

BAB III METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan April-Juni 2023, di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Katolik Widya Mandira Kupang.

B. Alat dan Bahan

1. Alat

Tabel 3.1 Daftar peralatan yang digunakan untuk penelitian

No	Alat	Fungsi
1	Rotary evaporator	Untuk melakukan proses ekstraksi
2	Autoclaf	Untuk mensterilisasi peralatan dan bahan penelitian
3	Labu Erlenmeyer	Tempat penyimpanan media
4	Timbangan analitik	Menimbang bahan , alat dengan ketelitian 0,0001 gram
5	Gelas ukur	Untuk mengukur sampel bahan cair dengan ketelitian rendah
6	Gelas kimia	Tempat mereaksikan bahan
7	oven	Untuk mengeringkan alat dan bahan sebelum digunakan
8	Inkubator	Untuk mengatur kelembaban dan suhu
9	Neraca Analitik	Untuk menimbang bahan
10	bunsen	Untuk pemanasan / sterilisasi
11	Pipet tetes	Mengambil bahan dalam jumlah sedikit
12	Pipet ukur	Untuk mengukur volume larutan pada berbagai skala
13	Batang pengaduk	Untuk menghomogenkan larutan

14	Kertas saring	Untuk menyaring larutan
15	Kandang ayam	Tempat pembiakan ayam broiler
16	Kertas lebel	Untuk menulis lebel bahan/alat
17	Thermostirer	Untuk pengaduk magnetic dan larutan
18	Vortex mixer	Untuk mencampur cairan atau larutan dalam tabung reaksi
19	Oven	Untuk menginkubasi
20	Magnetic stirer	Untuk mengaduk larutan
21	Aluminium foil	Untuk menutup bahan campuran
22	Botol falcon	Untuk menyimpan dosis
23	Jarum suntik 5cc	Mengambil sampel darah
24	Incubator	tempat pengaturan dan penyaringan aliran udara steril
25	Hemositometer	Untuk menghitung sel darah putih
26	Centrifuge	Untuk memisahkan molekul (partikel) suatu larutan antara yang terlarut (filtrate) dengan organel yang mengendap (substrat).
27	eppendorf	Sebagai wadah menyimpan larutan/cairan.
28	Mikropipet	memindahkan larutan atau cairan dari satu tempat ke tempat yang lainnya, tetapi untuk volume yang sangat kecil (dibawah 1,0 ml)
29	Neraca Analitik	Untuk menimbang serbuk kulit batang jambu air hutan
30	Yellow tip, blue tip	untuk mengambil larutan dalam ukuran mikro (20l sampai 200l)
31	Microplate	digunakan dalam reaksi imunologis, seperti: lapisan antibodi atau antigen
32	Lesung dan mortal	Untuk menghaluskan ekstrak

2. Bahan

Tabel 3.2 Daftar bahan yang digunakan untuk penelitian

No	Bahan	Fungsi
1	Serbuk kulit batang jambu air hutan	Bahan utama ekstrak
2	kertas saring	Untuk menyaring larutan ekstrak
3	Alcohol 95 %	Sebagai cairan antiseptic dan pelarut sampel
4	Aquades (<i>waterone</i>)	Sebagai pelarut bahan atau sampel
5	Ayam broiler (<i>Gallus domesticus</i>)	Sebagai hewan uji untuk sarana penelitian laborator
6	Larutan <i>Ethylene Diamine Tetra Acid (EDTA)</i>	Sebagai agen anestetik
7	Larutan <i>Phosphate Buffered Saline (PBS)</i>	Sebagai pengatur pH dan keseimbangan osmolaritas sel
8	RBC (<i>Red Blood Cells</i>) Ayam broiler	Sebagai bahan uji serologis
9	WBC (<i>White Blood Cell</i>) Ayam broiler	Sebagai bahan uji serologis
10	Pakan ayam: Broiler pre-starter (BPS), Hi pro vite 512 dan dedak padi)	Sebagai makanan ayam broiler
11	ND (<i>Newcastle Disease Vaccine</i>) & IBD (<i>Infectious Bursal Decease Vaccine</i>)	Sebagai bahan vaksin ayam

