



Lampiran 1. Prosedur Pemeriksaan *Radio Immuno Assay Cortisol*

Prosedur Pemeriksaan *Radio Immuno Assay (RIA) Cortisol*

Semua komponen harus dihangatkan dulu pada suhu ruangan (15-28)^oC sebelum digunakan.

1. Siapkan tabung :
4 (empat) buah (uncoated) dan beri tanda T (total count) untuk 2 (dua) tabung dan NSB (nonspecific binding) untuk 2 (dua) tabung.
12 (dua belas) tabung (cortisol Ab coated) tabung A(maximum binding) dan tabung B sampai F masing-masing dibuat duplikasi.
2. Ambil 25 μ L dari tabung A- Zero calibrator pada tabung A dan tabung NSB, dan pada tabung calibrator lainnya pada tabung B sampai F.
3. Ambil 25 μ L dari kontrol, dan semua sampel pada tabung yang telah dipersiapkan.
4. Tambahkan pada masing-masing tabung tersebut 1,0 mL ¹²⁵I Cortisol, dan tutup Vortex.
5. Inkubasi pada suhu 37 ^oC selama 45 menit.
6. Tuang segera semua isi tabung kecuali dari Tabung T. Tuangkan dalam rak khusus sampai habis, dan biarkan 2-3 menit. Kemudian taruh pada kertas tissue .
7. Hitung selama 1 menit dengan menggunakan alat Gamma Counter.

Perhitungan Hasil

Untuk mendapatkan hasil konsentrasi Cortisol, maka perlu dihitung terlebih dulu rerata tiap pasangan tabung NSB-corrected count per minute (CPM) :

$$\text{Net Counts} = \text{Average CPM} - \text{Average NSB CPM}$$

Kemudian tentukan persentasi ikatan dengan cara :

$$\text{Percent Bound} = (\text{Net Count}/\text{Net MB Counts}) \times 100$$

Dan persentasi ikatan sampel yang ditemukan, dikonversikan dengan kadar prosentasi Calibrator.

Lampiran 2. Prosedur Pemeriksaan *Indirect Sandwich ELISA* Rat IL-1 β .

PEMERIKSAAN
Indirect Sandwich Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
(ELISA)

Pedoman Pencucian

Pencucian yang tidak lengkap akan memberi dampak pada hasil pengujian. Semua pencucian harus dengan **Wash Buffer** yang telah disediakan.

Pencucian dapat dilakukan secara manual seperti berikut :

- aspirasi semua cairan dari masing-masing wells dengan memasukkan ujung tip ke bagian dasar tiap-tiap wells. Ambil hati-hati, **jangan menggores bagian dalam dinding wells.**
- Setelah aspirasi, isi tiap wells dengan paling sedikit **0,4 mL cairan wash** terlarut. Biarkan **selama 15-30 detik**, kemudian aspirasi cairannya.
- Ulangi langkah-langkah Metode Assay yang berikutnya.
- Setelah prosedur pencucian, plate dibalik dan ditaruh di atas kertas tissue absorbant.

Catatan Prosedur / Kontrol Kualitas

1. Jika tidak dipakai, simpan kit pada refrigerator. Semua reagen dihangatkan dulu sampai suhu ruangan sebelum dipakai.
2. **Microtiter plate dibiarkan dulu untuk mencapai suhu ruangan sebelum membuka kantongnya.** Sekali diambil yang diperlukan, maka lainnya segera masukkan kantong dan tutup kemudian segera simpan pada suhu 2-8 ° C untuk menjaga integritas plate.
3. Samples dikumpulkan pada tabung bebas endotoksin atau bebas pyrogen.
4. Samples harus didinginkan jika tidak dianalisa segera setelah dikumpulkan. Hindari sering melakukan siklus beku-encer pada sample yang beku. Encerkan secara lengkap dan campurkan dengan baik sebelum wells dianalisa.
5. Jika mungkin, hindari menggunakan sample hemolisis yang jelek, atau lipemic sera. Jika terdapat lebih besar bahan tersebut, maka sentrifus ulang atau difilter sebelum dianalisis.
6. Sangat disarankan, bahwa semua standart, kontrol dan samples di buat duplikat pemeriksaan.
7. Samples yang lebih dari 2000 pg/mL diencerkan dulu dengan Standart Diluent Buffer.
8. Saat pipeting reagent, jaga konsistensi pelaksanaan dari satu well ke well berikutnya. Ini untuk meyakinkan waktu untuk semua wells.
9. Tutup semua reagent jika tidak digunakan.
10. **Jangan campur atau saling bertukar reagent yang berbeda berlebih dari kit yang berlebih.**
11. Jangan gunakan reagent yang telah kadaluwarsa.

