

**TESIS**

**PENGGUNAAN INFUSUM BIJI JINTAN HITAM SEBAGAI  
IMUNOMODULATOR PADA AYAM YANG DI BERI  
STRES PANAS TERHADAP KADAR Hsp70**

**PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIK**



Oleh:

Asih Kurnia Srihartini

NIM 090810637 M

**PROGRAM STUDI VAKSINOLOGI DAN IMUNOTERAPETIKA**

**PROGRAM MAGISTER**

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA**

**SURABAYA**

**2011**

**TESIS**

**PENGGUNAAN INFUSUM BIJI JINTAN HITAM SEBAGAI  
IMUNOMODULATOR PADA AYAM YANG DIBERI  
STRES PANAS TERHADAP KADAR Hsp70**

**PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIK**

Oleh:

**Asih Kurnia Srihartini**

**NIM 090810637 M**

**PROGRAM STUDI VAKSINOLOGI DAN IMUNOTERAPETIKA  
PROGRAM MAGISTER  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2011**

**PENGGUNAAN INFUSUM BIJI JINTAN HITAM SEBAGAI  
IMUNOMODULATOR PADA AYAM YANG DIBERI  
STRES PANAS TERHADAP KADAR Hsp70**

**PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIK**

**TESIS**

**Untuk Memperoleh Gelar Magister  
Dalam Program Studi Vaksinologi dan Imunoterapetika  
Pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga  
Surabaya**

Oleh:

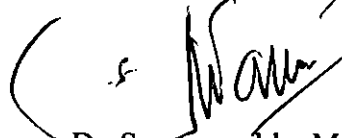
**Asih Kurnia Srihartini  
NIM 090810637 M**

**PROGRAM STUDI VAKSINOLOGI DAN IMUNOTERAPETIKA  
PROGRAM MAGISTER  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2011**

**LEMBAR PENGESAHAN**

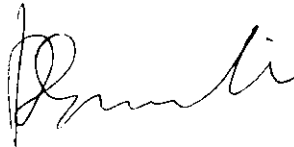
TESIS INI TELAH DIUJI  
PADA TANGGAL 21 JANUARI 2011

Pembimbing Ketua



Dr. Suwarno, drh., M.Si  
NIP.196105151989031002

Pembimbing



Prof. Dr. Rahayu Ernawati, drh., M.Sc.  
NIP. 195010031976032001

Mengetahui,

Ketua Program Studi  
Magister Vaksinologi dan Imunoterapeutika  
Program Pascasarjana  
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga



Prof. Dr. Rahayu Ernawati, drh., M.Sc.  
NIP. 195010031976032001

Tesis ini telah diujikan dan dinilai  
oleh panitia penguji pada  
Program Studi Vaksinologi dan Imunoterapetika  
Pada tanggal 21 Januari 2011

**Panitia Penguji**

**Ketua Penguji** : **Prof. Dr. Setiawan Koesdarto, drh., M.Sc.**

**Anggota** : **Dr. Hani Plumeriastuti, drh., M.Kes.**

**Dr. Ngakan Made Rai Widjaja, drh., MS.**

**Dr. Suwarno, drh., M.Si.**

**Prof. Dr. Rahayu Ernawati, drh., M.Sc.**

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas rahmat serta hidayah yang diberikan kepada penulis hingga tersusunnya tesis dengan judul **PENGGUNAAN INFUSUM BIJI JINTAN HITAM SEBAGAI IMUNOMODULATOR PADA AYAM YANG DIBERI STRES PANAS TERHADAP KADAR Hsp70.**

Tesis ini dapat diselesaikan tidak lepas dari dorongan, bimbingan, arahan, saran dan koreksi dari para pembimbing, oleh karena itu dengan segala kerendahan hati, perkenankan penulis manghaturkan terima kasih yang tulus serta penghargaan setinggi-tingginya kepada yang terhormat :

Dr. Suwarno, drh., M.Si. sebagai Pembimbing Ketua yang telah dengan penuh pengertian, perhatian dan kesabaran memberikan dukungan moral, meluangkan banyak waktu untuk berdiskusi dan memberi masukan agar penelitian bisa berjalan baik dan benar.

Prof. Dr. Rahayu Ernawati, drh., M.Sc., sebagai Pembimbing Kedua yang telah memberikan bimbingan yang besar sekali manfaatnya bagi penulis dalam membentuk pola pikir ilmiah yang baik dan benar.

Perkenankan pula penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada :

Prof. Dr. H. Fasich, Apt. selaku Rektor Universitas Airlangga atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada penulis untuk mengikuti dan menyelesaikan Program Magister pada Fakultas kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Prof. Romziah Sidik, PhD., drh selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan para Wakil Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas

kesempatan yang diberikan untuk mengikuti pendidikan Program Magister di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, sehingga penulis dapat menyelesaikan tulisan ini.

Prof. Dr. Rahayu Ernawati, drh., M.Sc selaku Ketua Program Studi Vaksinologi dan Imunoterapetika Program Magister Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada penulis untuk menjadi mahasiswa Program Magister.

Seluruh tim penguji, Prof. Dr. Setiawan Koesdarto, drh., M.Sc., Dr. Hani Plumeriastuti, drh., M.Kes., dan Dr. Ngakan Made Rai Widjaja, drh., MS. atas masukan saran dan koreksinya untuk perbaikan usulan penelitian tesis ini.

Seluruh staf pengajar pada Program Magister Vaksinologi dan Imunoterapetika yang telah memberikan ilmu dasar dan terapan yang sangat bermanfaat.

Seluruh staf di Laboratorium Virologi dan Imunologi, Kandang Hewan Coba, Laboratorium Patologi Veteriner, dan Laboratorium Patologi Klinik Veteriner atas bantuan, kemudahan dan kerjasama yang diberikan pada penulis terkait pelaksanaan penelitian di lapangan dan di laboratorium.

Seluruh teman senasib seperjuangan, Suryo Kuncorojakti, drh., M.Vet., Retno Wulan Handayani, drh., M.Vet., Aulia Firmawati, drh., M.Vet., Kholik, drh., Maulana Hanief Rachman, drh., Lita Rakhma Yustinasari, drh., Freshinta Jellia Wibisono, drh., Agatha Ria S., Linda Hervina, Luluk Setya A., Berlian Kusuma D., dan Purnaning Dhian I., yang telah bahu membahu, bekerjasama dan saling memberi motivasi untuk menyelesaikan pendidikan ini.

Kedua orang tua saya, Bapak Ghoefron Noerhadji dan Ibunda Farikah serta Nenek Karsi yang telah mengasuh, mendidik, mengayomi, menafkahi dan memberi tauladan yang baik dengan penuh kasih sayang hingga saat ini. Adik-adikku untuk dukungan dan pengertiannya

serta tentunya kepada suamiku, Hahang Dwinanda, drh. yang selalu ada kapanpun disaat dibutuhkan dan membuat semuanya terasa lebih baik.

Akhirnya penulis menyadari bahwa tulisan ini jauh dari sempurna.

Semoga hasil penelitian ini nantinya bermanfaat dan dapat menjadi informasi yang berharga bagi dunia Kedokteran Hewan.

Surabaya, Maret 2011

Penulis



## RINGKASAN

Lingkungan yang panas merupakan salah satu *stressor* penting yang berperan dalam produksi ternak unggas. Disisi lain, usaha peternakan unggas khususnya peternakan broiler, untuk produksi daging *broiler* mengalami pertumbuhan yang cukup pesat. Hal ini disebabkan semakin meningkatnya konsumsi masyarakat akan protein hewani yang diperoleh dari daging unggas. Ayam ras termasuk jenis ternak ayam yang sangat peka terhadap berbagai bentuk stresor (fisik maupun psikis), termasuk terhadap stres panas (*heat stress*). Paparan suhu yang tinggi akan menimbulkan efek stres pada *broiler*.

Pada kondisi stres, rangkaian protein dapat rusak, mengalami kesalahan susunan, dan memicu terjadinya formasi agregat. *Chaperone* molekular dapat didefinisikan sebagai protein yang memfasilitasi perbaikan susunan protein lain sehingga protein tersebut dapat mencapai struktur yang stabil. *Heat Shock Protein* (Hsp) merupakan satu dari klas utama *chaperone molecular*.

Seringnya bangsa unggas mendapatkan paparan panas secara konstan sehingga menderita *heat stress* utamanya pada negara-negara tropis, maka banyak studi diadakan yang melibatkan ekspresi Hsp 70 pada ayam *broiler*.

Hewan percobaan yang digunakan pada penelitian ini adalah ayam *broiler* dengan *strain* Cobb 500 produksi PT. Wonokoyo Jaya Corp., dari DOC sampai umur 28 hari. Hewan coba dipelihara standar dari umur 1 hari sampai umur 14 hari setelah memasuki umur 15 hari baru diberikan perlakuan berupa stres panas menggunakan suhu 35°C dan 38°C yang bersamaan dengan suplementasi infusum biji jintan.

Pembuatan infusum biji jintan hitam (*Nigella sativa*) dilakukan di laboratorium Farmakognosi dan Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya. Pemeliharaan ayam dilakukan di Kandang Hewan Coba Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan pemeriksaan kadar Hsp70 menggunakan kit ELISA *Chicken Hsp70* (Cusabio Biotech Co., LTD *Catalog* No. CSB-E11196Ch.) dilakukan di Laboratorium Virologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini berupa rancangan acak lengkap dengan pola faktorial 3x3 dan data hasil dianalisis menggunakan analisis varian (Anova) yang dilanjutkan dengan uji F.

Hasil yang didapat setelah 45 ekor ayam *broiler* Cobb500 tersebut mendapat perlakuan stres panas dan suplementasi infusum biji jintan hitam adalah untuk ayam yang tidak mendapat suplementasi infusum biji jintan hitam namun diberikan stres panas, maka kadar Hsp70 yang terdapat dalam serum darah mengalami penurunan bila dibandingkan dengan ayam yang mendapat perlakuan stres panas namun tidak mendapatkan suplementasi infusum biji jintan hitam.

Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa infusum biji jintan mempengaruhi nilai OD dan nilai kadar Hsp70 dengan menurunkan kadar Hsp70 pada ayam yang diberi stres panas sehingga kesimpulannya adalah infusum biji jintan hitam dapat dimanfaatkan sebagai upaya pencegahan terhadap dampak buruk yang disebabkan oleh stres panas.

## **SUMMARY**

### **BLACK SEED INFUSION AS IMMUNOMODULATOR FOR HEAT STRESSED CHICKEN ON Hsp70 LEVEL**

**Asih Kurnia Srihartini**

Dry environment is one of the most important stressors which influence the poultry industry. Poultry industry, especially broiler, experiences a fast meat growing production due to public consumption increased for protein which obtained from poultry meat. Broiler is sensitive with various stressors (physically as well as mechanically) include heat stress. High temperature may causes stress for broiler.

Under stress condition, protein series may damaged, misfolded, and prone to form agregate formation. Molecular chaperone by definition is protein which assists another protein structure to form stable formation. Heat Shock Protein (Hsp) is one of the main class of chaperone molecular. Hsp is classified based on molecular weight which are consist of 10kD, 40kD, 60kD, 70kD, 90kD, and 110kD. Hsp70 is the most inducible protein under stress condition triggered by heat.

Mainly in tropical countries, poultry animals tend to meet heat level of dry environment constantly with the heat stress as the result. Accordingly a lot of studies has performed implicate Hsp70 expression in broiler.

Animal used in this study was PT. Wonokoyo Jaya Corp. broiler Cobb500 which was reared from day old chick (DOC) until reached 28days old. Broilers were reared according to the standard procedure from DOC until reached 14 days old, after get into day 15, broilers were

stressed using high temperatures which was vary from 35°C and 38°C in conjunction with black seed infusion supplementation.

Production of the black seed infusion was done at faculty pharmacy of Airlangga University Surabaya. Broilers were reared in faculty of veterinary medicine of Airlangga Univeristy Surabaya and the Hsp70 examination was done at laboratory of virology faculty of veterinary medicine of Airlangga University using kit ELISA Chicken Hsp70 (Cusabio Biotech Co., LTD Catalog No. CSB-E11196Ch.). Experimental design which was used in this study was complete random sampling with 3x3 factorial design then the result data analyzed using analysis of variance (Anova) then continued with F test.

Result from this study was after 45 Cobb500 broilers were stressed using high temperatures in conjunction with black seed infusion supplementation that broilers which were supplemented with black seed infusion but stressed with high temperatures showed reduction of the Hsp70 level in blood serum compared with broilers stressed with high temperatures but not supplemented with black seed infusion.

Regarding those result has showed us that the black seed infusion influenced the Hsp70 level in blood serum and can be used as an immunomodulator as an precaution effort which caused by heat stress.

**BLACK SEED INFUSION AS IMMUNOMODULATOR  
FOR HEAT STRESSED CHICKEN ON Hsp70 LEVEL**

**Asih Kurnia Srihartini**

**ABSTRACT**

This study was aimed to know heat stress effect after supplementation of black seed (*Nigella sativa*) infusion for Hsp70. About 45 experimental broilers Cobb500 were stressed using high temperature which was vary from 35°C and 38°C for 8 hours started from 8am to 4pm, also 28°C as treatment control. Those temperatures based on the most temperature which might be achieved during dry season in Indonesia. Infusion of black seed served for 20% and 40% and applied orally. After chickens reached 29 days old, the blood serum collected and taken from brachial vein henceforth examined using ELISA kit Chicken Hsp70 (Cusabio Biotech Co., LTD *Catalog* No. CSB-E11196Ch.). The result showed that black seed infusion could reduce Hsp70 rate significantly on stressed broiler than stressed broiler which were not supplemented with black seed infusion. Black seed infusion with 20% concentration was enough to give protective effect against heat stress of hot climate. Thymoquinone as an active ingredient of black seed might work as antiinflammation which also happened on stressed broilers.

**Keywords :** Heat stress, black seed, Hsp70

**DAFTAR ISI**

SAMPUL DALAM.....	i
PRASYARAT GELAR.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN .....	iii
UCAPAN TERIMA KASIH.....	v
RINGKASAN .....	viii
SUMMARY .....	x
ABSTRACT .....	xii
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR TABEL.....	xvii
DAFTAR GAMBAR .....	xviii
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG .....	xix
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b>	
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	7
1.3. Tujuan Penelitian	
1.3.1. Tujuan Umum.....	7
1.3.2. Tujuan Khusus.....	8
1.4. Manfaat Penelitian	
1.4.1. Manfaat Teoritis.....	8
1.4.2. Manfaat Praktis.....	8
<b>BAB 2. Tinjauan Pustaka</b>	
2.1. Stres Panas ( <i>Heat Stres</i> ) Pada <i>Broiler</i>	

2.1.1. Permasalahan Stres Panas Pada <i>Broiler</i> .....	9
2.1.2. Pengaruh Suhu Lingkungan Terhadap Suhu Tubuh <i>Broiler</i> .....	10
2.1.3. Heat Loss Method Pada <i>Broiler</i> .....	12
2.2. Jintan Hitam	
2.2.1. Klasifikasi Jintan Hitam .....	14
2.2.2 Morfologi dan Ekologi .....	15
2.2.3 Kandungan Kimia .....	15
2.2.4 Efek Immunopotensiasi Jintan Hitam .....	16
2.3. Stres dan Respon Imun .....	17
2.3.1 Stres dan Pelepasan Kortisol .....	17
2.3.2 Heat Shock Protein (Hsp) .....	18
<b>BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN</b>	
3.1. Kerangka Konseptual.....	31
3.2. Hipotesis Penelitian .....	34
<b>BAB 4. MATERI DAN METODE</b>	
4.1. Jenis dan Rancangan Penelitian.....	35
4.2. Materi Penelitian	
4.2.1 Bahan Penelitian	
a. Hewan Percobaan .....	35
b. Infusum Biji Jintan Hitam .....	36
c. Kit ELISA Chicken Hsp70 .....	36
4.2.2 Alat Penelitian .....	36
4.3. Variabel Penelitian	

DAFTAR PUSTAKA .....	64
Lampiran 1. Analisis Data .....	70
Lampiran 2. Kurva Standard Kit ELISA Chicken Hsp70 .....	83
Lampiran 3. Data Hasil Pemeriksaan Kadar Hsp70 menggunakan Kit ELISA Chicken Hsp70.....	84
Lampiran 4. Dokumentasi Penelitian .....	86



## DAFTAR TABEL

### Tabel

2.1.	<i>Heat Loss Method</i> .....	12
2.2.	Keluarga Hsp70 dan Anggotanya .....	26
2.3.	Reaksi Silang Immunologis yang Dimiliki Hsp Homolog dengan Mikroba.....	27
2.4.	Reseptor Hsp pada Sistem Imun .....	28
5.1.	Rata-rata Nilai OD & Nilai Kadar Hasil Pengujian Hsp70.....	46
5.2.	Nilai Kadar Hasil Pengujian Hsp70 pada Ayam Broiler .....	47
5.3.	Sidik Ragam Nilai <i>Optical Density</i> Hsp70.....	50
5.4.	Sidik Ragam Nilai Kadar Hsp70.....	51
5.5.	Hasil Uji Duncan pada Nilai OD Hsp70 Terhadap Suhu.....	52
5.6.	Hasil Uji Duncan pada Nilai OD Hsp70 Terhadap Konsentrasi.....	52
5.7.	Hasil Uji Duncan Nilai Kadar Hsp70 Terhadap Suhu .....	52
5.8.	Hasil Uji Duncan Nilai Kadar Hsp70 Terhadap Konsentrasi.....	53

## DAFTAR GAMBAR

### Gambar

2.1	Morfologi Tanaman Jintan Hitam ( <i>Nigella sativa</i> ).....	14
2.2	Biji Jintan Hitam.....	15
2.3	Skematis keberadaan beberapa Hsp termasuk Hsp70 dalam sel.....	25
2.4.	Modulasi Jalur Apoptosis oleh <i>Heat Shock Protein</i> .....	29
2.5	<i>Cytokine-inducing effects</i> dari Hsp70.....	30
3.1	Bagan Kerangka Konseptual Penelitian.....	34
4.1	Diagram Alur Penelitian.....	45
5.1.	Hasil Pemberian Infusum Biji Jintan Hitam Terhadap Kadar Hsp70.....	48

**SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG**

ACTH	: <i>Adrenocorticotropic Hormone</i>
ADP	: <i>Adenosine Diphosphate</i>
APC	: <i>Antigen Presenting Cell</i>
ATP	: <i>Adenosine Tri Phosphate</i>
Bcl-2	: <i>B cell Lymphoma-2</i>
CD4 <sup>+</sup>	: <i>Cluster of Differentiation 4</i>
CO <sub>2</sub>	: <i>Karbon dioksida</i>
CRF	: <i>Corticotropin Releasing Factor</i>
CTLs	: <i>Cytotoxic Lymphocytes</i>
DOC	: <i>Day Old Chick</i>
Elisa	: <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ER	: <i>Endoplasmik Retikulum</i>
GH	: <i>Growth Hormone</i>
GRP	: <i>Glucose-Regulated Protein</i>
HPA	: <i>Hypothalamus Pituitary Adrenal</i>
Hsc	: <i>Heat Shock Cognate</i>
Hse	: <i>Heat Shock Element</i>
Hsf	: <i>Heat Shock Factor</i>
Hsp	: <i>Heat Shock Protein</i>
IFN $\gamma$	: <i>Interferon Gamma</i>
IL-	: <i>Interleukin</i>
MHC	: <i>Major Histocompatibility Complex</i>

mRNA	: <i>messenger Ribo Nucleid Acid</i>
NaOH	: Natrium Hidroksida
NF- $\kappa$ $\beta$	: <i>Nuclear Factor Kappa Beta</i>
NK	: <i>Natural Killer</i>
OD	: <i>Optical Density</i>
PBLs	: <i>Peripheral Blood Leukocytes</i>
SAM	: <i>Symphatetic-Adrenal-Medullary</i>
T <sub>h</sub>	: <i>T Helper</i>
T <sub>s</sub>	: <i>T Suppresor</i>
TNF $\alpha$	: <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
TLR	: <i>Toll-Like Receptor</i>
°C	: <i>Derajat Celcius</i>
%	: <i>Persentase</i>
$\beta$	: <i>Beta</i>
$\mu$ l	: <i>Mikroliter</i>
ml.	: <i>mililiter</i>
nm.	: <i>nano meter</i>
23G	: <i>23 gauge</i>
$\textcircled{\text{P}}$	: <i>Fosforilasi</i>

**BAB 1**  
**PENDAHULUAN**

## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang Permasalahan

Lingkungan yang panas merupakan salah satu *stressor* penting yang berperan dalam produksi ternak unggas. Stres panas tersebut di antaranya dihasilkan dari interaksi antara temperatur udara, kelembaban, panas pancaran, dan kecepatan udara, sementara yang berperan utama adalah temperatur udara. Temperatur optimum untuk pemeliharaan ayam adalah 19°C-22°C pada ayam petelur dan 18°C-22°C untuk pertumbuhan ayam *broiler*. Apabila temperatur yang berada di lingkungan sekitar melebihi dari yang disebutkan tadi maka akan muncul kondisi *heat stress*, juga bergantung pada strain, bulu, nutrisi, dan sistem produksi (Lin *et al.*, 2006).

