

BAB 4. METODE PENELITIAN

Penelitian eksperimental telah dilaksanakan di desa Sumberingin, Kec. Sanankulon Kab. Blitar selama 3 bulan, mulai bulan Februari sampai dengan Mei 2015. 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, fosfor, ADF, NDF, selulosa, hemiselulosa, silika, pektin dan lignin dilakukan di laboratorium milik Fakultas Peternakan UB. Penetapan senyawa metabolik pakan terdiri dari flavonoid, tanin dan saponin pada pakan dilakukan di laboratorium milik PAU Pangan dan Gizi- UGM. Penelitian eksperimental difokuskan untuk menguji mekanisme penurunan kadar lemak, kolesterol, LDL dan peningkatan HDL telur, serta peningkatan respon imun pada puyuh dilakukan di Kandang milik Kelompok peternak puyuh “Mandiri” Desa Sumberingin, laboratorium Teknologi Pertanian Untag Surabaya, lab. Faal FK-UB dan lab. milik PAU Pangan dan Gizi- UGM. Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) pola split plot dalam waktu yang diulang sebanyak 5 kali. Perlakuan penambahan serbuk daun seligi sebanyak 0, 2, 4, 6 dan 8% per kg pakan komersial, apabila terdapat perbedaan di antara perlakuan dilanjutkan dengan uji beda nyata jujur.

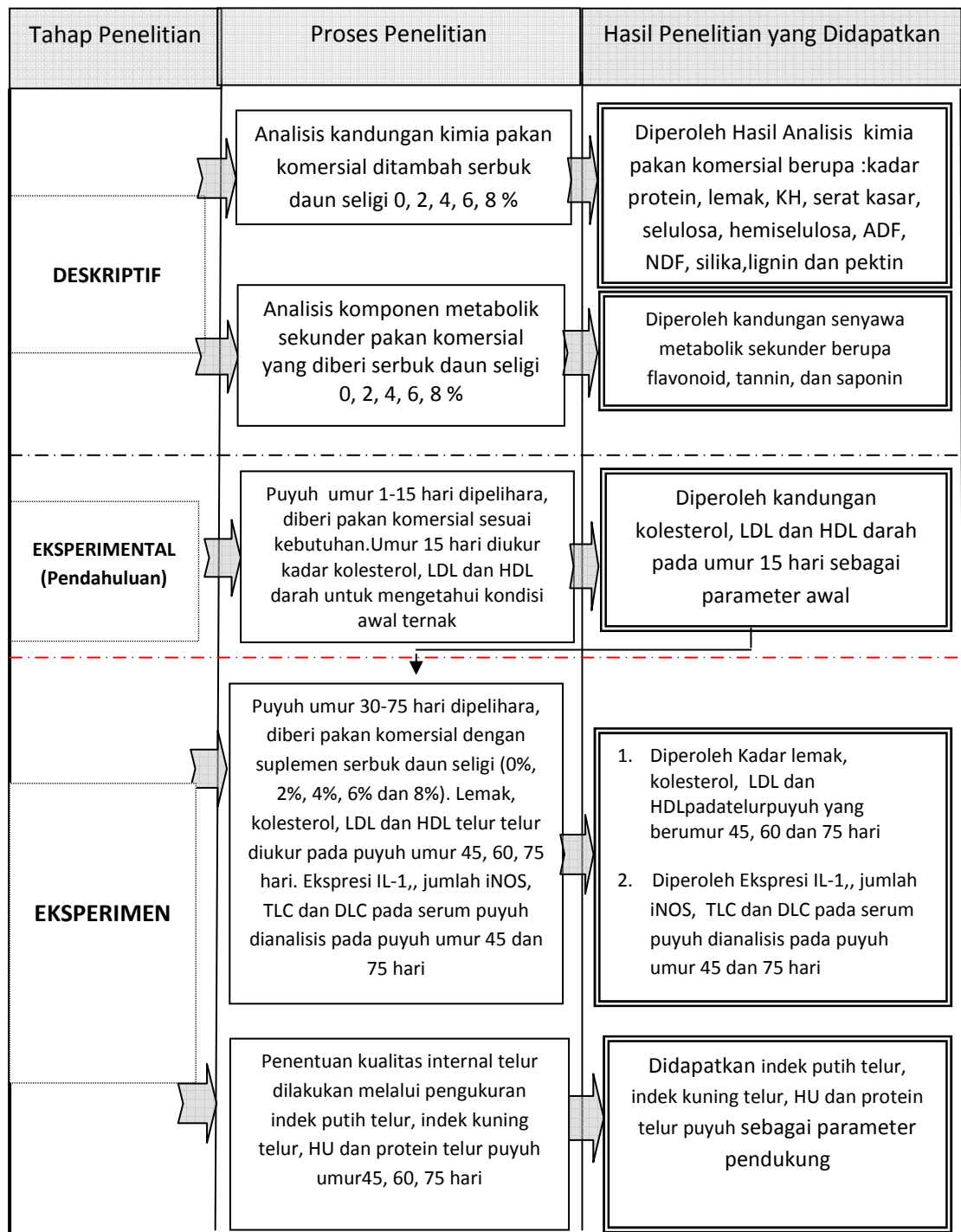
Sebanyak 100 ekor puyuh umur 7 hari ditempatkan dalam kandang kelompok secara acak masing-masing berisi 20 ekor. Kandang sudah dilengkapi dengan tempat pakan, tempat minum dan lampu penerangan. Puyuh percobaan berasal dari hasil penetasan peternakan rakyat yang berlokasi di desa Kalipucung Kecamatan Sanankulon Kabupaten Blitar. Puyuh diberi pakan jadi produksi

