

**ANALISIS EKSPRESI HSP-70 *Gallus-gallus* PADA SERUM  
AYAM BROILER MENGGUNAKAN METODE “*In House*”  
IMUNODOTBLOT**

**PUBLIKASI ILMIAH**

Diserahkan Guna untuk Memenuhi Sebagian Syarat yang Diperlukan untuk  
Mendapatkan Derajat Sarjana Peternakan pada  
**Program Studi Peternakan**



**MUSTIADI**

**B1D018196**

**PROGRAM STUDI PETERNAKAN  
FAKULTAS PETERNAKAN  
UNIVERSITAS MATARAM  
MATARAM  
2023**

**ANALISIS EKSPRESI HSP-70 *Gallus-gallus* PADA SERUM  
AYAM BROILER MENGGUNAKAN METODE “*In House*”  
IMUNODOTBLOT**

**PUBLIKASI ILMIAH**

**OLEH**

**MUSTIADI  
B1D018196**

Diserahkan Guna untuk Memenuhi Sebagian Syarat yang Diperlukan untuk  
Mendapatkan Derajat Sarjana Peternakan pada  
**Program Studi Peternakan**

**PROGRAM STUDI PETERNAKAN**

**Menyetujui  
Pada Tanggal: 30 Oktober 2023  
Pembimbing Utama**



**Prof. Ir. Sulaiman N. Depamede, M.Biotech., Ph.D.  
NIP. 195904301987031001**

**FAKULTAS PETERNAKAN  
UNIVERSITAS MATARAM  
MATARAM**

**2023**

## INTISARI

Oleh

**MUSTIADI**  
**B1D018196**

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis ekspresi HSP-70 *Gallus-gallus* pada serum ayam broiler menggunakan metode "*in house*" imunodotblot. Ayam broiler, sebagai hewan berdarah panas, sangat rentan terhadap cekaman panas karena produksi panas tubuh yang tinggi, yang dapat merusak kesehatan dan produktivitasnya. Ekspresi gen HSP-70 berperan sebagai indikator tingkat stres ayam broiler akibat panas, dimana HSP-70 diaktifkan untuk melindungi protein-protein yang sangat sensitif terhadap suhu tinggi. Penelitian ini menggunakan metode "*in house*" imunodotblot, yang memungkinkan analisis ekspresi protein secara semi-kuantitatif. Metode ini sederhana, spesifik, dan tepat. Sampel serum ayam diambil sebanyak tiga kali dari ayam-ayam broiler yang dipotong di UD. Mega Broiler Jl. Baitulrahman Karangpule Kota Mataram. Pengambilan pertama diberi kode SA 1 - SA 10, pengambilan kedua diberi kode SA 11 - SA 20, dan pengambilan ketiga diberi kode SA 21 - SA 30. Pada penelitian ini terjadi reaksi imunodotblot baik pada serum ayam yang diencerkan 10 kali (ulangan pertama) maupun serum ayam yang tidak diencerkan (ulangan kedua). Intensitas warna secara umum lebih tinggi pada sampel yang tidak diencerkan dibandingkan dengan yang diencerkan. Dari 30 ekor ayam, dapat dikelompokkan menjadi tiga kelompok berdasarkan scoring ekspresi HSP-70. Kelompok scoring satu (intensitas warna rendah) sebanyak 11 sampel (36,67%), kelompok scoring dua (intensitas warna sedang) sebanyak 9 sampel (30%), dan kelompok scoring tiga (intensitas warna tinggi) sebanyak 10 sampel (33,3%). Hasil ini menunjukkan bahwa metode "*in house*" imunodotblot dapat digunakan untuk menganalisis ekspresi HSP-70 pada ayam yang dipotong di UD Mega Broiler Karangpule.

