

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **A. DESAIN PENELITIAN**

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

#### **B. WAKTU DAN TEMPAT**

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Penelitian Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, Lembaga Pusat Penelitian Terpadu (LPPT) UGM dan Balai Besar Veteriner, Wates, Yogyakarta. Penelitian ini dimulai dari bulan Juni hingga September 2013.

#### **C. POPULASI DAN SAMPEL**

Pembagian masing-masing hewan uji adalah sebagai berikut : Puyuh yang digunakan sebanyak 15 ekor dalam kandang baterai dibagi menjadi 5 kelompok pelakuan. Tiap kelompok terdiri dari 5 ulangan secara individual.

1. Kelompok I : Puyuh tanpa diinduksi vaksin AI H5N1 dan tanpa suplementasi jus lidah buaya sebagai kontrol nol (0).
2. Kelompok II : Puyuh diinduksi vaksin AI H5N1 0,5 ml/250 g bb dan tanpa suplementasi jus lidah buaya sebagai kontrol negatif (-).
3. Kelompok III : Puyuh diinduksi vaksin AI H5N1 0,5 ml/250 g bb dan suplementasi jus lidah buaya dosis 1 ml/250 g bb tiap puyuh.
4. Kelompok IV : Puyuh diinduksi vaksin AI H5N1 0,5 ml/250 g bb dan suplementasi jus lidah buaya dosis 2,5 ml/250 g bb tiap puyuh.

5. Kelompok V : Puyuh diinduksi vaksin AI H5N1 0,5 ml/250 g bb dan suplementasi jus lidah buaya dosis 4 ml/250 g bb tiap puyuh.

#### D. VARIABEL PENELITIAN DAN DEFINISI OPERASIONAL

##### 1. Variabel Penelitian

❖ Variabel bebas

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

❖ Variabel kendali

Spesies/galur : *Coturnix coturnix japonica*

Berat badan : 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 : Sehat.

Kondisi kandang : Lokasi kandang harus jauh dari kebisingan, kandang harus kering, sirkulasi udara harus lancar, kandang tidak menampung noda tanah, dan kandang harus mendapat cahaya matahari

## 2. Alat

Alat-alat yang digunakan adalah alat-alat gelas yang lazim digunakan di laboratorium, *blender juice*, rotary evaporator (IKA), seperangkat alat pemeliharaan puyuh, timbangan, spuit injeksi 1 cc (Terumo), *ependorf tube*, neraca elektrik (Shimada, tipe LS-6DT), sentrifuge berpendingin (Rotina), mesin vortex, mikropipet 100  $\mu$ l (Socorex), *microcentrifuge* (Ependrof centrifuge, tipe 5417 R), *microplate 96-well u bottom* dan *blue tip*.

## F. CARA KERJA

### 1. Prosedur Pembuatan Jus Lidah buaya

Pembuatan jus lidah buaya dilakukan dengan mengambil bagian daging (gel) daun, kemudian dicuci bersih dan dibuang lapisan luar yang berwarna hijau kekuningan (*latex leaf lining*). Setelah selesai dilakukan pembersihan, gel tersebut kemudian diblender hingga halus tanpa penambahan air.

### 2. Pembuatan Sediaan Uji

Jus lidah buaya yang diperoleh diambil dan diletakkan kedalam gelas ukur. Siapkan sesuai dengan dosis pemberian pada masing-masing kelompok perlakuan hewan uji.

### 3. Perlakuan Hewan Uji

Pembagian masing-masing hewan uji adalah sebagai berikut :

Buah yang digunakan sebanyak 15 ekor dalam kandang baterai dibagi

menjadi 5 kelompok pelakuan. Tiap kelompok terdiri dari 3 ulangan secara individual.

1. Kelompok I : Puyuh tanpa diinduksi vaksin AI H5N1 dan tanpa suplementasi jus lidah buaya sebagai kontrol nol (0).
2. Kelompok II : Puyuh diinduksi vaksin AI H5N1 0,5 ml/250 g bb tiap puyuh pada minggu ke 1, 3 dan 6, namun tanpa suplementasi jus 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, serta suplementasi jus 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 dan 6, serta suplementasi jus lidah buaya dosis 2,5 ml/250 g bb tiap puyuh/hari.
5. Kelompok V : Puyuh diinduksi vaksin AI H5N1 0,5 ml/250 g bb tiap puyuh pada minggu ke 1, 3 dan 6, serta suplementasi jus lidah buaya dosis 4 ml/250 g bb tiap puyuh/hari.

Burung puyuh diberi pakan 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. 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.

#### 4. Pengambilan Sampel

Pada penelitian ini, setiap kelompok perlakuan diambil 3 sampel darah pada minggu ke-10. 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 3 sampai 4 minggu setelah vaksinasi (Deptan, 2005). Darah puyuh diambil menggunakan spuit injeksi 1 cc (Terumo) melalui pembuluh vena yang ada di sayap. Volume darah yang diambil adalah 0,5 ml dan diberi *chelating agent* EDTA sebanyak 0,1 ml setiap eppendorf. Kemudian sampel disentrifugasi pada suhu 4°C 14000 G selama 15 menit. Serum dipisahkan dari darah dan diletakkan pada tabung eppendorf lain serta diberi label. Selanjutnya serum ini disimpan pada suhu 20°C sampai digunakan untuk uji pengukuran titer antibodi.

#### 5. Pengukuran Titer Antibodi Dalam Serum Menggunakan Uji HI

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

Antigen yang digunakan adalah antigen subtype 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 keberapa 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  $\mu$ l. Sumuran kolom 1 sampai 11 dari *microplate U bottom* diisi dengan suspensi antigen standar (4 HAU) masing-masing 25  $\mu$ l dengan mikropipet kapasitas 200  $\mu$ l, sedangkan sumuran kolom 12 diisi PBS 25  $\mu$ l. Sebanyak 25  $\mu$ 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  $\mu$ 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 50  $\mu$ l suspensi sel darah merah 0,5% dalam PBS dimasukkan ke dalam seluruh sumur sehingga dalam 1 sumuran terdapat cairan dengan volume total 100  $\mu$ 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).

## G. ANALISIS DATA

Data yang diperoleh dianalisis secara statistik menggunakan uji normalitas *Shapiro-Wilk* untuk mengetahui apakah data yang diambil merupakan data yang terdistribusi normal. 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* untuk membandingkan dua mean populasi sama atau tidak