

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### A. HASIL

##### 1. Determinasi

Determinasi yaitu suatu cara untuk menetapkan atau memastikan, dimana dalam penelitian ini dilakukan untuk memastikan kebenaran bahan uji yang digunakan. Tanaman yang akan digunakan dalam penelitian harus dipastikan kebenarannya terlebih dahulu, meliputi kebenaran yang berkaitan dengan ciri morfologi secara mikroskopis tanaman daun sirih merah (*Piper crocatum*) terhadap kepustakaan. Tujuan dilakukannya determinasi adalah untuk menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan utama dan kesalahan pada hasil penelitian yang diambil. Determinasi tanaman bahan uji dilakukan dibagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

##### 2. Ekstraksi

Ekstraksi adalah penyarian zat-zat aktif dari bagian tanaman obat, hewan dan beberapa jenis ikan termasuk biota laut. Metode dan jenis pelarut yang digunakan tergantung zat-zat yang terdapat di dalam sel dan ketebalannya (Dirjen POM, 1986). Simplisia yang sudah didapatkan dari 5 kg daun sirih merah segar menjadi 800 gram serbuk kering, kemudian dilakukan ekstraksi untuk mengeluarkan senyawa yang terdapat dalam jaringan. Metode ekstraksi yang dipilih adalah maserasi yaitu proses ekstraksi simplisia menggunakan pelarut. Metode ini dilakukan ketika senyawa yang ingin diambil tidak tahan

terhadap panas serta belum diketahui tahan atau tidaknya terhadap panas. Pelarut yang digunakan adalah etanol 70% yang bersifat polar untuk menarik senyawa yang polar pula. Simplisia direndam dengan pelarut selama 5 hari dalam wadah tertutup. Kemudian dilakukan penyaringan hingga di dapat maserat yang diinginkan. Simplisia yang telah disaring diremaserasi dengan pelarut selama 2 hari.

Maserat yang telah di dapat di evaporasi menggunakan kompor listrik hingga maserat berbentuk kental dan berwarna hitam. Maserat yang di dapat sebanyak 3,8 gram dan selanjutnya diolah menjadi sediaan kapsul dengan penambahan laktosa.

### 3. Kromatografi Lapis Tipis

Uji kromatografi lapis tipis merupakan tahap awal dalam penelitian ini dan merupakan analisis kualitatif untuk mengetahui dan mendapatkan gambaran golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak daun sirih merah. Kelebihan dari uji kromatografi lapis tipis adalah keseragaman, kecepatan dan kepekaannya (Harborne, 1987). Uji ini dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya senyawa yang diduga memiliki khasiat dalam meningkatkan titer antibodi. Pemeriksaan yang dilakukan menggunakan fase diam Silika gel 60F<sub>254</sub> dan fase gerak yang sesuai. Ekstrak dilarutkan dahulu dengan pelarut menggunakan pelarut etanol dan dibuat pada konsentrasi 96%.

#### Profil kromatografi

1. Sampel : Ekstrak etanolik *Piper crocatum*
2. Fase diam : Silika gel 60F<sub>254</sub>

3. Fase gerak : Etil asetat (2) : n-heksan (4)
4. Jarak rambat : 8 cm
5. Pereaksi semprot: Sitoborat dan Vanilin sulfat

**Tabel 1. Hasil pengamatan uji kromatografi lapis tipis**

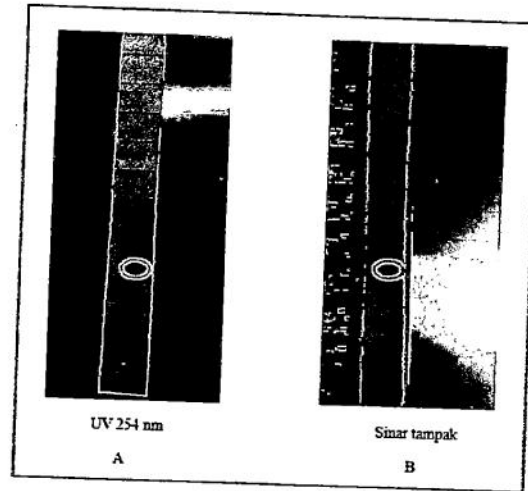
Rf	Deteksi		Keterangan
	UV 254 nm	UV 366 nm	
0,34	Kuning	Kuning meredam	Sitroborat
0,75	Ungu	Ungu meredam	Vanilin sulfat

