis laju sedimen eritrosit (ESR)**

Prosedur analisis untuk laju sedimen eritrosit (ESR) adalah sebanyak 0,4 ml larutan natrium sitrat 3,8% ditambahkan ke dalam 1,6 ml darah segar dan dicampur sempurna. Campuran dimasukkan ke dalam tabung dan tabung westergen dibiarkan dalam keadaan berdiri selama 1 jam, selanjutnya dibaca.

Analisis hitungan leukosit total (TLC) dilakukan dengan cara diambil darah sebanyak 2 ml, kemudian ditampung dalam tabung reaksi yang telah diisi antikoagulan EDTA dengan tujuan mencegah pembekuan darah. Tabung reaksi yang berisi darah ditutup dengan parafin untuk mencegah kontaminasi. Darah yang dicampur dengan antikoagulan EDTA dihisap dengan pipet hingga tanda 0,5 dan ujung pipet dibersihkan, kemudian pipet diletakkan pada larutan pengencer leukosit (larutan Turk) dan diisi perlahan-lahan hingga tanda angka 1 sehingga didapat konsentrasi menjadi 1:20. Pipet yang berisi darah ini dikocok selama 3 menit hingga tercampur homogen, setelah itu sebanyak 2 atau 3 tetes larutan diteteskan dari pipet dibuang sebelum mengisi kamar hitung. Setelah itu, larutan diteteskan ke dalam kamar hitung dan dibiarkan selama 1 menit. Dengan perbesaran rendah jumlah leukosit dihitung dalam 4 kotak sudut kamar hitung darah. Rumus perhitungan yang dipakai adalah:

$$\text{leukosit/cu.mm atau jumlah sel leukosit} = \frac{\text{Jumlah sel} \times 200 (\text{larutan } 1:20 \times 10)}{4}$$

dalam kotak sudut kamar hitung  $\times 50 = \text{leukosit/cu.mm}$ .

Penghitungan deferensial leukosit (DLC) dilakukan pemeriksaan dengan membuat preparat ulas darah dan diwarnai dengan pewarnaan Giemsa 10% selama 30 menit. Sampel darah di campur homogen sebelum diambil dengan pipet kapiler, kemudian satu tetes kecil darah diletakkan dekat ujung gelas obyek posisi permukaan datar. Gelas obyek yang kedua ditempatkan dengan ujung menyentuh permukaan gelas obyek pertama

sehingga membentuk sudut 30-45<sup>0</sup>. Gelas obyek kedua ditarik ke samping dan di biarkan darah mengalir dengan daya kapiler sehingga mencapai luasan 2/3 gelas obyek pertama. Gelas obyek kedua didorong dengan sudut yang sama sehingga membentuk lapisan tipis. Preparat apus dibiarkan mengering diudara terbuka. Preparat apus darah difiksasi dengan metil alkohol selama 3-5 menit, preparat diambil dan dibiarkan kering di udara. Setelah kering preparat direndam dengan pewarna Giemsa yang baru selama 15-60 menit. Preparat dicuci dengan air berkali-kali dan dibiarkan mengering di rak. Penghitungan persentase limfosit dilakukan perbesaran obyektif 100 x, klasifikasi leukosit pada beberapa lapang pandang dan dihitung per100 leukosit.

## **Analisis kandungan kimia dan senyawa metabolik pakan**

### **a. Pengambilan sampel daun seligi**

Daun seligi yang digunakan dalam penelitian berasal dari kebun koleksi tanaman milik pribadi dan milik masyarakat di desa Sumberingin Kec. Sanankulon, Blitar. Daun seligi (*P. buxifolius*) yang digunakan diambil dari seluruh bagian daun, terpisah dari tangkai dan biji lalu daun seligi dibersihkan dari kotoran, dikeringkan dalam ruang tertutup selama 2-3 minggu dan di oven dengan suhu 50°C selama 3 jam, selanjutnya digiling dan diayak lewat 20 mesh sampai diperoleh serbuk kering dengan kadar air rata-rata 10%. Serbuk daun seligi di simpan dalam wadah tertutup sampai akan digunakan. Serbuk daun seligi (*P. buxifolius*) yang telah didapat, selanjutnya ditambahkan pada pakan komersial untuk puyuh dengan perlakuan penambahan serbuk daun seligi sebanyak 0%, 2%, 4%, 6% dan 8%. Pakan yang telah diberi *feed supplement* serbuk daun seligi pada setiap perlakuan, lalu dicampur merata dan digiling sampai berbentuk serbuk halus, selanjutnya dilakukan analisis kandungan nutrisi maupun kandungan senyawa metabolik sekunder.