Lampiran 2. Prosedur Pemeriksaan *Indirect Sandwich ELISA Rat IL-1 β* (lanjutan)

12. Baca absorbant dalam 2 jam assay telah selesai.
13. Dalam rumah, kontrol harus dibuat pada tiap assay. Jika nilai kontrol jatuh di bawah dari rentang yang diketahui, akurasi assay perlu dicurigai.
14. Semua residu cucian harus dikeringkan dari tiap-tiap well dengan aspirasi yang efisien atau dengan mengetukkan plate secara kuat pada kertas tissue. Jangan pernah memasukkan kertas tissue langsung ke dalam wells.
15. Karena Stabilized Chromogen sangat sensitif dengan cahaya, hindari terpapar terlalu lama pada cahaya. Dan hindari kontak antara Stabilized Chromogen dengan metal, akan berubah warna.

Persiapan dan Penyimpanan Reagent

A. Pembuatan dan Pengenceran rat IL-1 B Standart

Catatan : Tabung Glas atau Plastik bisa digunakan untuk pencairan Standart.

1. Larutkan standart **sampai 10.000 pg/mL** dengan **Standart Diluent Buffer**. Lihat instruksi pada label vialnya. Putar-putar atau campurkan dengan baik dan **biarkan sampai 10 menit** agar terlarut dengan baik. Gunakan Standart dalam 1 jam larutan.
2. Tambahkan **0,120 mL** Larutan Standart ke dalam tabung yang telah terisi **0,480 mL** Standart Diluent Buffer. Beri label **2000pg/ML rat IL-1 B Mix**.
3. Isilah **0,300 mL** dengan **Standart Diluent Buffer** pada keenam tabung, dan beri label 1000, 500, 250, 125, 62.5, dan 31.5 pg/ml rat IL-1 B.
4. Buat pelarutan secara serial dari standart seperti tabel berikut. Campurlah baik-baik dari tiap-tiap langkah berikut.

B. Pengenceran rat IL-1 B Standart

Standart	Add:	Into :
2000 pg/ml	Disiapkan seperti dalam langkah 2	
1000 pg/mL	0,300 mL dari 2000pg/mL std	0,300 mL dari Diluent Buffer
500 pg/mL	0,300 mL dari 1000pg/mL std	0,300 mL dari Diluent Buffer
250 pg/mL	0,300 mL dari 500pg/mL std	0,300 mL dari Diluent Buffer
125 pg/mL	0,300 mL dari 250pg/mL std	0,300 mL dari Diluent Buffer
62.5 pg/mL	0,300 mL dari 125pg/mL std	0,300 mL dari Diluent Buffer
31.2 pg/mL	0,300 mL dari 62.5pg/mL std	0,300 mL dari Diluent Buffer
0 pg/mL	0,300 mL dari Diluent Buffer	Tabung kosong

C. Penyimpanan dan Pengenceran akhir Streptavidin HRP

Catatan : Streptavidin HRP 100 x konsentrat dalam 50% Glycerol. Cairan ini sangat kental, untuk pengenceran secara akurat biarkan dulu mencapai suhu ruangan. Campurkan dengan baik. Pipet Streptavidin HRP konsentrat pelan-pelan, buang sisa konsentrat yang menempel di ujung tip dengan tissue absorbant.

Lampiran 2. Prosedur Pemeriksaan *Indirect Sandwich ELISA Rat IL-1 β* (lanjutan)

1. Encerkan **10 uL** cairan konsentrat ini dengan **1 mL Streptavidin Diluent Buffer** untuk tiap strip 8 wells yang digunakan. Beri label dengan Streptavidin HRP Working Solution.
2. Kembalikan Streptavidin HRP konsentrat yang tidak digunakan ke refrigerator.

D. Pengenceran **Wash Buffer**

Biarkan 25 x konsentrat ini mencapai suhu ruangan dulu, dan campurkan dengan baik untuk meyakinkan beberapa pemicu garam terlarutkan lagi. Encerkan **1 volume** 25 x konsentrat Wash Buffer **dengan 24 volume** air deionized (misalnya 50 mL diencerkan dengan 1.25 Liter, 100 mL diencerkan dengan 2.5 Liter). Beri label Working Wash Buffer .

Simpan konsentrat dan Working Wash Buffer dalam refrigerator. Buffer yang telah diencerkan bisa digunakan dalam waktu 14 hari.

METODE ASSAY DAN PERHITUNGAN

Yakinkan bahwa telah membaca Catatan Prosedur / Kontrol Kualitas sebelum melaksanakan Assay.

Biarkan semua reagen mencapai suhu ruangan sebelum digunakan. Campurkan dengan baik semua reagen sebelum digunakan.

