

BAB III

METODE PENELITIAN

A. DESAIN PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental laboratorium dengan tema imunologi farmasetik.

B. TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Juni hingga September 2013, di Laboratorium Penelitian Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta dan Balai Besar Veteriner Wates, Yogyakarta.

C. SUBYEK PENELITIAN

Burung puyuh yang digunakan sebanyak 25 ekor diletakkan dalam kandang yang dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan. Tiap kelompok terdiri dari 5 ulangan secara individual.

1. Kelompok I : puyuh tanpa diinduksi vaksin AI H5N1 dan tanpa suplementasi jus daun lidah buaya sebagai kontrol nol.
2. Kelompok II : puyuh diinduksi vaksin AI H5N1 dan tanpa suplementasi jus daun lidah buaya sebagai kontrol negatif.
3. Kelompok III : puyuh diinduksi vaksin AI H5N1 dan suplementasi jus daun lidah buaya dosis 1.

4. Kelompok IV : puyuh diinduksi vaksin AI H5N1 dan suplementasi jus daun lidah buaya dosis 2.
5. Kelompok V : puyuh diinduksi vaksin H5N1 dan suplementasi jus daun lidah buaya dosis 3.

D. VARIABEL PENELITIAN

1. Variabel bebas

Dosis jus daun lidah buaya yaitu 1 ml; 2,5 ml; dan 4 ml tiap 250 g bb.

2. Variabel terkontrol

Spesies/galur puyuh : *Cortunix Japonica*

Berat badan puyuh : 250-350 gram.

Jenis kelamin : betina.

Umur puyuh : 2 bulan.

Pakan puyuh : pakan ayam BR Ad2 dengan kandungan PK 15,75%, ME 2.850 kcal/kg, Ca 3,27% dan P 1,08%.

Kondisi fisik puyuh : sehat.

Kondisi kandang : Lokasi kandang harus jauh dari kebisingan, kandang harus kering, sirkulasi udara harus lancar, kandang tidak menempel pada tanah, dan kandang harus mendapat cahaya matahari yang cukup.

Suhu kandang : 20-25 °C.

Kelembaban : 30-80%.

3. Variabel tergantung

Kadar IgY dalam telur puyuh.

E. DEFINISI OPERASIONAL

1. Tanaman lidah buaya : penelitian ini menggunakan lidah buaya jenis *Aloe barbadensis Mill.* dengan kriteria cukup ukurannya (panjang daun 30-40 cm, lebar 3-4 cm), dan dipanen saat umur daun mencapai 3 bulan.
2. Dosis lidah buaya : lidah buaya yang digunakan dalam penelitian ini adalah daging atau gel dari daunnya yang kemudian dibuat dalam bentuk jus dan diberikan dalam ukuran dosis 1 ml; 2,5 ml; dan 4 ml/250 g bb terhadap kelompok perlakuan hewan uji.
3. Hewan uji : penelitian ini menggunakan hewan uji burung puyuh yang berasal dari spesies/galur *Coturnix japonica* dengan berat badan 350-250 gram dan berumur 2 bulan.
4. Titer IgY : kadar IgY dalam kuning telur puyuh yang diukur peningkatannya dengan metode uji HI.

F. ALAT DAN BAHAN

1. Bahan

Puyuh berumur 2 bulan; pakan ayam BR Ad2 dengan kandungan PK 15,75%, ME 2.850 kcal/kg, Ca 3,27% dan P 1,08%; daun lidah buaya diambil dari wilayah Kasihan, Bantul, Yogyakarta; vaksin AI H5N1 (Medivac®) produksi PT Medion; akuades; bahan untuk uji HI serum antara lain: PBS (*Phosphate Buffered Saline*); buffer A (KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , NaCl fisiologis), eritrosit 0,5%; dan antigen AI subtipe H5N1 dari Balai Besar Veteriner, Wates, Yogyakarta.