Pada suhu lingkungan yang panas, ayam tumbuh dan bertelur dengan tambahan usaha untuk menjaga keseimbangan temperatur tubuhnya ke dalam kisaran yang normal, berhadapan dengan respons stres dan untuk memastikan bahwa fungsi organ visera berada dibawah batas panas yang berat. Respons stres utamanya dihubungkan dengan aktivasi aksis *hypothalamus-pituitary-adrenal* (HPA) dan sistem nervus orthosimpatik yang mana memperburuk efek kerusakan yang diakibatkan oleh temperatur tubuh yang tinggi. Efek buruk yang diakibatkan oleh heat stress diantaranya meliputi tingkat kematian yang tinggi, penurunan konsumsi pakan, dan peningkatan berat badan yang rendah dan juga penurunan kualitas karkas broiler, dan pada ayam petelur

juga mengalami penurunan rata-rata aktivitas bertelur, berat telur dan kualitas kerabang telur (Lin *et al.*, 2006).

Dilaporkan bahwa rerata pertumbuhan broiler setelah umur dua minggu dapat dicapai secara optimal bila suhu lingkungan berada pada kisaran 12,7°C - 23,88°C, serta kelembaban udara tidak lebih dari 60%. Pada kisaran suhu lingkungan yang normal, ayam dapat membuang kelebihan panas yang diterima dengan cara radiasi, konveksi dan konduksi atau *sensible heat loss method*. Metode pembuangan panas tersebut akan berubah secara bertahap menjadi *latent heat loss method* (yaitu cara pembuangan panas secara evaporatif melalui pernafasan atau *panting*), ketika suhu lingkungan beranjak melebihi 24°C. Pada suhu lingkungan diatas 30°C cara pembuangan panas pada broiler sepenuhnya akan dilakukan melalui cara evaporasi atau *panting*. *Panting* merupakan tanda klinis yang khas pada golongan unggas yang menderita *heat stress*, dimana bersamaan dengan hal tersebut akan terjadi berbagai gangguan fungsi normal tubuhnya (Moares *et al.*, 2003).

Patogenesis kerusakan berbagai organ dan jaringan pada *broiler* yang terpapar *heat stress* masih belum sepenuhnya diketahui secara pasti. Tanda klinis yang dijumpai diantaranya berupa ascites dan hipertensi paru-paru pada *broiler* yang menderita *heat stress* kronis dan diperkirakan bahwa hal tersebut dapat terjadi akibat dari: 1) terganggunya keseimbangan asam-basa dan homeostasis elektrolit plasma, 2) tertekannya respon imun, 3) gangguan

fungsi hormon, serta 4) terganggunya sistem pertahanan antioksidan (stres oksidatif). (Okolwski, 2005).

Rangsangan stres kronis dapat menyebabkan gangguan pada sistem imun sehingga tubuh mudah terinfeksi penyakit dan kanker. Stresor dapat memodulasi sistem imun dengan disekresikannya hormon kortisol (neuropeptida) selama stres, sel imunokompeten mempunyai reseptor terhadap hormon tersebut. Tingginya kadar hormon kortisol dalam darah dapat menyebabkan gangguan fungsi sel imun dalam aktifitasnya sebagai sel sekretorik maupun sel *antigen presenting*. Peningkatan ketahanan tubuh erat kaitannya dengan komponen sistem imun dalam merespon imunogen dan kondisi tubuh sendiri. Respons imun spesifik dimulai dengan aktifitas makrofag atau *antigen presenting cell* (APC) dalam memproses imunogen, selanjutnya dengan bantuan interleukin timbul interaksi dengan sel imunokompeten lainnya (Arimbi, 2000).

Pada kondisi stres, rangkaian protein dapat rusak, mengalami kesalahan susunan, dan memicu terjadinya formasi agregat. *Chaperone* molekular dapat didefinisikan sebagai protein yang memfasilitasi perbaikan susunan protein lain sehingga protein tersebut dapat mencapai struktur yang stabil. Tambahan lainnya *chaperone* molekular tersebut mengadakan penyusunan ulang dan mendegradasi protein terdenaturasi setelah mengalami stres selular. *Heat Shock Protein* merupakan satu dari klas utama *chaperone molecular* (Modisakeng *et al.*, 2004).



Fungsi ganda yang dimiliki *Heat shock protein* (Hsp) tergantung dari lokasinya apakah intraseluler ataukah ekstraseluler. Hsp intraseluler yang memiliki fungsi protektif yang membantu sel untuk bertahan dari kematian. Disisi lain, Hsp ekstraseluler atau yang terikat membran, memediasi fungsi imunologis. Hsp ekstraseluler dapat menimbulkan modulasi respon imun baik respon imun adaptif atau respon imun spesifik (Schmitt *et al.*, 2007).

Menurut penjelasan Schmitt *et al.*, (2007) sehubungan dengan fungsi ganda Hsp, maka Hsp ekstraseluler memiliki peran imunologis yang diantaranya adalah : 1) *peptide-carrier function*, 2) *cytokine-inducing effects*, dan 3) immunostimulan sel *Natural Killer*.

Seringnya bangsa unggas mendapatkan paparan panas secara konstan sehingga menderita *heat stress* utamanya pada negara-negara tropis, maka banyak studi diadakan yang melibatkan ekspresi Hsp 70 pada ayam *broiler*. Ekspresi Hsp 70 pada hepatosit broiler yang diberi paparan stres panas adalah bergantung pada suhu yang diberikan dan lamanya waktu pemaparan (Mazzi *et al.*, 2003).

Penanggulangan stres panas pada hewan unggas peternakan khususnya ayam broiler telah banyak dilakukan di antaranya dengan memberikan suplemen elektrolit dan multivitamin komersial, baik dalam dosis normal maupun dua kali dosis normal, namun itu masih dirasa kurang efektif bila ditinjau dari gambaran perubahan histopatologi organ (Arianto, 2008).

Panas merupakan induktor utama munculnya Hsp70. Paparan yang kontinyu dan rutin terhadap *heat stress sub lethal* selama 1,3, dari 5 minggu cukup untuk menjadikan unggas menginduksi lebih banyak mRNA Hsp 70 sama halnya dengan protein Hsp70 dibawah kondisi lingkungan panas yang akut. Hipertermia pada suhu 45,4°C memicu induksi signifikan Hsp70 pada ayam *broiler* (Rivera, 2004).

*Heat shock protein 70* merupakan protein poten yang mampu bertahan yang mana bila terjadi kekurangan (kekosongan) menjadi pemicu kematian besar-besaran sel tumor *caspase-independent*. Retikulosit ayam merespon terhadap peningkatan temperatur yang diakibatkan oleh induksi satu-satunya Hsp, yaitu Hsp70, sedangkan limfosit menginduksi sintesis keseluruhan empat Hsp (89, 70, 23, 22). Sintesis Hsp70 di limfosit secara cepat diinduksi oleh tingkat kenaikan suhu yang tidak terlalu banyak (2°-3°C) (Nylandsted *et al.*, 2004).

Jintan hitam diketahui dapat meningkatkan kekebalan tubuh karena dapat menekan sel T<sub>s</sub> (*suppresor*). Sel T<sub>s</sub> ditekan akan menyebabkan sel T<sub>h</sub> (*helper*) meningkat secara otomatis sehingga antibodi meningkat. Sel T<sub>h</sub> berfungsi untuk merangsang pembentukan sel B yang dapat membentuk sel plasma yang menghasilkan antibodi (Guler *et al.*, 2006).

*Thymoquinone*, yang memiliki struktur kimia C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>, merupakan substansi terbanyak yang di dapat dari tanaman tradisional jintan hitam. Mekanisme kerja *thymoquinone* ini dengan menghambat aktivitas

antiinflamasi dan antikanker yang jalurnya belum diketahui secara menyeluruh namun bisa dikaitkan interferensinya terhadap jalur penanda NF- $\kappa$ B (Winkler *et al.*, 2008). *Thymoquinone* menurunkan produksi TNF yang dapat menginduksi keberadaan NF- $\kappa$ B dan juga dapat menurunkan produksi NF- $\kappa$ B yang distimuli oleh berbagai agen karsinogenik dan inflamasi seperti polusi lingkungan, prooksidan, stres, dan faktor pertumbuhan. *Thymoquinone* sendiri relatif aman sekalipun bersifat mensupresi pertumbuhan sel-sel yang mengalami keganasan seperti pada kasus adenokarsinoma mammae, osteosarkoma, leukemia myeloblastik dan pankreatik karsinoma namun *thymoquinone* tidak toksik pada sel-sel yang normal (Isik *et al.*, 2005; Sethi *et al.*, 2008).

Jintan hitam merupakan bahan alami penyembuh penyakit yang sudah sering digunakan pada manusia. Tanaman tradisional ini sangat sedikit sekali dimanfaatkan peternak dalam penanganan penyakit hewan khususnya unggas. Penelitian ini mencoba memanfaatkan biji jintan hitam yang diproses dengan teknik pembuatan infusum dikarenakan cara pembuatan infusum tersebut relatif mudah, praktis, efektif dan ekonomis (Wijayanti, 2008). Maksud penggunaan infusum biji jintan hitam dalam penelitian ini adalah sebagai imunomodulator pada unggas yang diberi *stressor* panas. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Ritonga (2007), menjelaskan bahwa infusum biji jintan hitam konsentrasi 20% sudah cukup efektif untuk mengatasi dampak paparan stres yang diderita oleh ternak unggas sementara

dalam penelitian ini ditambahkan dosis 40% untuk mengetahui pengaruh peningkatan dosis dalam menurunkan kadar stres pada unggas. Biji jintan hitam dipilih dalam penelitian ini yaitu dikarenakan biji jintan hitam mudah didapat dan penggunaan biji jintan hitam dengan jumlah relatif sedikit saja sudah dapat memberikan hasil yang efektif.

## **1.2. Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang di atas, dapat dirumuskan suatu permasalahan yaitu

1. Apakah terdapat pengaruh perlakuan stres panas pasca pemberian infusum biji jintan hitam (*Nigella sativa*) terhadap nilai Optical Density Hsp70 dan nilai kadar Hsp70 setelah diperiksa menggunakan kit ELISA *Chicken* Hsp70?

## **1.3. Tujuan Penelitian**

### **1.3.1 Tujuan Umum**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penggunaan infusum biji jintan hitam (*Nigella sativa*) sebagai imunomodulator pada ayam *broiler* yang berada dalam kondisi terpapar panas.

### **1.3.2 Tujuan Khusus**

Dapat diketahui pengaruh pemberian infusum biji jintan hitam terhadap nilai kadar *heat shock protein 70* dalam serum ayam *broiler* yang diberikan stres panas setelah diperiksa menggunakan kit Elisa *chicken Hsp70*.

## **1.4 Manfaat Hasil Penelitian**

### **1.4.1 Manfaat Teoritis**

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan gambaran mengenai efektifitas infusum biji jintan hitam (*Nigella sativa*) sebagai imunomodulator pada ayam broiler yang dikondisikan terpapar panas sehingga diharapkan dapat mengatasi akibat dari stres panas yang merupakan salah satu faktor penyebab buruknya kualitas hasil produksi ayam *broiler*.

### **1.4.2 Manfaat Praktis**

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan tambahan informasi dan alternatif penggunaan infusum biji jintan hitam (*Nigella sativa*) sebagai imunomodulator bagi ternak ayam khususnya ayam *broiler* dalam mengatasi kondisi stres panas yang makin sering dihadapi seiring dengan makin buruknya efek pemanasan global di dunia sehingga nantinya dapat membantu peternak meningkatkan produksi baik secara kuantitatif maupun kualitatif.

**BAB 2**  
**TINJAUAN PUSTAKA**

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. *Heat Stress Pada Broiler*

#### 2.1.1 *Permasalahan Heat Stress Pada Broiler*

Pada industri peternakan komersial dengan pola pemeliharaan yang intensif, *broiler* sering dihadapkan pada berbagai permasalahan. Diantara permasalahan tersebut, *heat stress*, juga merupakan salah satu yang terpenting. Pada saat ini, stres panas tidak saja menjadi persoalan pada industri peternakan ayam komersial di negara-negara beriklim panas saja, tetapi juga negara-negara lain yang beriklim sedang dan dingin di seluruh dunia, antara lain akibat terjadinya pemanasan global. Suhu panas yang dikombinasi dengan kelembaban tinggi, tidak saja mengakibatkan morbiditas pada *broiler*, tetapi juga penurunan produksi. Selama berada dalam kondisi stres panas, aktifitas *broiler* akan terkurus pada proses adaptasi mengatur suhu, untuk menghindari dari kematian karena “kepanasan” (*heat exhaustion*). Sebagai akibatnya potensi genetik yang dimilikinya tidak dapat dicapai (Naseem *et al.*, 2005).

*Broiler* dikatakan menderita *heat stress*, apabila mengalami kesulitan dalam menjaga keseimbangan antara panas yang diterima (baik panas yang berasal dari hasil metabolisme/ *heat body* ataupun yang berasal dari lingkungan), dengan panas yang dikeluarkan (*heat loss*). Kegagalan dalam menjaga stabilitas suhu normal tubuh (pada kisaran yang sempit 41°C, dapat mengakibatkan gangguan fisiologis yang signifikan, dimana kenaikan temperatur tubuh diatas 42°C akan menyebabkan kematian (Emery, 2004).

Dibawah tekanan stres panas, unggas akan mengalami penurunan pertumbuhan, konsumsi pakan (*feed intake*), konversi pakan, produksi telur, daya tetas, kualitas kerabang telur, serta kualitas dan ukuran telur. Stres panas juga dapat mengakibatkan kematian pada semua jenis dan umur unggas, dimana unggas dewasa lebih beresiko dibandingkan unggas muda (Kocaman *et al.*, 2006; Lavergne, 2004).

Diantara perubahan fisiologis terpenting dan dapat mengakibatkan perubahan patologis pada *broiler* yang mengalami stres panas adalah *panting*. *Panting* merupakan cara terakhir dan satu-satunya yang dapat dilakukan *broiler* untuk mengurangi panas tubuh ketika suhu lingkungan mulai naik diatas 30°C (Grieve, 2003). Dilaporkan pula bahwa stres panas dapat mengaktivasi aksis *HypothalamicPituitary Adrenocortical* (HPA-axis) hingga menyebabkan meningkatnya kadar *adrenocorticotropin hormone* (ACTH) plasma, terutama kortisol. Peningkatan kadar kortisol pada plasma ini diyakini merupakan penyebab terjadinya perlemakan dan menurunnya kadar protein pada sel hepar, serta meningkatnya berat relatif dan presentase lemak hepar (Sheerwood, 2004; Baueur, 2001; Edens, 2001).

### 2.1.2 Pengaruh Suhu Lingkungan Terhadap Suhu Tubuh *Broiler*.

*Broiler* yang menderita stres panas menunjukkan beberapa perubahan tingkah laku seperti mengembangkan sayap, mengurangi gerak, dan *panting*. Perubahan juga terjadi didalam tubuh ayam antara lain adalah menurunnya aliran darah pada beberapa organ seperti hati, ginjal, dan usus, dan sebaliknya aliran darah ke daerah kulit meningkat. Perubahan perilaku dan fisiologis tersebut pada dasarnya bertujuan untuk



mengembalikan suhu normal tubuh ayam yang berkisar antara 41-42°C, dimana kenaikan suhu tubuh diatas 42°C akan mengakibatkan kematian (Naseem *et al.*, 2005).

Berbagai penelitian menunjukkan bahwa suhu lingkungan yang tinggi merupakan *stressor* eksternal yang paling penting yang dapat mempengaruhi suhu normal *broiler* dan mengakibatkan berbagai gangguan. Layaknya manusia, unggas termasuk *broiler* juga hidup pada lingkungan dengan suhu yang lebih rendah dibandingkan suhu tubuhnya. Berdasarkan pola dan lamanya paparan panas dan kelembaban yang terjadi, stres panas dibagi menjadi dua yaitu stres panas akut dan kronis. Stres panas akut adalah paparan oleh suhu dan kelembaban yang tinggi, yang terjadi secara mendadak dan dalam jangka waktu yang singkat (1-4jam). Sementara itu stres panas kronis adalah kombinasi paparan suhu dan kelembaban, yang terjadi secara perlahan dan terus meningkat dalam jangka waktu yang relatif lama (Emery, 2004).

Suhu tubuh normal (*per-rectal*) *broiler* adalah 41°C, ketika suhu lingkungan melebihi 30°C, maka *broiler* akan mengalami stres panas, dimana semakin lama paparan panas ini terjadi, semakin berat pula dampak yang terjadi. Pada paparan suhu lingkungan diatas 35°C, produktivitas *broiler* akan menurun drastis, dan apabila paparan panas terus berlangsung, angka mortalitas akan meningkat (Grieve, 2003; *Departement Rural Chemical Industries*, 2005).

Panas yang dihasilkan selama proses metabolisme merupakan faktor yang paling dominan dalam menentukan suhu tubuh pada *broiler*. Sementara itu, efektifitas produksi panas yang dihasilkan selama proses metabolisme, dipengaruhi berat badan, bangsa (*breed*) ayam, tingkat produksi, jumlah nutrisi yang dikonsumsi (*feed intake*), kualitas

dan ketersediaan pakan, serta aktivitas fisik (Cobb 500 breeder management guide, 2005).

### 2.1.3 Heat Loss Method Pada Broiler

Umumnya bangsa unggas sangat peka terhadap *stressor* (baik fisik maupun psikis) (Leandro, 2004). Moares *et al.*, (2003) menyatakan bahwa paparan suhu yang dikombinasi dengan kelembaban tinggi, dapat mengakibatkan dampak yang lebih serius pada ayam dibandingkan hewan lain, karena selain tidak memiliki kelenjar keringat, ayam sulit untuk membuang panas yang dihasilkan selama metabolisme akibat terhalang oleh “bulu” yang menutupi permukaan tubuhnya (*insulasi*).

Tabel 2.1 Heat Loss Method

<b>Heat Loss Method</b>	<b>Arah Aliran Panas</b>
<b>Radiasi</b> : aliran panas diantara permukaan objek tanpa medium perantara (panas matahari ke kulit).	Semua permukaan dapat memancarkan dan menerima radiasi netto, yang mengalir dari permukaan yang lebih panas ke yang lebih dingin.
<b>Konduksi</b> : Perpindahan energi panas antar objek membutuhkan media perantara (kontak fisik).	Panas mengalir menurut perbedaan gradient suhu antara keduanya (panas mengalir dari yang lebih tinggi ke yang lebih rendah).
<b>Konveksi</b> : Panas mengalir melalui medium seperti udara, gerakan udara (angin), dapat membawa panas mengalir meninggalkan permukaan objek.	Energi panas dapat pindah dan mengalir bersama udara, bila suhu udara lebih rendah dari permukaan objek (kulit).
<b>Latent Heat Loss Method</b>	<b>Arah Aliran Panas</b>
<b>Evaporasi</b> : Panas dipindahkan melalui cara penguapan (perubahan benda cair menjadi gas), jadi panas dikurangi dengan cara menggunakan energinya untuk merubah air menjadi gas.	Aliran panas masih ditentukan oleh kelembaban relatif di udara. Semakin tinggi presentase air (semakin lembab), maka semakin sulit evaporasi terjadi, demikian juga sebaliknya.

(Sumber : Anderson *and* Carter, 1998; Grieve, 2003).

Ayam memiliki beberapa cara dalam membuang/mengeluarkan kelebihan panas tubuhnya, ketiga cara yang pertama disebut *sensible heat loss* yang meliputi radiasi; konduksi dan konveksi. Metode *sensible heat loss* dapat dilakukan dan efektif membantu ayam dalam membuang panas tubuh, ketika suhu lingkungan tidak lebih dari atau suhu pada zona netral yaitu antara 12,7°C-18,33°C. Panas tubuh ayam terutama dikeluarkan melalui bagian tubuh yang tidak berbulu seperti pial, jengger, dan kulit dibawah sayap. Ketika suhu lingkungan mulai merangkak naik hingga mencapai 25°C ayam akan mulai merubah cara menghilangkan panas tubuhnya dari *sensible heat loss* menjadi *latent heat loss* dengan cara evaporasi. Evaporasi merupakan metode pengurangan panas yang membutuhkan banyak energi karena proses *panting* (hiperventilasi) merupakan proses aktif yang memerlukan banyak aktivitas otot-otot pernafasan. *Panting* mulai terlihat semakin jelas ketika suhu lingkungan telah mencapai lebih dari 26,6°C (Anderson and Carter, 1998).

Pada saat *sensible heat loss* tidak lagi efektif, maka evaporasi adalah jalan satu-satunya dan terakhir bagi ayam untuk membuang panas tubuhnya ke lingkungan sekitar. Pada industri peternakan komersial *broiler* dengan densitas yang tinggi, bisa menambah tingkat kelembaban relatif dalam kandang. Sistem ventilasi yang buruk dapat mengakibatkan stagnasi aliran udara yang mengandung banyak uap air dan CO<sub>2</sub> (dari respirasi), serta gas ammonia, hingga memperparah keadaan *broiler* yang terpapar *heat stress* yang disertai kelembaban (Moares *et al.*, 2003). Pada puncak musim panas, tingkat kematian *broiler* akibat *heat stress* akan meningkat tajam (lebih dari 5%), yang biasanya ditandai dengan adanya ascites dan kematian mendadak (*sudden death syndrome*) akibat *pulmonary hypertension* dan *cardiac arrhythmias* (Cherian, 2000).