pabrik pakan ternak. Untuk mengetahui kondisi awal ternak, diambil secara acak sebanyak 5 ekor puyuh umur 15 hari dilakukan pengukuran kadar kolesterol, LDL dan HDL serum dengan cara puyuh disembelih dan ditampung darahnya. Analisis kadar kolesterol, LDL dan HDL darah dilakukan di Lab. Faal milik Fakultas Kedokteran UB. Umur 22- 29 hari puyuh diberi pakan komersial yang dicampur dengan pakan perlakuan sedikit demi sedikit agar ternak dapat beradaptasi. Setelah selesai masa adaptasi (umur 30- 75 hari) ternak diberi tanda pada bagian kaki, diberi pakan perlakuan dengan takaran sesuai kebutuhan dan air minum diberikan secara ad libitum.

Pemeriksaan lemak (metode Soxhlet modifikasi Tecator – Swedia), kolesterol, LDL dan HDL (metode Liebermann Burchard) pada telur puyuh dilakukan saat puyuh berumur 45, 60 dan 75 hari. Parameter respon imun diamati sebanyak 5 ekor ternak pada setiap kelompok perlakuan pakan dengan cara ternak disembelih dan ditampung darahnya. Sampel darah dari setiap ternak dikumpulkan dalam botol berisi EDTA (2,5 mg/5 ml darah) yang akan digunakan untuk uji darah 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.

Pengamatan respon imun meliputi jumlah leukosit (TLC), deferensial leukosit (DLC), jumlah iNOS dan Ekspresi IL-1 (metode ELISA) diukur pada saat puyuh berumur 45 dan 75 hari (akhir penelitian). Pengukuran indeks putih telur, indeks kuning telur, Haugh Unit (HU), kadar protein telur sebagai parameter pendukung kualitas internal telur dilakukan pada telur saat ternak berumur 45, 60 dan 75 hari. Pengukuran parameter pendukung dilakukan di lab. Teknologi Industri Pertanian milik Politeknik UNTAG Surabaya. Pengambilan darah untuk

uji imunitas pada puyuh dilakukan dengan cara puyuh disembelih dan ditampung darahnya, masing-masing sebanyak 5 ekor pada setiap perlakuan. Tahapan penelitian yang merupakan kerangka operasional penelitian disajikan pada Gambar 3.1 berikut.



Gambar 3.1 Kerangka Operasional Penelitian

Prosedur pelaksanaan penelitian

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. Uji kandungan proksimat dan metabolik sekunder pakan dengan penambahan serbuk daun seligi 0%, 2%, 4%, 6% dan 8%.

1. Uji kimia pakan yang disuplemen serbuk daun seligi :

Penentuan Kadar Air

Bahan berupa serbuk ditimbang sebanyak 1-2g dalam botol timbang yang telah diketahui beratnya. Lalu dikeringkan dalam oven pada suhu 100-105°C selama 3-5 jam. Bahan didinginkan dalam eksikator dan ditimbang. Bahan dipanaskan lagi dalam oven 30 menit, didinginkan dalam eksikator dan ditimbang lagi, perlakuan diulang sampai tercapai berat konstan (selisih

penimbangan berturut-turut kurang dari 0,2mg). Pengukuran berat merupakan banyaknya air dalam bahan.

