

BAB III

BAHAN DAN CARA KERJA

1. Bahan Penelitian

a. Sampel yang Diperiksa

Sampel yang diperiksa berupa serum darah 30 ekor sapi berasal dari kelompok yang air susunya sering pecah dengan uji alkohol (kelompok terduga), dan 16 ekor sapi berasal dari kelompok yang air susunya normal (uji alkohol negatif).

Agar mendapatkan sampel yang representatif, maka pemilihan sapi didasarkan pada kriteria berikut :

Sapi-sapi yang diambil darahnya adalah sapi yang sedang menyusui antara bulan ke dua sampai bulan ke enam.

Secara klinis tidak menderita mastitis, dan dikuatkan dengan keterangan dari dokter hewan.

Air susu yang diuji dengan alkohol, baru diperah dari ambing.

b. Bahan Kimia yang Diperlukan

Alkohol 75,3 %.

Air Suling

KOH 1,25 N.

Larutan EDTA 395 ppm.

Larutan indikator Calcon.

Natrium sitrat 0,05 M.

Amil alkohol

Larutan standar kalsium

HCl 1,0 N.

Amonium oksalat.

Fe-Trichloroacetic acid (Fe-TCA).

Amonium molibdat 0,0355 M.

Larutan standar fosfor

HCl 6 N.

c. Alat-alat yang Digunakan

Sprit disposibel 10 ml.

Tabung reaksi dengan penutup karet.

Peti kemas pendingin (Termos).

Alat pemusing dan tabung pemusing.

Labu erlenmeyer 25 ml.

Pipet berskala 0,5 ml, 1 ml, 5 ml, 10 ml.

Pipet penetes.

Penimbang.

Gelas piala 500 ml dan 1000 ml.

Buret dan Statif.

Kertas indikator pH.

Spektrofotometer dan Kuvet.

2. Lokasi dan Lamanya Penelitian

Pelaksanaan penelitian ini dilakukan dalam dua tahap. Tahap pertama survai lapangan guna mengumpulkan data sapi-sapi yang air susunya sering pecah dengan uji alkohol, kemudian dilanjutkan dengan pengambilan sampel

darah dari tiap kolektor di wilayah kerja koperasi "Setia Kawan" Nongkojajar, Kecamatan Tukur Kabupaten Pasuruan. Kegiatan ini dilaksanakan mulai tanggal 19-Januari-1987 sampai tanggal 10-Februari-1987.

Tahap ke dua pemeriksaan secara laboratoris, dilakukan di Laboratorium Analisis Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga. Kegiatan ini dilaksanakan mulai tanggal 5-Februari-1987 sampai tanggal 18-Februari-1987.

3. Cara Kerja

a. Pengambilan Sampel

Darah diambil dari vena Abdominalis subcutaneus dengan spuit steril sebanyak 10 ml. Ditampung dalam tabung pemusing bersih dengan penutup karet, disimpan dalam peti kemas bersuhu 4° C, kemudian segera dibawa ke laboratorium.

Darah tersebut dipusingkan dengan kecepatan 2500rpm selama 10 menit. Serum diambil, ditempatkan dalam tabung reaksi steril dan ditutup dengan karet. Serum disimpan dalam lemari es (suhu 4° C) sampai dilakukan pemeriksaan.

b. Pemeriksaan Sampel

Pemeriksaan kadar kalsium dalam serum darah dilakukan dengan cara kompleksometri. Titrasi menggunakan larutan EDTA (Henry dkk., 1974).

Cara kerja :

1. Pipet ke dalam labu erlenmeyer :
 - a. Standar: 0,50 ml larutan standar kalsium*.
 - b. Sampel : 0,50 ml serum + sedikit Amil alkohol.
2. Tambahkan ke dalam masing-masing erlenmeyer dengan:

2,5 ml KOH 1,25 N, campur hingga rata.

0,25 ml indikator Calcon.
3. Segera dilakukan titrasi dengan larutan EDTA sampai terjadi perubahan warna dari merah menjadi biru.

Perhitungan:

$$\text{mg Ca/100 ml serum} = \frac{\text{ml titran sampel}}{\text{ml titran standar}} \times \frac{106,7679}{10}$$

Pemeriksaan kadar fosfor dalam serum darah dilakukan dengan cara spektrofotometri. Bahan diperiksa pada panjang gelombang 660 nm (Henry dkk., 1974).

Cara kerja :

1. Pipet ke dalam tabung pemusing 0,4 ml serum, tambah 10 ml Fe-TCA, kocok kemudian diamkan 10 menit. Pusingkan sampai supernatan jernih.
2. Pipet ke dalam kuvet kering :
 - a. Blanko : 5 ml Fe-TCA + 0,2 ml H₂O
 - b. Standar: 5 ml Fe-TCA + 0,2 standar fosfor**
 - c. Sampel : 5,2 ml supernatan dari langkah (1).

* Larutan standar mengandung kalsium 106,7679 ppm.