Catatan : Kurva standart harus dibuat tiap kali assay dilakukan.

1. Tentukan ke delapan strip wells yang akan digunakan. Masukkan dalam frame untuk penggunaan sekarang. Masukkan kantong lagi yang tidak digunakan.
2. Tambahkan 100 uL Standart Diluent Buffer ke Zero Wells. Wells disiapkan untuk chromogen blank setelah dikosongkan nanti.
3. Untuk membuat kurva standart, tambahkan 100 uL standart pada wells. Untuk serum, cairan buffer, tambahkan 50 uL Standart Diluent Buffer pada tiap-tiap wells dan kemudian 50 uL untuk masing-masing sample. Alirkan di tepi dinding untuk mencampur dengan baik.
4. Tutup dengan Cover Plate dan inkubasi selama 3 jam pada suhu ruangan.
5. Kemudian aspirasi atau keluarkan cairannya dari wells dan cuci wells 4 kali.
6. Pipet 100 uL Mouse anti IL-1B rat ke dalam tiap wells kecuali chromogen blank. Alirkan pada dinding wells dengan baik.
7. Tutup dengan Cover Plate dan inkubasi selama 1 jam pada suhu ruangan
8. Kemudian aspirasi atau keluarkan cairannya dari wells dan cuci wells 4 kali.
9. Pipet 100 uL Biotinylated Anti IL-1B mouse (Biotin Conjugate) ke dalam tiap wells kecuali chromogen blank. Alirkan pada dinding wells dengan baik.
10. Tutup dengan Cover Plate dan inkubasi selama 1 jam pada suhu ruangan.

**Lampiran 2. Prosedur Pemeriksaan *Indirect Sandwich ELISA Rat IL-1 β*
(lanjutan)**

11. Kemudian aspirasi, keluarkan cairannya dari wells. Cuci 4 kali.
12. Tambahkan 100 uL Streptavidin HRP Working Solution pada tiap-tiap wells kecuali chromogen blank.
13. Tutup dengan Cover Plate dan inkubasi selama 30 menit pada suhu ruangan.
14. Kemudian aspirasi, keluarkan cairannya dari wells. Cuci 4 kali.
15. Tambahkan 100 uL Stabilized Chromogen pada tiap wells. Cairan dalam wells akan berubah menjadi biru.
16. Inkubasi selama 25 menit pada suhu ruangan dan di tempat gelap. Perlu diingat : Jangan menutup menutup plate dengan aluminium foil atau mylar metalized. Waktu inkubasi untuk chromogen substrate sering ditentukan oleh microtiter plate reader yang digunakan. Banyak plate reader yang memiliki kapasitas mendeteksi maksimum Optical Density (OD) 2. Nilai OD bisa dimonitor dan reaksi substrat bisa distop sebelum OD positif wells melampaui batas kemampuan instrument. Nilai OD pada 450 nm hanya dapat dibaca setelah Stop Solution telah ditambahkan pada tiap-tiap wells. Jika menggunakan reader yang hanya mampu membaca sampai 2 OD, penghentian assay setelah 20 – 25 menit disarankan.
17. Setelah 25 menit segera tambahkan 100 uL Stop Solution pada tiap-tiap wells. Alirkan pada tepi dinding agar tercampur dengan baik. Cairan dalam well akan berubah dari biru menjadi kuning.
18. Baca absorbant tiap-tiap well pada 450 nm sekaligus blanked reader dan chromogen blank yang terisi dengan 100 uL Stabilized Chromogen dan Stop Solution. Baca plate dalam 2 jam setelah menambahkan Stop Solution.
19. Tandai pada kertas grafik yang menunjukkan standart absorbant dan standart konsentrasi. (Secara optimal, latar belakang absorbance bisa dibagi dari semua titil data, termasuk standart, bahan yang tidak diketahui dan kontrol, untuk ditandai). Gambarkan kurva yang sangat halus melalui titik-titik untuk menyusun kurva standart. Jika menggunakan fitting software, 4 parameter algoritme memungkinkan memperbaiki akurasi kurva.
20. Baca konsentrasi rat IL-1B sample dan kontrol dari dari titik-titik kurva yang telah dibuat pada langkah 16.

Lampiran 3. Hasil Pemeriksaan Berat Badan, *Cortisol* serum dan *IL-1 β* Kelompok Perlakuan dan Kelompok Kontrol.