**Kata kunci:** HSP-70 *Gallus-gallus*, *in house* imunodotblot, semi-kuantitatif

## **ABSTRACT**

**By**

**MUSTIADI**

**B1D018196**

This study aims to analyze the expression of HSP-70 *Gallus-gallus* in broiler chicken serum using the "in house" immunodotblot method. Broiler chickens, as warm-blooded animals, are highly susceptible to heat stress due to high body heat production, which can damage their health and productivity. HSP-70 gene expression acts as an indicator of the level of heat stress in broiler chickens, where HSP-70 is activated to protect proteins that are very sensitive to high temperatures. This study used the "in house" immunodotblot method, which allows semi-quantitative analysis of protein expression. This method is simple, specific, and precise. Chicken serum samples were taken three times from broiler chickens slaughtered at UD. Mega Broiler Jl. Baitulrahman Karangpule, Mataram City. The first sampling was coded SA 1 - SA 10, the second sampling was coded SA 11 - SA 20, and the third sampling was coded SA 21 - SA 30. In this study immunodotblot reactions occurred in both chicken serum diluted 10 times (first repeat) and undiluted chicken serum (second repetition). Color intensity is generally higher in undiluted samples than in diluted ones. Of the 30 chickens, they could be grouped into three groups based on HSP-70 expression scoring. Scoring group one (low color intensity) had 11 samples (36.67%), scoring group two (medium color intensity) had 9 samples (30%), and scoring group three (high color intensity) had 10 samples (33.3). %. These results indicate that the "in house" immunodotblot method can be used to analyze HSP-70 expression in chickens slaughtered at UD Mega Broiler Karangpule.

**Keywords:** HSP-70 *Gallus-gallus*, *in house* imunodotblot, semi-quantitative

## PENDAHULUAN

Indonesia termasuk negara tropis, sehingga sering terjadi stres panas yang memberikan dampak buruk terhadap kemampuan memproduksi, reproduksi, respon fisiologis, hingga sistem imun ayam broiler (Hao & Gu 2014). Suhu rata-rata sepanjang tahun di Indonesia adalah antara 26 – 27,2 °C hingga mencapai suhu maksimum 39,5 °C (Moberg, 2000) dan tingkat kelembaban berkisar antara 66,7 – 93,6% (Anonim, 2020). Kondisi suhu lingkungan di Indonesia yang tinggi ini sebenarnya kurang cocok untuk dijadikan sebagai tempat untuk memelihara ayam broiler karena menurut Amizar *et al* (2017) bahwa strain ayam broiler terbaru yang merupakan hasil seleksi secara intensif yang memiliki kinerja pertumbuhan lebih cepat harus dipelihara pada suhu nyaman yang berkisar antara 18 – 22 °C.

Ayam broiler termasuk dalam golongan hewan berdarah panas (*homeotermik*) dimana suhu tubuhnya sudah diatur dalam suatu batasan yang sesuai. Suhu normal tubuh ayam dewasa yaitu berkisar antara 41 – 42 °C (Aengwanich dan Chinrasri, 2003). Ayam mampu bereproduksi secara optimum apabila faktor-faktor internal dan eksternal berada dalam kondisi yang sesuai dengan kebutuhan hidupnya. Salah satu faktor eksternal yang sangat mempengaruhi produktivitas ayam yaitu suhu lingkungan. Suhu panas dari lingkungan menjadi salah satu perhatian utama, karena dapat menyebabkan kerugian ekonomi yang diakibatkan oleh meningkatnya angka kematian atau menurunnya produktivitas ayam (St-Pierre *et al.*, 2003). Keadaan suhu yang relatif tinggi pada suatu lingkungan pemeliharaan ayam menyebabkan terjadinya cekaman panas. Cekaman panas (*heat stress*) menyebabkan gangguan terhadap pertumbuhan pada ayam broiler (Mashaly *et al.*, 2004). Penurunan pertumbuhan ini terkait dengan penurunan konsumsi pakan dan

peningkatan konsumsi air minum selama ayam mengalami cekaman panas (Cooper dan Washburn, 1998).