## 2.2. Jintan Hitam

### 2.2.1 Klasifikasi Jintan Hitam

Menurut Sharma *et al.*, (2009) jintan hitam dapat diklasifikasikan sebagai berikut, Kingdom *Plantae*, Divisi *Magnoliophyta*, Ordo *Ranunculales*, Famili *Ranunculaceae*, Genus *Nigella*, dan Spesies *Nigella sativa*.

*Nigella sativa*, dikenal dengan beberapa nama seperti jintan hitam di Indonesia, *Habbatussauda* di daerah Timur Tengah dan umum dikenal dengan nama *black cumin*. Jintan hitam dengan komposisi antioksidan yang dimilikinya yang menjadikannya memiliki efek immunopotensiasi. Efek lain yang dimiliki jintan hitam ini diantaranya sebagai bronkodilatator, antiinflamasi, antibakteri dan antitumor (Winkler *et al.*, 2008).



**Gambar 2.1.** Morfologi tanaman Jintan Hitam (*Nigella sativa*)  
(Sumber : Bos, 2004).



**Gambar 2.2.** Biji Jintan Hitam (*Nigella sativa*)  
(Sumber :<http://www.eol.org/pages/485246>).

### 2.2.2 Morfologi dan Ekologi

Jintan hitam merupakan tanaman lunak, bagian pangkal seringkali menyerupai kayu. Tinggi tanaman mencapai satu meter dan beruas-ruas. Pada ruas yang menyentuh tanah akan terbentuk akar. Batang muda berambut kasar dengan warna hijau pucat. Daun tanaman ini merupakan daun tunggal, tebal berdaging, letak berhadapan dan berangkai serta bentuknya bulat telur agak bundar. Bunga jintan hitam berwarna putih keunguan yang kemudian berisi biji berwarna putih. Biji yang berkhasiat adalah biji jintan tua berwarna kehitaman (Agrina, 2006).

### 2.2.3 Kandungan Kimia

Komposisi nutrisi jintan hitam adalah sebagai berikut; protein 21%, lemak 35% dan karbohidrat 35-38%. Jintan hitam mengandung monosakarida (molekul gula tunggal) dalam bentuk glukosa, rhamnosa, silosa, dan arabinosa. Biji jintan hitam ini banyak mengandung senyawa kimia. Bahan aktif yang berkhasiat antara lain Kristal *nigellon*, arganin, asam lemak esensial, minyak eter, serta berbagai jenis vitamin dan mineral.

Jintan hitam mengandung komponen *non-starch polysaccharide* yang merupakan sumber yang berguna untuk serat makanan. (Agromedia, 2007).

Jintan hitam kaya akan kandungan asam lemak, terutama asam lemak jenuh dan tak jenuh yang merupakan asam lemak esensial yang tidak dapat dibuat oleh tubuh sehingga harus didapatkan dari suplemen makanan. Jintan hitam juga mengandung lima belas asam amino yang membentuk protein termasuk didalamnya delapan dari sembilan asam amino penting. Asam amino tersebut yaitu alanin, arginin, asparagin, asam glutamat, glisin, sistin, leusin, triptofan, lisin, metionin, phenilalanin, tirosin, treonin, isoleusin, dan tanin (Agromedia, 2007).

Analisis kimia lanjutan menemukan bahwa jintan hitam mengandung karotin yang diubah oleh hati menjadi vitamin A. jintan hitam juga memiliki kandungan kalsium, zat besi, natrium dan kalium. Meskipun dibutuhkan dalam jumlah yang sedikit oleh tubuh, elemen-elemen ini berfungsi sebagai kofaktor untuk fungsi bermacam enzim (Sharma *et al.*, (2009).

Komposisi terbanyak yang terkandung dalam biji jintan hitam adalah *thymoquinone*. Thymoquinone sendiri diketahui memiliki fungsi sebagai antioksidan, antiinflamasi dan efek anti kanker (Sethi *et al.*, 2008).

#### **2.2.4 Efek Imunopotensiasi Jintan Hitam**

Penelitian yang dilakukan belakangan ini oleh Majdalawieh *et al.*, (2010), menunjukkan bahwa larutan ekstrak jintan hitam secara signifikan meningkatkan proliferasi splenosit, sebagai tambahan juga pada larutan ekstrak jintan hitam ini

membantu sekresi sitokin dan menekan sekresi sitokin pro inflamasi (IL-6 dan TNF $\alpha$ ) pada eksperimen invitro. Pada percobaan berikutnya juga menunjukkan bahwa jintan hitam secara signifikan meningkatkan aktivitas sel NK terhadap sel tumor YAC-1 yang menjadikan jintan hitam juga memiliki potensi selain sebagai anti inflamasi, imunostimulan juga sebagai anti tumor.

Jintan hitam yang sudah digunakan lebih dari 2000 tahun di berbagai daerah di Timur Tengah sebagai bahan alami untuk menyembuhkan berbagai penyakit, memiliki kandungan *Thymoquinone* yang diperkirakan sebagai komponen bahan obat. *Nigella sativa* pada respon imun juga meningkatkan IL-1 $\beta$  yang berpengaruh pada makrofag. Penelitian penggunaan jintan hitam pada manusia menunjukkan peningkatan produksi IL-3 oleh limfosit pada biakan sel sekalipun tanpa digunakan stimulator tambahan. Informasi lain menunjukkan bahwa jintan hitam dapat menghambat aktivasi NF- $\kappa$ B. Faktor transkripsi NF- $\kappa$ B merupakan regulator utama dari respon inflamasi dan respon imun (Winkler *et al.*, 2007).

### **2.3. Stres dan Respons Imun**

#### **2.3.1 Stres dan Pelepasan Kortisol**

Pada kondisi stres, akan menyebabkan perubahan pada sistem imun yang tidak lazim, dengan diperantarai oleh hormon atau neurotransmitter. Stresor yang berlangsung lama, mampu menurunkan fungsi respon imun, sehingga tubuh rentan terhadap penyakit. Stresor merupakan respons spesifik pada organisme terhadap rangsangan yang sangat heterogen yang dapat berasal dari luar atau dalam tubuh. Stres adalah kondisi dimana individu untuk mengatasinya sampai melewati batas *coping* / melampaui batas

kemampuan dirinya dalam mengelola stresor tersebut. Stres juga merupakan reaksi tubuh untuk melawan agen perusak, infeksi dan bermacam-macam keadaan abnormal (stresor), sehingga cenderung mengganggu homeostasis. Respons terhadap stresor ditentukan melalui aktivitas hipotalamus – hipofisis – korteksuprarenalis, sampai akhirnya disekresikan neuropeptida ke dalam darah (McCann *et al.*, 1998).

Neuropeptida atau hormon yang berpengaruh pada respons imun yang utama adalah golongan steroid. Hormon adrenokortikoid dan sistem syaraf simpatik, mempunyai peran sebagai mediator pada peningkatan atau penekanan pada fungsi sistem imun. Monosit, makrofag dan sel T CD4<sup>+</sup> (helper), pada permukaannya mempunyai receptor -  $\beta$  adrenergik dan serotoninergik sebagai reseptor terhadap ACTH, CRF, endorfin, GH dan beberapa steroid. Glukokortikoid, sebagai hormon steroid (termasuk kortisol), berperan mengubah sintesa RNA dan enzim pada jaringan/ sel target. Akibatnya akan terjadi peningkatan sintesis total protein, glukoneogenesis dan perubahan asam amino menjadi CO<sub>2</sub><sup>+</sup> urea. Mekanisme kortisol dalam memodulasi sistem imun sangat multifaktorial, dimana akan menghambat produksi IL-1 dari makrofag, dan IL-2 dari sel T. Dengan demikian, terjadi penurunan respons sel T, dengan berkurangnya populasi sel T-*helper*, menyebabkan berkurangnya sel B maupun sel plasma, sehingga terjadi penurunan produksi antibodi (Murray, *et al.*, 2003).

### 2.3.2 *Heat Shock Protein (Hsp)*

*Heat Shock Protein (Hsp)*, disebut juga protein stres, merupakan sekelompok protein yang muncul didalam sel pada kondisi normal maupun menderita stres dan



protein tersebut tersimpan baik pada organisme mulai dari prokariota hingga eukariota (Schmitt *et al.*, 2007).

Wang *et al.*, (2005) mendefinisikan Hsp sebagai molekul pengantar dan (atau) penjaga yang muncul sebagai regulator biokimia dari pertumbuhan sel, apoptosis, homeostasis protein dan target seluler dari peptida.

Hsp dapat bertindak seperti penjaga yang memastikan bahwa protein sel berada dalam bentuk yang tepat dan berada ditempat yang benar di waktu yang tepat pula. Hsp membantu protein baru atau tereliminasi agar dapat terangkai sesuai bentuknya, yang mana penting untuk kelangsungan fungsinya. Hsp memindahkan protein-protein dari satu kompartemen (bagian) ke bagian lain didalam sel, dan mentransportasikan protein yang sudah tua kedalam "tempat pembuangan" didalam sel. Hsp juga dipercaya memerankan fungsi penting dalam mempresentasikan potongan protein (peptida) ke permukaan sel untuk membantu sistem imun dalam mengenali sel yang sakit (Yang *et al.*, 2009).

*Heat shock protein* pertamakali dikarakterisasi sebagai protein intraseluler, yang mana memiliki fungsi membatasi agregasi protein. selama masa terjadinya stres seluler, level intraseluler Hsp meningkat untuk memberi proteksi seluler. *Heat shock protein* terdiri atas beberapa keluarga protein yang mampu bertahan yang memainkan peran penting di sejumlah fungsi seluler yang penting. Pada tahun 1962 saat Ritossa menandai adanya respon terhadap stres lingkungan yang terdapat pada *Drosophila* yang menderita *shock* akibat terpapar suhu tinggi, menunjukkan adanya kelainan ekspresi gen dan kemudian di tahun 1974 hal tersebut dinamakan dengan *Heat Shock Protein* (Johnson and Fleshner, 2006). Sebagai protein intrasel, Hsp di bawah keadaan stres seluler, *self*-Hsp secara efisien akan dipresentasikan oleh molekul MHC kelas I pada limfosit T

sitotoksik (CTLs). Penelitian sebelumnya menunjukkan CTL tersebut akan memediasi lisis makrofag yang dipapar stres dengan diberikan perlakuan penambahan IFN- $\gamma$  bisa kemudian dihambat saat ekspresi Hsp60 ditekan oleh Hsp60-*directed antisense oligonucleotides*, yang mengkonfirmasi spesifisitas CTL untuk Hsp60. Penelitian lanjutan yang dilakukan invitro menggunakan APC yang mengalami stres dikenali oleh sel T CD4<sup>+</sup> yang meningkat jumlahnya terhadap sekuensi Hsp60 yang tersimpan dalam jumlah besar. Setelah beberapa kali restimulasi dengan peptida tersimpan, sel T tersebut merespon dengan adanya *non-stressed syngeneic* APCs. Model penelitian transfer sel T tersebut, pada hewan coba, ditemukan adanya produksi IFN- $\gamma$ , IL-4, dan IL-10. Bisa disimpulkan bahwa pengenalan Hsp yang diekspresi oleh sel terpapar stres dapat menginduksi penyakit suppresif fenotip regulator dalam merespon sel T (Eden *et al.*, 2005).

Rivera (2004) membahas mengenai penggolongan Hsp terdapat dua kriteria yaitu a) sintesisnya distimulasi kuat oleh stres lingkungan khususnya yang dihasilkan dari perubahan temperatur beberapa derajat diatas kondisi fisiologis normal dan b) didalam gen Hsp tersebut mengandung sekuensi dari 14 pasang dasar dalam regio 5' *non-coding*. Sekuensi tersebut bertindak sebagai promotor untuk transkripsi mRNA Hsp.

Induksi Hsp sebagai respon terhadap stres seluler diperantarai oleh keluarga *heat shock factor* (Hsf), yang bekerja melalui *heat shock element* (Hse). Pada kondisi terpapar stres panas, struktur kromatin DNA berubah secara besar-besaran. Pertama daerah penanda lebih mudah terhadap serangan nukleolitik. Kedua, posisi dan jumlah wilayah hipersensitif berubah. Terutama daerah terpusat keberadaan Hse menjadi lebih sulit untuk dipecah (dicerna), menunjukkan adanya ikatan dengan protein. Pada mamalia terdapat

dua bentuk Hsf, bentuk monomer saat kondisi normal dan selama stres membentuk trimer (Rivera, 2004).

Klasifikasi Hsp berdasar pada fungsi dan ukuran (berat molekul) yang kemudian diklasifikasikan kedalam enam famili yang termasuk didalamnya terdapat Hsp27, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90, dan Hsp110 serta beberapa famili Hsp dengan berat molekul yang lebih kecil (Lindquist and Craig, 1988; Eden *et al.*, 2005; Wieten *et al.*, 2007). Menggunakan cara penamaan yang diadopsi dari *Cold Spring Harbor Meeting* tahun 1996, nama famili ditulis dengan menggunakan huruf kapital misal HSP 70 sementara itu anggota dari familinya umumnya ditulis sebagai "Hsp" misal Hsp70 (Tsan and Gao, 2004).

**Hsp110.** Baik molekul dengan berat 100 kD dan 110 kD merupakan komponen yang terdapat pada sel normal dan bersifat *glucose regulated*. Pada berbagai kondisi protein ini disebut sebagai *glucose related protein*. Paparan stres panas yang berlangsung lama, maka Hsp110 akan membentuk bentukan struktur serupa cincin pada perifer nukleolar. Pemeriksaan menggunakan mikroskop elektron menunjukkan bahwa Hsp110 berhubungan dengan komponen fibrilar nukleoli, lokasi dari kromatin nukleolar (rDNA). Sehubungan dengan produksi ribosom yang sangat sensitif terhadap stres panas, maka diasumsikan bahwa induksi Hsp110 ditujukan untuk menjaga proses tersebut (Lindquist and Craig, 1988; Rivera, 2004).

**Hsp90.** Anggota dari famili gen Hsp90 telah diklon dan disekuensi dari beberapa organisme berbeda-beda yang mengalami evolusi, termasuk diantaranya lalat buah, *yeast*, unggas, mamalia, *trypanosoma*, dan bakteri. Berat molekul yang berkisar dalam famili Hsp90 dari kelompok eukariota berkisar antara 80 dan 108kD. Analisis sekuensi dari gen

kloning menunjukkan bahwa protein tersebut tersimpan sangat baik. Protein ini dapat disintesis dalam kondisi normal dan kadarnya akan meningkat seiring bertambahnya stres yang dialami individu tersebut, letak Hsp90 sendiri terlokalisasi didalam kompartemen sitosol sel dengan pengecualian juga dapat ditemukan dalam retikulum endoplasmik pada tingkatan eukariota yang lebih tinggi (Rivera, 2004). Hingga saat ini, hal yang paling menarik yang dilaporkan sehubungan dengan protein ini yaitu hubungannya yang bersifat sementara dengan protein pembentuk retrovirus dan kompleks reseptor hormon steroid. Antibodi monoklonal yang disiapkan terhadap reseptor progesteron 8S menunjukkan bahwa Hsp90 sebagai komponen utama dari kompleks ikatan tersebut dengan mengontrol kekuatan ikatan reseptor terhadap hormon (Yu *and* Bao., 2008).

**Hsp70.** Pertamakali dikenali sebagai lekukan pada kromosom yang diisolasi dari kelenjar saliva larva *Drosophila* yang diberi paparan suhu bertemperatur tinggi. Famili protein Hsp70 diantaranya Hsp72 kD dan Hsp73 kD (Johnson *and* Fleshner, 2006). Terdapat empat gen yang diekspresikan selama masa pertumbuhan normal yang diidentifikasi sebagai gen *heat shock cognate*. Merupakan Hsp yang tersimpan sangat banyak dalam tubuh dan peningkatannya menimbulkan banyak pengaruh yang menarik untuk dipelajari (Rivera, 2004). Gen Hsp70 akan muncul bila terinduksi panas, ada pula yang muncul pada kondisi temperatur normal. Seluruh famili Hsp70 dan protein terkait mengikat ATP dengan afinitas tinggi, banyak ditemukan di sel. Fungsi Hsp70 juga sebagai protein pelipatan peptida (Eden *et al.*, 2005). Perihal Hsp70 akan dijelaskan lebih lanjut di bagian berikutnya.

**Hsp60.** Protein ini dikenali juga sebagai protein stres 60 dan juga bertindak sebagai *molecular chaperone*. *Molecular chaperone* didefinisikan sebagai protein yang

memiliki kemampuan membantu perakitan *non-covalent* dari protein lainnya termasuk strukturnya secara *in vivo* namun bukan merupakan komponen yang permanen dari struktur tersebut disaat mereka melakukan fungsi biologis normalnya. Dipelajari secara luas menggunakan bakteri *E.coli* dengan protein GroEL dan GroES. Terekspresi pada sel yang tidak terpapar stres dan kadarnya meningkat dua sampai tiga kali setelah terpapar stres panas dan terasosiasi dengan mitokondria (Robert, 2002; Rivera, 2004).

**Hsp27.** Protein Hsp27 telah dianggap sebagai penanda potensial keadaan *aerothermbosis*. Peran Hsp27 dalam kompartemen ekstraseluler masih belum jelas; ditambahkan secara eksogenous ditunjukkan sebagai pencegah apoptosis neutrofil. Dua studi klinis pernah diadakan mengenai hubungan Hsp27 dengan kejadian penyakit *atherosclerosis*. Pada studi ini menggunakan sample karotid yang mengalami atherosklerosis dan femoral *endarterectomy* serta menggunakan endoarteri *mammary* untuk menunjukkan sekresi Hsp27 mengalami penurunan plak *atherosclerosis* dibandingkan dengan arteri kontrol (Kardys, 2008).

**Hsp Lainnya.** Merupakan anggota Hsp dengan berat molekul yang kecil dengan kisaran beragam dimulai dari 15kD sampai dengan 40kD. Berbagai organisme memiliki jumlah Hsp kecil yang berbeda, mulai dari satu pada spesies *S. cerevisiae*, sampai dengan 30 Hsp pada spesies tanaman yang lebih tinggi tingkatannya. Hsp kecil ini dinyatakan menyimpan bentukan mRNA inaktif (Lindquist and Craig, 1988). Munculnya Hsp kecil ini juga diakibatkan kondisi *thermotolerance* pada spesies *D.melanogaster* dan tanaman seperti tomat. Beberapa studi menyatakan bahwa Hsp kecil diatur dalam jaringan dalam stadium tertentu (Rivera, 2004).

Beberapa Hsp mampu untuk menggabungkan dan mengantar berbagai varian peptida seluler, secara efisien terinternalisasi oleh *antigen presenting cells* (APC) melalui reseptor memediasi endositosis, mengkomunikasikan peptida antigenik yang diantar dalam jalur presentasi MHC klas I milik APC, dan menstimulasi sitokin inflamasi, kemokin dan molekul kostimulator melalui jalur penanda NF- $\kappa$ B (Robert, 2003).

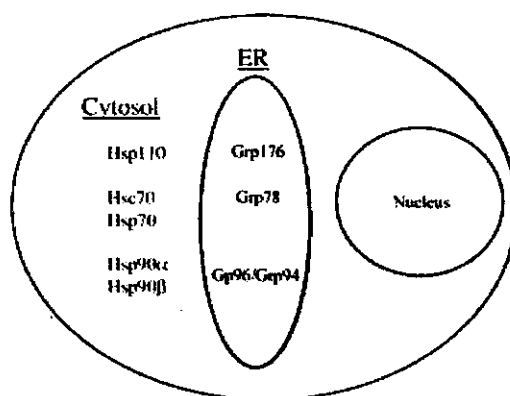
Gen Hsp muncul dari agen stresor yang menyebabkan akumulasi kerusakan protein dalam sel. Kerusakan tersebut dipantau dalam stres dan menghasilkan aktivasi protein pengatur yang tersimpan sebelumnya yang disebut dengan *heat shock factor* (Hsf) (Rivera, 2004).

Komponen Hsp berperan penting dalam proteksi dan perbaikan sel dan jaringan. Salah satu fitur Hsp adalah overekspresinya dari satu atau beberapa gen Hsp dapat memberikan perlindungan terhadap paparan stres berikutnya (Yu *et al.*, 2008).

Mazzi *et al.*, (2003) menjelaskan bahwa stres panas pada unggas merupakan salah satu perhatian khusus pada industri ternak unggas, sebab hal tersebut mengakibatkan tingkat kematian yang tinggi dan menurunnya tingkat produksi terutama pada musim panas (kemarau). Para ahli memiliki ketertarikan yang cukup besar untuk mengetahui respon spesifik yang dijumpai pada semua organisme makhluk hidup bila organisme tersebut berada dalam (diberikan) stres. Karakteristik utama pada respon spesifik selama terpapar stres adalah adanya peningkatan ekspresi yang disebut dengan protein stres (Hsp), terutama Hsp70, yang mana telah ditunjukkan sebagai salah satu stres protein yang tersimpan. disamping perannya dalam hal sitoproteksi, protein ini juga dianggap sebagai termometer seluler.