SAMPEL		BERAT BADAN	KADAR		KELOMPOK
NOMOR	KODE		CORTISOL	IL-1 BETA	(PERLAKUAN =1)
		(gram)	(ng/dL)	(pg/mL)	(KONTROL =2)
1	I 1 B	240.0	0.54	20.365	1
2	I 2 B	210.0	0.58	19.664	1
3	I 3 B	202.0	0.55	20.365	1
4	I 4 B	205.0	0.49	19.752	1
5	I 5 B	274.0	0.50	19.139	1
6	II 1 M	245.0	0.76	20.438	1
7	II 2 M	233.0	0.56	19.621	1
8	II 3 M	322.0	0.54	19.299	1
9	II 4 M	300.0	0.49	19.913	1
10	II 5 M	245.0	0.82	20.701	1
11	III 1 H	335.0	0.40	18.380	2
12	III 2 H	310.0	0.30	17.694	2
13	III 3 H	255.0	0.30	16.993	2
14	III 4 H	255.0	0.42	18.102	2
15	III 5 H	292.0	0.48	17.445	2
16	IV 1 B	276.0	0.40	17.168	2
17	IV 2 B	271.0	0.40	17.591	2
18	IV 3 B	294.0	0.40	16.526	2
19	IV 4 B	260.0	0.30	18.263	2
20	IV 5 B	268.0	0.40	17.518	2

Lampiran 4. Hasil Perhitungan Deskriptif Variabel Berat Badan, Cortisol dan IL-1 β .

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Cortisol (nM/dL)	20	0.4815	0.136855	0.3	0.82
IL-1 Beta (pg/mL)	20	18.74685	1.323562	16.526	20.701
Berat Badan (gram)	20	264.6	37.3326	202	335



Lampiran 5. Hasil Test Homogenitas Variabel Berat Badan, Cortisol dan IL-1 β .

Analysis Variance
Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Cortisol (nM/dL)	1.872	1	18	0.188
IL-1 Beta (pg/mL)	0.001	1	18	0.973
Berat Badan (gram)	1.226	1	18	0.283

Populasi homogen, dengan Sig > 0,05

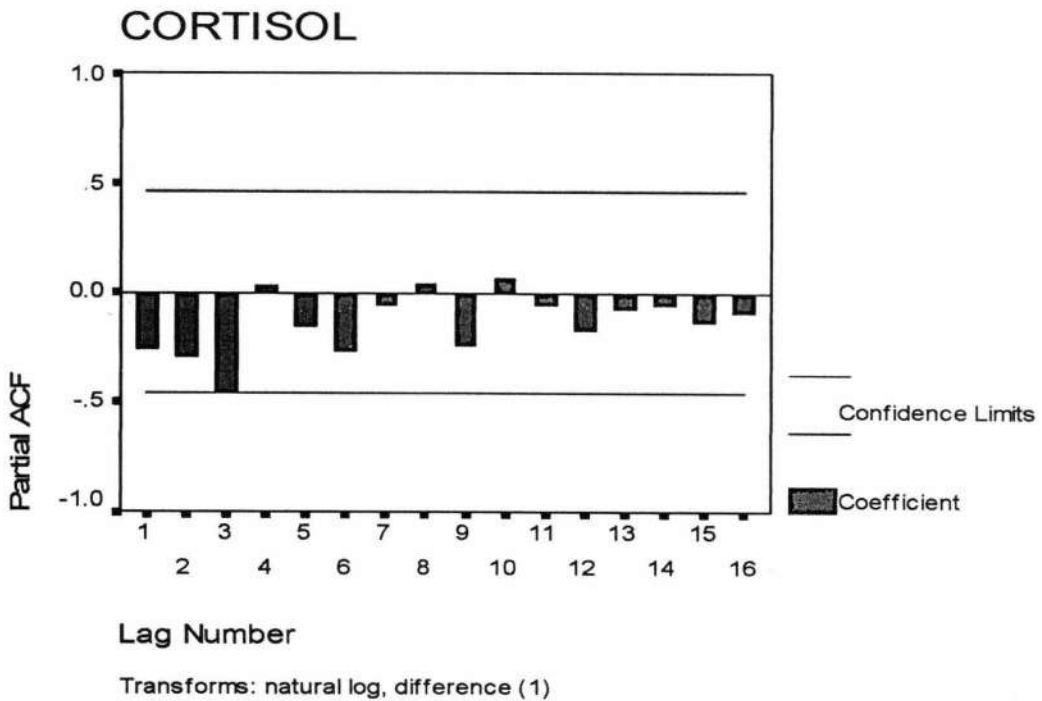
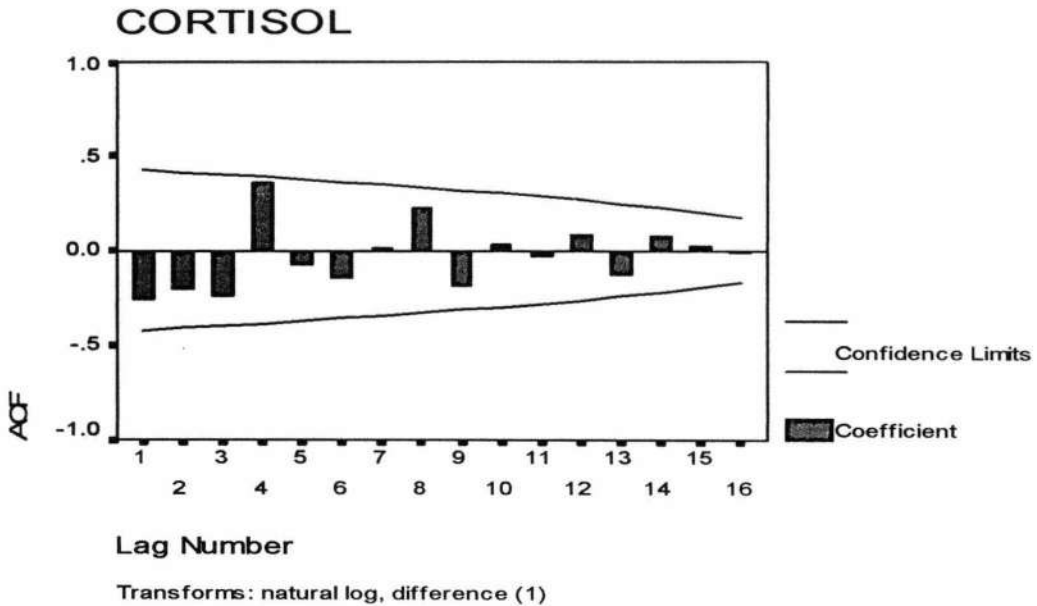
Lampiran 6. Hasil Test Normalitas Data Variabel Berat Badan, Cortisol dan IL-1 β .