Pengeluran panas didalam tubuh ayam broiler dilakukan dengan cara radiasi, konduksi, dan konveksi, ini karena ayam broiler tidak memiliki kelenjar keringat (Moberg, 2000). Akibat banyaknya aktivitas metabolisme yang dilakukan ayam broiler, maka ayam broiler memproduksi panas tubuh yang lebih tinggi (Lara & Rostagno, 2013). Seiring meningkatnya suhu lingkungan, maka suhu tubuh ayam broiler juga akan meningkat sehingga ayam broiler sangat rentan terkena cekaman panas akan berdampak buruk pada kesehatan dan produktivitasnya, bahkan dapat beresiko kematian yang akan menekan efisiensi produksi dan ekonomis (Tabiri *et al.*, 2000). Sintesis sebagian besar protein akan tertunda apabila organisme hidup mengalami stres panas, namun ada sekelompok protein yang dikenal dengan *Heat Shock Protein* (HSP) berperan sebagai respon tubuh terhadap stres panas itu sendiri (Jaiswal *et al.*, 2017). Menurut Khan *et al* (2016) bahwa HSP akan disintesis oleh sel-sel tubuh ayam broiler yang dalam kondisi stres panas. Terdapat berbagai macam jenis HSP, namun salah satu HSP yang paling sering dipelajari adalah HSP-70. HSP-70 berfungsi dalam melindungi organisme dari dampak negatif stres panas untuk mengontrol efek panas, salah satunya efek toksik, melalui peningkatan sistem kekebalan tubuh dan aktivitas enzim antioksidan.

Dinamika ekspresi gen HSP-70 dapat dijadikan indikator untuk mengamati tingkat stres ayam broiler karena panas, dimana HSP-70 diaktifkan untuk melindungi protein-protein yang sangat sensitif pada kondisi temperatur panas (Genin *et al.*, 2008) yang akan berdampak terhadap pertumbuhan ayam broiler, dengan menurunnya efisiensi pakan dan meningkatnya deposisi lemak tubuh.

*Imunodot blot* merupakan salah satu teknik biologi molekular yang telah banyak digunakan untuk analisis ekspresi protein secara semi-kuantitatif dari berbagai macam bahan uji baik dari sel maupun jaringan (Gilda dan Gomes 2013; Nie *et al.*, 2017). Teknik ini merupakan metode yang pengerjaannya sederhana, spesifik dan tepat (Li *et al.*, 2011). Pada saat penelitian ini diajukan, telah tersedia kit “*In house*” Imunodot blot di Laboratorium Mikro Biologi dan Bioteknologi. Kit ini ini dikembangkan untuk menganalisis ekspresi HSP-70 pada unggas. Dengan telah tersedianya kit dotblot HSP-70 “*in house*” di UNRAM maka dilakukan penelitian berjudul analisis ekspresi HSP-70 *Gallus-gallus* pada serum ayam broiler menggunakan metode “*in house*” imunodot blot.

## **MATERI DAN METODE**

### **Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September 2022 – Februari 2023, bertempat di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Fakultas Peternakan Universitas Mataram.

### **Materi Penelitian**

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah serum dari 30 ekor ayam broiler yang diambil darahnya. Ayam broiler yang digunakan sebagai sampel merupakan ayam broiler yang siap panen berumur antara 40 – 45 hari yang diambil darahnya di rumah potong ayam broiler UD. Mega Broiler Jl. Baitulrahman Karangpule Kota Mataram.

### **Bahan Penelitian**

Serum ayam broiler, Serum tikus, BSA (*Bovine Serum Albumin*), Membran nitroselulosa, Susu skim TBS-T (*Tris Buffered Saline-Tween* 20), Blocking

solution 4% skim milk dalam TBS-T (W/V), Larutan pengencer sampel yakni 1% skim milk dalam TBS-T (V/V), GAR atau *goat anti rabbit secondary antibody*, Ponceau, BCIP-NBT (*Kromogen Alkaline Phosphatase*).

### **Alat Penelitian**

Wadah penampung, Sentrifius, Mikropipet, Tip, Freezer, Vortex mixer, Pinset, Paper puncher/perforator (pelubang kertas), Micro plate, Aluminium foil, Inkubator.

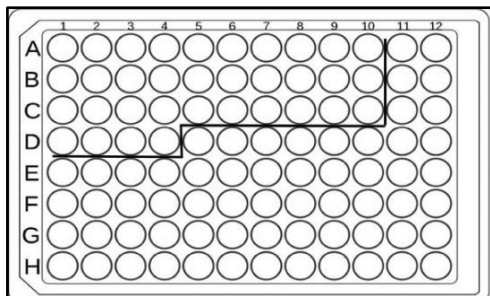
### **Pengambilan Darah**

Pengambilan sampel darah dilakukan dengan cara darah ditampung menggunakan wadah penampung yang sudah diberi label kemudian diisi hingga volume yang sudah ditentukan yaitu antara 5 dan 10 ml. Wadah penampung yang sudah berisi darah tersebut segera ditutup rapat dan disimpan dalam ice box berisi es batu. Darah yang diperoleh kemudian dibawa ke laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Fakultas Peternakan Unram untuk dilakukan pemisahan antara serum dan sel-sel darah. Di laboratorium darah yang diperoleh dikeluarkan dari ice box kemudian ditaruh di suhu 4°C selama 2 -3 jam hingga serum terpisah dari sel-sel darah. Kemudian serum diambil menggunakan pipet dan dipindahkan ke dalam microtube yang sudah diberi label masing-masing sesuai dengan nomor dan tanggal agar hasilnya mudah untuk diinterpretasikan.

