

## RESPONS HSP-70 DAN KADAR KORTISOL AKIBAT PEMBERIAN KOMBINASI EKSTRAK JALOH DAN KROMIUM PADA AYAM BROILER YANG MENGALAMI CEKAMAN PANAS

*Response of HSP-70 and Cortisol Levels as a Result of Giving Combine of Jaloh Extract and Chromium in Broiler Chickens Given Heat Stress*

Sugito<sup>1</sup>, Erdiansyah Rahmi<sup>2</sup>, dan Muhammad Isa<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Klinik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

<sup>2</sup>Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

<sup>3</sup>Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

E-mail: sugitofkhunsyah@gmail.com

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh pemberian kombinasi ekstrak jaloh dan kromium terhadap pembentukan *heat shock protein-70* (HSP-70) dan kadar kortisol ayam yang mengalami cekaman panas. Dalam penelitian ini digunakan ayam broiler sebanyak 12 ekor yang dibagi atas empat perlakuan: Perlakuan I (EC), cekaman panas + dan kombinasi 1.000 mg ekstrak jaloh dengan 1.000 µg kromium per liter air minum, perlakuan II (E), cekaman panas + 1.000 mg ekstrak jaloh per liter air minum, perlakuan III (KD), cekaman panas + 0,0 mg ekstrak jaloh dan 0,0 µg kromium, dan Perlakuan IV (KL), tanpa cekaman panas dan 0,0 mg ekstrak jaloh dan 0,0 µg kromium. Masing-masing perlakuan terdiri atas tiga ulangan. Metode pemberian cekaman panas dilakukan dengan meningkatkan suhu dalam kandang pada 33±1° C selama lima jam per hari dalam waktu lima belas hari. Pemberian kombinasi ekstrak jaloh dan kromium dilakukan dengan cara melarutkannya dalam air minum dan diberikan selama dua jam (pemberian pukul 10.00) sebelum suhu di dalam kandang mencapai 33±1° C. Pengambilan sampel serum dan jaringan paru dilakukan pada hari ke-15 pelaksanaan penelitian (ayam umur 36 hari). Pengambilan sampel darah dilakukan sebelum ayam dipotong dan jaringan organ paru diambil setelah ayam dipotong. Pada sampel serum dilakukan pemeriksaan kortisol dengan *enzymelinkedimmunosorbantassay* (ELISA) dan deteksi HSP-70 di dalam jaringan paru dilakukan menggunakan metode imunohistokimia. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian cekaman panas pada suhu 33±1° C selama lima jam per hari dapat meningkatkan pembentukan HSP-70 dalam paru dan kadar kortisol dalam serum. Pemberian ekstrak jaloh secara tunggal lebih efektif menurunkan jumlah HSP-70 pada jaringan paru dibandingkan jika dikombinasi dengan kromium.

Kata kunci: HSP-70, kortisol, cekaman panas, ekstrak jaloh, kromium

### ABSTRACT

This research was conducted to determine the effect to fextractj aloh combined with chromium on cortisol serum levels and formation of HSP-70 in lung tissue of heat stressed chicken. The research was conducted using a complete randomized block design using a total of 12 broiler chicken with the age of 20 days. Chicken were divided into four treatment groups, group I (EC) was given heat stress and jaloh extract 1,000 mg/l drinking water in combination with chromium 1,000 µg/l drinking water, group II (E) was given heat stress and jaloh extract 1,000 mg/l drinking water, group III (KD) was given heat stress without jaloh extract or chromium (negative control), and chicken in group IV (KL) without treated with heat stress or jaloh extract/chromium (positive control). The temperature in the cage was increase at 33±1° C for five hours per day within 15 days. The combination of jaloh extract and chromium was done by dissolving it in drinking water and was given for two hours (at 10.00) before the temperature inside the enclosure reach 33±1° C, each treatment consisted of three replication. Sampling of serum and lung tissue was performed on days fiveteen of research implementation. The chicken was euthanizedthen lung tissue was taken before the collection of blood sample. The cortisol of serum samples was examined using *enzymelinkedimmunosorbantassay* (ELISA) and the presence of HSP-70 in lung tissue was examined using immunohistochemical methods. The result of this study indicated that the administration of heat stress at 33±1° C for five hours may increase the formation of HSP-70 in lung tissue and serum cortisol level. The administration of jaloh extract, a single or combined with chromium effectively decrease the amount of HSP-70 in lung tissue.