C. Prosedur Penelitian

Prosedur mempersiapkan ekstrak untuk penelitian ini sesuai dengan prosedur yang dikemukakan oleh Seran & Herak (2022)

1. Tahap Persiapan

1) Menyiapkan Ekstrak Kulit Batang *Syzigium jambos* (L.) Alston

Kulit *S. jambos* (L.) Alston diambil dari Desa Foho Eka, Kecamatan Nanaet Dua Besi, Kabupaten Belu. Kulit tersebut dicuci dengan air bersih, kemudian dikeringkan pada suhu ruang. Kulit yang sudah kering dihaluskan menggunakan lesung untuk mendapatkan serbuk (simplisia) untuk diekstraksi dengan prosedur lengkapnya sebagaimana diuraikan pada bagian berikut. Ekstraksi kulit *S. jambos* (L.) Alston dengan menggunakan metode maserasi dan evaporasi. Tahapan-tahapan ekstraksi dengan metode maserasi dan evaporasi dapat diuraikan secara lengkap sebagai berikut:

- a. Sampel hasil penghalusan yang sudah tersedia, ditimbang dengan menggunakan timbangan analitik sebanyak 2000 gram. Dipisahkan masing-masing 333 gram dan dimasukkan ke dalam 6 buah Labu Erlenmeyer 1000 ml, ditambahkan Etanol 95% sebanyak 6000 liter, kemudian homogenkan dengan menggunakan shaker laboratorium. Hasil yang sudah homogen dimaserasi selama 2 kali 24 jam. Etanol 95% dipilih sebagai pelarut atau ekstraktor karena melalui serangkaian uji coba didapatkan bahwa etanol menunjukkan efek yang paling baik terhadap penarikan bahan aktif yang terkandung dalam bahan sampel.

- b. Hasil rendaman yang sudah dimaserasi, kemudian disaring dengan menggunakan corong *Buchner* dan kertas saring. Larutan hasil penyaringan diendapkan dan dipisahkan antara ekstrak dengan alkohol pelarut dengan menggunakan rotari evaporator sampai seluruh alkohol di dalam wadah rotavapor terpisah dengan alkohol, di mana alkohol akan keluar dari mesin rotari evaporator sedangkan ekstrak tertinggal di dalam wadah rotavapor. Catatan: Wadah yang berisi larutan hasil maserasi yang tersaring itu merupakan wadah porselen, diletakkan di atas pemanas air atau penguap putar (*rotavapor*) pada suhu 65°C dengan kecepatan 40 rpm hingga diperoleh ekstrak kental.
- c. Pembuatan Konsentrasi ekstrak uji kulit *S. jambos* (L.) Alston mengikuti prosedur sebagaimana dikemukakan oleh Zainab, 2013 dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Konsentrasi} = \frac{m}{V} \times 100\%$$

Keterangan:

% konsentrasi = Proporsi konsentrasi ekstrak yang terdapat di dalam pelarut

M = Berat/ massa dari ekstrak (gram)

V = Jumlah total ekstrak dan pelarut

Hasil penentuan konsentrasi ekstrak yang mengacu pada rumus di atas untuk masing-masing konsentrasi dasar ekstrak yaitu 25%, 50%, 75% sebagai berikut:

1. Konsentrasi 25%:

$$25\% = \frac{m}{10 \text{ ml}} \times 100\%$$

$$25\% = \frac{100\% \times m}{10 \text{ ml}}$$

$$100\% \times m = 25\% \times 10 \text{ ml}$$

$$100 \times m = 250 = \frac{250}{100}$$

$$= 2,5 \text{ gram}$$

Jadi ekstrak yang dibutuhkan dalam konsentrasi 25% adalah 2,5 gr.