Seringnya bangsa unggas mendapatkan paparan panas secara konstan dan menderita *heat stress* pada negara-negara tropis, banyak studi diadakan yang melibatkan ekspresi Hsp70 pada ayam broiler. Ekspresi Hsp70 pada hepatosit broiler yang diberi paparan stres panas adalah bergantung pada suhu yang diberikan dan lamanya waktu pemaparan (Mazzi *et al.*, 2003).

**Heat Shock Protein70 (Hsp70).** Keluarga protein Hsp70 terdiri atas baik protein yang secara alamiah terekspresi maupun molekul pengantar yang terinduksi stres yang mana berada dilokasi yang berbeda didalam sel. Komponen utama Hsp70 (disebut juga sebagai Hsp72) *stress-inducible* diekspresikan sebagian besar di sitosol dan membran plasma dari tumor primer, sedangkan ekspresi Hsp 70 pada sel normal sangat sedikit hingga tidak dapat dijumpai di sitosol (Nylandsted *et al.*, 2004). Modisakeng *et al.*, (2004) menjelaskan bahwa terdapat dua kategori dari anggota keluarga Hsp70, bentuk alamiah (*heat shock cognate70*, Hsc70) dan bentuk terinduksi (disebut juga Hsp70). Menurut Tsan and Gao (2004), famili Hsp termasuk didalamnya bentuk asal sitosolik Hsc70 (atau Hsp73), bentuk terinduksi stres sitosolik Hsp70 (atau Hsp72), Endoplasmik retikulum (ER) Bip (atau Grp78) dan mitokondrial mt-Hsp70.



**Gambar 2.1** Skematis keberadaan beberapa Hsp termasuk Hsp70 dalam sel. (Sumber : Robert, 2003).

*Heat shock protein 70* tersusun atas dua domain fungsional utama. Domain terminal NH-2 mengandung ATPase tersimpan dalam jumlah besa, secara kuat mengikat ADP dan ATP dan menghidrolisis ATP, sedangkan domain terminal COOH- dibutuhkan untuk mengikat polipeptida (Tsan *and* Gao, 2004).

*Heat shock protein 70* dapat pula berarti sebagai molekul penjaga. Molekul penjaga merupakan protein yang memfasilitasi pelipatan atau perakitan dan pelepasan protein-protein lain namun bukan merupakan bagian dari struktur yang telah terangkai. Salah satu mekanisme yang mungkin yang terlibat dengan fungsi penjaga dari Hsp adalah kemampuan menjaga protein dari denaturasi. Bertindak pula sebagai molekul penjaga, Hsp70 berpartisipasi pada pelipatan, transport dan modifikasi protein postranslasi (Rivera, 2004).

Lindquist *and* Craig (1988) menjelaskan mengenai penamaan dalam keluarga Hsp70 sebagaimana tertera pada tabel 2.2.

**Tabel 2.2** Keluarga *Heat Shock Protein 70* dan Fungsi Pengaturan

<b>Nama Protein</b>	<b>Nama Lain</b>	<b>Pengaturan</b>
Hsp70	72K, Hsx70, SP71, Hsp68	Protein utama terinduksi panas, ekspresi basal, stimulasi di serum, teregulasi siklus sel.
Hsp72	Hsp70	Tanpa ekspresi basal, terinduksi panas.
P72	73K, Hsc70, Hsc73	Ekspresi basal tinggi, sedikit terinduksi panas.
Grp78	BIP, Hsp80	Ekspresi basal tinggi (terutama di sel sekretori, peningkatan ekspresi akibat deprivasi glukosa, penghambat glikosilasi.

(Sumber : Lindquist *and* Craig 1988).



Menurut Eden *et al.*, (2005) Hsp diklasifikasikan menjadi enam famili (termasuk didalamnya Hsp 10, Hsp 40, Hsp 60, Hsp 70, Hsp 90 dan Hsp 100) yang berdasarkan pada berat molekul monomernya, dengan masing-masing didalam famili tersebut terdapat setidaknya satu anggota namun seringkali lebih. Famili Hsp merupakan komponen yang mampu bertahan melewati sekian proses evolusi sel, dan beberapa yang terdapat dalam anggota famili mamalia memiliki kemampuan bertahan homolog mikroba yang menghasilkan rekognisi silang imunologis antara mamalia dan homolog mikroba.

**Tabel 2.3** Reaksi Silang Imunologis yang Dimiliki *Heat Shock Protein* Homolog dengan Mikroba

<b>Reaksi Silang Imunologis, Hsp alami antara mamalia dan mikroorganisme lainnya</b>				
<b>Famili Hsp</b>	<b>Anggota Pada Mamalia</b>	<b>Lokasi Seluler</b>	<b>Fungsi</b>	<b>Tipe Homolog Mikroba</b>
Hsp10	Hsp10(Cpn10)	Mitokondria	Co-chaperone aktivitas Hsp60	GroES( <i>E.coli</i> )
Hsp40	Hdj1,Hdj2	Sitosol	Co-chaperone aktivitas Hsp70	DnaJ( <i>E.coli</i> )dan Ydj1( <i>S.cerevisiae</i> )
Hsp60	Hsp60(Cpn60)	Mitokondria	Aktivitas chaperone dalam (re)folding&perakitan struktur protein multimerik	GroEL( <i>E.coli</i> )
Hsp70	Hsp70 Hsc70 Grp78 mHsp70(Grp75)	Sitosol dan nukleus Sitosol dan nukleus Endoplasmik retikulum Mitokondria.	Chaperone untuk rantai polipeptida baru,(re)folding, transport melalui membran organel subseluler	DnaK( <i>E.coli</i> )dan Ssa1, Ssa2, Ssa3, Ssa4 dan Kar2 ( <i>S.cerevisiae</i> )

(Sumber : Eden *et al.*, 2005).

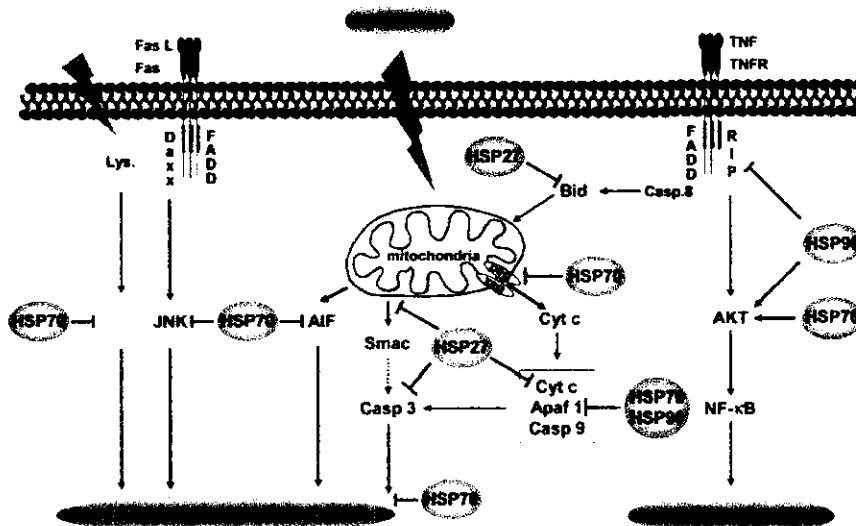
Peran Hsp pada sistem imun membawa pada pandangan lain ketika diketahui Hsp dapat mengaktifkan sistem imun melalui reseptor nonklonal seperti TLR (*Toll-like Receptor*). Terkait penelitian yang dilakukan oleh Srivastava *et al.*, (2002), ditunjukkan bahwa Hsp merupakan adjuvan endogen yang dapat digunakan untuk menginduksi respon imun spesifik patogen. Penelitian tersebut menuntun dalam penemuan efek Hsp pada makrofag, sel dendrit, sel T, sel B dan sel NK melalui reseptor yang berbeda.

**Tabel 2.4** Reseptor *Heat Shock Protein* pada Sistem Imun

HSP	Fungsi	Reseptor
Hsp60	Aktivasi makrofag dan sel dendrit Regulasi adhesi migrasi sel T dan polarisasi sitokin	TLR4 TLR2
Hsp70	Aktivasi splenosit, sel NK, promonosit, dan sel dendrit	CD91 TLR2 TLR4 LOX-1 CD40 CD14 CD94
Hsp90 Gp96	Aktivasi makrofag Aktivasi makrofag dan sel dendrit	CD91 CD91 SR-A TLR2 TLR4

(Sumber : Quintana and Cohen, 2005).

Sel tubuh memiliki sistem kompleks dalam mengatur perakitan protein yang sesuai, yang mana dimulai dengan fasilitasi perakitan protein muda (baru), memonitor keberadaan protein yang belum terakit didalam kompartemen intrasel yang berbeda, mencari target sasaran terhadap protein yang tidak terakit sempurna atau abnormal dari degradasi. Banyak aspek dari interaksi protein-protein secara spesifik diatur oleh molekul penjaga. Akumulasi protein yang belum terakit didalam lumen retikulum endoplasma dapat memicu respon protein tak terangkai, yang mana terlibat dalam penghentian sintesis protein yang merupakan tanda dari respon terhadap iskemia dan stres seluler yang lain. Salah satu perubahan patologis yang diinduksi oleh stres kronis adalah apoptosis sel. Penelitian baru-baru ini menandai kemampuan Hsp70 untuk menekan berbagai macam tipe kematian sel termasuk kematian nekrotik, apoptosis klasik, dan jalur kematian sel terprogram lainnya yang mana tidak bergantung terhadap *caspase* dan tidak dihambat oleh Bcl-2 (Schmitt *et al.*, 2007, Yang *et al.*, 2009).

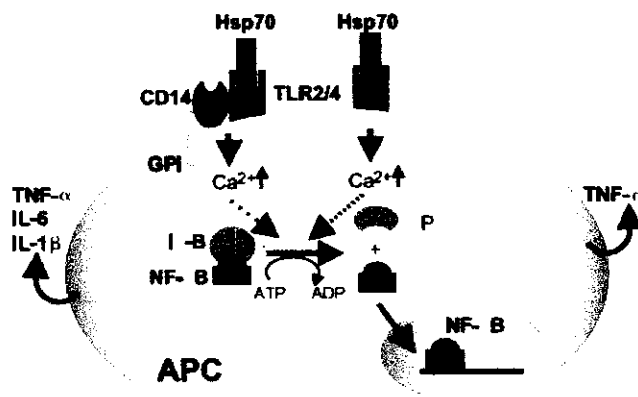


**Gambar 2.3** Modulasi jalur apoptosis oleh *heat shock protein* (Sumber : Schmitt *et al.*, 2007).

Penelitian yang pernah dilakukan dengan menggunakan epitel intestinum mencit, menjelaskan bahwa Hsp 70 menghambat stres kronis yang menginduksi disfungsi barier intestinal kemungkinan melalui pencegahan apoptosis sel epitelial intestinal terinduksi stres. Banyak juga studi yang telah menjelaskan mengenai neuroproteksi yang dilakukan oleh fungsi penjaga dari Hsp70. Penelitian yang dilakukan dengan menggunakan kultur sel dan sel imun menunjukkan bahwa Hsp70 dapat mencegah apoptosis baik pada tahap awal dan akhir dari kaskade. Stres kronis menghambat ekspresi Hsp70 sel epitelial intestinal baik pada tahap mRNA maupun tahap protein. Hal ini dapat menjadi bukti yang mendukung konsep bahwa stres kronis terlibat pada berbagai masalah gangguan kronis lainnya. Pada kasus ini penggunaan *pretreatment* menggunakan Hsp70 secara signifikan

melindungi fungsi pertahanan epitel intestinal yang dirusak oleh stres kronis. Perlindungan tersebut dapat meliputi, seperti yang sudah diketahui sebelumnya, perakitan ulang protein terdenaturasi dan mencegah agregasi protein tak terangkai dan protein yang rusak, atau dengan mekanisme langsung anti-apoptosis (Yang *et al.*, 2009).

Sekalipun tidak didapat adanya peptida imunogenik, kelompok Hsp70 dan Hsp90 memberikan penanda bahaya untuk sistem imun host. Interaksi antara Hsp70- peptida bebas dengan CD14 dan TLR2/4 pada APC menginisiasi pelepasan sitokin proinflamasi termasuk didalamnya TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , Il-12,dan IL-6. Proses ini dipicu oleh translokasi NF- $\kappa$ B kedalam nukleus (Schmitt *et al.*, 2007).



**Gambar 2.4** Cytokine-inducing effects heat shock protein 70  
(Sumber : Schmitt *et al.*, 2007).

**BAB 3**  
**KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN**

## BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN

### 3.1. Kerangka Konseptual dan Hipotesis Penelitian

Kondisi stres mampu mengubah fungsi sistem imun, karena pada kondisi tersebut dapat dihasilkan berbagai neurotransmitter/ neuropeptida serta beberapa hormon yang mampu memodulasi fungsi sistem imun. Respon terhadap stres yang berjalan kronik melibatkan *Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis* (HPA Axis) dan *Sympathetic-Adrenal-Medullary Axis* (SAM Axis) dengan hasil akhir produksi hormon glukokortikoid dan katekolamin yang berjalan kronis. Reseptor glukokortikoid diekspresikan oleh bermacam-macam sel imun yang akan mengikat kortisol bekerjasama dengan fungsi NF- $\kappa$ B yang mengatur produksi sitokin sel-sel imun. Reseptor adrenergik mengikat epinefrin dan norepinefrin dan mengaktifkan respon cAMP yang akan menginduksi transkripsi gen-gen yang mengkode bermacam-macam sitokin. Perubahan ekspresi gen diperantarai hormon-hormon glukokortikoid sedangkan katekolamin dapat mengacaukan pengaturan fungsi imun. Sekarang terdapat banyak bukti baik dari penelitian hewan maupun manusia bahwa kekacauan sistem imun yang diakibatkan stress cukup berpengaruh terhadap kesehatan (McCann *et al.*, 1998).

*Heat stress* merupakan sebuah kondisi yang paling mempengaruhi peternakan komersil. Perbandingan diantara ternak unggas, *broiler* merupakan spesies yang lebih sensitif terhadap kenaikan suhu lingkungan dibandingkan dengan hewan ternak lainnya (Yu and Bao, 2008). Pada kondisi tersebut semua makhluk hidup baik organisme prokariotik sampai dengan organisme eukariotik akan membentuk respon protektif terhadap stres akibat kenaikan suhu tersebut yang dikenal dengan *heat shock protein*

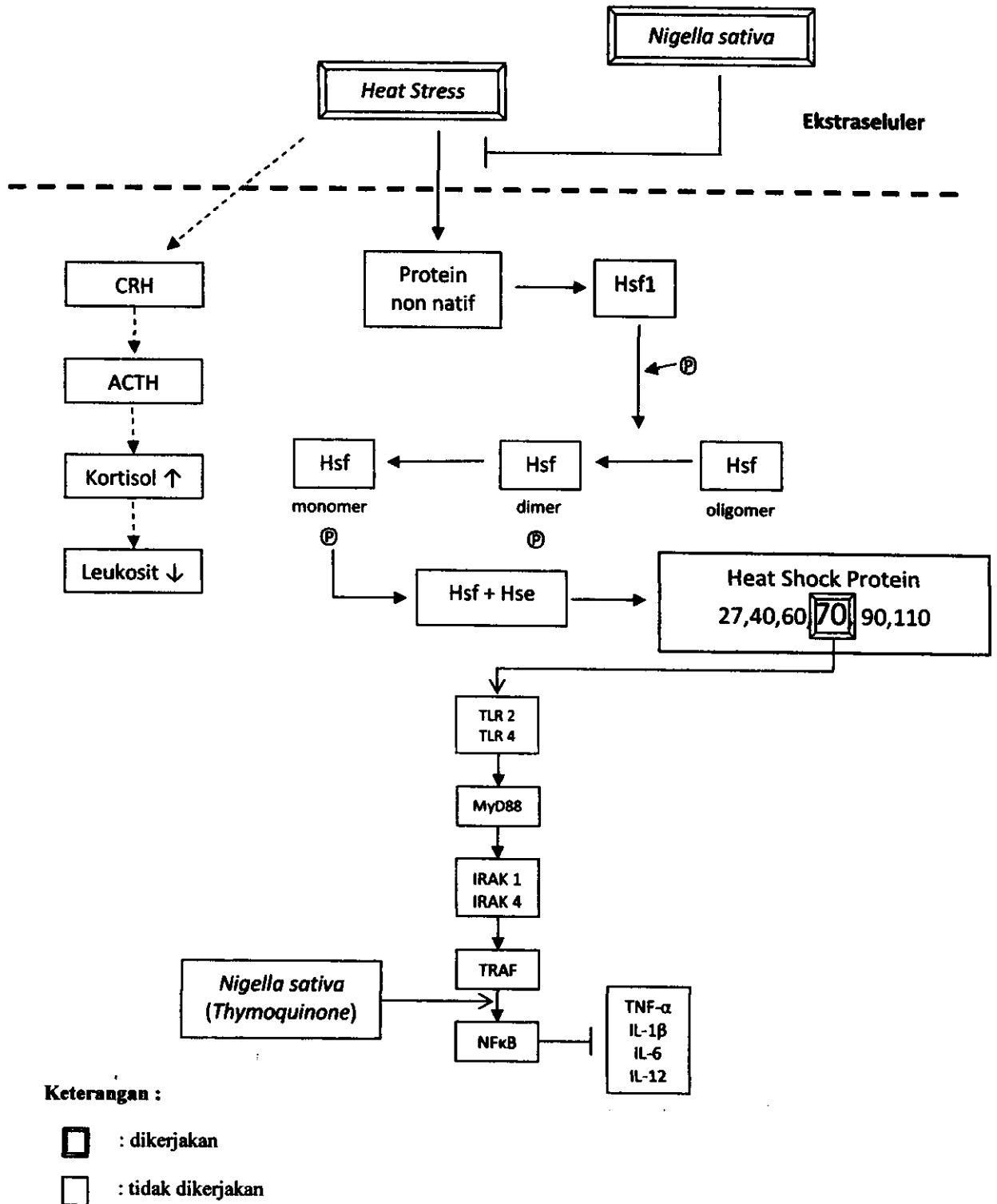
(Hsp) yang juga berperan penting dalam perlindungan dan perbaikan sel dan jaringan (Yu *et al.*, 2008).

Regulasi transkripsi gen Hsp dimediasi oleh interaksi dari faktor transkripsi Hsf dengan *heat shock element* (Hse) didalam wilayah promotor gen Hsp. *Heat shock factor* utama yang berperan dalam respon vertebrata terhadap stres fisiologis dan lingkungan adalah Hsf1, sementara aktivitas Hsf2 lebih selektif, dan lebih sering muncul pada masa differensiasi dan tahap awal perkembangan embrional. Pada kondisi fisiologis normal, Hsf1 berbentuk monomer inaktif dengan mengikat Hsp70 dan Hsp90. *Heat shock factor* yang terikat pada Hse nantinya menghasilkan mRNA Hsp70. *Heat shock factor* 1 dirilis sesaat setelah sel terpapar stres dan mengalami translokasi kedalam nukleus yang selanjutnya mengalami trimerisasi kemudian mengikat Hse dan akhirnya mengalami hiperfosforilasi yang menghasilkan transkripsi Hsp. *Heat shock protein* eukariot (mamalia) dan prokariot (mikroba) menginduksi sitokin proinflamasi seperti IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  (Rivera, 2004; Wieten *et al.*, 2007; Galloway *et al.*, 2008).

Stres kronis / intensif akan menyebabkan sel-sel imun kehilangan respon untuk melawan adanya agen patogen. Pada sistem imun yang mengalami stres yang terus menerus dan tubuh tidak dapat merespons dengan baik, maka pemberian vaksinasi tidak akan dapat menghasilkan titer antibodi yang maksimal. Penelitian yang dilakukan belakangan ini oleh Majdalawieh *et al.*, (2010), menunjukkan bahwa larutan ekstrak jintan hitam secara signifikan meningkatkan proliferasi splenosit, sebagai tambahan juga pada larutan ekstrak jintan hitam ini membantu sekresi sitokin dan menekan sekresi sitokin pro inflamasi (IL-6 dan TNF $\alpha$ ) pada eksperimen invitro.

*Thymoquinone*, yang memiliki struktur kimia  $C_{10}H_{12}O_2$ , merupakan substansi terbanyak yang didapat dari tanaman tradisional jintan hitam. Mekanisme kerja *thymoquinone* ini dengan menghambat aktivitas antiinflamasi dan antikanker yang jalurnya belum diketahui secara menyeluruh namun bisa dikaitkan interferensinya terhadap jalur penanda NF- $\kappa$ B. *Thymoquinone* menurunkan produksi TNF yang dapat menginduksi keberadaan NF- $\kappa$ B dan juga dapat menurunkan produksi NF- $\kappa$ B yang distimuli oleh berbagai agen karsinogenik dan inflamasi seperti polusi lingkungan, prooksidan, stres, dan faktor pertumbuhan.





Gambar 3.1. Bagan Kerangka Konseptual Penelitian

### **3.2 Hipotesis Penelitian**

Hasil dari penelitian ini diharapkan terdapat pengaruh terhadap penurunan nilai kadar Hsp70 pasca pemberian infusum biji jintan hitam (*Nigella sativa*) pada ayam *broiler* yang diberikan stres panas.