Key words: HSP-70, cortisol, heat stress, extract jaloh, chromium

### PENDAHULUAN

Cekaman panas direspons tubuh dengan menghasilkan beberapa senyawa dalam upaya mengantisipasi keadaan yang lebih buruk. Salah satu senyawa tersebut adalah protein *shock* panas (*heat shock protein*=HSP). Protein *shock* panas merupakan suatu protein yang terbentuk akibat adanya pemicu stres, terutama yang berasal dari peningkatan suhu lingkungan. Semua organisme yang hidup bereaksi terhadap peningkatan suhu. Keadaan ini akan menginduksi pembentukan HSP. Tanggapan ini disebut sebagai respons *shock* panas. Respons ini merupakan mekanisme utama untuk melindungi sel terhadap berbagai pemicu

stres pada organisme tersebut. Respons protein *shock* panas ini diatur oleh transkripsi gen *shock* panas (King *et al.*, 2002; Inouye *et al.*, 2003). Protein *shock* panas bekerja sebagai kaperon, suatu fungsi yang mengatur pelipatan kembali (*refolding*) protein-protein secara benar akibat pemicu stres, sehingga dapat melindungi kerusakan sel akibat perubahan fisiologis, patologis, dan lingkungan yang abnormal (Wang *et al.*, 2003). Protein (HSP70) berfungsi sebagai respons*shock* panas yang paling banyak terlibat terhadap termotoleransi akibat kenaikan suhu lingkungan (King *et al.*, 2002). Menurut Mazzi *et al.* (2003), ayam yang memiliki gen dominan HSP70 dalam merespons panas mempunyai daya tahan yang memadai terhadap cekaman panas.

Beberapa perubahan fisiologis akibat cekaman panas dapat dijadikan indikator pada ayam broiler yang mengalami cekaman panas. Peningkatan kadar kortisol merupakan salah satu indikator cekaman panas pada ayam (Dehnhard *et al.*, 2003; Boonstra, 2005).

Sugito *et al.* (2010) melaporkan pemberian ekstrak kulit batang jalooh secara tunggal atau kombinasi dengan mineral kromium (Cr) dalam air minum dapat mengurangi dampak cekaman panas pada ayam sehingga akan memperbaiki performa ayam broiler. Ditambahkan Sugito *et al.* (2011) bahwa pemberian ekstrak jalooh baik secara tunggal atau kombinasi dengan probiotik dan Cr tidak mempengaruhi profil sel darah. Penelitian ini bertujuan mengetahui pemberian kombinasi ekstrak jalooh mineral Cr terhadap pembentukan HSP-70 dan hormon kortisol dalam serum ayam broiler yang mengalami cekaman panas.

## MATERI DAN METODE

Dalam penelitian ini digunakan 12 ekor ayam broiler betina galur Cobb, umur 20 hari ayam broiler betina jenis pedaging berumur 20 hari. Pakan yang diberikan adalah pakan komersial ayam pedaging jenis *starter* (511). Hasil analisis proksimat menunjukkan bahwa kadar protein kasar adalah 18,8%, lemak kasar 6,9%, serat kasar 4,7%, dan energi bruto 3945,5 kkal/g. Ayam ditempatkan dalam kandang litter berlantai berukuran panjang 150 cm, lebar 100 cm, dan tinggi 70 cm. Kandang berpemanas yang digunakan berukuran panjang 4,5 m, lebar 3,5 m, dan tinggi 3,25 m. Serbuk kulit batang jalooh diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan etanol 70%. Untuk pengentalan dilakukan dengan alat pengup berputar.

Pemberian cekaman panas dilakukan dengan meningkatkan suhu di dalam kandang berpemanas dengan menggunakan alat pemanas (*heater*) yang terbuat dari komponen kawat nikelin berdaya 1000 Watt. Sebagai pengontrol suhu pada *heater* dipasang termoregulator berskala 0 sampai 40° C. Untuk mengukur temperatur dan kelembaban dalam kandang, digunakan termometer dan higrometer digital Corona. Suhu dalam kandang berpemanas dinaikkan secara perlahan-lahan yang dimulai pukul 10.00 WIB dan dipertahankan stabil pada suhu 33±1° C selama lima jam.