**b. Analisis proksimat dan senyawa metabolik sekunder pakan yang disuplemen Serbuk daun seligi**

**Penentuan Kadar Protein (metode Macro-Kjeldahl modifikasi Tecator-FOSS)**

Pada proses digesti, alat dinyalakan dan diatur setting suhu ke 420oC. Bahan ditimbang sebanyak 1 gram dan dimasukkan dalam labu Kjeltec. Ditambahkan 15 ml asam sulfat pekat dan 2 biji tablet Kjeldahl. Kran air aspirator dinyalakan atau digunakan lemari asam dengan exhaust pump. Tabung Kjeltec dimasukkan ke dalam digestor. Sampel didestruksi selama 45–60 menit. Destruksi dinyatakan selesai jika sampel berubah menjadi jernih dan asap putih tidak terbentuk lagi. Setelah destruksi berakhir, angkat labu Kjeltec dari digestor dan biarkan dingin ( $\pm$  15 menit).

Proses destilasi, labu Kjeltec diletakkan ke dalam alat distilasi otomatis, tombol AUTO ditekan (telah disetting pemasukan aquadest 75 ml dan alkali - NaOH 40% - 25 ml, serta steaming time 4 menit, sesuai standar Tecator). Sebanyak 25 ml asam borat 4% (yang mengandung indikator methyl red dan brom cresol green dalam metanol) ditakar sebagai penampung destilat dalam erlenmeyer. Dinaikkan posisi erlenmeyer hingga pipa distilat tercelup dan berada di permukaan dasar erlenmeyer. Alat distilasi bekerja otomatis, biarkan sampai proses selesai. Sampel dititrasi dengan HCl titrisol 0,2N sampai titik akhir titrasi. HCl yang digunakan dicatat, nitrogen dan protein dihitung dengan rumus sebagai berikut.

$$N (\%) = 6,25 \times \frac{14,01 \times (\text{sampel} - \text{blanko}) \times 0,2}{\text{berat sampel} \times 10}$$

$$\text{Protein} (\%) = \% N \times \text{factor konversi}$$

**Penentuan kadar lemak total metode Soxhlet modifikasi Tecator – Swedia**

Sebanyak 1 gram sampel dibungkus dengan kertas saring masukkan dalam extraction thimble (yang sudah ditimbang) dan pasang pada extraction unit. Kran kondensor dibuka dan service unit disiapkan. Dituangkan solvent (petroleum benzen 80-



100oC) 75 ml ke dalam extration cup dan dicelupkan thimblenya (yang sudah berisi sampel), condenser valve dibuka. Extraction mode knop diarahkan ke posisi boiling, dibiarkan selama 25 menit. Lalu dipindahkan ke posisi rinsing selama 25 menit. condenser valve ditutup dan nyalakan kipas pada service unit, biarkan selama 10 menit. Extraction thimbles dikeluarkan dari extraction cup dan dimasukkan ke dalam oven pada suhu 105oC selama 30 menit. Lalu dimasukkan ke dalam eksikator dan ditimbang sampel setelah sampel dingin betul.

Penghitungan :

$$\% \text{ kadar lemak} = \frac{C - A}{B} \times 100\%$$

Dimana : A = berat kertas saring + ikatan + sampel akhir

C = berat kertas saring + ikatan + sampel awal

B = berat sampel

### **Analisis Acid Detergent Fiber (ADF)**

Analisis ADF dilakukan menggunakan metode AOAC (1990). Sebanyak 1 g sampel dimasukan ke dalam 250 ml labu Erlenmeyer volume 250 ml dan ditambahkan 100 ml larutan asam deterjen yang dibuat dari 20 g asetilmetil amonium bromida yang dilarutkan dalam 1 l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N. Labu yang berisi campuran tersebut dipanaskan selama 2-6 menit. Setelah didinginkan campuran disaring dan bagian residu dicuci dengan aquadest panas sebanyak 3 kali dan terakhir dicuci dengan larutan aseton. Residu selanjutya ditempatkan dalam cawan dan dipanaskan dalam oven pada suhu 105°C selama 3-4 jam dan ditimbang. Kadar ADF ditentukan dengan rumus :

$$\text{ADF (\%)} = \frac{\text{Berat cawan + Residu ADF} - \text{Berat Cawan}}{\text{Berat Sampel}} \times 1000$$

### **Analisis Neutral Detergent Fiber (NDF)**

Analisis NDF dilakukan menggunakan metode AOAC (1990). Sebanyak 1 g sampel dimasukan ke dalam 250 ml labu Erlenmeyer volume 250 ml ditambahkan 1 g

natrium sulfat dan 100 ml larutan neutral deterjen yang dibuat dari campuran 18,6 g EDTA dan 8,6 natrium tetraborat dalam 100 ml aquadest digunakan sebagai larutan 1. Selanjutnya dibuat larutan 2 yang terdiri atas 30 ml natrium lauril sulfat dan 10 ml etoksi etanol dan kedalam campuran tersebut ditambahkan 450 g natrium hidrogen fosfat dalam 100 ml aquadest. Kedua larutan (larutan 1 dan 2) dicampur homogen dipanaskan selama 1 jam. Setelah didinginkan campuran disaring dan residu dicuci 3 kali dengan aquadest. Residu selanjutnya disimpan dalam cawan dan dipanaskan dalam oven pada suhu 105°C selama 3-4 jam dan ditimbang. Kadar NDF ditentukan dengan :

$$\text{NDF (\%)} = \frac{\text{Berat cawan + Residu NDF} - \text{Berat Cawan}}{\text{Berat Sampel}} \times 100$$