2. Konsentrasi 50 %:

$$50\% = \frac{m}{10 \text{ ml}} \times 100\%$$

$$50\% = \frac{100\% \times m}{10 \text{ ml}}$$

$$100\% \times m = 50\% \times 10 \text{ ml}$$

$$100 \times m = 500 = \frac{500}{100}$$

$$= 5,0 \text{ gram}$$

Jadi ekstrak yang dibutuhkan dalam konsentrasi 50% yaitu 5,0 gram.

3. Konsentrasi 75 %

$$75\% = \frac{m}{10 \text{ ml}} \times 100\%$$

$$75\% = \frac{100\% \times m}{10 \text{ ml}}$$

$$100\% \times m = 75\% \times 10 \text{ ml}$$

$$100 \times m = 750$$

$$m = \frac{750}{100}$$

$$= 7,5 \text{ gram}$$

Jadi ekstrak yang dibutuhkan dalam konsentrasi 75% adalah

7,5gr.

2) Menyiapkan Hewan coba dan tata laksana pemeliharaan

a. Menyiapkan hewan coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah ayam broiler. Adapun kriteria hewan uji memiliki kondisi fisik sehat, kaki normal, dapat berdiri tegak, tampak segar dan aktif, tidak dehidrasi, tidak ditemukan kelainan bentuk dan cacat fisik sekitar pusar dan dubur. Bila tidak memenuhi kriteria ini maka perlu diberikan suplemen pengendalian stress.

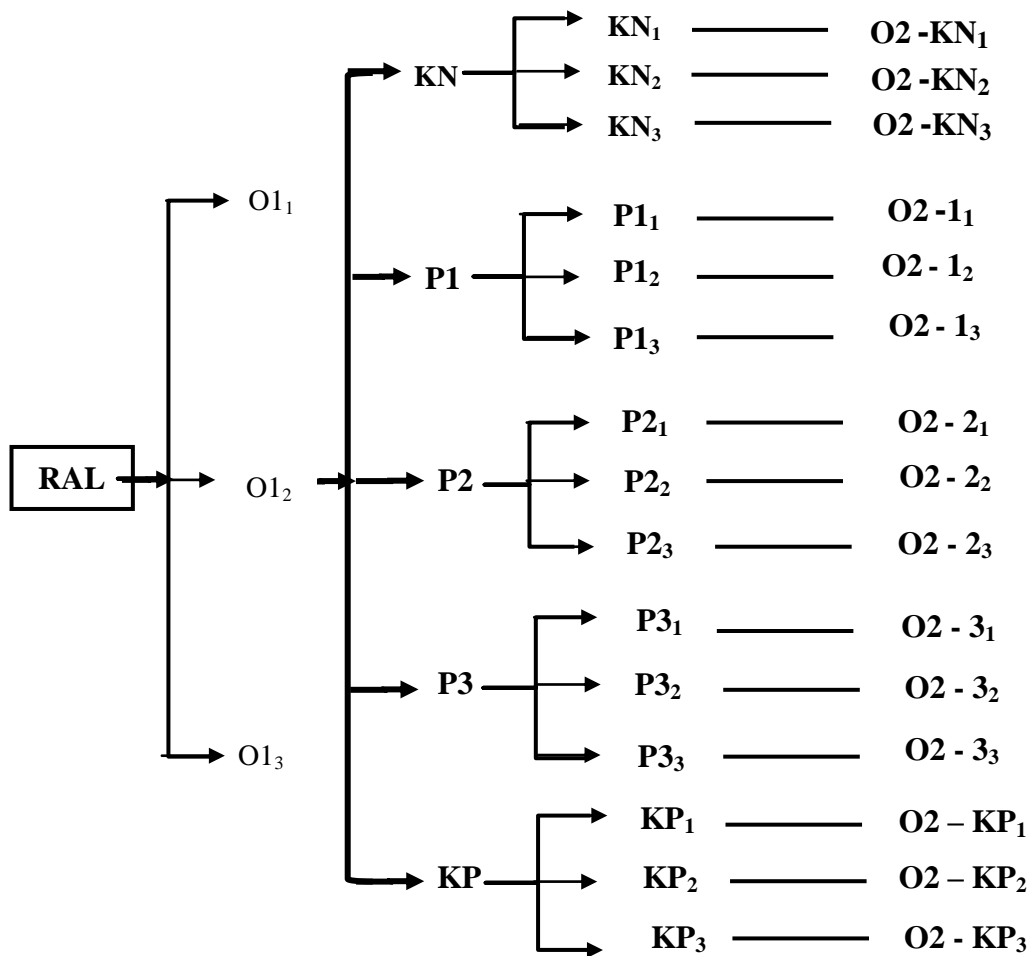
Ayam broiler dipelihara di dalam kandang berukuran 3 meter dengan tinggi 8 meter untuk menampung 15 ekor ayam. Pakan ayam terdiri dari: *Broiler Pre Starter* (BPS) untuk umur 1-20 hari dan *Hi Pro Vite 512 B* untuk umur 21 hari - panen. Pakan tambahan berupa dedak padi halus. Tempat makan dan minum disesuaikan dengan jumlah ayam.