Test Normalitas Data

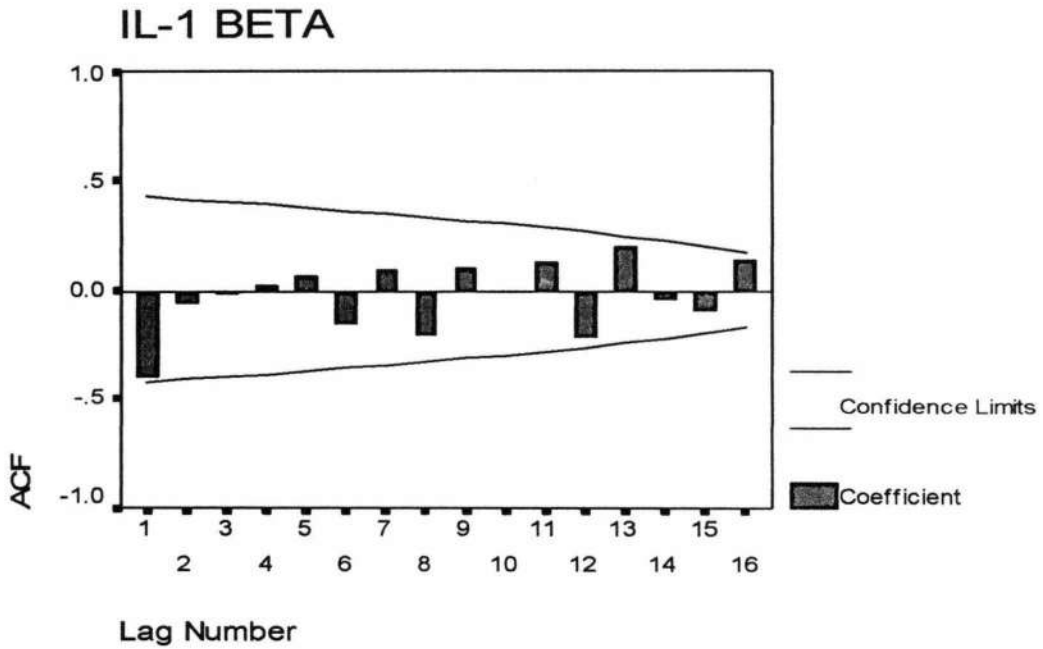
	Cortisol (nM/dL)	IL-1 Beta (pg/mL)	Berat Badan (gram)
Chi-Square	10	0.9	1.6
df	11	18	17
Asymp. Sig.	0.53	1	1

- a 12 cells (100.0%) have expected frequencies less than 5. The minimum expected cell frequency is 1.7.
- b 19 cells (100.0%) have expected frequencies less than 5. The minimum expected cell frequency is 1.1.
- c 18 cells (100.0%) have expected frequencies less than 5. The minimum expected cell frequency is 1.1.