Pemisahan pada kromatografi lapis tipis dilakukan dengan penotolan sampel sekecil dan sesempit mungkin agar hasil yang diperoleh optimal, karena jika sampel yang digunakan terlalu banyak maka akan menurunkan resolusi (Rohman, 2011). Sampel sebanyak 0,5 µl ditotolkan pada fase diam dengan 3 tempat penotolan dan totolan yang berbeda gunanya untuk melihat efektifitas penotolan dengan bercak yang akan terlihat pada sinar UV 254 dan UV 366. Hasil yang diperoleh akan reproduibel jika volume sampel yang ditotolkan paling sedikit 0,5 µl. Jika volume sampel yang akan ditotolkan lebih besar dari 2-10 µl maka penotolan harus dilakukan secara bertahap dengan dilakukan pengeringan antar totolan (Rohman, 2011).

Fase gerak ditempatkan pada bejana yang tertutup rapat, untuk menghindari penguapan fase gerak yang akan mempengaruhi jalannya pengembangan (elusi). Sebelum digunakan, fase gerak harus dipastikan telah jenuh. Namun, jika fase gerak belum jenuh maka arah rambatan pengembangannya akan miring.

*Piper crocatum* memiliki beberapa kandungan senyawa, diantaranya senyawa golongan flavonoid dan terpenoid. Senyawa yang diduga kuat memiliki aktivitas sebagai imunomodulator adalah flavonoid. Hal ini diperkuat dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa flavonoid mampu meningkatkan titer antibodi. Senyawa flavonoid akan memunculkan warna kuning pada sinar UV maupun sinar tampak.

Flavonoid secara teori akan terdeteksi dengan warna bercak kuning berfluorensi jika dideteksi dengan sinar UV karena memiliki ikatan rangkap terkonjugasi, sehingga dapat menyerap sinar UV dan menimbulkan warna. Setelah itu dilakukan deteksi penyemprotan sitroborat untuk memperjelas bercak yang ditimbulkan dan terbentuklah warna yang dapat dilihat pada sinar tampak. Hal ini terjadi karena adanya reaksi antara flavonoid dengan asam borat yang berasal dari pereaksi sitroborat, sehingga membentuk khelat yang berwarna kuning (Harborne, 1987). Identifikasi ini menghasilkan warna kuning pada sinar tampak setelah penyemprotan, dengan nilai  $R_f$  yaitu 0,34 atau bisa dilihat pada gambar 10.



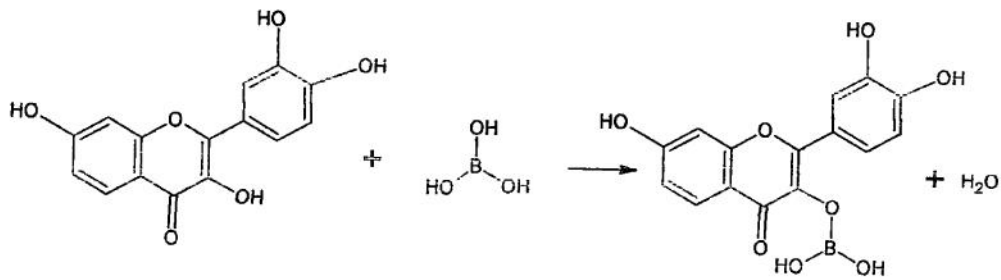
**Gambar 10.** Profil kromatogram identifikasi senyawa flavonoid

Keterangan :