#### **Analisis Selulosa(Gopal dan Ranjhan, 1980)**

Sebanyak 1 g sampel dimasukan ke dalam labu Erlenmeyer 150 ml ditambahkan 12,5 ml asam asetat glasial dan 1,5 ml asam pitrat. Labu yang berisi campuran tersebut dipanaskan dalam penangas air selama 20 menit. Larutan selanjutnya disaring dalam penyaring asbes dan residu yang diperoleh dicuci secara bertahap dengan air panas, alkohol, bensen dan terakhir dicuci dengan alkohol. Sampel kemudian dipanaskan pada suhu 100°C dan ditimbang sampai beratnya konstan. Sampel kering selanjutnya dipanaskan dalam cawan pada suhu 550°C selama 30 menit dan ditimbang. Kadar selulosa ditentukan dengan rumus

$$\text{Selulosa (\%)} = \frac{(\text{Berat cawan + asbes + material sebelum pengabuan}) - (\text{Berat Cawan + berat material setelah pengabuan})}{\text{Berat Sampel Kering}} \times 100$$

#### **Analisis Hemiselulosa(Gopal dan Ranjhan, 1980)**

Sebanyak 1 g sampel kering tongkol jagung diekstraksi dengan 75 ml asam sulfat 8% dalam percolator dan dididihkan selama 1 jam. Campuran didinginkan, disaring dan

residu dikeringkan pada suhu 105°C sampai berat konstan. Kadar hemiselulosa ditentukan dengan rumus :

$$\text{Hemiselulosa (\%)} = \frac{\text{Berat Residu sampel} - \text{Berat sampel setelah diekstraksi}}{\text{Berat Sampel Kering}} \times 100$$

### **Analisis Lignin (Gopal dan Ranjhan, 1980)**

Penentuan lignin ditentukan dari residu hasil ekstraksi hemiselulosa. Cawan yang berisi residu sampel yang telah diekstraksi hemiselulosa disimpan dalam beaker glass yang berisi 50 ml asam sulfat 72%.

### **Penentuan kadar pektin (AOAC, 2000)**

Sebanyak 5 g sampel serbuk daun seligi diekstrak dengan 400 ml HCl 0,05N selama 2 jam pada suhu 90°C lalu ditambahkan air yang hilang karena penguapan. Selanjutnya didinginkan dan dipindahkan seluruh isinya ke dalam labu takar 500 ml, ditepatkan sampai tanda batas dengan air. Dikocok merata dan disaring dengan kertas Whatman no. 4 lalu filtrat dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Ekstraksi diulang dengan cara memanaskan ekstrak campuran sebelum penyaringan atau dididihkan lagi dengan penambahan HCl 0,01N sebanyak 10 ml dan dididihkan selama 30 menit, lalu disaring dan endapan dicuci dengan air panas. Ditambahkan HCl 0,05N sebanyak 50 ml pada residu, lalu dididihkan selama 10 menit dan disaring. Seluruh filtrat yang diperoleh dikumpulkan, didinginkan dan ditepatkan sampai volume tertentu.

Pada penetapan sampel, sebanyak 100-200 ml alikuot dipipet dan ditambahkan sebanyak 250 ml air, lalu dinetralkan dengan NaOH 1N dengan menggunakan Phenolftalin sebagai indikator. Ditambahkan lagi 10 ml NaOH 1N sambil diaduk dan dibiarkan semalam. Ditambahkan 50 ml asam asetat 1N, sesudah 5 menit ditambahkan 25 ml kalsium klorida 1N dan diaduk merata. Filtrat disaring dengan kertas saring yang sudah dibasahi dengan air panas dan dikeringkan dalam oven 102°C didinginkan, lalu ditimbang

dan diulang sampai beratnya konstan. Selanjutnya endapan dicuci dengan air panas yang hampir mendidih sampai bebas dari klorida. Kertas saring yang berisi endapan dipindahkan ke dalam wadah timbang dan dikeringkan pada 100oC selama semalam, lalu didinginkan dalam desikator dan ditimbang.

$$\% \text{ Kalsium pektat} : \frac{\text{Perak kalsium pektat} \times \text{volume filtrat}}{\text{ml filtrat yang digunakan untuk penetapan} \times \text{berat sampel (mg)}} \times 100\%$$