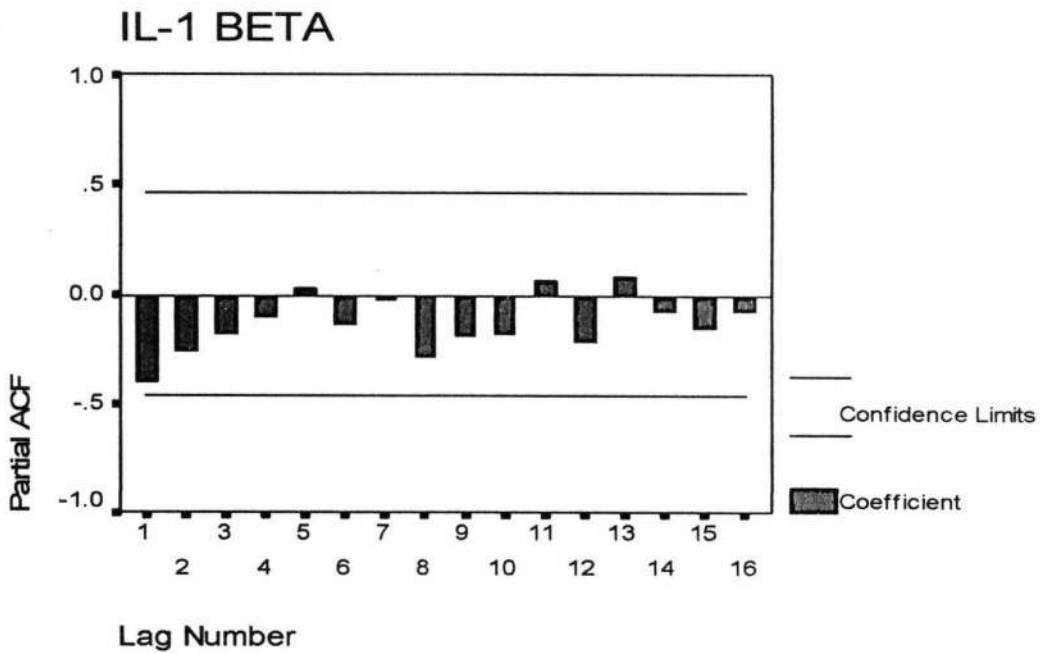
Lampiran 7. Hasil Uji Manova, dan Anava terhadap Variabel *Cortisol* dan *IL-1 β*



Lampiran 7. Hasil Uji Manova, dan Anava terhadap Variabel *Cortisol* dan *IL-1 β* (lanjutan)