### Metode Penelitian

Ayam dibagi atas empat perlakuan, yaitu: Perlakuan I (EC), cekaman panas + dan kombinasi 1.000 mg ekstrak jalooh dengan 1.000 µg kromium per liter air minum, perlakuan II (E), cekaman panas + 1.000 mg ekstrak jalooh per liter air minum, perlakuan III (KD), cekaman panas + 0,0 mg ekstrak jalooh dan 0,0 µg kromium, dan perlakuan IV (KL), tanpa cekaman panas dan 0,0 mg ekstrak jalooh dan 0,0 µg kromium. Masing-masing perlakuan terdiri atas tiga ulangan. Metode pemberian cekaman panas dilakukan dengan meningkatkan suhu dalam kandang pada 33±1° C selama lima jam per hari dalam waktu lima belas hari. Pemberian

kombinasi ekstrak jalooh dan kromium dilakukan dengan cara melarutkannya dalam air minum dan diberikan selama dua jam (pemberian pukul 10.00) sebelum suhu di dalam kandang mencapai 33±1° C. Pengambilan sampel serum dan jaringan organ paru dilakukan pada hari ke-15 pelaksanaan penelitian (ayam umur 36 hari). Pengambilan sampel darah dilakukan sebelum ayam dipotong dan jaringan organ paru diambil setelah ayam dipotong.

### Pewarnaan Imunohistokimia HSP-70

Sampel jaringan paru difiksasi dalam bufer netral formalin 10% dan ditanam (*embedding*) dalam parafin. Ketebalan pemotongan jaringan adalah 6 µl dan potongan ini ditempelkan pada objek gelas dengan neofren. Penghilangan peroksidase endogen dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3% dalam metanol (0,5 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ditambah 50 ml metanol) selama 15 menit. *Blocking* nonspesifik menggunakan serum *rabbit* normal 10% (Nichire Corporation, Histofine) dan diinkubasi pada suhu 37° C selama 60 menit.

Untuk pembukaan epitop pada jaringan dilakukan *retrieval* dengan menggunakan enzim tripsin. Antibodi primer HSP-70 dilarutkan 1:100 dan diinkubasi pada suhu ruangan selama dua jam. Antibodi sekunder (biotinylated anti rabbit immunoglobulin Dako Nichirel Corporation, Histofine Japan) diinkubasi pada suhu 37° C selama 30 menit dan penambahan avidin-biotin-peroxidase complexes (ABC diproduksi Nichirel Corporation, Histofine Japan) diinkubasi pada suhu 37° C selama 30 menit. Visualisasi dilakukan dengan menggunakan 3,3'-diamino-benzidine (DAB) dilarutkan dalam tris-bufer dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mg DAB + 5 ml tris buffer + 5 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) diinkubasikan pada suhu 37° C selama 45 menit. *Counterstain* dilakukan dengan hematoksin dan penutupan preparat (*mounting*) dengan entelan.

Perhitungan jumlah sel yang membentuk warna positif HSP-70 (membentuk warna kecoklat-coklatan) dihitung pada luas pandang 60x45 µm<sup>2</sup> menggunakan mikroskop (*Olympus*) pada pembesaran objektif 100 kali dengan bantuan video mikroskop (*Video measuring gauge IV-560, for Company Limited*) pada 5 lapang pandang per preparat.

### Pengukuran Hormon Kortisol

Pengukuran kadar hormon kortisol dalam serum menggunakan kit kortisol *enzymeimmunoassay* (EIA, DRG Instruments GmbH Germany, nomor katalog EIA-1887). Prosedur kerja dari analisis hormon yang digunakan adalah prinsip kompetitif yaitu kortisol di dalam serum akan berkompetisi dengan kortisol-*konjugat horse raddish peroxidase* (HRP). Pembacaan dilakukan menggunakan *enzymelinkedimmuno-sorbantassay* (ELISA) (Bio-Rad 550) pada panjang gelombang 450 nm.

### Analisis Statistik

Untuk mengetahui adanya pengaruh perlakuan dilakukan uji statistik menggunakan analisis sidik ragam.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### **Heat Shock Protein-70 (HSP-70) pada Jaringan Paru**

Hasil pewarnaan imunohistokimia HSP-70 menunjukkan bahwa pemberian cekaman panas menyebabkan peningkatan ( $P < 0,05$ ) pembentukan HSP-70 dalam jaringan paru seperti yang disajikan pada Gambar 1. Pemberian ekstrak jalo secara tunggal pada rentang dua jam pada ayam yang mengalami cekaman panas dapat menurunkan ( $P < 0,05$ ) pembentukan HSP-70 pada jaringan paru. Namun, pemberian kombinasi ekstrak jalo dengan Cr tidak mempengaruhi pembentukan HSP-70. Peningkatan pembentukan HSP-70 yang paling banyak ditemukan pada ayam yang hanya diberi perlakuan cekaman panas.