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 sampel 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 H₂SO₄ 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 dimasukkan 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 dimasukkan 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 90oC 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 100°C selama semalam, lalu didinginkan dalam desikator dan ditimbang.

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

2. Uji kandungan metabolik sekunder pakan yang disuplemen serbuk daun seligi

Penentuan kadar flavonoid metode pharmakope swiss VII (Morais et al, 1999)

A. Pereaksi : Larutan HMT 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 AlCl₃ (larutan 2% AlCl₃ dalam larutan asam asetat glasial).

B. Larutan induk : Ekstrak yang setara dengan 200,0 mg simplisia 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.

C. Larutan blangko: Diambil 10,0 ml larutan induk, ditambah dengan larutan asam asetat glasial sampai 25,0 ml dalam labu ukur.

D. Larutan sampel : Diambil 10,0 ml larutan induk, ditambah dengan 1 ml larutan $AlCl_3$ 32 dan larutan asam asetat glasial sampai 25,0 ml dalam labu ukur.

E. Pengukuran : Pengukuran dilakukan 30 menit setelah penambahan $AlCl_3$ dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 425 nm.

Pemeriksaan saponin

Penetapan senyawa saponin dengan uji reaksi warna dan KLT (Harborne, 1996). Sebanyak 10 ml dari masing-masing filtrat pada larutan percobaan flavonoid dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dikocok secara vertikal kuat-kuat selama 10 detik. Terbentuknya busa setinggi 1 sampai 10 cm yang stabil kurang dari 10 menit dan tidak hilang dengan penambahan 1 tetes HCl 2N menunjukkan adanya saponin.

Pada uji KLT, ekstrak etanol 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 tanin 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 Na_2CO_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.

c. Uji kandungan kolesterol, LDL, dan HDL pada telur puyuh yang diberi pakan komersial dengan penambahan serbuk daun seligi

Pada penentuan kadar kolesterol total, LDL dan HDL dalam penelitian ini menggunakan metode colorimetri Liberman-Burchard.

c. Prinsip Pemeriksaan

Bila kolesterol direaksikan dengan asam asetat anhidrit dan asam sulfat pekat dalam lingkungan bebas air, maka akan terbentuk warna hijau biru yang intens akibat pembentukan polimer hidrokarbon tak jenuh. Hasil reaksi antara kolesterol dengan pereaksi warna yang membentuk kompleks berwarna hijau biru tersebut diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis.

1. Sampel 1 mL/1 gr dimasukkan ke dalam tabung sentrifuge yang telah berisi 10 mL aseton:alkohol (1:1) kemudian diaduk sampai rata.
2. Tabung yang berisi bahan tadi dipanaskan pada waterbath sampai mendidih. Tabung kemudian diangkat dan didinginkan dalam temperatur kamar, setelah dingin disentrifuge pada kecepatan 1750 rpm selama 15 menit.
3. Supernatan (bagian bening) yang terbentuk dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian diuapkan dengan dipanaskan dalam waterbath sampai kering dan akan terbentuk pasta (residu).
4. Residu dilarutkan dalam kloroform dan dihomogenisasi (langkah ini merupakan langkah pengenceran yang disesuaikan dengan volume pengenceran dari masing-masing sampel yang diperiksa. Setelah diencerkan sampel ditambah dengan 2 mL campuran asam sulfat dan asetat anhidrat (1:30).
5. Larutan residu yang telah diencerkan tadi ditempatkan pada ruang gelap selama 5 menit hingga terbentuk warna hijau. Hasil warna yang diperoleh dibaca dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 680 nm.
6. Membuat larutan blanko yang berisi 2 mL kloroform dan 2 mL campuran asam sulfat dan asetat anhidrat (1:30)

7. Hasil pembacaan dimasukkan ke dalam persamaan regresi dari kadar kolesterol standart.

d. Uji Imunitas Puyuh yang diberi perlakuan pakan komersial dan penambahan serbuk daun seligi