Pengambilan sampel serum ayam dilakukan sebanyak 3 kali, pengambilan pertama diberi kode SA 1 – SA 10 diambil pada tanggal 29 September 2022 dan pengambilan kedua diberi kode SA 11 – SA 20 diambil pada tanggal 6 Oktober 2022 sementara pengambilan ketiga serum dengan kode SA 21 – SA 30 diambil pada tanggal 18 Oktober 2022.

## Analisis Ekspresi HSP-70 *Gallus-gallus* dengan Metode Immunodotblot

Sampel serum ayam broiler yang disimpan dalam lemari pendingin pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  di-*thawing* terlebih dahulu. Kemudian membrane nitroselulosa dilubangi menggunakan pelubang kertas untuk mendapatkan bagian-bagian bundaran kecil. Bundaran-bundaran nitroselulosa dimasukkan ke dalam sumuran microplate menggunakan pinset. Sumuran microplate yang digunakan adalah sumuran dengan kode A1-10, B1-10, C1-10, dan D 1-4 (Gambar 1).



Gambar 1. Microplate

Pada uji ini dilakukan dua kali ulangan. Pada ulangan pertama, semua sampel serum diencerkan 10 kali. Lajur A, B, C diisi dengan sampel sedangkan pada lajur D diisi dengan kontrol. Setiap sumuran yang sudah berisi membran nitroselulosa ditetesi  $5\mu\text{l}$  sampel atau kontrol. Secara rinci lajur diisi sebagai berikut: Ulangan pertama lajur A 1-10 diisi dengan sampel serum ayam SA1-SA10 lajur B 1-10 diisi dengan sampel serum ayam SA 11-SA 20, lajur C 1-10 diisi dengan sampel serum ayam SA 21- SA 30, sedangkan untuk lajur D 1-4: D1 diisi dengan BSA, D2 diisi dengan skim milk dan D3 diisi dengan serum tikus masing-masing sebagai kontrol negatif dan D4 diisi dengan serum kelinci sebagai kontrol positif.

Selanjutnya sampel diinkubasi dalam inkubator selama 60 menit dengan suhu  $37^{\circ}\text{C}$  hingga membrane kering. Micro plate kemudian dikeluarkan dan membrane

nitroselulosa ditetesi ponceau masing-masing sebanyak  $50\mu\text{l}$  didiamkan selama 5 menit dan setelah itu ponceau disedot dengan pipet tetes kemudian membrane nitroselulosa dicuci menggunakan  $100\mu\text{l}$   $\text{dH}_2\text{O}$  per sumur. Pencucian diulangi 4 kali sampai terlihat adanya spot berwarna merah pada membrane. Setelah dicuci kemudian ditambahkan  $100\mu\text{l}$  blocking solution (4% larutan susu skim w/v) pada masing-masing sumuran, dan diinkubasi selama 60 menit pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ . Selanjutnya blocking solution dibuang dan membrane nitroselulosa dicuci dengan washing solution masing-masing sebanyak  $250\mu\text{l}$  per sumur dan dicuci 4 kali. Setiap pencucian plate didiamkan selama 60 detik kemudian cairan pencuci dibuang. Setelah tahap tersebut selesai, ke dalam setiap smuran yang berisi membrane nitroselulosa ditambahkan "*in house*" antibody HSP-70 masing-masing sebanyak  $100\mu\text{l}$  per sumuran, dan diinkubasi semalaman dalam suhu  $4^{\circ}\text{C}$ . Setelah proses inkubasi selesai, "*in house*" antibody HSP-70 disedot dan membrane nitroselulosa dicuci menggunakan washing solution masing-masing sebanyak  $250\mu\text{l}$  per sumur dan dicuci 4 kali. Setelah proses pencucian selesai, kemudian ditambahkan goat anti rabbit antibody (GAR) sebagai antibody sekunder (mengandung enzim alkalin fosfatase) yang diencerkan 4000 kali sesuai petunjuk pabrik (SIGMA A-3937), masing-masing sebanyak  $100\mu\text{l}$  per sumuran dan diinkubasi selama 60 menit pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ . Selanjutnya dilakukan pencucian menggunakan washing solution masing-masing sebanyak  $250\mu\text{l}$  per sumur dan dicuci 4 kali.