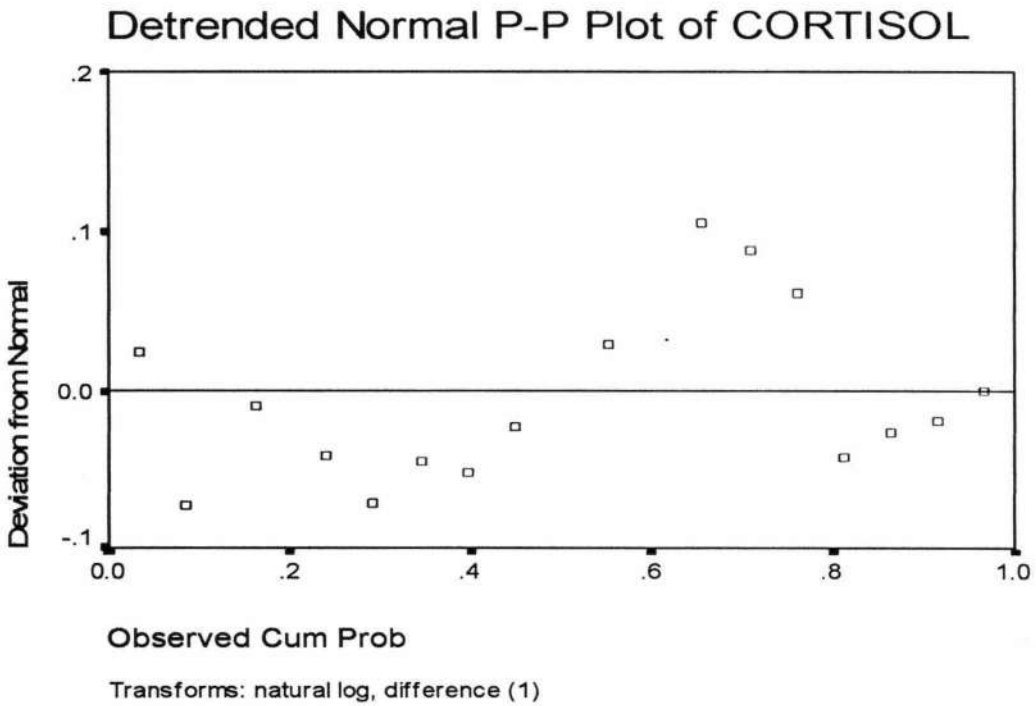
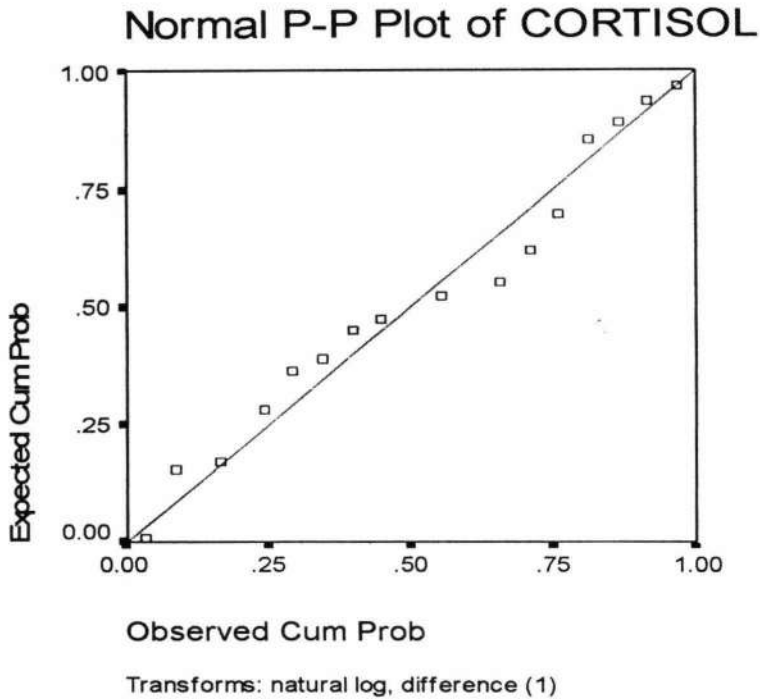


Transforms: natural log, difference (1)



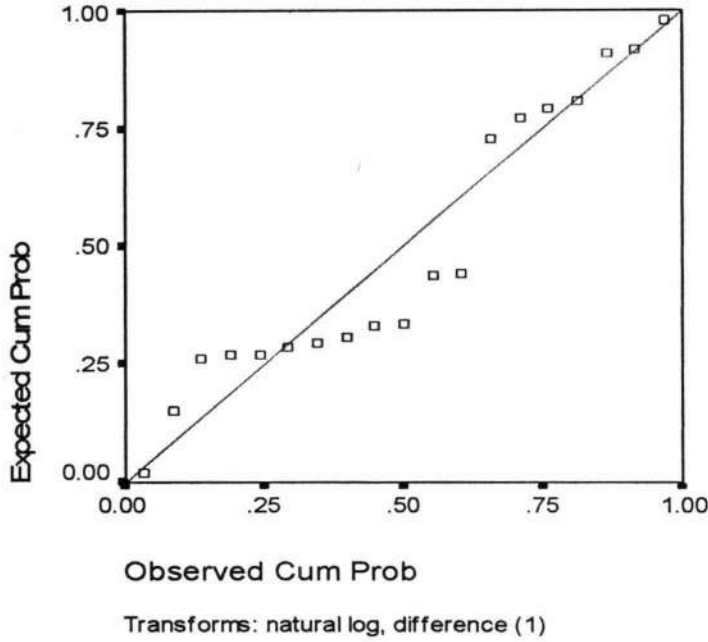
Transforms: natural log, difference (1)

Lampiran 7. Hasil Uji Manova, dan Anava terhadap Variabel *Cortisol* dan *IL-1 β* (lanjutan)