1. Pengamatan Ekspresi interleukin 1 β (IL-1 β) dengan teknik *enzyme-linked immuno sorbent Assay* (ELISA)

Pengamatan interleukin 1 β dalam penelitian ini menggunakan metode Sandwich-ELISA. Mikro plate ELISA yang ada dalam kit telah dilapisi dengan antibodi spesifik untuk IL-1 β . Standar atau sampel yang ditambahkan pada vial mikro plate ELISA sesuai dan terikat oleh antibodi spesifik. Selanjutnya deteksi antibodi terbiotinilasi khusus untuk IL-1 β dan konjugat Avidin-Horse radish Peroxidase (HRP) ditambahkan pada setiap mikro plate dan diinkubasi. Larutan substrat ditambahkan ke dalam masing-masing vial dengan baik dan hanya vial yang mengandung IL-1 β , deteksi antibodi terbiotinilasi dan Avidin-HRP konjugat akan muncul berwarna biru. Reaksi enzim-substrat diakhiri dengan penambahan larutan asam sulfat dan warna berubah menjadi kuning. Kepadatan optik (OD) diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 450 nm \pm 2 nm. Nilai OD sebanding dengan konsentrasi IL-1 β . Penghitungan konsentrasi IL-1 β dalam sampel dilakukan dengan membandingkan OD sampel dengan kurva standar.

Prosedur Kerja

1. Pengumpulan dan penyiapan sampel

Sampel berupa serum terlebih dahulu disentrifugasi untuk menghilangkan padatan tersuspensi. Selanjutnya serum dibekukan semalam pada suhu 4oC.

Sampel dibiarkan pada suhu kamar selama ± 2 jam apabila akan digunakan, lalu di sentrifugasi selama 15-20 menit pada $1000 \times g$, supernatan siap diuji.

2. Sebanyak $100\mu\text{L}$ standar ditambahkan pada masing-masing vial lempeng ELISA dan campur dengan pengencer, lempeng ditutup dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 90 menit. Inkubasi dilakukan untuk mencegah penguapan dan menjamin hasil yang akurat.

3. Biotinylated deteksi Ab

Cairan pada tiap well dihapus dan jangan dicuci, segera ditambahkan sebanyak $100\mu\text{L}$ Biotinylated Deteksi Ab dengan dengan baik, tutup dengan lempeng sealer dan tekan lempeng untuk memastikan pencampuran secara menyeluruh. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Inkubasi dilakukan untuk mencegah penguapan dan menjamin hasil yang akurat.

4. Pencucian

Setiap pencucian harus dilakukan dengan baik dan diulang sebanyak tiga kali. Pencucian dengan mengisi masing-masing well dengan \pm sekitar $350\mu\text{L}$ Buffer pencuci. Alat pencuci dapat menggunakan botol semprot, multi pipet atau mesin pencuci otomatis apabila diperlukan. Penghapusan lengkap cair pada setiap langkah sangat penting. Setelah pencucian berakhir, buffer pencuci dibersihkan dengan cara lempengan dibolak-balik dan dihapus dan dibersihkan dengan kertas penyerap.

5. HRP Conjugate

Sebanyak $100\mu\text{L}$ HRP Conjugate ditambahkan dengan baik lalu ditutup dengan lempeng sealer dan diinkubasi pada 37°C selama 30 menit.

6. Pencucian

Proses pencucian kembali dilakukan pencucian sebanyak 5 kali dan dilakukan seperti pada langkah 4.

7. Substrat

Sebanyak 90 μ L substrat ditambahkan pada setiap well, lalu ditutup dengan lempeng sealer dan diinkubasi pada suhu 37 ° C selama 15 menit. Lindungi plate dari cahaya. Waktu reaksi dapat dipersingkat atau diperpanjang sesuai dengan perubahan warna yang terjadi, tetapi tidak lebih dari 30 menit. Reaksi berakhir ketika gradien warna muncul dengan jelas pada vial standar ini menunjukkan reaksi harus berakhir.

8. Larutan akhir

Tambahkan 50 μ L substrat larutan akhir pada setiap well, kemudian segera terjadi perubahan warna kuning. Perintah untuk menambahkan stop solution harus sama sebagai larutan substrat.

9. Pengukuran optical density (OD) dengan Spektrofotometer

Pada pengukuran kerapatan optik (OD) harus ditentukan terlebih dahulu nilai OD dengan baik sekaligus menggunakan *Elisa plate reader* diatur dengan panjang gelombang 450 nm. Pengguna harus membuka *micro plate reader*, memanaskan instrumen dan mengatur parameter pengujian.