Setelah dicuci membran nitroselulosa, ditetesi substrat NBT/BCIP pada setiap sumuran masing-masing sebanyak  $90\mu\text{l}$  dan didiamkan selama 5 – 15 menit dalam ruangan tanpa cahaya, diamati setiap 5 menit sekali. Reaksi dihentikan dengan menambahkan  $\text{dH}_2\text{O}$  (*aquades*) pada masing-masing membran

sebanyak 250 µl per sumuran. Hasil negatif jika membrane berwarna putih dan hasil positif apabila berwarna biru atau ungu hingga hitam yang ditandai dengan terbentuk dot-dot pada membran nitroselulosa. Kualitas hasil dilihat berdasarkan intensitas warna yang terbentuk.

Sementara itu untuk ulangan kedua dilakukan dengan cara yang sama seperti ulangan pertama, hanya saja sampel serum ayam yang digunakan tidak diencerkan (menggunakan serum asli). Kontrol pada sumuran D3 diganti dengan serum kelinci dan D4 diganti dengan antigen HSP-70.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Ayam broiler yang digunakan sebagai sampel merupakan ayam broiler siap panen yang diambil dari rumah potong ayam broiler UD. Mega Broiler Jl. Baitulrahman Karangpule Kota Mataram. Ayam-ayam yang disembelih di RPA tersebut berasal dari peternakan ayam broiler yang bersifat komersil atau dengan skala besar. Ayam-ayam diangkut dan dibawa menuju lokasi RPA dengan menggunakan transportasi berupa mobil box, yang bermuatan atau berisi ratusan ekor ayam dalam sekali pengangkutan.

Dari 30 ekor ayam yang diambil darahnya diperoleh sebanyak 60 microtube serum. Setiap ayam yang disembelih diperoleh darah dengan volume antara 5 sampai 10 ml per wadah penampung. Selanjutnya sampel darah dipisahkan dengan cara sentrifus, setiap satu wadah penampung diperoleh dua microtube serum dengan volume yang berbeda-beda. Masing-masing serum diberi kode SA1 – SA30 (setiap serum yang diperoleh dari wadah yang sama diberi kode sama). Contoh sampel serum disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Contoh sampel serum ayam broiler yang digunakan dalam penelitian

Selanjutnya serum yang diperoleh dimasukkan ke dalam freezer pada suhu -20°C sebelum digunakan. Data pengambilan setiap serum dari 30 ekor ayam broiler dalam penelitian ini dicatat dan diberi kode sesuai tanggal pengambilan seperti disajikan dalam Tabel 1.

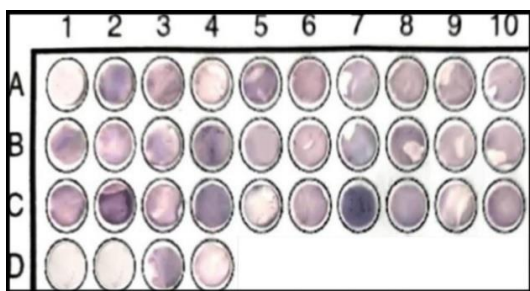
Tabel 1. Sampel Serum Ayam

No	Kode sampel	Tanggal pengambilan	No	Kode sampel	Tanggal pengambilan	No	Kode sampel	Tanggal pengambilan
1	SA 1	29/09/2022	11	SA 11	6/10/22	21	SA 21	18/10/22
2	SA 2	29/09/2022	12	SA 12	6/10/22	22	SA 22	18/10/22
3	SA 3	29/09/2022	13	SA 13	6/10/22	23	SA 23	18/10/22
4	SA 4	29/09/2022	14	SA 14	6/10/22	24	SA 24	18/10/22
5	SA 5	29/09/2022	15	SA 15	6/10/22	25	SA 25	18/10/22
6	SA 6	29/09/2022	16	SA 16	6/10/22	26	SA 26	18/10/22
7	SA 7	29/09/2022	17	SA 17	6/10/22	27	SA 27	18/10/22
8	SA 8	29/09/2022	18	SA 18	6/10/22	28	SA 28	18/10/22
9	SA 9	29/09/2022	19	SA 19	6/10/22	29	SA 29	18/10/22
10	SA 10	29/09/2022	20	SA 20	6/10/22	30	SA 30	18/10/22