**BAB 4**  
**MATERI DAN METODE**

## BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN

### 4.1. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan eksperimental sesungguhnya (*true experimental*) dengan rancangan acak lengkap model faktorial 3 x 3. Sebanyak 45 ekor ayam *broiler* akan mendapat perlakuan berupa stres panas kronis dengan suplementasi infusum biji jintan hitam per oral. Faktor pertama yaitu kondisi stres dan tidak stres, faktor kedua yaitu diberikan infusum biji jintan hitam (*Nigella sativa*) dan tidak diberikan infusum biji jintan hitam (*Nigella sativa*). Tiap perlakuan akan mendapat tiga ulangan.

### 4.2. Materi Penelitian

#### 4.2.1 Bahan Penelitian

##### a. Hewan Percobaan

Hewan percobaan yang digunakan pada penelitian ini adalah ayam *broiler* dengan *strain* Cobb 500 produksi PT. Wonokoyo Jaya Corp., dari DOC sampai umur 28 hari. Selama pemeliharaan ayam diberi pakan dengan formulasi standar untuk *broiler* tahap awal (*starter*) dengan merek dagang CP 511 produksi PT Charoen Pokphand serta diberi minum yang berasal dari air bersih Perusahaan Daerah Air Minum Surabaya (PDAM).

**b. Infusum Biji Jintan Hitam (*Nigella sativa*)**

Suplemen pakan yang digunakan pada penelitian ini adalah biji jintan hitam (*Nigella sativa*) yang selanjutnya akan dibuat menjadi infusum dengan dua konsentrasi berbeda yaitu konsentrasi 20% dan 40%.

**c. Kit ELISA Chicken Hsp70**

Sampel serum darah yang telah dikoleksi akan diperiksa dengan menggunakan Kit ELISA *Chicken Hsp70* produksi Cusabio Biotech Co., LTD *Catalog No. CSB-E11196Ch*. Kit tersebut merupakan kit untuk deteksi secara cepat keberadaan kadar Hsp70 yang terkonsentrasi pada plasma, serum dan bahan cairan biologis lain dari ayam. Penggunaan kit tersebut hanya ditujukan untuk penelitian dan bukan merupakan alat bantu diagnosis.

#### **4.2.2 Alat Penelitian**

Peralatan utama dalam penelitian ini adalah tiga ruangan berbeda yaitu ruangan A, ruangan B, dan ruangan C yang dipersiapkan untuk perlakuan dengan suhu yang berbeda

Ruangan A adalah ruangan dengan suhu sekitar (suhu ruang). Ruangan B adalah ruangan untuk perlakuan stres panas dengan sumber panas berasal dari pancaran lampu. Suhu ruangan B dipertahankan konstan secara otomatis menggunakan *thermoregulator* pada kisaran 35°C, ruangan C adalah ruangan dimana ayam *broiler* mendapat perlakuan stres panas pada suhu 38°C.

Kandang *litter* nantinya akan dilengkapi dengan tempat pakan dan minum, termometer untuk mengetahui suhu disekitar kandang, peralatan yang digunakan untuk mengambil sampel darah dan pemeriksaan antibodi meliputi alat suntik 3ml, *needle* 23G, tabung *venoject*, gunting bedah, *microtube*, mikropipet, dan kit Elisa *Chicken Hsp70*.

### 4.3. Variabel Penelitian

#### 4.3.1 Variabel Bebas

1. Stres panas yang akan diberikan adalah pada suhu ruangan, suhu 35°C dan suhu 38°C.
2. Suplementasi infusum biji jintan hitam (*Nigella sativa*) yang akan diberikan adalah dengan konsentrasi 20% dan 40%.

#### 4.3.2 Variabel Tergantung

Kadar Hsp70. Kadar Hsp70 diketahui dari nilai *optical density* yang berasal dari sampel serum *broiler* yang menerima stres panas, serum *broiler* yang menerima stres panas sekaligus diberikan suplementasi infusum jintan hitam dan serum *broiler* yang tidak menerima stres panas maupun suplementasi infusum biji jintan hitam. Semua sampel tersebut akan diperiksa dengan menggunakan kit ELISA *Chicken Hsp70*.

#### 4.3.3 Variabel Kendali

1. Jenis kelamin dan *strain*. Ayam *broiler* yang digunakan sebagai hewan coba semuanya berjenis kelamin jantan dan *strain* Cobb 500.

2. Umur. Ayam broiler yang digunakan sebagai hewan coba dipelihara sejak umur 1 hari (DOC).
3. Pakan *broiler*. Pakan yang digunakan yaitu dengan formulasi standar untuk *broiler* tahap awal (*starter*).

#### 4.3.4 Definisi Operasional Variabel

**Stres Panas.** Suatu kondisi di mana ayam *broiler* dikondisikan pada lingkungan dengan suhu yang lebih tinggi dari suhu normal sehari-hari di sekitar kandang tempat ayam dipelihara. Suhu normal sehari-hari di sekitar kandang tempat ayam dipelihara adalah sekitar 28°C-30°C. Suhu panas yang bertindak sebagai stressor, dihasilkan dari lampu halogen yang memiliki kekuatan 150 watt dan lampu bohlam yang memiliki kekuatan 100 watt. *Panting* merupakan suatu indikator awal bahwa unggas mengalami stres panas biasanya diikuti dengan tingkah laku mengembangkan sayap dan minum dengan frekuensi yang lebih sering.

**Infusum biji jintan hitam.** Tumbuhan tradisional dari famili *Ranunculaceae* dengan spesies *Nigella sativa* yang diambil bijinya lalu dibuat menjadi infusum untuk mendapatkan bahan aktif yang terkandung di dalamnya. Infusum pada penelitian ini adalah 20% (20gram biji jintan hitam dalam 100ml air) dan 40% (40gram biji jintan hitam dalam 100ml air).

**Heat shock protein 70.** Protein Hsp70 merupakan protein utama yang dapat ditemukan di sitoplasma tiap sel hidup yang telah mengalami paparan suhu

panas dalam jangka waktu tertentu. Kadar Hsp70 ini kemudian diperiksa dengan menggunakan teknik pemeriksaan *Sandwich* ELISA dengan menggunakan sampel dari broiler yang telah diberi perlakuan dengan stres panas dan perlakuan stres panas dengan tambahan suplementasi infusum biji jintan hitam 20% dan 40%.

#### **4.4. Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2010. Pembuatan infusum biji jintan hitam (*Nigella sativa*) dilakukan di laboratorium Farmakognosi dan Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya. Pemeliharaan dilakukan di Kandang Hewan Coba Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan Pemeriksaan kadar Hsp70 dilakukan di Laboratorium Virologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

#### **4.5. Metode Penelitian**

##### **4.5.1 Persiapan hewan coba**

Satu minggu sebelum DOC datang, dilakukan desinfeksi pada ruangan, kandang, dan peralatan lainnya.

##### **4.5.2 Pembuatan infusum biji jintan hitam (*Nigella sativa*).**

Pembuatan infusum dilakukan di Laboratorium Farmakognosi dan Fitokimia, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga. Tahap awal pembuatan infusum yaitu biji jintan hitam yang sudah dipersiapkan dicuci terlebih dahulu kemudian ditiriskan lalu



dikeringkan pada suhu ruangan atau dengan bantuan kipas angin. Jintan hitam yang sudah kering ditumbuk hingga menjadi halus seperti bubuk.

Pembuatan infusum jintan hitam 20% dengan menggunakan bubuk jintan hitam 20gram, kemudian ditambahkan aquades 100ml lalu dipanaskan 90°C secara tidak langsung dalam penangas air. Bahan yang telah dipanaskan tadi dibiarkan 15 menit kemudian diangkat dan didinginkan. Setelah dingin bahan disaring. Hasil saringan ditambah air hangat sampai volume 100ml.

Pembuatan infusum 40% sama dengan cara yang disebutkan sebelumnya. Namun bubuk jintan hitam yang digunakan adalah sebanyak 40gram dan begitu seterusnya, berat bubuk jintan hitam yang digunakan nanti sesuai dengan konsentrasi yang akan dibuat. Penelitian ini menggunakan konsentrasi 20% sebab menurut penelitian yang telah dilakukan oleh Ritonga (2007) konsentrasi 20% sudah dapat berfungsi sebagai imunomodulator, dan juga menggunakan infusa jintan hitam konsentrasi 40% sebagai pembanding.

#### **4.5.3 Metode Perlakuan**

##### **Perlakuan Stres Panas dan Infusum Biji Jintan Hitam**

Perlakuan yang diberikan yaitu infusum biji jintan hitam diberikan secara peroral dengan dosis pemberian 2ml infusum biji jintan hitam konsentrasi 0%, 20% dan 40% setiap pagi saat ayam *broiler* memasuki umur 15 hari selama 14 hari. Hewan coba pada kelompok kontrol perlakuan (0%) maka sebagai gantinya diberikan aquades peroral dengan volume dan rute pemberian yang sama.

Ruangan A merupakan ruang dengan suhu 28°C, ruangan B dan C adalah ruangan untuk perlakuan stres panas dengan sumber panas berasal dari pancaran lampu. Suhu ruangan B dipertahankan konstan secara otomatis menggunakan *thermoregulator* pada kisaran 35°C, ruangan C adalah ruangan dengan suhu yang lebih tinggi berkisar antara 38°C. Pemberian perlakuan stres panas ini dilakukan saat ayam *broiler* telah memasuki usia 15 hari dan diberikan perlakuan stres panas selama 14 hari.

Pemilihan tiga variasi suhu disebabkan yaitu diperkirakan suhu lingkungan sehari-hari disekitar kandang penelitian berkisar antara 28°C dan sesekali bisa lebih tinggi, kemudian pemberian perlakuan stres panas dengan suhu 35°C disebabkan telah ada penelitian pendahuluan yang dilakukan oleh Wahyuni (2010) dan pemberian perlakuan stres panas dengan suhu 38°C disebabkan suhu lingkungan pada musim kemarau didalam kandang sesekali bisa mencapai suhu tersebut dengan adanya pengaruh pemanasan global yang terjadi beberapa tahun ini.

Saat ayam *broiler* telah memasuki usia 15 hari mulai diperlakukan dengan memberikan infusum biji jintan hitam selama 3 hari, setelah memasuki hari ke-4 maka ayam *broiler* diberlakukan dengan pemberian stres panas setiap hari dari pukul 8.00 WIB sampai dengan pukul 16.00 WIB dan suplementasi infusum biji jintan hitam sebanyak 2ml tiap ekor. Stressor panas yang diberlakukan pada ayam *broiler* merupakan hasil dari panas lampu halogen yang memiliki daya sebesar 150W.

#### 4.5.4 Pengambilan dan Uji Sampel

##### 1. Pengambilan Sampel

Sampel darah diambil dari vena *brachialis* yang terdapat pada daerah sayap. Pengambilan darah dengan menggunakan alat suntik 3ml yang dilakukan ketika seluruh ayam *broiler* sudah mencapai pada umur 29 hari baik ayam *broiler* yang diberikan perlakuan stres panas dan diberi infusum biji jintan hitam maupun ayam *broiler* yang hanya diberikan suplementasi infusum biji jintan hitam saja.

Sampel darah yang telah diambil diletakkan dalam posisi miring kemudian disimpan dalam *freezer* selama 24jam yang setelah itu serum dipanen kemudian dimasukkan kedalam *microtube*. Serum disimpan dalam *freezer*. Sebelum dilakukan pemeriksaan, serum di *thawing* terlebih dahulu dan serum siap untuk diuji menggunakan Kit ELISA *Chicken Heat Shock Protein 70* untuk diketahui kadar Hsp70.

##### 2. Uji Sampel

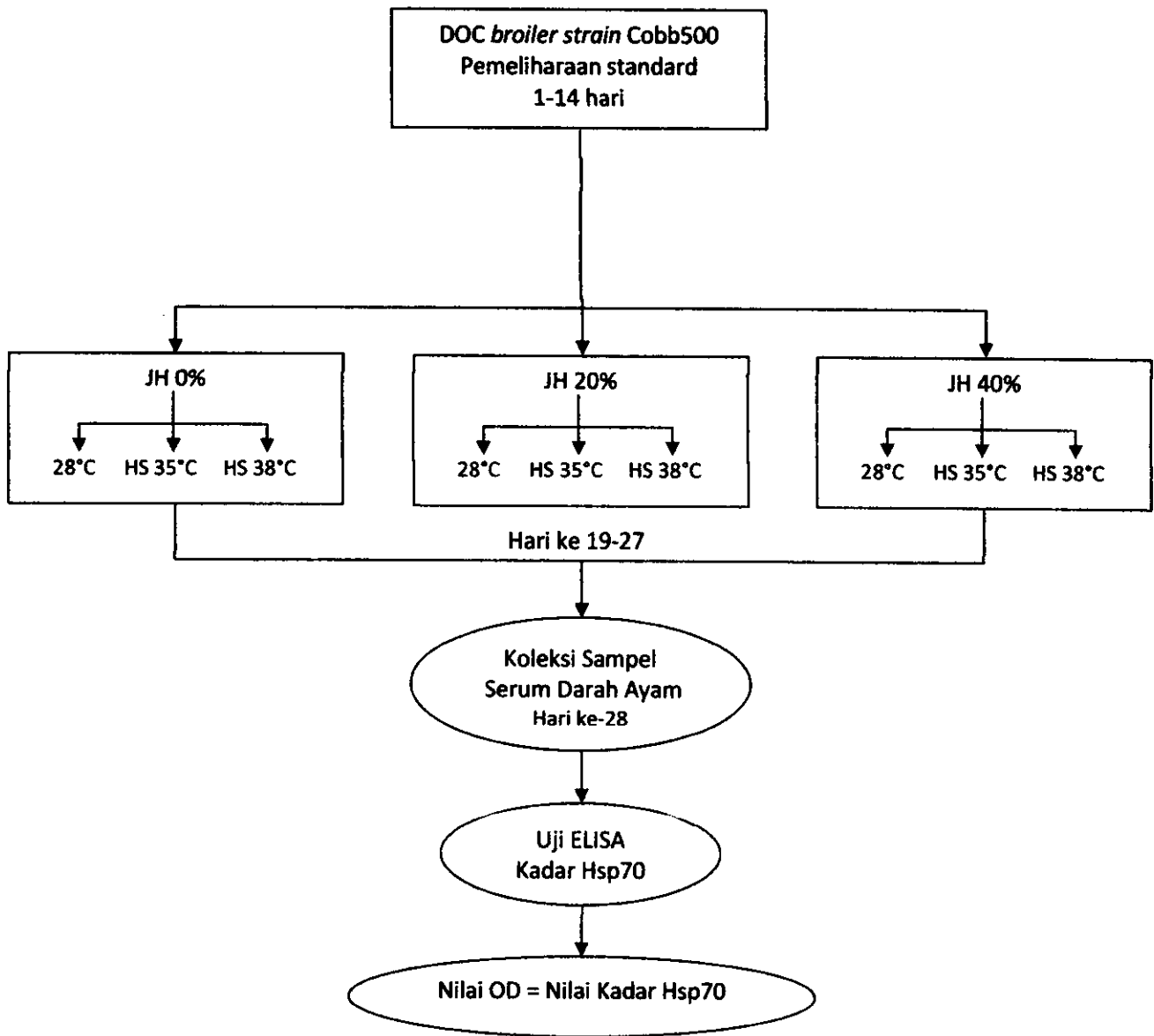
Sampel serum hasil penelitian ini akan diuji dengan menggunakan metode ELISA. Metode Pemeriksaan ELISA itu sendiri akan menggunakan kit siap pakai. Berdasarkan petunjuk pemakaian ELISA pada kit tersebut menggunakan teknik pemeriksaan *inhibition* ELISA. Prinsip pemeriksaan yaitu dengan menggunakan kit siap pakai yang juga telah di *coating* dengan antibodi monoklonal spesifik untuk Hsp70 ke dalam plate mikrotiter. Sampel serum darah ayam broiler, reagen standar siap pakai, dan kontrol kemudian diinkubasikan bersamaan dengan antibodi Hsp70 kedalam plate mikrotiter selama 1jam pada suhu 37°C. Setelah inkubasi dan telah melewati proses pencucian, enzim *horseradish* peroksidase dan

konjugat berlabel enzim *horseradish* peroksidase ditambahkan lalu kemudian diinkubasi kembali dalam suhu 37°C selama 1jam. Tiap sumuran dikosongkan lalu dicuci kembali dengan menggunakan larutan *washing buffer* yang diisikan sebanyak 200µl ke tiap sumuran, lalu dicuci sebanyak tiga kali proses pencucian. Setelah *microplate* selesai dicuci dan dikeringkan maka ditambahkan substrat A dan substrat B masing-masing 50µl ke dalam tiap-tiap sumuran dan diinkubasikan kembali selama 15 menit dalam suhu 37°C di dalam ruang gelap. Proses inkubasi di ruang gelap usai maka akan tampak larutan dalam tiap sumuran berubah warna menjadi biru atau biru muda lalu kemudian ditambahkan 50µl larutan penghenti reaksi hingga warna berubah menjadi kuning dan langsung dibaca nilai *Optical Density* dengan menggunakan *ELISA reader* panjang gelombang 450nm (Suwarno dkk., 2010, Cusabio Biotech, 2010).

#### 4.6. Analisis Data

Sesuai dengan jenis skala datanya, maka data yang tergolong dalam skala rasio akan dianalisis dengan uji F atau *Analysis Of Variance* (Anova). Anova merupakan metode untuk menguji hubungan antara satu variabel dependen (skala metrik) dengan satu atau lebih variabel independen (skala nonmetrik atau kategorikal dengan kategori lebih dari dua). Anova digunakan untuk mengetahui pengaruh utama (*main effect*) dan pengaruh interaksi (*interaction effect*) dari variabel independen kategorikal (sering disebut faktor) terhadap variabel dependen metrik. Pengaruh utama adalah pengaruh langsung variabel independen terhadap variabel dependen, sedangkan pengaruh interaksi adalah pengaruh bersama atau *joint effect* dua atau lebih variabel independen terhadap

variabel dependen (Ghozali, 2006). Pada penelitian ini nantinya akan diuji dengan menggunakan Anova dengan kepercayaan 99% ( $\alpha = 0,01$ ), dan bila terdapat perbedaan yang sangat nyata maka, dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (Sarmanu, 1993; Ghozali 2009).



**Gambar 4.1 Diagram Alur Penelitian**

**Keterangan :**

**HS** : *Heat Stress* (Stres Panas).

**JH** : Konsentrasi Infusum Biji Jintan Hitam.

**BAB 5**  
**HASIL DAN ANALISIS DATA**

## BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

### 5.1. Hasil Penelitian

#### 5.1.1 Nilai Optical Density (OD) Hasil Pengujian Hsp70

Hasil pemeriksaan sampel serum darah *broiler* Cobb500 menggunakan kit ELISA *Chicken* Hsp70 berupa nilai *Optical Density* (OD) kadar Hsp70 yang tertera dalam Tabel 5.1.

**Tabel 5.1. Rata-rata Nilai OD dan Nilai Kadar Hasil Pengujian Hsp70**

Suhu	Konsentrasi	X Nilai OD	X Kadar Hsp70
28°C	0%	1.73	0.21
	20%	1.76	0.21
	40%	1.68	0.21
35°C	0%	1.02 <sup>■</sup>	1.52 <sup>■</sup>
	20%	1.39 <sup>*</sup>	0.73 <sup>*</sup>
	40%	1.17 <sup>**</sup>	0.66 <sup>**</sup>
38°C	0%	1.17	0.66
	20%	1.22 <sup>*</sup>	0.55 <sup>*</sup>
	40%	1.26 <sup>**</sup>	0.44 <sup>**</sup>

Keterangan : \* = efektif  
 \*\* = lebih efektif  
 ■ = tidak efektif

Berdasarkan Tabel 5.1. setelah pemeriksaan dengan kit ELISA *Chicken* Hsp70 menunjukkan bahwa pemberian stres panas dan infusum biji jintan hitam berpengaruh terhadap nilai OD Hsp70 yang terkandung didalam serum darah ayam *broiler* strain Cobb500. Stres panas (suhu) memberikan pengaruh yang nyata terhadap nilai OD Hsp70



sementara itu pemberian infusum biji jintan hitam berpengaruh tidak nyata terhadap nilai OD Hsp70 yang terkandung di dalam serum darah ayam *broiler* strain Cobb500 (Lampiran 3). Tabel 5.1. juga menunjukkan bahwa pada suhu 35°C dan 38°C pada konsentrasi pemberian infusum biji jintan hitam 20% sudah cukup efektif menurunkan kadar Hsp70 sedangkan pada konsentrasi pemberian infusum biji jintan hitam 40% lebih efektif dalam menurunkan kadar Hsp70 sementara pada suhu 35°C pada konsentrasi pemberian infusum biji jintan hitam 0% merupakan perlakuan yang tidak efektif dalam menurunkan kadar Hsp70.