A : Identifikasi flavonoid pada  $\lambda$  254 nm

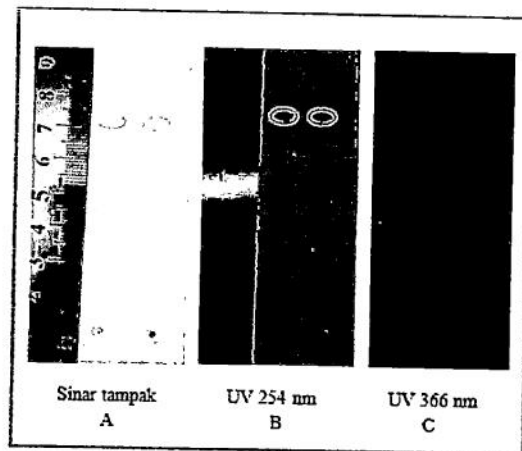
B : Identifikasi flavonoid pada sinar tampak

Flavonoid adalah suatu kelompok senyawa fenol yang terbesar ditemukan di alam. Mempunyai kerangka dasar karbon yang terdiri dari 15 atom karbon, dimana dua cincin benzene ( $C_6$ ) terikat pada suatu rantai propane ( $C_3$ ) sehingga membentuk suatu susunan  $C_6-C_3-C_6$ . Susunan ini dapat menghasilkan tiga jenis struktur, yaitu 1,3-diarilpropan atau neoflavonoid. Senyawa-senyawa flavonoid terdiri dari beberapa jenis tergantung pada tingkat oksidasi dari rantai propane dari sistem 1,3-diarilpropana. Flavonoid merupakan senyawa polar karena memiliki gugus hidroksil yang tidak tersubstitusi (Gafur, 2010).



**Gambar 11.** Reaksi antara flavonoid dengan reagen sitroborat

Deteksi selanjutnya menggunakan reagen vanilin sulfat sebagai penyemprot. Penggunaan reagen ini untuk mendeteksi senyawa terpenoid, karena reaksi yang terjadi dengan vanilin sulfat akan membentuk warna ungu kemerahan (Harborne, 1987). Pada deteksi ini, *Piper crocatum* diduga positif mengandung terpenoid.



**Gambar 12.** Profil kromatogram identifikasi senyawa flavonoid

Keterangan :

- A : identifikasi terpenoid pada sinar tampak
- B : identifikasi terpenoid pada sinar UV 254 nm
- C : identifikasi terpenoid pada sinar UV 366 nm

#### 4. Pengukuran Jumlah Titer Antibodi IgG

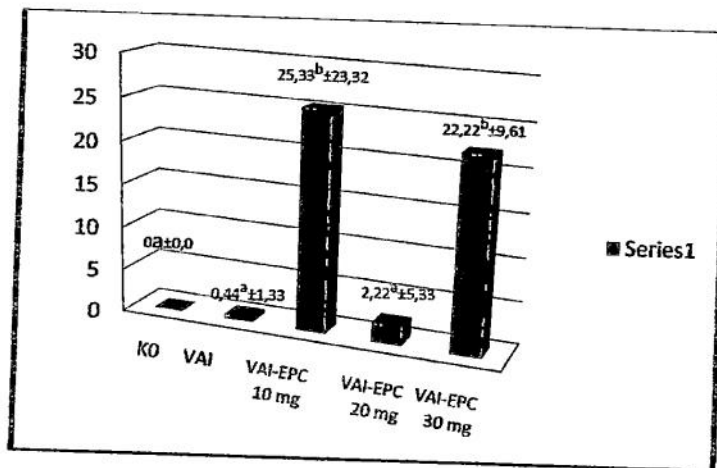
Setelah dilakukan penelitian pengukuran jumlah titer antibodi IgG pada *Cortunix sp.* didapatkan rata – rata hitung pengukuran jumlah titer antibodi IgG pada setiap kelompok. Pemberian kelompok ekstrak *Piper crocatum* meningkatkan hitung titer antibodi IgG *Cortunix sp.* Data jumlah titer antibodi IgG disajikan pada tabel 2.