Keberadaan HSP-70 pada jaringan paru ayam broiler yang mengalami cekaman panas diduga berhubungan dengan peran menjaga kestabilan protein peka panas pada paru. Wang *et al.* (2003) menjelaskan HSP-70 merupakan jenis senyawa kaperon yang hampir ditemukan pada semua bagian jaringan atau organ tubuh. Peningkatan suhu akan menginduksi ekspresi HSP-70 yang terjadi sebagai fungsi pelindung sel terhadap adanya cekaman panas. Hal ini diperlukan agar tubuh mampu mengontrol efek panas.

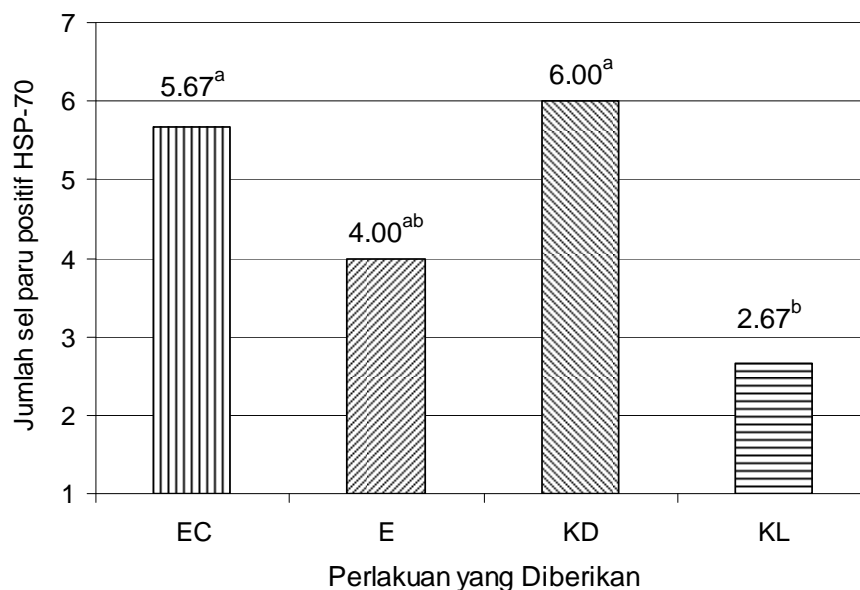
Pada Gambar 1 terlihat bahwa jumlah sel positif HSP-70 dalam jaringan paru menurun ( $P < 0,05$ ) pada ayam yang diberi perlakuan ekstrak jalo. Beberapa senyawa bioaktif dalam ekstrak jalo dapat segera diabsorpsi dan mencapai sel target (sasaran), seperti beberapa jenis asam lemak dan terpenoid yang terkandung di dalamnya. Menurut Sugito *et al.* (2007), hasil analisis dengan menggunakan kromatografi gas massa spektrofotometer (GC-MS) teridentifikasi beberapa senyawa dalam ekstrak kulit batang jalo,

antara lain: beberapa jenis asam lemak, senyawa golongan fitosterol, dan terpenoid. Efek ekstrak etanol kulit batang jalo yang relatif pendek ini menunjukkan bahwa jalur mekanisme kerja ekstrak jalo terhadap penurunan jumlah HSP-70 dapat terjadi secara langsung atau tidak langsung pada sel sasaran dengan menstimulasi pembentukan HSP-70.