### **Penentuan kadar flavonoid, saponin dan tannin (metode Spektrofotometri UV-VIS).**

Penentuan kadar flavonoid menggunakan metode pharmakope swiss VII (Morais et al, 1999). Larutan HMT sebagai pereaksi yang akan digunakan adalah larutan 0,5% b/v heksametilen-tetramin, larutan HCl 25%, larutan asam asetat glasial (larutan asam asetat glasial 5% v/v dalam metanol), dan larutan AlCl<sub>3</sub> (larutan 2% AlCl<sub>3</sub> dalam larutan asam asetat glasial). Sedangkan larutan induk adalah ekstrak yang setara dengan 200 mg serbuk pakan dimasukkan ke dalam labu alas bulat, ditambah dengan 1 ml larutan HMT, 20 ml aseton dan 2 ml larutan HCl, dihidrolisis dengan cara direfluks selama 30 menit. Campuran hasil hidrolisis disaring dengan menggunakan kapas, filtrat dimasukkan ke dalam labu ukur 100,0 ml. Residu direfluks kembali dengan 20 ml aseton selama 30 menit, disaring dan filtrat dicampur ke dalam labu ukur 100,0 ml. Campuran filtrat dalam labu ukur ditambah dengan aseton sampai tepat 100,0 ml. Diambil 20,0 ml filtrat dimasukkan ke dalam corong pisah, ditambah dengan 20 ml air dan diekstraksi kocok, pertama dengan 15 ml etil asetat, kemudian 2 kali dengan 10 ml etil asetat. Fraksi etil asetat dikumpulkan dan ditambah dengan etil asetat sampai tepat 50,0 ml dalam labu ukur. Larutan blangko: Diambil 10,0 ml larutan induk, ditambah dengan larutan asam asetat glasial sampai 25,0 ml dalam labu ukur. Larutan sampel diambil 10 ml larutan induk, ditambah dengan 1 ml larutan AlCl<sub>3</sub> 32 dan larutan asam asetat glasial sampai 25,0 ml

dalam labu ukur. Pengukuran dilakukan 30 menit setelah penambahan  $\text{AlCl}_3$  dengan menggunakan spektrofotometer UV-vis pada panjang gelombang 425 nm.

Penetapan kadar saponin dengan Spektrofotometer UV-vis. Sebanyak 10 ml dari masing-masing filtrat pada larutan percobaan Pada uji kuantitatif saponin dari Quillaja bark, ekstrak etanol sampel pakan dengan konsentrasi 0,1 % dalam metanol ditotolkan di atas pelat silika gel 60F254 dan dikembangkan dengan pelarut pengembang campuran n-heksana-etil asetat (4:1) dalam chamber (Cammag 25267). Penampak noda adalah anisaldehyda asam sulfat (merah ungu) atau antimon klorida (merah muda) sebagai saponin.

Penentuan kadar tannin metode folin ciocalteu dan spektrofotometri UV-VIS (Morais et al, 1999). Pada pembuatan larutan sampel/larutan baku (asam galat), larutan baku induk dibuat dengan cara menimbang sebanyak 10,0 mg asam galat, dilarutkan dalam 100 ml aquadest dalam labu ukur 100,0 ml (100 ppm). Sedangkan Larutan baku sampel dibuat dengan konsentrasi 1 ppm; 1,5 ppm; 2 ppm; 2,5 ppm; 3 ppm; 3,5 ppm; 4 ppm. Larutan standar dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml, ditambah dengan 500 (l reagen FC digoyang selama 1 menit dan ditambah 2,0 ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (15 % b/v), digoyang selama 1 menit lalu ditambah dengan aquadest sampai garis tanda (10,0 ml). Setelah itu dipindahkan kedalam tabung reaksi kecil dan ditutup dengan aluminium foil dan diletakkan didalam penangas air 50oC selama 5 menit, lalu didinginkan dan diukur absorbannya pada panjang gelombang maks. 756 nm. Setelah diukur absorbannya, dicari persamaan regresi antara kadar (konsentrasi) dengan absorban, kemudian dihitung koefisien korelasi (r) dan koefisien korelasi dari fungsi untuk mengevaluasi linieritas. Dalam pembuatan larutan sampel, masing-masing sampel ditimbang sejumlah 50 mg. Setelah diperoleh supernatan sampel, setiap supernatan diambil 75 l; tahap selanjutnya sama dengan larutan standar diatas. Setelah diukur absorbannya dihitung kadar rata-rata.

## **Analisis Data**

Data yang diperoleh dilakukan analisis statistika dengan analisis varian, apabila terdapat perbedaan akan dilanjutkan dengan uji beda nyata jujur (BNJ) menurut petunjuk Steel dan Torrie (1999) dengan bantuan SPSS 17 for Windows.