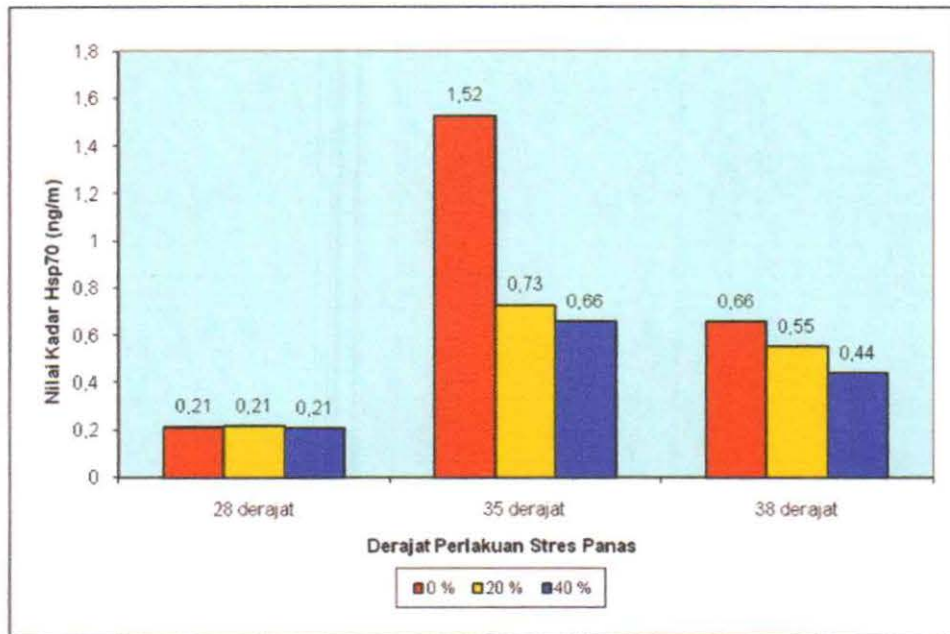
Tabel 5.2. dibawah ini menjelaskan nilai kadar Hsp70 yang dapat dihitung setelah diketahui nilai OD hasil pemeriksaan sampel serum darah ayam *broiler* Cobb500 menggunakan kit ELISA *Chicken* Hsp70.

**Tabel 5.2. Nilai Kadar Hasil Pengujian Hsp70 pada Ayam Broiler (ng/ml)**

Infusum Suhu	0%	20%	40%
	X ± SD	X ± SD	X ± SD
28°C	0,2118 ± 0,003633 <sup>d</sup>	0,2146 ± 0,001517 <sup>d</sup>	0,2054 ± 0,003507 <sup>d</sup>
35°C	1,5242 ± 1,274899 <sup>c</sup>	0,7252 ± 0,028543 <sup>a</sup>	0,6556 ± 0,025472 <sup>ab</sup>
38°C	0,6552 ± 0,016223 <sup>ab</sup>	0,5496 ± 0,209649 <sup>bc</sup>	0,4374 ± 0,231305 <sup>c</sup>

Keterangan : superskrip <sup>a,b,c,d</sup> yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata.

Hasil pemeriksaan nilai OD dan nilai kadar Hsp70 setelah diberi perlakuan stres panas dan diberikan suplementasi infusum biji jintan hitam ditunjukkan pengaruhnya dalam grafik pada Gambar 5.1.



**Gambar 5.1. Hasil Pemberian Infusum Biji Jintan Hitam Terhadap Nilai Kadar Hsp70.**

Data yang tercantum dalam Tabel 5.2. menunjukkan yaitu pada ayam yang tidak mendapatkan stres panas ( $28^{\circ}\text{C}$ ) dan juga tidak mendapatkan suplementasi infusum biji jintan hitam memiliki rata-rata kadar Hsp70 yaitu sebesar  $0.2118\text{ng/ml}$ , pada ayam yang tidak diberikan stres panas ( $28^{\circ}\text{C}$ ) namun mendapat suplementasi infusum biji jintan hitam memiliki rata-rata kadar Hsp70 yaitu sebesar  $0.2146\text{ng/ml}$  pada konsentrasi pemberian infusum 20% dan  $0.2054\text{ng/ml}$  pada konsentrasi pemberian infusum 40%.

Pada perlakuan stres panas dengan suhu  $35^{\circ}\text{C}$  untuk ayam yang tidak diberikan suplementasi infusum biji jintan hitam maka rata-rata kadar Hsp70 adalah sebesar  $1.5242\text{ng/ml}$ , sementara untuk ayam yang diberikan suplementasi infusum biji jintan

hitam maka rata-rata kadar Hsp70 yang terkandung adalah sebesar 0.7252ng/ml pada konsentrasi pemberian infusum 20% dan sebesar 0.6556ng/ml pada konsentrasi pemberian infusum 40%.

Pada perlakuan stres panas dengan suhu 38°C, untuk ayam yang tidak diberikan suplementasi infusum biji jintan hitam maka rata-rata kadar Hsp70 adalah sebesar 0,6552ng/ml, sementara untuk ayam yang diberikan suplementasi infusum biji jintan hitam maka rata-rata kadar Hsp70 yang terkandung adalah sebesar 0.5496ng/ml pada konsentrasi pemberian infusum 20% dan sebesar 0.4374ng/ml pada konsentrasi pemberian infusum 40%.

Prinsip pemeriksaan kit ELISA *Chicken* Hsp70 yang digunakan pada penelitian ini bahwa semakin tinggi nilai OD maka semakin rendah kadar Hsp70 yang terkandung dan begitu pula sebaliknya yaitu semakin rendah nilai OD maka semakin tinggi kadar Hsp70 (Lampiran 2).

Prinsip kit ELISA *Chicken* Hsp70 yang digunakan dalam penelitian ini adalah reaksi inhibisi kompetitif yang muncul antara Hsp70 (sampel maupun standar) dan Hsp70 yang terkonjugasi dengan enzim *Horseradish Peroxidase* (HRP) dengan antibodi spesifik untuk Hsp70, kemudian larutan substrat ditambahkan pada tiap sumuran. Reaksi enzim-substrat dihentikan dengan penambahan larutan asam sulfur dengan perubahan warna yang kemudian dibaca menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 450nm. Berdasarkan uraian tersebut tahapan antibodi spesifik diikatkan pada fase padat (*microplate*) selanjutnya ditambahkan antigen yang akan diperiksa kemudian ditambahkan antibodi kedua berlabel enzim dan terakhir ditambahkan substrat, maka

perihal tersebut sesuai dengan tata cara ELISA jenis *Inhibition ELISA* (Suwarno, dkk., 2010).

## 5.2. Analisis Data

### 5.2.1 Hasil Pemeriksaan Nilai Kadar Hsp70

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap pola faktorial yang kemudian data hasil dianalisis menggunakan analisis varian (Anova). Data hasil penelitian ini setelah dianalisis menggunakan Anova dapat diketahui bahwa varian suhu yang digunakan dalam penelitian ini adalah berbeda secara signifikan karena memiliki nilai signifikansi yang lebih kecil dari 0,05 ( $p < 0,05$ ). Kemudian analisis data dilanjutkan dengan menggunakan uji berjarak Duncan. Hasil uji berjarak Duncan menjelaskan bahwa konsentrasi pemberian infusum biji jintan hitam 20% tidak berbeda secara bermakna dengan konsentrasi pemberian infusum 40% (Lampiran 1).

Analisis data dilanjutkan dengan Anova dan diuji menggunakan uji F. Hasil dari analisis tersebut diperoleh sidik ragam seperti dibawah ini :

**Tabel 5.3 Sidik Ragam Nilai *Optical Density* Hsp70**

Variabel	F Hitung	F Tabel	
		0,05	0,01
Suhu	131,605**	3,28	5,25
Konsentrasi	4,343		
Suhu-Konsentrasi	2,848	2,63	3,86

Keterangan : Hasil dikatakan berbeda nyata jika  $F_{hitung} > F_{tabel}$ .  
Tanda(\*\*) mempunyai arti bahwa suhu berbeda sangat nyata.

**Tabel 5.4. Sidik Ragam Nilai Kadar Hsp70**

Variabel	F Hitung	F Tabel	
		0,05	0,01
Suhu	11,282**	3,28	5,25
Konsentrasi	2,963		
Suhu-Konsentrasi	1,713	2,63	3,86

Keterangan : Hasil dikatakan berbeda nyata jika  $F_{hitung} > F_{tabel}$ .  
Tanda(\*\*) mempunyai arti bahwa suhu berbeda sangat nyata.

Analisis data dilanjutkan dengan menggunakan uji Duncan untuk mengetahui kadar tertinggi dan kadar terendah nilai Hsp70. Suhu memiliki pengaruh yang sangat nyata pada nilai OD dan kadar Hsp70.

Hasil uji Duncan pada nilai OD dan kadar Hsp70 yang dipengaruhi oleh suhu tertera pada Tabel 5.5. dan Tabel 5.7., menunjukkan bahwa nilai OD pada suhu 28°C berbeda nyata dengan nilai OD suhu 35°C dan 38°C namun nilai OD suhu 35°C tidak berbeda nyata dengan nilai OD suhu 38°C. Suhu juga memberi pengaruh yang berbeda nyata terhadap nilai Kadar Hsp70, yaitu pada suhu 28°C berbeda nyata dengan suhu 35°C yang juga berbeda nyata dengan suhu 38°C.

Konsentrasi infusum biji jintan hitam tidak memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap nilai OD dan kadar Hsp70 yang tertera pada Tabel 5.6. dan Tabel 5.8. Data menunjukkan bahwa konsentrasi infusum 0% berbeda nyata dengan konsentrasi infusum 20% dan 40% namun pengaruh konsentrasi infusum 20% dan 40% tidak berbeda secara nyata.

**Tabel 5.5. Hasil Uji Duncan pada Nilai OD Hsp70 terhadap Suhu**

Suhu	Rata-rata	
35°C	1,16440 <sup>b</sup>	1,72340 <sup>a</sup>
38°C	1,21433 <sup>b</sup>	
28°C		

Keterangan: superskrip <sup>a,b</sup> yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata.

**Tabel 5.6 Hasil Uji Duncan pada Nilai OD Hsp70 terhadap Konsentrasi**

Konsentrasi	Rata-rata	
0%	1,31020 <sup>b</sup>	1,36940 <sup>ab</sup>
40%	1,36940 <sup>ab</sup>	
20%		1,42253 <sup>a</sup>

Keterangan: superskrip <sup>a,b</sup> yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata.

**Tabel 5.7. Hasil Uji Duncan Nilai Kadar Hsp70 terhadap Suhu**

Suhu	Rata-rata		
28°C	0,2106 <sup>c</sup>	0,5474 <sup>b</sup>	0,96833 <sup>a</sup>
38°C	—————		
35°C	—————		

Keterangan: superskrip <sup>a,b,c</sup> yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata.

**Tabel 5.8. Hasil Uji Duncan Nilai Kadar Hsp70 terhadap Konsentrasi**

<b>Konsentrasi</b>	<b>Rata-rata</b>	
40%	0,43280 <sup>b</sup>	
20%	0,49647 <sup>ab</sup>	0,49647 <sup>ab</sup>
0%		0,79707 <sup>a</sup>

Keterangan: superskrip <sup>a,b</sup> yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata.

**BAB 6**  
**PEMBAHASAN**



## BAB 6 PEMBAHASAN

### 6.1. Ayam Broiler Tanpa Perlakuan Stres Panas

Stres panas merupakan faktor paling utama dari kondisi lingkungan yang mempengaruhi hewan ternak unggas komersial khususnya *ayam broiler*. Ayam broiler lebih sensitif terhadap temperatur lingkungan yang tinggi disebabkan karena secara fisiologis ayam tidak memiliki kelenjar keringat, metabolisme yang cepat, dan suhu tubuh yang tinggi. Pengeluaran cairan dalam tubuh ayam tersebut salah satunya dilakukan melalui saluran pernafasan yang dikenal dengan mekanisme “*panting*” (Yu and Bao, 2008).

Suhu optimum yang dibutuhkan unggas adalah 18°C-22°C untuk ayam broiler namun dikarenakan penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober yang panas dan lembab sehingga kondisi lingkungan normal setiap hari berada pada kisaran suhu 28°C-32°C (Lin *et al.*, 2006; Yuwono, 2007). Pada lingkungan yang panas, ayam tumbuh dan berproduksi dengan disertai usaha tambahan supaya dapat mempertahankan temperatur tubuh agar dalam batasan normal sehingga organ-organ dalam tubuh tetap berfungsi secara normal (Lin *et al.*, 2006). Fisiologi stres panas pada unggas telah dipelajari secara luas dan sebagai hasilnya banyak usaha dilakukan untuk meningkatkan *thermotolerance* yang dapat membantu meminimalkan tingkat kematian terkait efek stres panas dan mempertahankan optimalisasi produktivitas unggas. Studi terhadap respon tingkat seluler dan molekuler telah memberikan petunjuk pemahaman mengenai mekanisme *thermotolerance* pada sel. Fenomena respon stres panas ini didefinisikan akan keberadaan ekspresi dari sekelompok kecil polipeptida terkandung dalam sel baik sel

prokariotik maupun sel eukariotik yang dikenal sebagai *heat shock protein* (Hsp) sebagai respon akan adanya peningkatan suhu lingkungan (Wang and Edens, 1998).

Menurut fungsinya Hsp merupakan protein yang tersimpan hampir diseluruh bagian dalam tubuh dan bertindak sebagai molekul pengantar untuk membantu perakitan struktur protein lainnya, pelipatan dan translokasi protein serta pelipatan ulang protein yang telah mengalami kerusakan (Marques *et al.*, 2006).

Salah satu peran penting Hsp adalah memberikan perlindungan, perbaikan sel dan jaringan. Overekspresi beberapa gen Hsp akan memberikan perlindungan terhadap berbagai jenis stres yang kejadiannya berkelanjutan (Luh *et al.*, 2007). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Yu *et al.*, (2008) bahwa paparan panas yang diberikan pada unggas dengan kenaikan suhu 3°C sampai 5°C lebih tinggi dari suhu lingkungan selama lebih dari dua jam dapat memunculkan dan menaikkan ekspresi gen Hsp60, Hsp70 dan Hsp90 disebabkan ketiga mRNA gen Hsp tersebut sensitif terhadap kenaikan suhu. Hsp ditemukan di sirkulasi individu normal dan konsentrasinya menurun seiring dengan penambahan umur (Pockley, 2003).

## 6.2. Perlakuan Stres Panas Pada Ayam Broiler

Stres panas tersebut merupakan hasil dari penggabungan beberapa faktor yaitu suhu udara, kelembaban, pancaran panas dan kecepatan udara dengan suhu udara sebagai faktor yang memiliki peran yang penting (Lin *et al.*, 2006). Stres panas serta bentuk stressor lainnya, dilaporkan dapat mengaktivasi aksis *hypothalamic pituitari adrenocortical* (HPA-axis) dan menekan kerja kelenjar tiroid, sehingga mengakibatkan peningkatan kadar kortisol. Peningkatan kadar kortisol berpengaruh buruk terhadap kesehatan dan pertumbuhan karena stres merupakan salah satu faktor *immunosuppressive*

yang dapat menurunkan sistem pertahanan tubuh, konversi pakan, fertilitas dan memacu timbulnya radikal bebas, hingga mengakibatkan kerusakan membran sel, inflamasi dan menimbulkan penyakit degeneratif (Naseem *et al.*, 2005).

Paparan stres yang bersifat kronis menurut Mashaly *et al.* (2004) akan menyebabkan penurunan ingesti protein secara signifikan pada ayam *broiler* yang berarti kemampuan ayam dalam mencerna nutrisi dalam pakan seperti protein, lemak, dan serat menurun sehingga berakibat pada performa dan produktivitas ayam *broiler* menjadi tidak optimal. Pada studi yang dilakukan di mencit oleh Yamamoto *et al.*, (1999) menggunakan mencit yang terpapar dengan suhu panas 35°C menunjukkan terjadinya supresi produksi Ig G sedangkan perlakuan pada suhu 37°C akan mensupresi produksi Ig M. Pada suhu 35°C juga terjadi penurunan produksi sel Th, penurunan berat *thymus* dan limpa yang mana *thymus* sebagai tempat diferensiasi sel T menjadi sel T yang *mature* sementara limpa merupakan organ dimana efek imunitas sel T dan antibodi humoral terlihat. Sel Th sendiri bertindak sebagai pendukung imunitas humoral. Paparan suhu tinggi secara berkelanjutan menyebabkan terjadinya supresi respon antibodi humoral.

Beberapa studi telah diadakan sehubungan dengan efek hasil pemberian stres panas terhadap respon imun ayam dengan hasil yang beragam. Thaxton *et al.*, (1968) pertama kali menunjukkan bahwa temperatur lingkungan yang tinggi mempengaruhi perkembangan respon imun spesifik pada ayam usia muda. Efek yang terjadi pada supresi sirkulasi sel darah putih dan peningkatan rasio heterofil/limfosit yang mana diartikan sebagai salah satu indikator terjadi stres. Stres panas menginduksi respon fase akut yang meliputi yang menginduksi sitokin. Pada kondisi stres, didalam tubuh akan terjadi keadaan leukositosis hasil dari limfosit yang aktif merespon kondisi stres tersebut

(Drobatz, 2003). Stres panas juga akan meningkatkan reaksi radang melalui peningkatan sel monosit (Haftzfeld-Charbonnier *et al.*, 2007).

Unggas sebagai makhluk hidup memiliki sistem batasan ukuran protektif dalam menghadapi lingkungan utamanya terkait kenaikan suhu lingkungan. *Heat shock proteins* (Hsp) merupakan serangkaian protein yang disintesis sebagai respon terhadap stres fisik, kimiawi, atau stres biologis, termasuk didalamnya paparan panas (Staib *et al.*, 2007).

Studi pendahuluan yang dilakukan oleh Morimoto *and* Fodor (1984) menemukan bahwa retikulosit ayam merespon terhadap kenaikan temperatur dengan induksi sintesis satu-satunya Hsp yaitu Hsp70 sementara limfosit ayam menginduksi sintesis empat gen Hsp yaitu Hsp89, Hsp70, Hsp 23 dan Hsp22. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kadar Hsp70 yang terkandung didalam serum darah ayam *broiler* Cobb500 secara signifikan meningkat pada ayam yang menerima perlakuan stres panas 35°C dan 38°C (1,52ng/ml dan 0,66ng/ml) dengan durasi 8jam per hari selama 14 hari bila dibandingkan dengan ayam yang tidak mendapat perlakuan stres panas yaitu pada suhu 28°C (0,21ng/ml).

Penelitian yang dilakukan selama 28 hari pada bulan Oktober ini, memasuki musim panas yang lembab. Penelitian ini menggunakan beberapa perlakuan suhu yaitu suhu 28°C untuk suhu yang dianggap sebagai temperatur yang terjadi secara alami pada musim kemarau, kemudian suhu 35°C dan suhu 38°C untuk perlakuan stres panas sebab menurut Yuwono (2007), iklim tropis Indonesia mempunyai kelembaban relatif (RH) yang sangat tinggi (kadang-kadang mencapai 90%) dengan curah hujan yang cukup banyak dan rata-rata suhu tahunan umumnya berkisar 23°C dan dapat naik sampai 38°C

pada musim kemarau. Memasuki musim panas yang lembab, temperatur udara di siang hari berkisar antara 27°C-32°C.

Pada masa sekarang ini, masyarakat cenderung memilih menggunakan obat-obatan yang berbahan dasar alami yang berasal dari tumbuhan karena bersifat relatif aman bila dikonsumsi dengan frekuensi yang sering dan untuk jangka waktu yang lama. *Nigella sativa* atau yang dikenal sebagai jintan hitam di Indonesia, belakangan ini menjadi sangat populer sebagai salah satu pengobatan tradisional yang memiliki khasiat sebagai antikanker, antiradikal bebas, immunomodulator, analgesik, antimikroba, antiinflamasi, spasmolitik, bronkhodilator, hepatoprotektif dan antihipertensi (Agromedia, 2007, Khasanah, 2009). Jintan hitam pertama kali dideskripsikan oleh Linnaeus tahun 1753. Biji jintan hitam pertama kali dimanfaatkan sebagai bumbu dapur dan sebagai bahan untuk pengawet produk olahan dari keju. Biji, minyak hingga ekstrak dari jintan hitam tersebut telah dimanfaatkan baik sendiri ataupun dikombinasikan dengan bahan lainnya sebagai obat tradisional untuk mengobati berbagai kondisi gangguan kesehatan yang lain seperti eksim, batuk, sakit kepala, diabetes, asma, infeksi dan hipertensi.

Penelitian ini diawali dengan mempersiapkan infusum yang terbuat dari biji jintan hitam yang dibuat menjadi konsentrasi 20% dan 40%. Konsentrasi infusum biji jintan hitam sebesar 20% telah diketahui memiliki efek imunomodulator yang efektif pada penelitian yang telah dilakukan oleh Ritonga (2007). Komponen antioksidan yang terkandung didalam biji *Nigella sativa* merupakan komponen penting yang diantaranya terdiri atas *essential oil*, protein, alkaloid, flavanoid dan saponin. *Thymoquinone* merupakan substansi terbanyak yang terdapat didalam biji jintan hitam yang

bertanggungjawab memberikan reaksi farmakologis dan imunologis (Salem *and* Hossain, 2000).