Efek langsung ekstrak jalo diduga bekerja melalui aktivasi penghambatan pembentukan transkripsi gen mRNA HSP-70. Menurut Yu *et al.* (2008) pada ayam broiler yang mengalami cekaman panas terjadi peningkatan pembentukan transkripsi gen mRNA HSP-70. Penurunan pembentukan jumlah HSP-70 terjadi bila transkripsi gen mRNA HSP-70 dihambat. Efek tidak langsung ekstrak jalo diduga terjadi melalui jalur sekunder. Senyawa bioaktif ekstrak jalo bekerja dengan mengurangi dampak cekaman panas, seperti meningkatkan pelepasan panas sehingga dampak yang diakibatkan cekaman berkurang. Akibat pengurangan dampak cekaman panas, pembentukan senyawa HSP-70 yang bertanggung jawab terhadap kerusakan protein juga menurun. Sugito (2007) melaporkan pemberian ekstrak heksan tanaman jalo pada ayam yang diberi cekaman panas dapat dapat mengurangi dampak cekaman. Dari hasil pewarnaan imunohistokimia menunjukkan pengurangan dampak tersebut seiring dengan peningkatan jumlah sel yang menghasilkan iNOS pada jaringan paru. Peningkatan jumlah enzim iNOS ini berkaitan dengan peningkatan aktivitas paru dalam bentuk *panting* untuk melepaskan panas tubuh.

### **Kadar Kortisol Serum**

Rata-rata ( $\pm$ SD) kadar kortisol dalam serum (pg/ml) ayam broiler yang diberi kombinasi ekstrak jalo dengan



**Gambar 1.** Rata-rata jumlah sel paru yang secara imunoreaktif positif terhadap HSP-70 dengan metode pewarnaan DAB yang dihitung pada luas pandang  $60 \times 45 \mu\text{m}^2$  (EC=cekaman panas + dan kombinasi 1.000 mg ekstrak jalo dengan 1.000  $\mu\text{g}$  kromium per liter air minum, E=cekaman panas + 1.000 mg ekstrak jalo per liter air minum, KD= cekaman panas + 0,0 mg ekstrak jalo dan 0,0  $\mu\text{g}$  kromium, dan KL= tanpa cekaman panas dan 0,0 mg ekstrak jalo dan 0,0  $\mu\text{g}$  kromium).

Cr pada pukul 10.00 WIB, dua jam sebelum suhu dalam kandang mencapai  $33\pm 1^\circ\text{C}$  disajikan pada Gambar 2. Peningkatan suhu dalam kandang pada  $33\pm 1^\circ\text{C}$  yang dialami ayam selama lima jam sehari dalam masa lima belas hari menyebabkan peningkatan kadar kortisol. Secara statistik tidak terlihat adanya pengaruh pemberian ekstrak jalo secara tunggal (E) atau dikombinasi dengan Cr (EC) terhadap kadar kortisol. Pada kelompok EC menyebabkan penurunan kadar kortisol jika dibandingkan dengan kelompok lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak jalo pada dosis 1000 mg/l air minum yang dikombinasi dengan kromium 1.000  $\mu\text{g/l}$  air minum (perlakuan EC) dapat menekan pembentukan kortisol dalam serum ayam jika dibandingkan dengan pemberian ekstrak jalo tunggal.

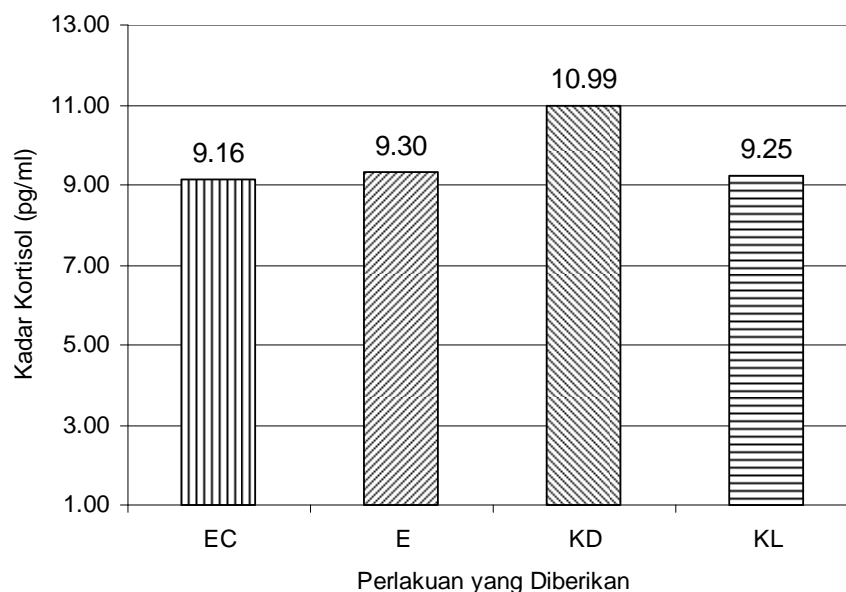
Pada ayam broiler, cekaman panas berpengaruh buruk pada pengaturan sekresi berbagai jenis hormon. Cekaman panas menginduksi suatu seri reaksi kaskade pada sistem saraf dan endokrin sehingga terjadi peningkatan aktivitas jalur hipotalamus-hipofisa-kelenjar adrenal. Keadaan ini menyebabkan peningkatan pelepasan berbagai jenis hormon, seperti *corticotropin releasing hormone* (CRH), *adrenocorticotropic hormone* (ACTH), dan glukokortikoid yang memicu pembentukan dan pelepasan kortisol dalam sirkulasi darah (Hillman *et al.*, 2000; Boonstra, 2005). Pada ayam broiler yang mengalami cekaman panas, terjadi peningkatan kadar glukokortikoid dengan cepat diikuti peningkatan pelepasan kortisol dalam serum (Postet *et al.*, 2003). Pada ayam yang diberi cekaman panas mempunyai kadar kortisol serum yang lebih tinggi dibandingkan dengan tanpa perlakuan cekaman panas. Peningkatan kadar kortisol dalam serum ini menunjukkan ayam dalam