b. Tata laksana pemeliharaan

Hewan uji sebanyak lima belas ekor ayam broiler yang telah beradaptasi selama 16 hari. Ayam kemudian dibagi dalam 5 kelompok, dengan masing-masing kelompok terdiri dari 3 ekor ayam. Setiap ayam broiler diberikan pakan (BPS untuk umur 1-20 hari dan *Hi pro Vite 512 B* untuk umur 21hari - panen). Pakan tambahan berupa dedak padi. Setiap harinya ayam diberi makan dan minum secara *ad libitium*.

2. Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian eksperimen dengan rancangan yang digunakan yaitu *the pre test post test control group design*, yang terdiri dari 3 perlakuan dan kelompok kontrol yang diulang sebanyak 3 kali. Ketiga perlakuan tersebut yaitu perlakuan yang menggunakan 3 konsentrasi ekstrak yang berbeda; 25%, 50% dan 75%



Gambar 3.1 *The pre-test post-test control group design*

Keterangan:

RAL : Rancangan Acak Lengkap	K ₁₋₃ : Kontrol ulangan 1-3
O1: Observasi awal	O2: Observasi akhir
P1 ₁₋₃ : Percobaan 1 ulangan 1-3	O1 ₁₋₃ : Observasi 1 ulangan 1-3
P2 ₁₋₃ : Percobaan 2 ulangan 1-3	O2 ₁₋₃ : Observasi 2 ulangan 1-3
P3 ₁₋₃ : Percobaan 3 ulangan 1-3	O3 ₁₋₃ : Observasi 3 ulangan 1-3

Dari tiga perlakuan yang dirancang, ditentukan dosis untuk kelompok perlakuan ekstrak. Kemampuan Unggas khususnya ayam, mampu mentoleransi ransum yang mengandung tannin sebesar 33% maka pemberian ekstrak *S. jambos* (L.) Alston kepada kelompok perlakuan adalah sebagai berikut:

- 1) Kelompok perlakuan terdiri dari 9 ekor ayam, untuk kelompok konsentrasi 25%, 50% dan 75%. Ayam broiler diberi perlakuan pada umur 16 hari setelah beradaptasi dengan lingkungan. Tiap kelompok diberikan ekstrak pada sore hari. Ekstrak yang diberikan sebanyak 30 mg dilarutkan didalam 10 ml air lalu diberikan kepada masing-masing ayam untuk diminum. Sebelum diberikan perlakuan, ayam dibiarkan berpuasa minum selama 3-4 jam. Hal ini untuk mempermudah ayam meminum ekstrak secara sukarela.
- 2) Kelompok kontrol negatif tidak diberi perlakuan, tetapi makanan dan minuman yang diberikan tetap diperhatikan.
- 3) Pada kelompok kontrol positif diberikan vaksin berupa ND-IB tetes mata. Selanjutnya, pada umur 7 hari vaksin yang diberikan adalah ND (*Newcastle*

Disease Vaccine). Ketika berumur 12 hari, ayam broiler diberikan vaksin IBD (*Infectious Bursal Disease*) melalui air minum. Pada umur 19 hari, ayam diberikan lagi vaksin ND melalui air minum dan pada umur 25 hari ayam diberikan lagi vaksin IBD melalui air minum.