Penelitian yang dilakukan oleh Winkler *et al.* (2008), menjelaskan bahwa biji jintan hitam dapat menekan respon imun tipe Th-1 dan produksi IFN- $\gamma$  sebagai sitokin proinflamasi. Proses inflamasi sendiri meliputi proses aktivasi oksigen dimana *reactive oxygen species* (ROS) diproduksi. Radikal bebas dan oksidan yang diproduksi serta meningkat jumlahnya kemudian dikenali tubuh sebagai komponen terintegrasi pada sel dan jaringan yang mengalami jejas. IFN- $\gamma$  potensial menginduksi produksi dan pelepasan ROS di makrofag yang mana berikutnya dapat mempengaruhi aktivasi NF- $\kappa$ B dan ekspresi sitokin. Supresi pembentukan ROS juga aktivasi dan ekspresi gen, misalnya, berbagai jenis sitokin, kemokin, perlekatan molekul, faktor pertumbuhan, ikatan molekul, enzim dan reseptor imun menjadi dihambat.

Keadaan stres juga mengakibatkan terjadinya induksi kenaikan *cyclic Adenosine Monophosphate* (cAMP) sehingga menyebabkan terjadinya supresi sistem imun contohnya dengan menghambat proliferasi limfosit, menghambat produksi limfokin dan antibodi (Glaser *et al.*, 1990). Jintan hitam berperan dalam mengatasi stres melalui mekanisme menginduksi penghambatan dari pelepasan histamin yang nantinya mereduksi nilai cAMP (Abdel-Sater, 2009).

Mekanisme kemampuan jintan hitam dalam menghambat kenaikan kadar Hsp masih belum banyak diketahui secara pasti namun dapat diamati dari kemampuan bahan aktif jintan hitam, *thymoquinone*, yang berperan sebagai antiinflamasi. Keadaan antiinflamasi juga memicu pelepasan sitokin. Jalur yang mungkin adalah dengan melihat hubungannya terhadap keberadaan NF- $\kappa$ B. *Thymoquinone* dapat mensupresi TNF- $\alpha$

yang nantinya dapat menghambat aktivasi NF- $\kappa$ B namun hal ini tergantung pada lama dan dosis pemberian *thymoquinone* itu sendiri (Sethi *et al.*, 2008).

Rivera, (2004) menyatakan bahwa keadaan yang menimbulkan rilis hormon kortisol, rilis sitokin, dapat memicu ekspresi Hsp70. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa ayam yang tidak menerima stres panas namun diberikan suplementasi infusum biji jintan hitam menunjukkan adanya sedikit peningkatan nilai rata-rata kadar Hsp70 pada konsentrasi pemberian 20% nilai rata-rata kadar Hsp70 menjadi 0,2146ng/ml dan jumlahnya sedikit menurun pada konsentrasi pemberian 40% yaitu 0,2054ng/ml bila dibandingkan dengan ayam yang tidak menerima stres panas dan juga tidak mendapat suplementasi infusum biji jintan hitam nilai rata-rata kadar Hsp70 yang terkandung sebesar 0,21ng/ml. Sekalipun peningkatan nilai rata-rata kadar tersebut tidak berbeda nyata, peningkatan nilai rata-rata kadar Hsp70 tersebut dimungkinkan ayam sedang memasuki masa pertumbuhan sehubungan dengan Hsp70 juga tersimpan dalam sel tubuh yang berada dalam kondisi normal dan ekspresinya akan meningkat sekitar 5-10% dari keseluruhan jumlah protein dalam tubuh pada kondisi pertumbuhan normal (Pockley, 2003). Saat broiler memasuki usia 21 - 42 hari maka broiler mengalami periode pertumbuhan yang pesat (terjadi peningkatan rata-rata pertumbuhan. Pada periode ini ditandai dengan perkembangan skeletal secara cepat dengan tingkatan perkembangan mencapai 75 % (poultrypro.com, 2010).

Pemeriksaan kadar Hsp70 dalam penelitian ini menggunakan teknik *Direct Sandwich ELISA*. *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) merupakan salah satu uji serologik yang saat ini banyak dimanfaatkan secara luas untuk keperluan riset, diagnosis maupun pengujian berbagai jenis analit. Uji ELISA memiliki sensitivitas yang

sangat tinggi ini pertama kali dilaporkan untuk mengukur kadar imunoglobulin kelinci (Suwarno dkk.,2010). Hasil pemeriksaan menggunakan kit ELISA Chicken Hsp70 ini menunjukkan nilai OD dari serum darah ayam yang tidak mendapat perlakuan stres panas dan juga tidak diberikan infusum biji jintan hitam rata-ratanya lebih kecil bila dibandingkan nilai OD serum darah ayam yang diberikan perlakuan berupa stres panas dengan suplementasi infusum biji jintan hitam. Nilai OD hasil penelitian ini sehubungan dengan prinsip pemeriksaan kit ELISA yang digunakan pada penelitian ini yaitu dengan prinsip hambatan kompetitif bahwa semakin tinggi nilai OD maka semakin rendah kadar Hsp70 yang terkandung didalamnya dan begitu pula sebaliknya yaitu semakin rendah nilai OD maka semakin tinggi kadar Hsp70 (Cusabio Biotech Co., LTD *Catalog* No. CSB-E11196Ch.).

Tingginya kadar Hsp70 bukan berarti ancaman sel yang mengalami stres sebab menurut Trivedi *et al.*, (2010) bahwa Hsp70 memiliki fungsi membantu sel untuk menghadapi peningkatan konsentrasi dari sel yang belum terlipat atau protein terdenaturasi serta membantu mencegah terjadinya apoptosis dan juga Hsp70 sendiri menurut Angelidis *et al.*, (1991), membantu proses *thermotolerance* yang dibutuhkan sebagai mekanisme pertahanan pada sel yang terpapar suhu tinggi. Nilai rata-rata kadar Hsp70 dari hasil penelitian ini, untuk perlakuan stres panas menggunakan suhu 38°C tanpa pemberian infusum biji jintan hitam, adalah lebih kecil bila dibandingkan dengan nilai rata-rata kadar Hsp70 pada ayam yang terpapar suhu 35°C (Gambar 5.2.), hal tersebut dimungkinkan dengan keterkaitan produksi Hsp70 didalam sel. Suhu 38°C merupakan stressor yang dapat mengakibatkan kerusakan sel dalam jumlah besar. Sel yang mengalami jejas maka dapat mengakibatkan kematian sel, sementara Hsp70



diproduksi didalam sel (Schmitt *et al*, 2007). Pada suhu 35°C (tanpa pemberian infusum biji jintan hitam) dari penelitian ini menunjukkan rata-rata nilai kadar Hsp70 adalah 1,52ng/ml yang berarti lebih besar dibandingkan dengan perlakuan suhu 38°C, keadaan tersebut terkait dengan proses aktivasi Hsp70 endogen yang diproduksi didalam sel dalam jumlah besar sehingga menambah total mRNA Hsp70 yang diproduksi sementara bila banyak sel yang mengalami kerusakan, hanya Hsp70 ekstrasel yang tersisa dan jumlah Hsp70 ekstrasel yang tersisa tersebut tidak cukup untuk memberi perlindungan pada sel (Angelidis *et al.*, 1991).

**BAB 7**  
**KESIMPULAN DAN SARAN**

## BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

### 7.1. Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah :

1. Stres panas menginduksi pengeluaran *heat shock protein 70*, nilai kadar Hsp70 meningkat seiring dengan meningkatnya suhu dan kadar Hsp menurun setelah diberikan suplementasi infusum biji jantan hitam.
2. Infusum biji jantan hitam dengan konsentrasi 20% sudah dapat dimanfaatkan sebagai agen imunomodulator untuk menghadapi efek buruk akibat peningkatan suhu lingkungan.
3. Suhu 35°C dan konsentrasi infusum biji jantan hitam 20% dan 40% saling berinteraksi dan menimbulkan pengaruh terhadap penurunan nilai kadar Hsp70.

### 7.2. Saran

1. Pemberian infusum biji jantan hitam secara per-oral dapat dicampurkan langsung kedalam minuman dan diberikan sejak ayam masih berusia satu hari (DOC) sebagai tindakan pencegahan supaya performans dan hasil produksi ayam lebih optimal.
2. Diperlukan pembuatan preparat histopat organ untuk dapat mengetahui seberapa parah tingkat kerusakan sel akibat stres panas.
3. Perlu dipelajari lebih lanjut peran Hsp70 sebagai protein pengantar yang mampu mengadakan *thermotolerance* dan mencegah apoptosis sel akibat stres panas.

## DAFTAR PUSTAKA

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, Abul K., A.H. Lichtman, S. Pillai. 2007. *Cellular and Molecular Immunology* 6<sup>th</sup> ed. Saunders Elsevier. Philadelphia.
- Abdel-Sater, K.A. 2009. Gastroprotective Effects Of *Nigella sativa* Oil On The Formation Of Stress Gastritis In Hypothyroidal Rats. *J. Physiol Patophysiol. Pharmacol.* 1 : 143-149.
- Agrina. 2006. *Tingkatkan Stamina dengan Jintan Hitam*. Vol I, No. 23. Jakarta.
- Agromedia. 2007. *Sehat dengan Habbatussauda*. Agromedia Pustaka. Jakarta.
- Anderson, K.E and T.A. Carter, 1998. *Hot Weather Management Of Poultry*. Poultry Science Extension, North Carolina State University.
- Angelidis, C.E., Ioannis L., and Gerassimos N.P. 1991. Constitutive Expression Of Heat Shock Protein70 In Mammalian Cells Confers Thermoresistance. *Eur. J. Biochem.* 199, 35-39.
- Arianto, I. 2008. Pengaruh Pemberian Elektrolit dan Multivitamin Terhadap Gambaran Patologi Jantung Pada Broiler Yang Terpapar *Heat Stress* Kronis. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya
- Arimbi. 2000. Tesis. Respon Imun Pada Ayam Petelur Setelah Vaksinasi ND Dalam Keadaan Stres Karena Pengaruh Bising. Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.
- Asea, A., Michael R., Edith K., Jason A.B., Olivia B., Philip E.A., Marry A.S., and Stuart K.C. 2002. Novel Signal Transduction Pathway Utilized By Extracellular Hsp70; Role of Toll-Like Receptor (TLR)2 and 4. Vol. 277, No. 17, Issue of April 26, pp. 15028-15034.
- Bauer, M. E; Perks, P. Lightman, S. L.; Shanks, N. 2001. Are Adhesion Molecules Involved In Stress-Induced Changes In Lymphocyte Distribution. *Life Sci.* Jul 27; 69 (10): 1167-79.
- Cahyono, B. 2006. *Usaha Beternak Ayam Buras Petelur*. CV. Aneka Solo. Solo.
- Cherian, G. 2000. *Metabolic And Cardiovascular Diseases In Poultry: Role Of dietary fat*. Oregon State University, Corvallis.
- Cobb 500 Breeder Management Guide. Ross Breeders Limited. 2005. Newbridge Midlothian. Scotland. P.81-87.
- Department Rural Chemical Industries. 2005. How to Know Heat Stress on Poultry. <http://www.Heat Stress in Broiler> 20 Juli 2010.
- Drobatz, K.J. 2003. *Heat Illness And Heatstroke*. University Of Pennsylvania. USA.
- Edens, F. W., 2001. Involvement of Sel-Plex in physiological stability and performance of broiler chickens. Pages 349-376 in: *Biotechnology In the feed industry*. Proceedings of Altech's 17<sup>th</sup> Annual Symposium. T.P. Lyons and K.A. Jacques (eds.), Nottingham University Press, Nottingham, U.K.

- Eden W.V., Ruurd van der Zee and Berent, P. 2005. Nature Reviews Immunology : Heat Shock Proteins Induces T-Cell Regulation Of Chronic Inflammation. Division Of Immunology Faculty Of Veterinary Medicine Utrecht University. Netherlands.
- Emery, J. 2004. Heat Stress In Poultry. International Journal Of Poultry Science 2(01): 275-281.
- Galloway, E., Thomas S., Nadine H., Thorsten E., Sathosi K., Rebecca S., John B., Hector R.W., and Alex B.L. 2008. Activation Of Hepatocytes By Extraceluller Heat Shock Protein 72. Am. J. Physiol Cell Physiol 295: C514-520.
- Glaser, R., Susan K.W., William P.L., and Robert H.B. 1990. Physiological Stress-Induced Modulation Of Interleukin 2 Receptor Gene Expression And Interleukin 2 Production In Peripheral Blood Leukocytes. Arch Gen Psvchiatr. 47.
- Grieve, D. 2003. Heat Stress In Commercial Layers And Breeders. [www.hyline.com](http://www.hyline.com). 16 Agustus 2010.
- Guler, T., O.N., Ertes, M. Kizil, Bestami D., and M. Ciftci. 2006. Effect of dietary supplemental black cumin seeds on antioxidant activity in broilers. Medycyna Wed 63(9). 1060-1063.
- Hatzfeld-Charbonnier, A.S., Audrey L., Laurent C., Philippe G., Thierry V., Pierre F., Laurent M., and Phillipe M. 2007. Influence Of Heat Stress On Human Monocyte-Derived Dendritic Cell Function With Immunotherapeutic Potential For Antitumor Vaccines. J.Leukocyte Biol. 81:1-8.
- Isik, A.F., Ismail K., Irfan B., and Hanefi O. 2005. A New Agent For Treatment Of Acute Respiratory Distress Syndrome: Thymoquinone. An Experimental Study In A Rat Model. European Journal of Cardio-thoracic Surgery 28 : 301-305.
- Johnson, J.D., and Monika F. 2006. Releasing Signals, Secretory Pathways And Immune Function Of Endogenous Extracellular Heat Shock Protein 72. J. Leukocyte Biology. 79:000:000.
- Kardys, I., Nader R., Olivier M., Jean B.M., Jose L.M.V., Julie E.B., Peter L., and Paul M.R. 2008. Plasma Concentration Of Heat Shock Protein 27 And Risk Of Cardiovascular Disease : A Prospective, Nested Case Control Study. Clinical Chemistry 54:1 139-146.
- Khasanah, N. 2009. Pengaruh Pemberian Ekstrak Jintan Hitam (*Nigella sativa*) Terhadap Respon Proliferasi Limfosit Limpa Mencit BALB/C Yang Diinfeksi *Salmonella typhimurium*. Karya Tulis Ilmiah. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Semarang.
- Kocaman, B., Nurinisa, E., Ahmet Y., Ekrem, L., and Muhlis, M. 2006. Effect Of Environmental Conditions In Poultry Houses On The Performance Of Laying Hens. International Journal Of Poultry Sciences 5(1): 26-30.
- Lavergne T., 2004. Advice On Reducing Heat Stress In Poultry. LSU Ag Center.com. Lusiana USA. 1-5.

- Leandro, N.S.M., Gonzales, E. Ferro, J.A., Givisiez, P.E.N., and Macari, M. 2004. Expression of Heat Shock Protein in Broiler after Acute and Chronic cold and Heat Stress. *J. Molecu. Repro. And Develop.* 67: 171-177.
- Lin, H., H.C., Jiao, J. Busye, and E. Decuypere. 2006. Strategies For Preventing Heat Stress In Poultry. *World Poultry Science Journal*, Vol. 62.
- Lindquist, S., and E.A., Craig. 1998. The Heat Shock Proteins. *Annu. Rev. Genet.* 1988. 22:631-77.
- Luh, S.P., Kuo P.H., Kuo T.F., Tsai T.P., Tsao T.C., Chen J.Y., Tsai C.H., Yang P.C. 2007. Effects Of Thermal Preconditioning On The Ischemia-Reperfusion Induced Acute Lung Injury In Minipigs. *Shock* 28(5):615-622.
- Mazzi, C.M., Jesus A.F., Maria Ines T.F., Vicente J.M.S., Antonio Augusto D.C., and Marcos, M. 2003. Polymorphism Analysis Of The Hsp70 Stress Gene In Broiler Chickens (*Gallus gallus*) Of Different Breeds. *Genetics And Molecular Biology*, 26, 3. 275-281.
- Majdalaweih. Amin, F., Reem, H., Ronald, I.C. 2010. *Nigella sativa* Modulates Splenocyte Proliferation, Th1/Th2 Cytokine Profile, Macrophage Function And NK Anti-Tumor Activity. *Abstract Journal of Ethnopharmacology*.
- Marques, C., Guo W., Pereira P., Taylor A., Patterson C., Evans P.C., Shang F. (2006). The Triage Of Damaged Proteins: Degradation By Ubiquitin-Proteasome Pathway Or Repair By Molecular Chaperones. *FASEB J* 20:741-743.
- Mashaly, M.M., G.L. Hendricks, M.A. Kalama, A.E. Gehad, A.O., Abbas, P.H., Patterson. 2004. Effect Of Heat Stress On Production Parameters And Immune Responses Of Commercial Laying Hens. *Poultry Science* 83 : 889-894.
- McCann, S., James, M.L., Esther M.S., George P.C., Philip, W.G., and Craig, C.S. 1998. Neuroimmunomodulation : Molecular Aspects, Integrative System And Clinical Advances. *Annals of the New York Academy of Science* Vol. 840.
- Moares, V.M.B., Malheiros, R.D., Bruggeman, V., Collin, A., Tona K., Van A., P., Onggbsen, O.M., Buyse, J., Decuypere, E., Macari, M., 2003. Effect Of Thermal Conditioning During Embrionic Development On Aspects Of Physiological Responses Of Broiler To Heat Stress. *J. Term Biol.* 28: 133-140.
- Modisakeng, K.W., Rosemary, A.D., and Gregory L.B. 2004. Isolation of Genes Encoding Heat Shock Protein 70 (*Hsp70s*) From The Coelacanth, *Latimeria chalumnae*. *South African Journal of Science* 100, November/December 2004.
- Morimoto, R. and Eric F. 1984. Cell-specific Expression Of Heat Shock Proteins In Chicken Reticulocytes And Lymphocytes. *Journal of Cell Biology* Vol.99 1316-1323.
- Murray, R.K., Darryl K.G., Peter A.M., Victor W.R. 2003. *Harper's Illustrated Biochemistry* 26th ed. The McGraw-Hill Companies USA.

- Naseem M. T., Shamoan N., M.Younus, Zafar I.Ch., Aamir G., Asim A., and S. Akhter. 2005. Effect Of Potassium Chloride And Sodium Bicarbonate Supplementation On Thermotolerance Of Broilers Exposed To Heat Stress. *International Journal of Poultry Science* 4 (11): 891-895.
- Nylandsted, J., Mads G.H., Agnieszka D., Nicole F., Ekkehard W., Ulrik L., Gabriele M., Maria H.H., Mikkel R., and Marja M. 2004. Heat Shock Protein 70 Promotes Cell Survival By Inhibiting Lysosomal Membrane Permeabilization. *J. Exp. Med.* Volume 200, Number 4, August 16, 2004 425-435.
- Okolwski, A. 2005. Patho-Physiology Of Heart Failure In Broiler Chickens: Structural, Biochemical and Molecular Characteristic. Abstract Paper. *Metabolic Disease Symposium: Metabolic and Cardiovascular in Poultry: Nutritional and Physiological Aspects.* P.142.
- Pockley, A.G. 2003. Heat Shock Proteins In Health And Disease : Therapeutic Targets Or Therapeutic Agents? Expert Review In *Molecular Medicine.* ISSN 1462-3994. Cambridge University Press.
- Quintana, F.J. and Irun R.C. 2005. Heat Shock Protein As Endogenous Adjuvants In Sterile And Septic Inflammation. *The Journal Of Immunology*, 175: 2777-2782.
- Ritonga, M.Z. 2007. Potensi Jintan Hitam (*Nigella sativa*) Sebagai Imunomodulator Terhadap *Infectious Bursal Disease* (IBD) Pada Ayam Broiler. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Rivera, R.E. 2004. Thesis : The Effect Of Selenium On Heat Shock Protein 70 Expression In Turkey Embryos. North Carolina State University.
- Robert, J. 2003. Review : Evolution Of Heat Shock Protein And Immunity. *Developmental and Comparative Immunology* 27: 449-464.
- Salem M.L., and Hossain M.S. 2000. Protective Effect Of Black Seed Oil From *Nigella sativa* Against Murine Cytomegalovirus Infection. *Int. J. Immunopharmacol*; 22:729-40.
- Sarmanu. 1993. *Statistik Parametrik : Uji t dan Anova Satu Arah, Penataran Metodologi Penelitian, Statistik dan Komputer.* Lembaga Penelitian Universitas Airlangga.
- Schmitt, E., M. Gehrman, M. Brunet, G. Multhoff, and C. Garrido. 2007. Intracellular And Extracellular Functions Of Heat Shock Proteins : Repercussions In Cancer Therapy. *J. Leukocyte Biology* 81: 15-27.
- Sethi, G., Kwang S.A., and Bharat B.A. 2008. Targeting Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation Pathway by Thymoquinone : Role In Suppression of Antiapoptotic Gene Products and Enhancement of Apoptosis. *Mol Cancer Res* 2008;6(6):1059-70.
- Sharma, N.K., D. Ahirwar, D. Jhade, S. Gupta. 2009. Medicinal And Pharmacological Potential Of *Nigella sativa* : A Review. *Ethnobotanical Review*, School of Pharmacy, Chouksey Engineering College, Bilaspur, (C.G.)-India, Bilaspur, p.946-55.