keadaan stres sehingga tubuh merespons pembentukan hormon kortisol (Millsbaugh dan Washburn, 2004; Rettenbacher *et al.*, 2004). Menurut Rettenbacher *et al.* (2004) rendahnya kadar kortisol dalam serum dapat memberikan gambaran bahwa keadaan stres pada hewan yang diukur kortisolnya lebih rendah dibandingkan dengan hewan lainnya.

Tidak terlihatnya perubahan yang nyata pada kadar kortisol dalam serum ayam pada penelitian ini diduga juga terkait dengan waktu pengambilan sampel. Pengambilan sampel dilakukan pada pagi hari antara pukul 09.00-10.30 WIB, setelah lebih kurang dua belas jam dihentikan pemberian cekaman panas, bukan pada saat ayam sedang dalam cekaman panas atau beberapa saat setelah cekaman panas dihentikan. Pada saat pengambilan sampel darah, ayam telah berada relatif lama dalam keadaan tanpa cekaman. Menurut Hillman *et al.* (2000) dan Lin *et al.* (2005) peningkatan kadar kortisol dalam plasma terjadi beberapa jam setelah ayam mengalami cekaman panas. Sugito *et al.* (2007) melaporkan kadar kortisol dalam plasma dan feses ayam yang diberi cekaman masih tetap tinggi meskipun setelah 3 jam suhu dalam kandang telah seperti suhu lingkungan (di bawah  $30^\circ\text{C}$ ).

## KESIMPULAN

Pemberian cekaman panas pada ayam broiler berumur di atas 20 hari pada suhu kandang  $33\pm 1^\circ\text{C}$  selama lima jam per hari dalam jangka waktu lima belas hari menyebabkan peningkatan jumlah HSP-70 dalam jaringan paru dan kadar kortisol dalam serum. Pemberian ekstrak jalo secara tunggal dapat



**Gambar 2.** Rata-rata kadar kortisol dalam serum (pg/ml) ayam broiler yang diberi ekstrak jalo dikombinasi dengan mineral kromium dua jam sebelum suhu dalam kandang mencapai  $33\pm 1^\circ\text{C}$  (EC=cekaman panas + dan kombinasi 1.000 mg ekstrak jalo dengan 1.000  $\mu\text{g}$  kromium per liter air minum, E=cekaman panas + 1.000 mg ekstrak jalo per liter air minum, KD=cekaman panas + 0,0 mg ekstrak jalo dan 0,0  $\mu\text{g}$  kromium, dan KL=tanpa cekaman panas dan 0,0 mg ekstrak jalo dan 0,0  $\mu\text{g}$  kromium).

menurunkan jumlah HSP-70 pada jaringan paru, tetapi pemberian ekstrak jalah secara tunggal maupun kombinasi dengan Cr tidak berpengaruh terhadap kadar kortisol dalam serum.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dapat terselenggara dengan Pembiayaan oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, melalui Hibah Kompetitif Penelitian Sesuai Prioritas Nasional Nomor : 212/SP2H/PP/DP2M/V/2009, tanggal 30 Mei 2009. Untuk itu penulis mengucapkan terima kasih kepada berbagai pihak yang telah banyak membantu pelaksanaan penelitian ini sehingga dapat berjalan dengan baik.