2. Alat

Alat-alat yang digunakan adalah: alat-alat gelas yang lazim digunakan di laboratorium, *blender juice*, seperangkat alat pemeliharaan puyuh, timbangan, spuit injeksi 3 cc (terumo), *ependrof tube*, neraca elektrik (Shimadza tipe LS-6DT), mikropipet 100 μl (Socorex), *microcentrifuge* (Ependrof centrifuge, tipe 5417 R), *microplate 96-well u bottom*, dan *blue tip*.

G. CARA KERJA

1. Pembuatan jus daun lidah buaya

Daun lidah buaya yang digunakan adalah yang sudah cukup ukurannya, diperoleh dari Tamantirto, Kasihan, Bantul, Yogyakarta. Awal dari pelaksanaan percobaan adalah pemanenan daun lidah buaya. Daun lidah buaya dipotong dari tanamannya kemudian dicuci menggunakan akuades untuk menghilangkan kotoran dan bakteri yang terdapat pada

permukaan lidah buaya tersebut. Selanjutnya dikupas dan dagingnya lalu dipotong kecil-kecil untuk dimasukkan ke dalam *blender*. Setelah didapatkan jus daun lidah buaya, maka dilakukan penyaringan.

2. Perlakuan pada hewan uji

Pembagian masing-masing hewan uji adalah sebagai berikut, puyuh yang digunakan sebanyak 25 ekor, diletakkan pada kandang baterai dan dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan. Tiap kelompok terdiri dari 5 ulangan secara individual.

1. Kelompok I : puyuh tanpa diinduksi vaksin AI H5N1, dan tanpa dilakukan suplementasi jus daun lidah buaya sebagai kontrol nol.
2. Kelompok II : puyuh diinduksi vaksin AI H5N1 0,5 ml/250 g bb tiap puyuh pada minggu ke 1, 3, 6, dan tanpa dilakukan suplementasi jus daun lidah buaya sebagai kontrol negatif.
3. Kelompok III : puyuh diinduksi vaksin AI H5N1 0,5 ml/250 g bb tiap puyuh pada minggu ke 1, 3, dan 6, dan dilakukan suplementasi jus daun lidah buaya dosis 1 ml/250 g bb tiap puyuh/hari.
4. Kelompok IV : puyuh diinduksi vaksin AI H5N1 0,5 ml/250 g bb tiap puyuh pada minggu ke 1, 3, 6, dan dilakukan suplementasi jus daun lidah buaya dosis 2,5 ml/250 g bb tiap puyuh/hari.

5. Kelompok V : puyuh diinduksi vaksin H5N1 0,5 ml/250 g bb tiap puyuh pada minggu ke 1, 3, 6, dan dilakukan suplementasi jus daun lidah buaya dosis 4 ml/250 g bb tiap puyuh/hari.

Puyuh diberi pakan ayam BR AD2 tanpa antibiotik dengan kandungan PK 15,75%, ME 2.850,25 Kcal/kg, Ca 3,27% dan P 1,08% serta diberi minum *ad libitum*. Sebelum diberi perlakuan pada tiap kelompok seperti deskripsi di atas, hewan uji pada kelompok III, IV, dan V dilakukan pengkondisian dengan cara suplementasi jus daun lidah buaya tiap jam 9 pagi selama 7 hari berturut-turut.

3. Pengambilan Sampel

Setiap kelompok perlakuan diambil lima telur pada minggu ke-10, untuk diisolasi IgY nya dengan uji HI. Hal ini mengacu pada SOP (*Standard Operational Procedure*) untuk pengendalian penyakit AI yang diterbitkan oleh Direktorat Jenderal Peternakan Departemen Pertanian, yang menyatakan bahwa keberhasilan vaksinasi dapat diketahui dengan memeriksa adanya antibodi setelah tiga sampai empat minggu setelah vaksinasi (Deptan, 2005).