10. Perhitungan hasil

Rata-rata duplikat bacaan untuk setiap standar dan sampel, kemudian dikurangi standar rata-rata nol densitas optik. Dibuat kurva standar dengan memplot nilai OD rata-rata untuk masing-masing standar pada sumbu y terhadap konsentrasi pada sumbu x dan menarik kurva terbaik melalui titik-titik pada kurva. Dengan perangkat software, maka persamaan terbaik dari kurva standar akan dihitung

dengan menggunakan nilai-nilai OD dan konsentrasi sampel standar. Penghitungan konsentrasi sampel dapat dilakukan setelah memasuki nilai OD sampel. Jika sampel telah diencerkan, maka konsentrasi dihitung dari kurva standar dan harus dikalikan dengan faktor pengenceran. Jika OD sampel melebihi batas atas kurva standar, maka harus menguji kembali setelah pengenceran. Konsentrasi sebenarnya dihitung dari konsentrasi dikalikan faktor pengenceran.

b. Pengamatan ekspresi iNOS dengan teknik ELISA

Teknik pengamatan ini menggunakan metode Sandwich-ELISA. Mikro plate ELISA yang ada dalam kit telah dilapisi dengan antibodi spesifik untuk NOS2 / iNOS. Standar atau sampel yang ditambahkan pada vial mikro plate ELISA sesuai dan terikat oleh antibodi spesifik. Selanjutnya deteksi antibodi terbiotinilasi khusus untuk iNOS dan konjugat Avidin-Horse radish Peroxidase (HRP) ditambahkan pada setiap mikro plate dan diinkubasi. Larutan substrat ditambahkan ke dalam masing-masing vial dengan baik dan hanya vial yang mengandung iNOS, deteksi antibodi terbiotinilasi dan Avidin-HRP konjugat akan muncul berwarna biru. Reaksi enzim-substrat diakhiri dengan penambahan larutan asam sulfat dan warna berubah menjadi kuning. Kepadatan optik (OD) diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang $450 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$. Nilai OD sebanding dengan konsentrasi iNOS. Penghitungan konsentrasi IL-1 β dalam sampel dilakukan dengan membandingkan OD sampel dengan kurva standar.

Prosedur kerja

1. Pengumpulan dan penyimpanan sampel

Plasma yang diperoleh menggunakan EDTA atau heparin sebagai antikoagulan, lalu sampel dicentrifuge selama 15 menit. Hasil pemisahan

berupa serum yang akan digunakan sebagai sampel, lalu dibiarkan membeku selama 2 jam pada suhu kamar atau semalam menggunakan suhu 4 °C Kumpulkan supernatan sebelumnya disentrifugasi selama 15 menit pada 1000 × g dan siap untuk diuji.

2. Sampel yang akan diuji, terlebih dahulu disentrifugasi dimaksudkan untuk menghilangkan padatan tersuspensi dan tercampur secara menyeluruh.

3. Penambahan sampel

Sebanyak 100µL Standar ditambahkan, kosong atau sampel per well. Kosong juga ditambahkan dengan Referensi Standar & Sample pengencer. Larutan ditambahkan dengan cermat di bawah lempeng mikro ELISA agar tidak berbusa. Lempengan ditutup dengan sealer. Selanjutnya diinkubasi pada 37 °C selama 90 menit.

4. Mendeteksi Biotinylated Ab

Setiap cairan dihapus dengan baik dan tidak dicuci, segera ditambahkan 100µL larutan Biotinylated Ab dengan baik. Lalu ditutup dengan plate sealer sambil sedikit ditekan untuk memastikan bahwa pencampuran menyeluruh. Inkubasi pada suhu 37 ° C selama 1 jam.

5. Pencucian

Proses pencucian well dilakukan dengan baik, diulang sebanyak tiga kali, dengan Wash Buffer sekitar 350µL pada setiap well dengan baik. Wash Buffer dapat menggunakan botol semprot, pipet multi-channel, sejenis dispenser atau mesin cuci otomatis apabila diperlukan. Selanjutnya untuk menghilangkan larutan Wash Buffer yang tersisa pada pencucian terakhir, bersihkan dengan cara membalikkan plate dan menepuknya dengan kertas penyerap.

6. HRP Conjugate

Sebanyak 100 μ L larutan HRP Conjugate ditambahkan dengan baik, lalu plate ditutup dengan sealer dan diinkubasi pada suhu 37 ° C selama 30 menit.