## Analisis Ekspresi HSP-70 *Gallus-gallus* dengan Metode Immunodotblot

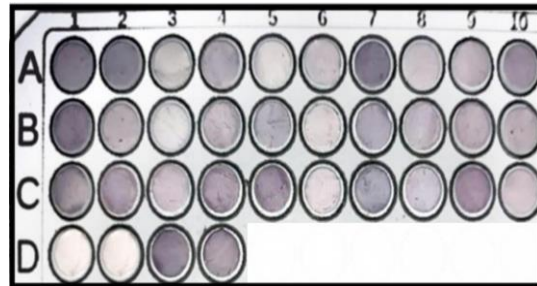
Dotblot merupakan suatu metode yang dikembangkan pada penelitian semi kuantitatif pada uji imun untuk mendeteksi antigen. Sampel yang mengandung antigen ditetaskan pada membran yang dilabel dengan antibodi. Pada metode ini tidak dilakukan pemisahan seperti pada SDS-PAGE. Jadi dotblot hanya digunakan untuk mengetahui ada atau tidak adanya suatu antigen. Namun demikian estimasi konsentrasi antigen dapat diketahui pada blot tersebut tetapi kurang akurat karena sulit untuk dikatakan akurat terhadap warna yang timbul pada blot tersebut. Metode ini cukup baik digunakan pada uji atau *screening* dengan sampel yang cukup banyak (Rantam, 2003). Pada penelitian ini, uji immunodotblot dilakukan untuk menganalisis ekspresi antibodi poliklonal terhadap HSP-70 *Gallus-gallus* pada serum ayam broiler. Hasil dot blot untuk ulangan pertama dan kedua masing-masing disajikan dalam Gambar 3 dan 4.



Gambar 3. Hasil dotblot ulangan I

Keterangan gambar:

- A1 – A10: serum ayam SA 1 – SA 10
- B1 – B10: serum ayam SA 11 – SA 20
- C1– C10: serum ayam SA 21– SA 30
- D1: kontrol negatif berupa BSA
- D2: kontrol negatif berupa skim milk
- D3: kontrol negatif berupa serum tikus
- D4: kontrol positif berupa ayam kelinci



Gambar 4 Hasil dotblot ulangan II

Keterangan gambar:

- A1 – A10: serum ayam SA 1 – SA 10
- B1 – B10: serum ayam SA 11 – SA 20
- C1– C10: serum ayam SA 21– SA 30
- D1: kontrol negatif berupa BSA
- D2: kontrol negatif berupa skim milk
- D3: kontrol positif berupa serum kelinci
- D4: kontrol positif berupa HSP-70

Pada Gambar 3 tampak kontrol positif (D4) tidak mencerminkan intensitas warna yang tinggi dibandingkan kontrol negatif serum tikus (D3). Akan tetapi pada gambar 4.3 jelas terlihat bahwa kontrol positif serum kelinci (D3) dan vaksin HSP-70 (D4) menunjukkan intensitas warna positif, ini berarti immunodotblot pada ulangan/perlakuan ke dua (Gambar 4) berkerja lebih baik daripada perlakuan pertama (Gambar 3)

Berdasarkan Gambar 3 dan 4, terlihat bahwa secara umum terjadi reaksi immunodotblot baik pada serum ayam yang diencerkan 10 kali (Gambar 3) maupun serum ayam yang tidak diencerkan (Gambar 4). Selanjutnya terlihat bahwa intensitas warna pada sampel yang tidak diencerkan secara umum lebih kuat dibandingkan serum ayam yang diencerkan. Hal ini menunjukkan bahwa kadar HSP-70 pada serum ayam yang digunakan pada penelitian ini relatif rendah, karena pada pengenceran 10 kali (Gambar 3) intensitas warnanya lebih rendah. Akan tetapi hal ini perlu dibuktikan lebih lanjut karena pengamatan dengan metode immunodotblot ini masih bersifat kualitatif.