4. Isolasi IgY dengan metode presipitasi PEG

Kuning telur dipisahkan dari putih telur kemudian ditambahkan 30 ml buffer A dan dicampur dengan baik. Selanjutnya ditambahkan 30 ml 7% (b/v) PEG 6000 dalam buffer A, lalu disentrifugasi pada 14000 g selama 10 menit, $T = 40^{\circ}\text{C}$. Supernatan yang diperoleh disaring dengan

kain kassa dobel, ditambahkan PEG 6000 padatan sampai konsentrasi akhir 12%, diaduk sampai larut. Kemudian disentrifuge 14000 g selama 10 menit, $T = 40^{\circ}\text{C}$. Pelet yang diperoleh dilarutkan dalam 20 ml buffer A dan juga ditambahkan 20 ml 24% PEG dalam buffer A. Suspensi yang terbentuk disentrifugasi pada 14000 g selama 10 menit pada $T = 40^{\circ}\text{C}$ (Gassmann dkk., 1990). Serum yang diperoleh diuji dengan metode HI.

5. Pengukuran titer antibodi dalam serum menggunakan uji HI

a. Pembuatan larutan antigen 4 HA unit (4 HAU)

Antigen yang digunakan adalah antigen subtipe H5N1 yang inaktif. Satu vial antigen H5N1 ditambah PBS hingga 1 ml. Kemudian sebanyak 50 μl larutan diisi pada *microplate 96 well U bottom*, masing-masing sumuran dari kolom 1 hingga 12. Pada masing-masing sumuran ditambahkan 50 μl eritrosit 0,5% lalu digoyang selama 5 menit. Hasilnya dibaca setelah 30 menit. Pembacaan dilakukan dengan melihat pada kolom seberapa antigen mampu mengaglutinasi eritrosit. Setelah titer antigen diketahui, maka larutan antigen tadi dapat diencerkan hingga bilangan titer dibagi empat.

b. Pengukuran titer antibodi

Metode ini menggunakan antigen yang sudah disetarakan berdasarkan aktivitas HA-nya yaitu sebesar 4 HA. Pada metode ini digunakan plat mikro 96 sumuran (*microplate U bottom*) yang terdiri dari 8 baris dan 12 kolom. Semua sumuran diisi dengan PBS sebanyak 25 μl . Sumuran kolom 1 sampai 11 dari *microplate U bottom* diisi

dengan suspensi antigen standar (4 HAU) masing-masing 25 μ l dengan mikropipet kapasitas 200 μ l, sedangkan sumuran kolom 12 diisi PBS 25 μ l. Dua puluh lima μ l serum yang akan diuji dimasukkan ke dalam sumur pertama. Serum dicampur dengan suspensi antigen di sumur pertama dengan cara mengaduk cairan tersebut dengan diluter 25 μ l. Diluter diambil dari sumuran kolom pertama kemudian digunakan untuk mengaduk sumuran kolom dua dan dicampur, selanjutnya dipindah ke sumuran kolom 3, begitu seterusnya sampai sumuran kolom 10. Setelah itu cairan yang ada diluter dibuang. *Microplate* digoyang kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. Kemudian lima puluh μ l suspensi sel darah merah 0,5% dalam PBS dimasukkan ke dalam seluruh sumur sehingga dalam 1 sumuran terdapat cairan dengan volume total 100 μ l. Pembacaan titer antibodi dilakukan saat eritrosit pada sumuran kolom 12 mengendap. Hasil pengujian dapat dibaca yaitu sampai sumuran kolom berapa yang menunjukkan eritrosit mampu mengendap (tidak diaglutinasi). Kolom 1: titer 2 (2^1), kolom 2: titer 4 (2^2), kolom 3: titer 8 (2^3) dan seterusnya (Beard, 1989).

H. ANALISIS HASIL

Data yang diperoleh dianalisis secara statistik menggunakan uji normalitas *Shapiro-Wilk*. Data yang diperoleh dari hasil pengukuran uji normalitas tersebut kemudian dianalisis secara statistik menggunakan uji *Kruskal-Wallis* (Anova non parametrik). Langkah berikutnya yaitu dilakukan analisis lanjutan dengan uji *Mann-Whitney*.