7. Proses pencucian diulang selama lima kali dilakukan seperti pada langkah 5.

8. Substrat

Sebanyak 90 μ L larutan substrat ditambahkan untuk setiap vial, tutup dengan plate sealer baru dan diinkubasi pada suhu 37 ° C selama 15 menit. Plate harus dilindungi dari cahaya. Waktu reaksi dapat dipersingkat atau diperpanjang sesuai dengan perubahan warna yang sebenarnya, tetapi tidak lebih dari 30 menit. Ketika gradien yang muncul di vial standar tampak jelas, maka reaksi harus diakhiri.

9. Larutan akhir

Tambahkan 50 μ Lof larutan akhir (stop solution) untuk setiap pengamatan segera setelah warna berubah menjadi kuning. Perintah untuk menambahkan stop solution harus sama sebagai larutan substrat.

10. Pengukuran *optical density* (OD) dengan Spektrofotometer

Pada pengukuran kerapatan optik (OD) harus ditentukan terlebih dahulu nilai OD dengan baik sekaligus menggunakan *micro plate reader* diatur dengan panjang gelombang 450 nm. Pengguna harus membuka micro plate reader, memanaskan instrumen dan mengatur parameter pengujian.

11. Perhitungan hasil

Rata-rata duplikat bacaan untuk setiap standar dan sampel, kemudian dikurangi standar rata-rata nol densitas optik. Dibuat kurva standar dengan memplot nilai OD rata-rata untuk masing-masing standar pada sumbu y terhadap konsentrasi pada sumbu x dan menarik kurva terbaik melalui titik-

titik pada kurva. Dengan perangkat software, maka persamaan terbaik dari kurva standar akan dihitung dengan menggunakan nilai-nilai OD dan konsentrasi sampel standar. Penghitungan konsentrasi sampel dapat dilakukan setelah memasuki nilai OD sampel. Jika sampel telah diencerkan, maka konsentrasi dihitung dari kurva standar dan harus dikalikan dengan faktor pengenceran. Jika OD sampel melebihi batas atas kurva standar, maka harus menguji kembali setelah pengenceran. Konsentrasi sebenarnya dihitung dari konsentrasi dikalikan faktor pengenceran.

c. Perhitungan jumlah leukosit (TLC)

Bahan dan alat.

Pipet, kamar hitung, larutan Turk, EDTA, tabung reaksi, alkohol 70%, dan kapas.

Prosedur kerja.

Secara hati-hati bagian badan dan kaki ayam dipegang sehingga tidak meronta. Jarum suntik dimasukkan ke bagian sayap (*vena brachialis*) yang sebelumnya dibersihkan dengan alkohol. Darah diambil 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:

$$\text{leukosit/cu.mm atau jumlah sel leukosit} = \frac{\text{Jumlahsel} \times 200 (\text{larutan 1: 20x10})}{4}$$

dalam kotak sudut kamar hitung x 50 = leukosit/cu.mm.

d. Penghitungan deferensial leukosit (DLC)

Pemeriksaan dilakukan 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 30-45⁰. 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 di udara 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 per 100 leukosit.

e. Pembuatan preparat imuno histokimia

Bahan dan alat : Inkubator, xylo, alkohol absolut III, II, I, 95%, 90%, 80%, dan 70%, diionizewater (DW), H₂O₂, metanol, PBS, serum normal, *Inducible Nitric Oxyd Synthase* (iNOS), antibodi primer, antibodi sekunder (biotinilasi), 3,3'-diaminobenzidine (DAB), hematoksilin.

Prosedur kerja

Jaringan dipotong menggunakan mikrotom dengan ketebalan 3-5 μ m. Deparafinisasi dilakukan dengan larutan xylol (III, II, dan I) masing-masing larutan 5 menit. Kemudian dilakukan rehidrasi dengan alkohol bertingkat, dimulai dari alkohol absolut III, II, I, 95%, 90%, 80%, dan 70% pada masing-masing larutan selama 5 menit. Selanjutnya pencucian dilakukan dengan menggunakan *diionize water* (DW) selama 15 menit. Penghilangan peroksidase endogen menggunakan (0,5ml H₂O₂ ditambah 50 ml metanol) selama 15 menit. Pembilasan dilakukan dengan menggunakan DW selama 7 menit dua kali dan PBS selama 7 menit dua kali. Kemudian preparat ditetesi dengan serum normal pada gelas obyek secara merata, dimasukkan kedalam kotak preparat (*humiditychamber*) ditambah kertas tissue dan ditetesi dengan PBS untuk menjaga kelembaban. Selanjutnya preparat dimasukkan kedalam inkubator pada suhu 37°C selama 45 menit. Pencucian dengan PBS masing-masing 5 menit dilakukan 3 kali :