Hasil dari metode imunodotblot dapat dianalisis secara semi kuantitatif dengan melakukan scoring terhadap intensitas warna yang dihasilkan. Pada penelitian ini imunodotblot pada ulangan atau perlakuan kedua sampel (kontrol) positif menghasilkan intensitas warna yang seharusnya terjadi dalam reaksi imunodotblot. Menurut pendapat Agustina (2007) pada uji IgG pada mencit BALB/C dengan metode *immunoblotting*, warna dari dot blot dapat menunjukkan nilai rata-rata reaksi

antigen-antibodi secara kualitatif. Semakin gelap warna yang ditimbulkan pada membran nitroselulosa menunjukkan nilai rata-rata titer antibodi yang semakin tinggi, demikian sebaliknya. Semakin tipis warna yang ditimbulkan pada membran nitroselulosa menunjukkan nilai rata-rata titer antibodi yang semakin rendah. Pada penelitian ini, scoring dilakukan pada hasil ulangan kedua, karena terdapat konsistensi antara kontrol positif dan control negatif. Hasil scoring disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Scoring dot ulangan kedua

No	Kode sampel	Skor	No	Kode sampel	Skor	No	Kode sampel	Skor	No	Kode sampel	Skor
1	SA1	3	11	SA11	3	21	SA21	3	31	D1	0
2	SA2	3	12	SA12	2	22	SA22	3	32	D2	0
3	SA3	1	13	SA13	1	23	SA23	1	33	D3	3
4	SA4	2	14	SA14	2	24	SA24	3	34	D4	3
5	SA5	1	15	SA15	2	25	SA25	3			
6	SA6	1	16	SA16	1	26	SA26	1			
7	SA7	3	17	SA17	2	27	SA27	3			
8	SA8	1	18	SA18	2	28	SA28	1			
9	SA9	2	19	SA19	1	29	SA29	3			
10	SA10	2	20	SA20	2	30	SA30	1			

Berdasarkan Tabel 2 dari 30 ekor ayam dapat dikelompokkan menjadi tiga kelompok ayam berdasarkan scoring ekspresi HSP-70. Kelompok scoring satu sebanyak 11 sampel (36,67%), kelompok scoring dua sebanyak 9 sampel (30%) dan kelompok scoring tiga sebanyak 10 sampel (33,3%). Hasil ini menunjukkan bahwa metode “*in house*” imunodotblot dapat digunakan untuk menganalisis ekspresi HSP-70 pada ayam yang dipotong di UD Mega Broiler Karangpule.

Secara umum dapat dikatakan bahwa ayam-ayam yang digunakan dalam penelitian ini terindikasi mengalami stres menjelang dilakukan pemotongan. Hal ini sesuai dengan pendapat Tamzil et al (2022) bahwa, pengangkutan menyebabkan unggas

mengalami cekaman akibat proses pemindahan ayam dari kandang ke box, kepadatan ayam dalam box yang berlebihan, ketidaktersediaan pakan dan air minum, cekaman panas dan tiupan angin, proses pemindahan ayam dari box ke tempat penampungan sementara, serta kelelahan dan ketakutan. Untuk memastikan tingkat akurasi metode “*in house*” imunodotblot yang digunakan dalam penelitian ini perlu dilakukan uji lebih lanjut menggunakan sampel yang lebih banyak dan uji banding menggunakan kit komersial dengan metode kuantitatif seperti ELISA.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa analisis ekspresi HSP-70 *Gallus-gallus* dapat dilakukan dengan metode “in house” imunodotblot. Sebanyak 30 sampel serum ayam broiler yang diuji, secara kualitatif didapatkan tiga kategori ekspresi HSP-70 yaitu rendah 11 ekor (36,7%), sedang 9 ekor (30%) dan tinggi 10 ekor (33,3%).

## SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menganalisis ekspresi HSP-70 *Gallus-gallus* secara kuantitatif agar dapat diperoleh data yang lebih akurat dan dapat dipelajari untuk dijadikan sebagai metode dalam mendeteksi pengaruh HSP-70 terhadap pertumbuhan ayam broiler.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aengwanich, W. and O. Chinrasri. 2002. Effect of heat stress on body temperature and hematological parameters in male layers. *Thai.J. Physiol. Sci.* 15:27-33.
- Agustina Dini. 2017. Immunoblotting Detection of Immunoglobulin G Post Subcutaneous Immunization of Protein Hemagglutinin Pili *Klebsiella pneumoniae* 12,8 kDa on Mice BALB / C. *Journal of Agromedicine and Medical Sciences.* Vol. 3 No. 2
- Amizar R, Suharti S, Jakaria, Mutia R. 2017. The expression of heat shock protein 70 gene with organic selenium supplementation and its effect on productivity of broilers in tropical environment. *J Indones Trop Anim Agric.* 42:279–287.
- Anonim. 2020. Kelembaban udara [Internet]. [accessed 18th September 2022]. Available from: <https://www.bps.go.id/searchengine/result.html>
- Cooper, M.A. and K.W. Washburn. 1998. The Relationships of Body Temperature to Weight Gain, Feed Consumption, and Feed Utilization in Broilers under Heat Stress. *Poult. Sci.* 77:237–242.
- Genin O, Hasdai A, Shinder D, Pines M. 2008. Hypoxia, hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1 $\alpha$ ) and heat-shock proteins in tibial dyschondroplasia. *Poult Sci.* 87:1556-1564.
- Gilda JE, Gomes AV. 2013. Stain-free total protein staining is a superior loading control to  $\beta$ -actin for western blots. *Analytical biochemistry* 440:168 – 188.
- Hao Y, Gu XH. 2014. Effects of heat shock protein 90 expression on pectoralis major oxidation in broilers exposed to acute heat stress. *Poult Sci.* 93:2709–2717.
- Jaiswal K, Raza M, Uniyal S, Chaturvedani A, Sahu V, Dilliwar L. 2017. Heat Stress and its Relation with Expression of Heat Shock Proteins in Poultry. *Int J Sci Env Tech.* 6:159-166.
- Khan AZ, Khumbar S, Hamid M, Afzal S, Parveen F, Liu YShu H, Mengistu BM, Huang K. 2016. Effects of Selenium-Enriched Probiotics on Heart Lesions by Influencing The mRNA Expression of Selenoproteins and Heat Shock Proteins in Heat Stressed Broiler Chickens. *Pak Vet J.* 36:460-464.
- Lara LJ, Rostagno MH. 2013. Impact of heat stress on poultry production. *Animals.* 3:356–369.
- Li X, Hui B, Xianyun W, Liyun L, Yinghao C, Jian W, Yumeng L, Lijuan L, Xiaodong G, Lin W, Siqi L, Guozhen L. 2011. Identification and validation of rice reference proteins for western blotting. *Journal of Experimental Botany* 62:4763-4772.
- Mashaly, M.M., G.L. Hendricks, M.A. Kalama, A.E. Gehad, A.O. Abbas, and

- P.H. Patterson. 2004. Effect of heat stress on production parameters and immune responses of commercial laying hens. *Poult. Sci.* 83:889-894.
- Moberg GP. 2000. Biological response to stress: Implications for animal welfare. In: Moberg GP, Mench JA, editors. *Biol Anim Stress*. Oxfordshire (UK): CABI Publishing. p. 1-21.
- Nie X, Chen L, Sheng H, Fulai X, YJ Kang, Wenjing Z. 2017. An appropriate loading control for western blot analysis in animal models of myocardial ischemic infarction. *Biochemistry and Biophysics Reports* 12:108-113.
- Rantam FA. 2003. *Metode Imunologi*. Airlangga University Press. Surabaya.
- St-Pierre, N.R., B. Cobanov, and G. Schnitkey. 2003. Economic losses from heat stress by US livestock industries. *J. Dairy Sci.* 86:E52-E77.
- Tabiri HY, Sato K, Takashi K, Toyomizu M, Akiba Y. 2000. Effect of Acute Heat Stress on Plasma Amino Acid Concentrations of Broiler Chickens. *Japan Poult Sci.* 37:86-94.
- Tamzil MH, Haryani NKD, Indarsih B. Sukarthajaya IN. 2022. Stres pengangkutan pada ternak unggas, pengaruh dan upaya penanggulangan. *Livestock and Animal Research* 20(1): 48-58.