- Sherwood, L. 2004. Human Physiology. Departement of Physiology and Pharmacology, School of Medicine West Virginia University. P558-585
- Staib, J.L., Quindry J.C., French J.P., Criswell D.S., Powers S.K. 2007. Increased Temperature, Not Cardiac Load, Activities Heat Shock Transcription Factor I And Heat Shock Protein 72 Expression In The Heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292: R432-439.
- Suwarno., Fedik A.R., Rahaju E., Nanik S., Adi P.R., dan Jola R. 2010. Elisa Teori Dan Protokol. Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.
- Trivedi, V., Pruthvi G., Mehul C., and Gaurang, S. 2010. Role Of Heat Shock Proteins In Immune Response And Immunotherapy For Human Cancer. *International Journal Of Pharmaceutical Sciences Review And Research*. Vol 2. Article012. 57-62
- Tsan, M.F. and Baochong G. 2004. Heat Shock Protein and Innate Immunity. *Cellulary And Molecular Immunology*, 1(4): 274-279.
- Wahyuni, R.M. 2010. Jumlah Sel Plasma Pada Caeca Tonsil Broiler Yang Terpapar *Heat Stress* Kronis Yang Divaksin ND. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Wang, X.P., Qiao X.W., Hai Y.L., and Rui F.C. 2005. Heat Shock Protein 70 Chaperoned Alpha-Fetoprotein In Human Hepatocellular Carcinome Cell Line BEL-7402. *World J. Gastroenterol*; 11(35):5561-5564.
- Wieten, L., Femke B., Ruurd Van Der Zee, Elles K.K., Jose W., Willem Van Eden. 2007. Minireview : Cell Stress Induced HSP Are Target Of Regulatory T Cells : A Role For Hsp Inducing Compounds As Anti-Inflammatory Immune-modulators. *FEBS Letters* 581 (2007) 3716-3722.
- Wijayanti, A.W. 2008. Daun Pare (*Momordica charantia L.*) Pada Mukus Usus Sapi Secara In Vitro. Skripsi. Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta.
- Winkler, C., Katharina S., Maximilian L., Harald S., Backouche H., and Dietmar F. 2008. In Vitro Effects Of *Nigella sativa* Seeds Extracts On Stimulated Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Pteridines* Vol.19, 2008, pp. 101-106.
- Yamamoto, S., Mitsuru A., and Eiko S. 1999. High Temperature Effects On Antibody Response To Viral Antigen In Mice. *Exp. Anim.* 48(1), 9-14.
- Yang, P.C., Ya H.T., Mary H.P., Christine O., and Stevie S. 2009. Regulatory Effect Of Heat Shock Protein 70 In Stress-Induced Rat Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction. *North Am.J.Med.Sci*; 1:9-15.
- Yu, J. And E. Bao. 2008. Effect Of Acute Heat Stress On Heat Shock Protein 70 And Its Corresponding mRNA Expression In The Heart, Liver, And Kidney Of Broilers. *Asian-Australasian Journal Of Animal Sciences*.

[Http://findarticles.com/p/articles/mi\\_6971/is\\_8\\_21/ai\\_n29481823/pg\\_2/?tag=content;col](http://findarticles.com/p/articles/mi_6971/is_8_21/ai_n29481823/pg_2/?tag=content;col)  
1. 3 Agustus 2010.

- Yu, J., Endong B., Jianyan Y., Lei L. 2008. Expression and Localization Of Hsps in The Heart And Blood Vessel Of Heat-Stressed Broilers. *Cell Stress And Chaperones* 13:327-335.
- Yuwono, A.B. 2007. Pengaruh Orientasi Bangunan Terhadap Kemampuan Menahan Panas Pada Rumah Tinggal Di Perumahan Wonorejo Surakarta. Tesis. Program Pasca Sarjana Magister Teknik Arsitektur Universitas Diponegoro. Semarang.

# LAMPIRAN

**Lampiran 1. Hasil Analisis Data****Descriptives****Descriptive Statistics**

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
opticaldensity	45	.954	1.774	1.36738	.281320
kadarhsp70	45	.182	2.945	.57544	.557400
Valid N (listwise)	45				

**Summarize****Case Processing Summary<sup>a</sup>**

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
opticaldensity * Suhu * Konsentrasi	45	100.0%	0	.0%	45	100.0%
kadarhsp70 * Suhu * Konsentrasi	45	100.0%	0	.0%	45	100.0%

a. Limited to first 100 cases.

**Lanjutan Lampiran 1**

**Case Summaries\***

					opticaldensity	kadarhsp70
Suhu 28	Konsentrasi	0	1		1.701	.208
			2		1.702	.208
			3		1.746	.213
			4		1.754	.214
			5		1.770	.216
		Total	N		5	5
		Mean			1.73460	.21180
		Median			1.74600	.21300
		Std. Deviation			.031429	.003633
		20	1		1.757	.215
			2		1.752	.214
			3		1.750	.214
			4		1.774	.217
			5		1.746	.213
		Total	N		5	5
Mean			1.75580	.21460		
Median			1.75200	.21400		
Std. Deviation			.010918	.001517		
40	1		1.664	.203		
	2		1.684	.206		
	3		1.644	.201		
	4		1.692	.207		
	5		1.715	.210		
Total	N		5	5		
Mean			1.67980	.20540		
Median			1.68400	.20600		

**Lanjutan Lampiran 1**

			Std. Deviation	.027096	.003507
		Total	N	15	15
			Mean	1.72340	.21060
			Median	1.74600	.21300
			Std. Deviation	.040307	.004881
35	Konsentrasi	0	1	1.096	.613
			2	1.081	.604
			3	1.008	.563
			4	.983	2.896
			5	.954	2.945
		Total	N	5	5
			Mean	1.02440	1.52420
			Median	1.00800	.61300
			Std. Deviation	.061784	1.274899
		20	1	1.387	.776
			2	1.280	.716
			3	1.276	.713
			4	1.275	.713
			5	1.265	.708
		Total	N	5	5
			Mean	1.29660	.72520
			Median	1.27600	.71300
			Std. Deviation	.050836	.028543
		40	1	1.103	.617
			2	1.161	.649
			3	1.170	.655
			4	1.208	.676
			5	1.219	.681
		Total	N	5	5
			Mean	1.17220	.65560

**Lanjutan Lampiran 1**

			Median	1.17000	.65500
			Std. Deviation	.045801	.025472
		Total	N	15	15
			Mean	1.16440	.96833
			Median	1.17000	.68100
			Std. Deviation	.125267	.794483
38	Konsentrasi	0	1	1.141	.638
			2	1.153	.645
			3	1.161	.649
			4	1.193	.667
			5	1.210	.677
		Total	N	5	5
			Mean	1.17160	.65520
			Median	1.16100	.64900
			Std. Deviation	.028841	.016223
		20	1	1.486	.182
			2	1.075	.601
			3	1.147	.641
			4	1.100	.615
			5	1.268	.709
		Total	N	5	5
			Mean	1.21520	.54960
			Median	1.14700	.61500
			Std. Deviation	.168596	.209649
		40	1	1.491	.183
			2	1.541	.188
			3	1.156	.646
			4	1.048	.586
			5	1.045	.584
		Total	N	5	5

**Lanjutan Lampiran 1**

		Mean	1.25620	.43740
		Median	1.15600	.58400
		Std. Deviation	.241989	.231305
	Total	N	15	15
		Mean	1.21433	.54740
		Median	1.15600	.63800
		Std. Deviation	.162384	.190769
Total		N	45	45
		Mean	1.36738	.57544
		Median	1.26800	.60400
		Std. Deviation	.281320	.557400

a. Limited to first 100 cases.

**NPar Tests**

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		opticaldensity	kadarhsp70
	N	45	45
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	1.36738	.57544
	Std. Deviation	.281320	.557400
	Most Extreme Differences		
	Absolute	.200	.334
	Positive	.200	.334
	Negative	-.171	-.240
	Kolmogorov-Smirnov Z	1.340	2.239
	Asymp. Sig. (2-tailed)	.055	.000

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.



## Lanjutan Lampiran 1

### Univariate Analysis of Variance

#### Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Suhu	1	28	15
	2	35	15
	3	38	15
Konsentrasi	1	0	15
	2	20	15
	3	40	15

#### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: opticaldensity

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	3.090 <sup>a</sup>	8	.386	35.411	.000
Intercept	84.137	1	84.137	7714.655	.000
Suhu	2.871	2	1.435	131.605	.000
Konsentrasi	.095	2	.047	4.343	.020
Suhu * Konsentrasi	.124	4	.031	2.848	.038
Error	.393	36	.011		
Total	87.620	45			
Corrected Total	3.482	44			

a. R Squared = .887 (Adjusted R Squared = .862)

## Lanjutan Lampiran 1

## Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: kadarhsp70

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	6.772 <sup>a</sup>	8	.847	4.418	.001
Intercept	14.901	1	14.901	77.764	.000
Suhu	4.324	2	2.162	11.282	.000
Konsentrasi	1.136	2	.568	2.963	.064
Suhu * Konsentrasi	1.313	4	.328	1.713	.169
Error	6.898	36	.192		
Total	28.572	45			
Corrected Total	13.671	44			

a. R Squared = .495 (Adjusted R Squared = .383)

## Oneway

## Descriptives

OD

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
28 dan 0	5	1.7346	.03143	.01406	1.6956	1.7736	1.70	1.77
28 dan 20	5	1.7558	.01092	.00488	1.7422	1.7694	1.75	1.77
28 dan 40	5	1.6798	.02710	.01212	1.6462	1.7134	1.64	1.72
35 dan 0	5	1.0244	.06178	.02763	.9477	1.1011	.95	1.10
35 dan 20	5	1.2966	.05084	.02273	1.2335	1.3597	1.27	1.39
35 dan 40	5	1.1722	.04580	.02048	1.1153	1.2291	1.10	1.22
38 dan 0	5	1.1716	.02884	.01290	1.1358	1.2074	1.14	1.21
38 dan 20	5	1.2152	.16860	.07540	1.0059	1.4245	1.08	1.49
38 dan 40	5	1.2562	.24199	.10822	.9557	1.5567	1.05	1.54
Total	45	1.3674	.28132	.04194	1.2829	1.4519	.95	1.77

**Lanjutan Lampiran 1****Test of Homogeneity of Variances**

OD

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
13.271	8	36	.000

**ANOVA**

OD

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.090	8	.386	35.411	.000
Within Groups	.393	36	.011		
Total	3.482	44			

**Post Hoc Tests****Homogeneous Subsets**

OD

Duncan

suhuinfusum	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
35 dan 0	5	1.0244		
38 dan 0	5		1.1716	
35 dan 40	5		1.1722	
38 dan 20	5		1.2152	
38 dan 40	5		1.2562	
35 dan 20	5		1.2966	
28 dan 40	5			1.6798
28 dan 0	5			1.7346
28 dan 20	5			1.7558
Sig.		1.000	.099	.286

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.  
 a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

## Lanjutan Lampiran 1

## Oneway

## Descriptives

hsp

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
28 dan 0	5	,211800	,0036332	,0016248	,207289	,216311	,2080	,2160
28 dan 20	5	,214800	,0015186	,0006782	,212717	,218483	,2130	,2170
28 dan 40	5	,205400	,0035071	,0015684	,201045	,209755	,2010	,2100
35 dan 0	5	,472820	,1661014	,0742828	,266578	,679062	,2896	,8130
35 dan 20	5	,725200	,0285430	,0127648	,689759	,760641	,7080	,7760
35 dan 40	5	,655600	,0254716	,0113912	,623973	,687227	,6170	,6810
38 dan 0	5	,655200	,0162234	,0072553	,635056	,675344	,6380	,6770
38 dan 20	5	,549600	,2096492	,0937580	,289286	,809914	,1820	,7090
38 dan 40	5	,437400	,2313046	,1034425	,150197	,724803	,1830	,6460
Total	45	,458624	,2244853	,0334643	,391182	,526067	,1820	,7760

## Test of Homogeneity of Variances

hsp

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
13,027	8	36	,000

## ANOVA

hsp

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1,710	8	,214	15,173	,000
Within Groups	,507	36	,014		
Total	2,217	44			

**Lanjutan Lampiran 1**

**Post Hoc Tests  
Homogeneous Subsets**

hsp

Duncan<sup>a</sup>

suhuinfusum	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
28 dan 40	5	,205400			
28 dan 0	5	,211800			
28 dan 20	5	,214600			
38 dan 40	5		,437400		
35 dan 0	5		,472820		
38 dan 20	5		,549600	,549600	
38 dan 0	5			,655200	,655200
35 dan 40	5			,655600	,655600
35 dan 20	5				,725200
Sig.		,909	,167	,191	,386

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

**Estimated Marginal Means**

**1. Suhu \* Konsentrasi**

Dependent Variable:kadarhsp70

Suhu	Konsentrasi	95% Confidence Interval			
		Mean	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound
28	0	.212	.196	-.185	.609
	20	.215	.196	-.182	.612
	40	.205	.196	-.192	.602
35	0	1.524	.196	1.127	1.921
	20	.725	.196	.328	1.122
	40	.656	.196	.259	1.053
38	0	.655	.196	.258	1.052
	20	.550	.196	.153	.947
	40	.437	.196	.040	.834

## Lanjutan Lampiran 1

## 2. Konsentrasi

Dependent Variable:kadarhsp70

Konsentrasi			95% Confidence Interval	
	Mean	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound
0	.797	.113	.568	1.026
20	.496	.113	.267	.726
40	.433	.113	.204	.662

## 3. Suhu

Dependent Variable:kadarhsp70

Suhu			95% Confidence Interval	
	Mean	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound
28	.211	.113	-.019	.440
35	.968	.113	.739	1.198
38	.547	.113	.318	.777

**Lanjutan Lampiran 1****Post Hoc Tests****Suhu****Homogeneous Subsets****Opticaldensity**Duncan<sup>a,b</sup>

Suhu	N	Subset	
		1	2
35	15	1.16440	
38	15	1.21433	
28	15		1.72340

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .011.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.

**Konsentrasi****Homogeneous Subsets****opticaldensity**Duncan<sup>a,b</sup>

Konsentrasi	N	Subset	
		1	2
0	15	1.31020	
40	15	1.36940	1.36940
20	15		1.42253
Sig.		.129	.172

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .011.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.

b. Alpha = .05.

**Lanjutan Lampiran 1****Post Hoc Tests****Suhu****Homogeneous Subsets**

kadarhsp70

Duncan<sup>a,b</sup>

Suhu	N	Subset		
		1	2	3
28	15	.21060		
38	15		.54740	
35	15			.96833
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .192.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.

b. Alpha = .05.

**Konsentrasi****Homogeneous Subsets**

kadarhsp70

Duncan<sup>a,b</sup>

Konsentrasi	N	Subset	
		1	2
40	15	.43280	
20	15	.49647	.49647
0	15		.79707
Sig.		.693	.068

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .192.

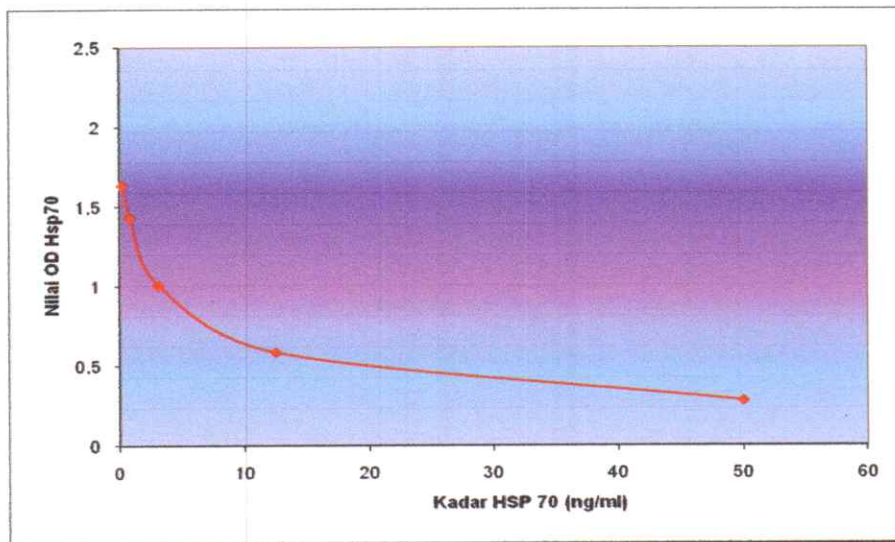
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.



**Lampiran 2. Kurva Standard Kit ELISA *Chicken Hsp70***

**Nilai Standar OD Terhadap Kadar Hsp70**

Standar	S1	S2	S3	S4	S5
OD	0.280	0.584	1.004	1.430	1.633
Kadar(ng/ml)	50	12.5	3.1	0.8	0.2



**Kurva Standar Kadar Hsp70 Terhadap Nilai *Optical Density***

Keterangan Gambar:

Garis — : Nilai Kadar Hsp70 Terhadap Nilai *Optical Density*.

**Lampiran 3. Data Hasil Pemeriksaan kadar Hsp70 menggunakan Kit ELISA *Chicken Hsp70* (Cusabio Biotech Co., LTD *Catalog No. CSB-E11196Ch.*)**

**Nilai Optical Density**

Infusum / Suhu	0%	20%	40%
28°C	1.701	1.757	1.664
	1.702	1.752	1.684
	1.746	1.750	1.644
	1.754	1.774	1.692
	1.770	1.746	1.715
35°C	1.096	1.387	1.103
	1.081	1.280	1.161
	1.008	1.276	1.170
	0.938	1.275	1.208
	0.954	1.265	1.219
38°C	1.141	1.486	1.491
	1.153	1.075	1.541
	1.161	1.147	1.156
	1.193	1.100	1.048
	1.210	1.268	1.045

**Nilai Kadar Hsp70**

Infusum / Suhu	0%	20%	40%
28°C	0.208	0.215	0.203
	0.208	0.214	0.206
	0.213	0.214	0.201
	0.214	0.217	0.207
	0.216	0.213	0.210
35°C	0.613	0.776	0.617
	0.604	0.716	0.649
	0.563	0.713	0.655
	2.896	0.713	0.676
	2.945	0.708	0.681
38°C	0.638	0.182	0.183
	0.645	0.601	0.188
	0.649	0.641	0.646
	0.667	0.615	0.586
	0.677	0.709	0.584

## Lanjutan Lampiran 3

## Nilai OD Hasil Pengujian Hsp70 pada serum Ayam Broiler

Infusum Suhu	0% X ± SD	20% X ± SD	40% X ± SD
28° C	1,7346±0,031429 <sup>a</sup>	1,7558±0,010918 <sup>a</sup>	1,6798±0,027096 <sup>a</sup>
35° C	1,0244 ± 0,61784 <sup>c</sup>	1,297 ± 0,050836 <sup>b</sup>	1,172 ± 0,045801 <sup>b</sup>
38° C	1,172 ± 0,028841 <sup>b</sup>	1,215 ± 0,168596 <sup>b</sup>	1,256 ± 0,241989 <sup>b</sup>

Keterangan : superskrip <sup>a,b,c</sup> yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata

**Lampiran 4. Dokumentasi Penelitian**



**Thermoregulator**



**Pakan CP 511**



**Infusum Biji Jintan Hitam Siap Pakai**

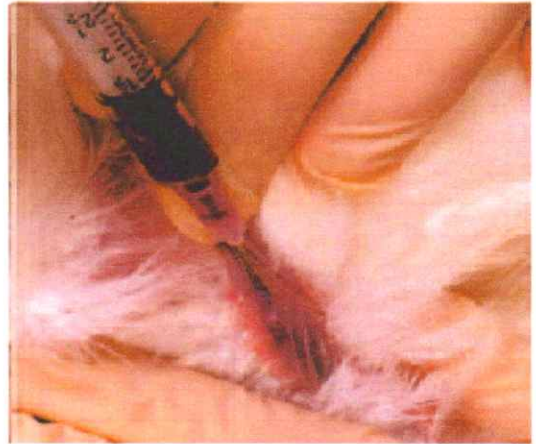


**Broiler Cobb500 Tanpa Perlakuan Stres Panas**

**Lanjutan Lampiran 4**



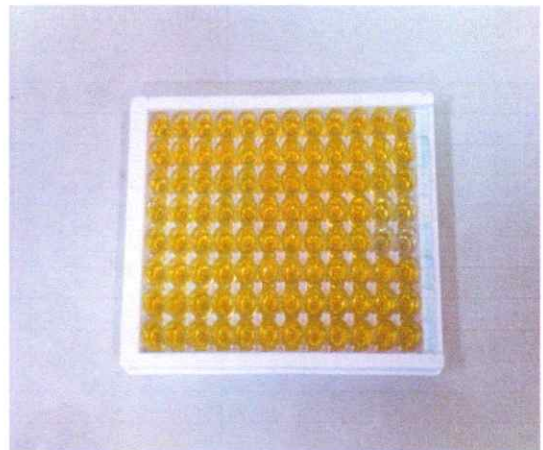
**Broiler Cobb500 Dengan Perlakuan Stres Panas**



**Pengambilan Sampel Darah**



**Reagen Kit ELISA Chicken Hsp70**



**Hasil Pemeriksaan Sampel**