**Larutan standar fosfor yang digunakan ada 2 macam :

5,0475 mg P/100 ml dan 5,1841 mg P/100 ml.

3. Pada masing-masing kuvet tambahkan :

0,5 ml reagen molibdat, dan amati setelah 20 menit dengan panjang gelombang 660 nm.

Perhitungan:

$$\text{mg P/100 ml serum} = \frac{A \text{ sampel}}{A \text{ standar}} \times \text{standar fosfor}$$

A = Absorben. (Henry dkk., 1974)

Karena yang terbaca pada skala spektrofotometer adalah % T (persen transmitten), maka absorben dapat dicari dengan perhitungan sebagai berikut:

$$A = \log \frac{1}{T} = \log 100 - \log T.$$

4. Analisis Data

Data yang diperoleh dari pemeriksaan ini dianalisis dengan uji t (Budiarto, 1984; Sudjana, 1982; Steel dan Torrie, 1980). Pengujian dilakukan secara dua pihak, sehingga pasangan hipotesis nol dan hipotesis alternatif yang akan diuji adalah :

1. H_0 : Tidak ada perbedaan kadar kalsium dalam serum darah sapi yang air susunya sering pecah (uji alkohol positif) dengan sapi yang air susunya normal (uji alkohol negatif).

H_1 : Terdapat perbedaan kadar kalsium dalam serum darah sapi yang air susunya sering pecah (uji alkohol positif) dengan sapi yang air susunya normal (uji alkohol negatif).

2. H_0 : Tidak ada perbedaan kadar fosfor dalam serum darah sapi yang air susunya sering pecah (uji alkohol positif) dengan sapi yang air susunya normal (uji alkohol negatif).

H_1 : Terdapat perbedaan kadar fosfor dalam serum darah sapi yang air susunya sering pecah (uji alkohol positif) dengan sapi yang air susunya normal (uji alkohol negatif).

Secara umum hipotesis nol dan hipotesis alternatifnya dapat dirumuskan sebagai berikut :

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1: \mu_1 \neq \mu_2$$

Karena kedua simpangan baku populasi tidak diketahui dan keduanya tidak sama, maka statistik yang digunakan adalah

$$t' = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{(s_1^2/n_1) + (s_2^2/n_2)}} \quad (\text{Steel dan Torrie, 1980})$$

Kriteria pengujian adalah: Hipotesis nol diterima jika :

$$-\frac{w_1 t_1 + w_2 t_2}{w_1 + w_2} < t' < \frac{w_1 t_1 + w_2 t_2}{w_1 + w_2}$$

$$\text{dengan : } w_1 = s_1^2/n_1 \quad ; \quad w_2 = s_2^2/n_2$$

$$t_1 = t_{\alpha, (n_1 - 1)}$$

$$t_2 = t_{\alpha, (n_2 - 1)} \quad (\text{Budiarto, 1984; Sudjana, 1982}).$$

$t_{\alpha, m}$ didapat dari daftar distribusi Student, dengan peluang α dan $dk = m$.

Untuk harga-harga t lainnya, H_0 ditolak

Keeratan hubungan antara kadar kalsium dan fosfor dalam serum darah dianalisis dengan menggunakan analisis korelasi (Sudjana, 1982). Untuk itu perlu dicari koefisien korelasinya dengan rumus :

$$r = \frac{n \cdot \sum xy - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{\{n \cdot \sum x^2 - (\sum x)^2\} \{n \cdot \sum y^2 - (\sum y)^2\}}}$$

Kemudian koefisien korelasi (r) yang didapatkan diuji dengan statistik t dengan rumus :

$$t = \frac{r}{\sqrt{\left(\frac{1 - r^2}{n - 2}\right)}}$$

Karena pengujian dilakukan secara dua pihak, maka pasangan hipotesis nol dan hipotesis alternatif yang akan diuji adalah :

1. H_0 : Tidak ada korelasi antara kadar kalsium dan fosfor dalam serum darah sapi yang air susunya normal (uji alkohol negatif).
- H_1 : Terdapat korelasi antara kadar kalsium dan fosfor dalam serum darah sapi yang air susunya normal (uji alkohol negatif).

2. H_0 : Tidak ada korelasi antara kadar kalsium dan fosfor dalam serum darah sapi yang air susunya sering pecah (uji alkohol positif).

H_1 : Terdapat korelasi antara kadar kalsium dan fosfor dalam serum darah sapi yang air susunya sering pecah (uji alkohol positif).

Secara umum hipotesis nol dan hipotesis alternatifnya dapat dirumuskan sebagai berikut:

$$H_0 : r = 0$$

$$H_1 : r \neq 0$$

Kriteria pengujian adalah : Hipotesis nol diterima jika

$$- t_\alpha < t < t_\alpha$$

t_α didapat dari daftar distribusi Student, dengan derajat kebebasan = $(n - 2)$.

Untuk harga-harga t lainnya, H_0 ditolak.