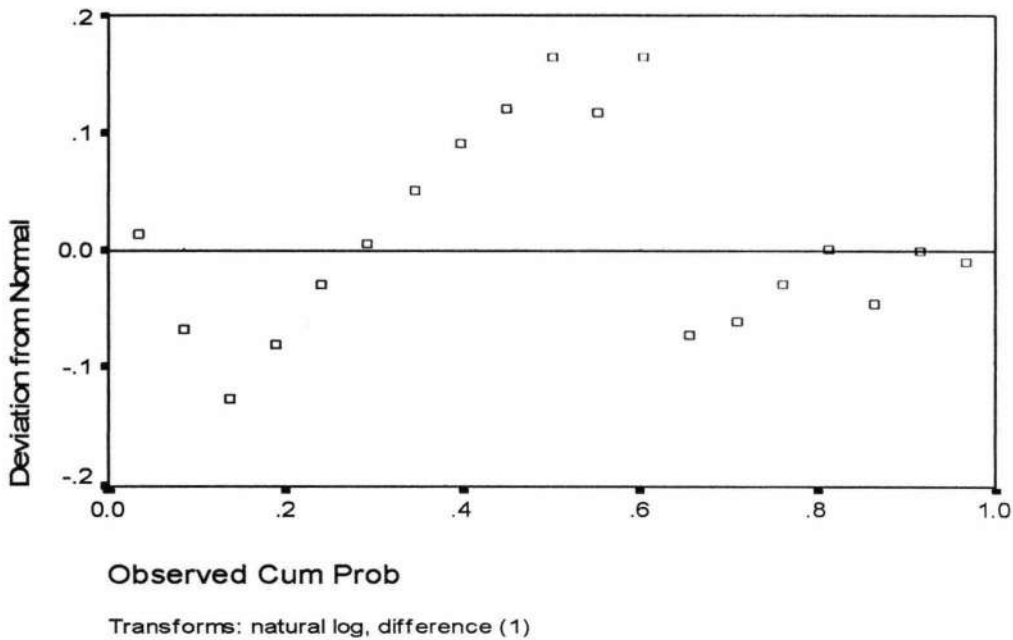


Lampiran 7. Hasil Uji Manova, dan Anava terhadap Variabel *Cortisol* dan *IL-1 β* (lanjutan)

Normal P-P Plot of IL-1 BETA



Detrended Normal P-P Plot of IL-1 BETA



Lampiran 7. Hasil Uji Manova, dan Anava terhadap Variabel *Cortisol* dan *IL-1 β* (lanjutan)
General Linear Model

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
TREAT & Control	1	Control (0')	10
	2	Treatmen (30')	10

Descriptive Statistics

	TREAT & Control	Mean	Std. Deviation	N
CORTISOL	Control (0')	.3800	6.037E-02	10
	Treatmen (30')	.5830	.1140	10
	Total	.4815	.1369	20
IL-1 BETA	Control (0')	17.56800	.58099	10
	Treatmen (30')	19.92570	.52205	10
	Total	18.74685	1.32356	20

Multivariate Tests

	Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Pillai's trace	.839	44.181(a)	2.000	17.000	.000
Wilks' lambda	.161	44.181(a)	2.000	17.000	.000
Hotelling's trace	5.198	44.181(a)	2.000	17.000	.000
Roy's largest root	5.198	44.181(a)	2.000	17.000	.000

Each F tests the multivariate effect of TREAT & Control. These tests are based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

a Exact statistic

Univariate Tests

Dependent Variable		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CORTISOL	Contrast	.206	1	.206	24.757	.000
	Error	.150	18	8.323E-03		
IL-1 BETA	Contrast	27.794	1	27.794	91.114	.000
	Error	5.491	18	.305		

The F tests the effect of TREAT & Control. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

Lampiran 8. Hasil Analisis Diskriminan terhadap Variabel *Cortisol* dan *IL-1 β*

Discriminant

Variables Entered/Removed(a,b,c,d)

Step	Entered	Wilks' Lambda							
		Statistic	df1	df2	df3	Exact F			
						Statistic	df1	df2	Sig.
1	IL-1 BETA	.165	1	1	18.000	91.114	1	18.000	.000

At each step, the variable that minimizes the overall Wilks' Lambda is entered.

- a Maximum number of steps is 4.
- b Maximum significance of F to enter is .05.
- c Minimum significance of F to remove is .10.
- d F level, tolerance, or VIN insufficient for further computation.

Classification Function Coefficients

	TREAT & Control	
	Control (0')	Treatment (30')
IL-1 BETA	57.592	65.321
(Constant)	-506.581	-651.476

Fisher's linear discriminant functions

Empiran 6. Jadwal Penelitian

Penelitian ini akan di laksanakan pada tahun 2004, dengan rincian sebagaimana yang terdapat dalam table berikut :

Bulan	Jan	Feb	Maret	April	Mei	Juni
Persiapan	xxxxx	xxxxx				
Penyusunan Proposal	xxxxx	xxxxx				
Penyelaksanaan			xxxxxxx	xxxxx		
Analisis Data				xxxxx	xxxxxxx	xxxxxxx
Penelusuran Perpustakaan	xxxxx	xxxxx	xxxxxxx	xxxxx	xxxxxxx	xxxxxxx
Penulisan Laporan				xxxxx	xxxxxxx	xxxxxxx
Penyusunan Tesis						xxxxxxx