3. Tahap Pengumpulan Data

Proses pengumpulan data dilakukan mengikuti langkah-langkah sebagai berikut:

- a. Pengambilan darah ayam broiler. Darah ayam diambil sebanyak dua kali yaitu pada saat ayam berumur 16 hari untuk *pre test* dan 41 hari untuk *post test*. Pengambilan sampel darah ayam broiler pada masing-masing ayam sebanyak 5 cc melalui vena lateral menggunakan jarum suntik 5 cc yang dimasukkan kedalam tabung EDTA. Darah kemudian disimpan dalam kotak dingin yang sudah disteril untuk proses sentrifugasi.
- b. Proses centrifugasi darah ayam broiler. Proses centrifugasi dari masing-masing kelompok dilakukan secara teliti. Pada masing-masing kelompok mengalami pengulangan sebanyak 3 kali.
 - 1) Kelompok kontrol negatif. Pada hari ke-41 darah ayam diambil melalui vena lateral untuk disentrifugasi. *Red blood cell* (RBC) hasil centrifugasi kelompok kontrol negative disimpan untuk proses pengujian *Hemagglutination Inhibition* (HI) atau penghambatan penggumpalan darah untuk mengukur titer antibodi.
 - 2) Kelompok perlakuan. Pada hari ke-41, darah ayam diambil melalui vena lateral untuk disentrifugasi. Kelompok perlakuan terdiri dari 3 perlakuan

yaitu pada konsentrasi 25%, 50% dan 75% dengan masing-masing kelompok konsentrasi mengalami pengulangan sebanyak 3 kali.

- 3) Kelompok kontrol positif. Pada hari ke-41, darah ayam diambil melalui vena lateral untuk disentrifugasi.

Langkah centrifugasi darah ayam broiler sebagai berikut:

- a. Penentuan konsentrasi RBC ayam broiler (*Red Blood Cell*) 1%
 - Diambil sel darah merah ayam broiler sebanyak 5cc dari kelompok kontrol negatif
 - Dimasukkan dalam tabung EDTA
 - Darah ayam broiler kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 10 menit, lalu dibuang supernatnya.
 - Ditambahkan PBS dengan perbandingan PBS dan platelet 1:3
 - Disentrifugasi lagi (diulang 3-4 kali), tiap sentrifugasi PBS supernatan dibuang.
 - Sentrifugasi terakhir: platelet diambil (100%)
 - Dibuat konsentrasi RBC menjadi 1% diambil dari: 1 ml RBC 10% ditambah 9 ml PBS ($V_1M_1 = V_2M_2$)
- b. Penentuan konsentrasi WBC ayam broiler (*White Blood Cell*)
 - Diambil darah ayam broiler sebanyak 5cc pada masing-masing kelompok. Dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali.
 - Darah disimpan dalam eppendorf.
 - Darah ayam kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 10 menit, lalu dibuang supernatnya.

- Ditambahkan PBS dengan perbandingan PBS dan platelet 1:3
- Disentrifugasi lagi (diulang 3-4 kali), tiap sentrifugasi PBS supernatan dibuang.
- Sentrifugasi terakhir: diambil leukositnya (100%).
- Dibuat konsentrasi WBC menjadi 1% diambil dari: 1 ml WBC 10% ditambah 9 ml PBS ($V1M1 = V2M2$)

c. Melakukan test hambatan hemaglutinasi

Langkah pelaksanaan test hambatan hemaglutinasi baik pada kelompok kontrol positif, kelompok perlakuan maupun kelompok kontrol negatif dengan mengikuti prosedur sebagai berikut:

- Microplate diisi PBS 25 μ L pada 96 well. Dilakukan yang sama untuk kedua buah microplate.
- Diisi leukosit ayam pada kelompok kontrol negatif ulangan satu sebanyak 20 μ L di sumuran A1. Kemudian dilakukan pengenceran sampai sumuran A12 dengan mengambil 25 μ L dari sumuran pertama dan dimasukkan pada sumuran kedua. Diulangi sampai sumuran A12.
- Diisi leukosit ayam pada kelompok kontrol negative ulangan 2 sebanyak 20 μ L di sumuran B1. Kemudian dilakukan pengenceran sampai sumuran B 12 dengan mengambil 25 μ L dari sumuran pertama dan dimasukkan pada sumuran kedua. Diulangi sampai sumuran B12.
- Diisi leukosit ayam pada kelompok kontrol negative ulangan 3 sebanyak 20 μ L di sumuran C1. Kemudian dilakukan pengenceran sampai

sumuran C 12 dengan mengambil 25 μ L dari sumuran pertama dan dimasukkan pada sumuran kedua. Diulangi sampai sumuran A12.

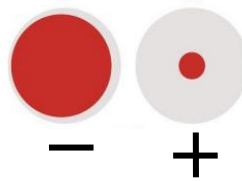
- Diisi leukosit ayam pada kelompok perlakuan konsentrasi 25 % ulangan satu sebanyak 20 μ L di sumuran A1. Dilakukan pengenceran sampai sumuran A12 dengan mengambil 25 μ L dari sumuran A1 dan diulangi sampai sumuran A12
- Diisi leukosit ayam pada kelompok perlakuan konsentrasi 25 % ulangan 2 sebanyak 20 μ L di sumuran B1. Dilakukan pengenceran sampai sumuran B12 dengan mengambil 25 μ L dari sumuran B1 dan diulangi sampai sumuran B12
- Diisi leukosit ayam pada kelompok perlakuan konsentrasi 25 % ulangan 3 sebanyak 20 μ L di sumuran C1. Dilakukan pengenceran sampai sumuran C12 dengan mengambil 25 μ L dari sumuran C1 dan diulangi sampai sumuran C12
- Diisi leukosit ayam pada kelompok perlakuan konsentrasi 50 % ulangan satu sebanyak 20 μ L di sumuran A1. Dilakukan pengenceran sampai sumuran A12 dengan mengambil 25 μ L dari sumuran A1 dan diulangi sampai sumuran A12
- Diisi leukosit ayam pada kelompok perlakuan konsentrasi 50 % ulangan 2 sebanyak 20 μ L di sumuran B1. Dilakukan pengenceran sampai sumuran B12 dengan mengambil 25 μ L dari sumuran B1 dan diulangi sampai sumuran B12

- Diisi leukosit ayam pada kelompok perlakuan konsentrasi 50 % ulangan 3 sebanyak 20 μL di sumuran C1. Dilakukan pengenceran sampai sumuran C12 dengan mengambil 25 μL dari sumuran C1 dan diulangi sampai sumuran C12
- Diisi leukosit ayam pada kelompok perlakuan konsentrasi 75 % ulangan satu sebanyak 20 μL di sumuran A1. Dilakukan pengenceran sampai sumuran A12 dengan mengambil 25 μL dari sumuran A1 dan diulangi sampai sumuran A12
- Diisi leukosit ayam pada kelompok perlakuan konsentrasi 75 % ulangan 2 sebanyak 20 μL di sumuran B1. Dilakukan pengenceran sampai sumuran B12 dengan mengambil 25 μL dari sumuran B1 dan diulangi sampai sumuran B12
- Diisi leukosit ayam pada kelompok perlakuan konsentrasi 75 % ulangan 3 sebanyak 20 μL di sumuran C1. Dilakukan pengenceran sampai sumuran C12 dengan mengambil 25 μL dari sumuran C1 dan diulangi sampai sumuran C12
- Diisi leukosit ayam pada kelompok kontrol positif ulangan 1 sebanyak 20 μL di sumuran A1. Dilakukan pengenceran sampai sumuran A12 dengan mengambil 25 μL dari sumuran A1 dan diulangi sampai sumuran A12
- Diisi leukosit ayam pada kelompok kontrol positif ulangan 2 sebanyak 20 μL di sumuran B1. Dilakukan pengenceran sampai sumuran B12 dengan mengambil 25 μL dari sumuran B1 dan diulangi sampai sumuran B12