1. Jaringan ditetesi dengan antibodi primer terhadap enzim *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS), kemudian diinkubasi pada suhu 4°C selama 1 malam. Kemudian dilakukan pencucian dengan PBS masing-masing 5 menit sebanyak 3 kali.
2. Selanjutnya preparat ditetesi dengan antibodi sekunder (biotinilasi), diinkubasi pada suhu 37°C selama 35 menit. Pencucian dengan PBS masing-masing 5 menit sebanyak 3 kali. Ditetesi dengan peroksidase inkubasikan pada suhu 37°C selama 30 menit. Pencucian dengan PBS masing-masing 5 menit 3 kali.
3. Pemberian chromogen dilakukan dengan cara penetesan larutan 3,3'-diaminobenzidine (DAB), diinkubasikan pada suhu 37°C selama 35 menit.

Pencucian dengan PBS masing-masing 5 menit sebanyak 3 kali. *Counterstain* menggunakan hematoksin dilakukan dengan cara meneteskan sampai rata dan dibiarkan 15 detik lalu dicuci dengan DW. Dehidrasi dilakukan dengan larutan alkohol berseri 70%, 80%, 90%, dan 100% serta alkohol absolut I, II, dan III. Pada masing-masing larutan dibiarkan selama 1 menit. *Clearing* dilakukan dengan Xylol (I, II, dan III). Penutupan preparat (*mounting*) dilaksanakan dengan segera ditutup dengan *coverglass*. Evaluasi pewarnaan imunohistokimia dilakukan dengan dua metode. Pewarnaan menggunakan antibodi primer terhadap iNOS dilanjutkan dengan penghitungan secara kuantitatif, yaitu dengan menghitung imunoreaktivitas positif menggunakan lensa obyektif 40x pada 5 lapang pandang, kemudian menghitung rata-rata. Sedangkan hasil pewarnaan menggunakan antibodi primer IBD. Kemudian dievaluasi secara deskriptif.

e. Uji Kualitas Internal Telur Puyuh

Pengukuran Indeks Putih Telur dihitung dengan menggunakan alat jangka sorong untuk mengukur tinggi putih telur dan lebar putih telur. Telur yang telah mendapat perlakuan masing-masing sebanyak lima butir diukur Indeks Putih Telurnya. Hasil pengamatan Indeks Putih Telur dicatat pada tabel hasil pemeriksaan. Rumus Indeks Putih Telur menurut (Laily dan Suhendra, 1979).

$$\frac{T}{\frac{1}{2} (L1 + L2)}$$

Keterangan : T : Tinggi Putih Telur, L1 : Lebar Putih Telur, L2 : Panjang Putih Telur.

Pengukuran Indeks Kuning Telur dipecahkan di atas bidang datar dan licin (kaca). Kuning telur dipisahkan dari putih telur secara hati-hati. Indeks Kuning Telur diukur dengan menggunakan alat jangka sorong untuk tinggi

kuning telur dan lebar kuning telur. Telur yang telah mendapat perlakuan masing-masing sebanyak enam butir diukur Indeks Kuning Telurnya. Komponen yang digunakan untuk mengukur indeks kuning telur adalah tinggi kuning telur dan diameter kuning telur (Sirait, 1986). Nilai yang diperoleh dimasukkan dalam formulasi sebagai berikut.

$$IKT = \frac{\text{tinggi kuning telur (mm)}}{\text{diameter kuning telur (mm)}}$$

Hasil pengamatan indeks kuning telur dicatat pada tabel hasil pemeriksaan. Penghitungan nilai HU menggunakan rumus Yuwanta (2004).

$$HU = 100 \log (h+7,57-1,7.W^{0,37})$$

Ket: HU = Haugh Unit h = tinggi albumen pekat (mm) W = bobot telur (g)

Analisis Statistika

Data yang diperoleh dilakukan penghitungan analisis statistika dengan analisis varian yang dilanjutkan dengan uji beda nyata jujur menurut petunjuk Steel dan Torie (1999) dengan bantuan *Microsoft Excell 2003* dan *SPSS 17 for Windows*.