

BAB III
MATERI DAN METODE

Multi Jasa

BAB III

MATERI DAN METODE

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan Laboratorium Virologi-Immunologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Penelitian ini dilaksanakan selama dua bulan, mulai September sampai November 2002. Ayam percobaan dipelihara di kandang hewan percobaan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, sedangkan pengukuran titer antibodi HI dilakukan di Laboratorium Virologi-Immunologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya.

3.2. Materi Penelitian

3.2.1. Hewan Coba

Dalam penelitian ini digunakan 32 ekor ayam broiler strain CP 707 berumur empat belas hari

3.2.2. Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah vaksin ND aktif strain Hotchner B-1, tablet *chlorella* buatan PT. Centra Nusa Insancemerlang dengan dosis 200 mg, antigen ND, larutan NaCl fisiologik, serum ayam, suspensi eritrosit ayam 0.5%, antikoagulan EDTA, aquadest, dan alkohol.

3.2.3. Alat Penelitian

Alat - alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah tabung venoject, tabung microcentrifuge, microplate V shape, microdiluter 0.025 ml dan 0.05 ml, pipet hisap 1 ml dan 10 ml, pipet pasteur, spuit disposable 1 ml dan 3 ml, beker glass 50 ml, erlenmeyer 50 ml, centrifuge, dan lemari es.

3.3. Metode penelitian

3.3.1. Persiapan Penelitian

Sebelum penelitian dimulai, semua kandang difumigasi dengan KMnO_4 dan formalin 40%. Kandang indukan diberi lampu 10 watt sebanyak dua buah yang diletakkan sedemikian rupa dan dinyalakan sehari sebelum DOC dimasukkan ke dalam kandang. Setelah umur 21 hari lampu dimatikan.

3.3.2. Perlakuan Hewan Coba

DOC yang berjumlah 32 ekor dipelihara dahulu dalam kandang indukan sampai berumur 14 hari. Setelah berumur 14 hari ayam dimasukkan kedalam kandang percobaan yang dipilih secara acak kemudian diberi nomor perlakuan. Kemudian semua ayam divaksinasi secara intraokuler pada umur 21 hari. Perlakuan yang diberikan untuk ayam-ayam tersebut sebagai berikut :

Perlakuan pertama (P0) : Tanpa penambahan *chlorella*

Perlakuan kedua (P1) : Penambahan *chlorella* 1 minggu sebelum dan satu minggu setelah vaksinasi ND (umur 14 sampai dengan 28 hari).

Perlakuan ketiga (P2) : Penambahan *chlorella* 1 minggu sebelum vaksinasi ND (umur 14 sampai dengan 21 hari).

Perlakuan keempat (P3): Penambahan *chlorella* 1 minggu setelah vaksinasi ND (umur 21 sampai dengan 28 hari)

Semua perlakuan (P1 s/d P3) diberikan *chlorella* dosis 200mg/ekor/hari

III.3.3. Pengambilan Serum

Pengambilan serum dilakukan pada umur 18 hari (tiga hari sebelum vaksinasi), 28 hari, 35 hari dan 42 hari (seminggu sampai dengan tiga minggu pasca vaksinasi), melalui vena axillaris sebanyak 1 ml dengan menggunakan spuit disposable secara aseptis. Darah segera dipindahkan kedalam tabung venoject, disumbat dengan karet dan diletakkan dalam posisi miring, ditunggu beberapa saat hingga terjadi pemisahan antara serum dan bekuan darah. Bila belum terjadi pemisahan, maka darah disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit. Serum yang telah terpisah segera dipindahkan kedalam tabung lain, kemudian dilabel sesuai dengan masing-masing perlakuan dan disimpan dalam freezer -20°C sampai saat diperiksa.

III.3.4. Pemeriksaan Sampel

Pemeriksaan titer antibodi dilakukan tiga hari sebelum vaksinasi serta setiap minggu pasca vaksinasi, mulai minggu pertama sampai dengan minggu ketiga pasca vaksinasi. Pemeriksaan titer antibodi dilakukan dengan menggunakan Uji Hambatan Hemaglutinasi (*Hemagglutination Inhibition, HI*) mikroteknik (Allan, *et.al*, 1978).

III.3.4.1. Pelaksanaan Uji HI Mikroteknik

Langkah-langkah dalam melakukan uji HI Mikroteknik sebagai berikut :

1. Lubang microplate diisi dengan 0,025 ml dari lubang satu sampai lubang dua belas.
2. Lubang satu sampai lubang dua belas (lubang dua belas sebagai kontrol serum) diisi dengan serum yang diperiksa sebanyak 0,025 ml dengan menggunakan micropipet dropper 0,025 ml.
3. Dengan menggunakan microdiluter 0,025 ml campurkan serum sebanyak 0,025 ml dengan PZ pada lubang satu dengan cara memutar-mutar microdiluter kemudian pindahkan ke lubang berikutnya, demikian seterusnya hingga lubang sepuluh.
4. Lubang satu sampai lubang sepuluh diisi dengan antigen 4 HA unit sebanyak 0,025 ml dengan menggunakan micropipet dropper.
5. Diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit.
6. Semua lubang diisi dengan 0,05 ml suspensi eritrosit ayam 0,5 % menggunakan micropipet dropper 0,025 ml.

7. Diinkubasi lagi pada suhu kamar selama 30 menit.
8. Titer dibaca, pembacaan titer sebaiknya di bandingkan dengan kontrol eritrosit (Allan et al., 1978)

III.3.5. Parameter yang Diamati

Titer antibodi diukur dengan menggunakan Uji Hambatan Hemaglutinasi. Titer antibodi dihitung dari rata-rata titer HI ($\log 2$) dalam masing-masing kelompok perlakuan.

III.3.6. Rancangan Penelitian dan Analisis Data

III.3.6.1. Rancangan Penelitian

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap Pola Faktorial 4X3, dimana faktor A (waktu penambahan *chlorella*) mempunyai empat taraf, yaitu tanpa penambahan *chlorella*, penambahan tablet *chlorella* satu minggu sebelum dan satu minggu sesudah vaksinasi, penambahan *chlorella* satu minggu sebelum vaksinasi, dan penambahan *chlorella* satu minggu sesudah vaksinasi. Faktor B (waktu pengamatan) mempunyai tiga taraf, yaitu pengamatan pada umur 28 hari, 35 hari dan 42 hari. Semua kelompok perlakuan dilakukan delapan kali ulangan.

III.3.6.2. Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pemeriksaan titer antibodi pada berbagai interval waktu dianalisis dengan menggunakan sidik ragam (ANAVA). Pengaruh bermakna dalam pengujian Analisis Varian dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT 5%). (Kusriningrum, 1990; Steel, 1993).