- Diisi leukosit ayam pada kelompok kontrol positif ulangan 3 sebanyak 20 μL di sumuran C1. Dilakukan pengenceran dengan mengambil 25 μL dari sumuran C1 dan diulangi sampai sumuran C12
- Diinkubasi suhu ruang 18-20⁰c selama 30 menit tanpa pencahayaan.
- Ditambah RBC 1% sebanyak 25 μL di semua sumuran
- Diinkubasi 30 menit tanpa pencahayaan.

d. Membaca Hasil Titer Antibodi

Titer antibodi dibaca berdasarkan hasil hemaglutinasi yang terjadi pada kelompok kontrol negatif, kelompok eksperimen, maupun kelompok kontrol positif.



Gambar 3.1 Interpretasi hasil uji hambatan hemaglutinasi.

Hasil uji HI dinyatakan positif menghambat aglutinasi eritrosit, jika setelah inkubasi terdapat endapan eritrosit berbentuk titik di tengah sumuran mikroplet.

Rumus untuk memperoleh nilai titer adalah sebagai berikut:

$$\frac{2^{-n}}{2^2} = 2^{n-2}$$

D. Analisis Data

Data penelitian ini dianalisis secara inferensial kualitatif dan deskriptif kualitatif.

1. Analisis Inferensial Kuantitatif.

Analisis data yang digunakan adalah analisis keragaman (Analysis of Variance – ANOVA) dengan tahapan-tahapannya.

Tahapan-tahapan ANOVA adalah sebagai berikut:

a. Menentukan Derajat bebas perlakuan (DB)

1. Derajat Bebas Total = $(t \cdot r) - 1$
2. Derajat Bebas Perlakuan = $t - 1$
3. Derajat Bebas Galat = $DBT - DBP$

b. Menentukan Faktor Koreksi (FK)

$$FK = \frac{T_{ij}^2}{r \cdot t}$$

1. Menentukan Jumlah Kuadrat (JK)

a) Jumlah Kuadrat Total (JKT)

$$JKT = (P_1)^2 + (P_2)^2 + \dots + (P_n)^2 - FK$$

b) Jumlah Kuadrat Perlakuan (JKP)

$$JKP = \frac{(TA)^2 + (TB)^2 + (TC)^2 + \dots + (Tn)^2}{r} - FK$$

c) Jumlah Kuadrat Galat (JKG)

$$JKG = JKT - JKP$$

2. Menghitung Kuadrat Tengah (KT)

a. Kuadrat Tengah Perlakuan (KTP)

$$KTP = \frac{JKP}{DBP}$$

b. Kuadrat Tengah Galat (KTG)

$$KTG = \frac{JKG}{DBG}$$

3. Menentukan F_{hitung}

$$F_{hitung} = \frac{KTP}{KTG}$$

4. F_{tabel} (0.05) dan (0.01)

$$\text{Nilai } F_{tabel} (0.01) = (0.01.DBP, DBG)$$

Tabel 3.3 Data analisis varians (ANOVA)

Sumber Variasi	DB	JK	KT	F hitung	F table
					0,01
Perlakuan					
Galat					
Total					

Ket: ** = Berpengaruh nyata pada F (0,01)

Jika $F_{hitung} > F_{table}$, maka hal ini menunjukkan bahwa ekstrak uji berkemampuan secara nyata sebagai imunomodulator terhadap respon antibodi ayam broiler. Hasil analisis varian tersebut akan memberi informasi mengenai ada tidaknya kemampuan imunomodulasi ekstrak kulit batang jambu air hutan dari

masing-masing level konsentrasi terhadap respon antibodi ayam broiler sebagai indikator meningkatnya system imun tubuh untuk melawan wabah penyakit.

Apabila hasil analisis varians menunjukkan adanya kemampuan imunomodulasi ekstrak kulit batang jambu air hutan terhadap respon antibodi ayam broiler secara signifikan, maka analisis dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan tingkat signifikan 1%.