### DAFTAR PUSTAKA

- Boonstra, R. 2005. Coping with changing northern environments: The role of the stress axis in birds and mammals. **Integr. Comp. Biol.** 44:95-108.
- Dehnhard, M., A. Schreer, O. Krone, K. Jewgenow, M. Krause, and R. Grossmann. 2003. Measurement of plasma corticosterone and fecal glucocorticoid metabolites in the chicken (*Gallus domesticus*), the great cormorant (*Phalacrocorax carbo*), and the goshawk (*Accipiter gentilis*). **Gen. Compar. Endocrinol.** 131:345-352.
- Hillman, P.E., N.R. Scot, and A. van Tienhoven. 2000. Physiological, Responses and Adaptations to Hot and Cold Environments. In **Stress Physiology in Livestock**. Yousef, M.K. (Ed.) Vol. 3. CRC Press. Florida
- Inouye S., K. Katsuki, H. Izu, M. Fujimoto, K. Sugahara, S. Yamada, Y. Shinkai, Y. Oka, Y. Katoh, and A. Nakai. 2003. Activation of heat shock genes is not necessary for protection by heat shock transcription factor 1 against cell death due to a single exposure to high temperatures. **Mol. Cell. Biol.** 23(16):5882-5895.
- King Y, C. Lin, J. Lin, and W. Lee. 2002. Whole-body hyperthermia-induced thermotolerance is associated with the induction of Heat Shock Protein 70 in mice. **J. Exp. Biol.** 205:273-278.
- Lin, H., H.F. Zhang, R. Du, X.H. Gu, Z.Y. Zhang, J. Buysse, and E. Decuyper. 2005. Thermoregulation responses of broiler chickens to humidity at different ambient temperatures. II. Four weeks of age. **Poult. Sci.** 84:1173-1178.
- Mazzi, C.M., J.A. Ferro, M.I.T. Ferro, V.J.M. Savino, A.A.D. Coelho, and M. Macari. 2003. Polymorphism analysis of the HSP-70 stress gene in Broiler chickens (*Gallus gallus*) of different breeds. **Gen. Mol. Biol.** 26(3):275-281.
- Millsbaugh, J.J. and B.E. Washburn. 2004. Use of fecal glucocorticoid metabolite measures in conservation biology research: Considerations for application and interpretation. **Gen. Compar. Endocrinol.** 138:189-199.
- Post, J., J.M. Rebel, and A.A.T. Huurne. 2003. Physiological effects of elevated plasma corticosterone concentrations in broiler chickens. An alternative means by which to assess the physiological effects of stress. **Poult. Sci.** 82:1313-1318.
- Rettenbacher, S., E. Most, R. Hackl, K. Ghareeb, and R. Palme. 2004. Measurement of corticosterone metabolites in chicken droppings. **Bri. Poult. Sci.** 45:704-711.
- Sugito, W. Manalu, D.A. Astuti, E. Handharyani, dan Chairul. 2007. Efek cekaman panas dan pemberian ekstrak heksan tanaman jalah (*Salix tetrasperma* Roxb) terhadap kadar kortisol, triiodotironin, dan profil hematologi ayam broiler. **JITV.** 12(3):175-182.
- Sugito, E. Rahmi, Azhari, dan M. Isa. 2010. Pertambahan bobot badan dan waktu pembusukan daging ayam broiler yang diberi ekstrak jalah dikombinasi dengan kromium. **J. Agripet** 10(2):21-26.
- Sugito, Fakhurrizi, dan M. Isa. 2011. Efek pemberian ekstrak jalah dikombinasi dengan probiotik dan kromium terhadap profil hematologi dan titer antibodi vaksin ND pada ayam broiler yang mengalami stres panas. **J. Agripet** 11(2):8-15.
- Toghyani M., S. Zarkesh, M. Shivazad, and A. Gheisari. 2007. Immune responses of broiler chicks fed chromium picolinate in heat stress condition. **J. Poult. Sci.** 44:330-334.
- Yu, J., B. Endong, J. Yan, and L. Lei. 2008. Expression and localization of HSPs in the heart and blood vessel of heat-stressed broilers. **Cell Stress Chap.** 13:327-335.
- Wang S, K.R. Diller, and S.J. Aggarwal. 2003. Kinetics study of endogenous heat shock protein 70 expression. **J. Biomechanic. Engin.** 125:794-797.