Tahapan-tahapan analisis lanjutan Beda Nyata Terkecil:

1. Data hasil penelitian dianalisis terlebih dahulu dengan Analisis Varians atau sidik ragam, untuk memperoleh data seperti rata-rata perlakuan, derajat bebas perlakuan yang dibutuhkan di dalam uji lanjutan BNT. Selain itu, Bahan lain yang juga dibutuhkan yaitu nilai kritis atau taraf signifikan BNT dan tabel t-student, sesuai komponen rumus BNT di bawah ini:

$$BNT_{\alpha} = t_{(\alpha, v)} \cdot \sqrt{\frac{2 (KT Galat)}{r}}$$

2. Tentukan berbeda atau tidak berbedanya pengaruh antara perlakuan di dalam penelitian ini dengan cara menjumlahkan nilai kritis BNT 1%, dengan nilai rata-rata perlakuan terkecil dan berikan huruf “a” dari nilai rata-rata terkecil pertama hingga nilai rata-rata perlakuan berikutnya yang kurang dari atau sama dengan nilai hasil penjumlahan nilai kritis BNT 1% dengan nilai rata-rata perlakuan terkecil.
3. Demikian dan seterusnya, proses penghitungan tersebut sampai pada nilai rata-rata perlakuan terbesar.

4. Dilakukan penjelasan atau pemaknaan terhadap huruf-huruf yang berada pada bagian belakang angka rata-rata perlakuan. Bila antara dua atau lebih perlakuan yang memiliki huruf yang sama maka hal itu berarti bahwa pengaruh antara ke dua perlakuan tersebut tidak berbeda secara nyata pada nilai kritis BNT yang ditentukan dalam konteks penelitian ini yaitu 1%.
5. Menentukan perlakuan terbaik dari semua perlakuan yang ada di dalam penelitian tersebut dengan cara:
 - a. Lihat perlakuan yang memiliki nilai rata-rata tertinggi, perhatikan huruf notasinya, lihat juga huruf notasi pada perlakuan lain yang sama dengan perlakuan yang nilai rata-ratanya tertinggi tadi.
 - b. Bila ada perlakuan lain yang konsentrasinya lebih kecil dari perlakuan yang memiliki rata-rata tertinggi berhuruf notasi sama, maka perlakuan tersebutlah yang ditetapkan sebagai perlakuan terbaik.

Untuk penegasan bahwa analisis lanjutan Beda Nyata Terkecil (BNT) yang dilakukan sangat penting sebagai dasar untuk menyimpulkan mengenai berbeda tidaknya kemampuan imunomodulasi ekstrak kulit batang jambu air hutan terhadap respon antibodi hewan uji bahkan dapat diperoleh data mengenai konsentrasi ekstrak yang paling tinggi kemampuan imunomodulasinya terhadap respon antibodi ayam broiler sebagai indikator meningkatnya system imun tubuh untuk melawan wabah penyakit.

2. Analisis Deskriptif Kualitatif.

Analisis Deskriptif Kualitatif dilakukan dengan cara mengumpulkan data titer antibodi, menghitung rata-rata tiap perlakuan kemudian berdasarkan hasil rata-rata tiap perlakuan itu dibuatkan kesimpulan deskriptif kualitatif.

- a) Bahwa ekstrak kulit batang jambu air hutan (*Syzigium jambos* (L.) Alston) Timor memiliki potensi sebagai imunomodulator terhadap respon antibodi ayam broiler (*Gallus domesticus*) secara *in vivo*.
- b) Bahwa terdapat perbedaan jumlah imunomodulasi antar level konsentrasi ekstrak kulit batang jambu air hutan (*Syzigium jambos* (L.) Alston) Timor terhadap respon antibodi ayam broiler (*Gallus domesticus*) secara *in vivo*.
- c) Bahwa terdapat perbedaan kemampuan imunomodulasi antara ekstrak kulit batang jambu air hutan (*Syzigium jambos* (L.) Alston) Timor dengan kelompok kontrol negative dan kelompok kontrol positif.