**Tabel 2. Rata-rata jumlah total titer antibodi IgG dari minggu ke-4 hingga minggu ke-12**

Kelompok	N	Jumlah titer antibodi IgG
Kontrol nol	3	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00
VAI	3	0,44 <sup>a</sup> ± 1,33
VAI-EPC 10 mg/puyuh/hari	3	25,33 <sup>b</sup> ± 23,32
VAI-EPC 20 mg/puyuh/hari	3	2,22 <sup>a</sup> ± 5,33
VAI-EPC 30 mg/puyuh/hari	3	22,22 <sup>b</sup> ± 9,61

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama menandakan nilai tidak berbeda signifikan, sedangkan angka yang berbeda menandakan terdapat perbedaan yang signifikan.

Histogram rata – rata hitung jumlah titer antibodi IgG *Cortunix sp.* pada tiap kelompok perlakuan



**Gambar 13.** Histogram hitung titer antibodi IgG tiap kelompok perlakuan

Keterangan :

Data disajikan dengan 3x replikasi Mean :  $\bar{x} \pm SD$

Angka yang diikuti oleh huruf yang sama menandakan nilai tidak berbeda signifikan, sedangkan angka yang diikuti oleh huruf berbeda menandakan terdapat perbedaan yang signifikan.

Jumlah titer antibodi IgG dapat diketahui setelah dilakukan uji hemaglutinasi inhibisi. Sebelum dilakukan pengolahan data lebih lanjut perlu dilakukan uji normalitas terlebih dahulu. Uji yang digunakan adalah Shapiro-Wilk karena sampel yang digunakan  $\leq 50$ . Data sig. menunjukkan tingkat signifikansi atau nilai probabilitas di bawah 0,05, maka dapat dikatakan distribusi titer antibodi IgG pada masing – masing kelompok tidak terdistribusi normal atau signifikansi yaitu 0,000. Data dapat dikatakan terdistribusi normal jika nilai signifikansi tersebut  $> 0,05$ . Sehingga uji selanjutnya menggunakan uji non-parametrik, yaitu *Kruskal-Wallis Test*.

*Kruskal-Wallis Test* digunakan untuk analisis data yang tidak berpasangan dan lebih dari 2 kelompok serta untuk data yang tidak terdistribusi normal. Data menggambarkan hasil analisis dari setiap kelompok. Didapatkan nilai signifikansi 0,000 yang berarti  $H_1$  diterima, yaitu terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok.  $H_0$  dan  $H_1$  adalah hipotesis dimana  $H_0$  berarti tidak ada perbedaan peningkatan jumlah titer antibodi IgG antar kelompok sedangkan  $H_1$  berarti ada perbedaan peningkatan jumlah titer antibodi IgG antar kelompok perlakuan. Pengambilan keputusan dari analisis ini adalah jika nilai signifikansi yang diperoleh  $> 0,05$  maka  $H_0$  diterima dan jika nilai signifikansi  $< 0,05$  maka  $H_0$  ditolak atau  $H_1$  diterima.

Untuk mengetahui di antara kelima kelompok, mana saja kelompok yang berbeda dan mana saja yang tidak berbeda signifikan akan dibahas pada



analisis *Mann-Whitney Test*. Uji ini merupakan bagian dari statistik non-parametrik yang bertujuan untuk membedakan hasil kinerja kelompok yang terdapat dalam sampel ke dalam 2 kelompok dengan 2 kriteria yang berbeda. *Mann-Whitney Test* digunakan untuk menguji beda dengan menggunakan rata-rata variabel dan jumlah data sampel yang sedikit (kurang 30) atau tidak terdistribusi normal (Sujarweni, 2014).

Data dari total rata-rata jumlah antibodi dari pengukuran pertama hingga ketiga dianalisis menggunakan *Mann-Whitney Test*. Hasil dari *Mann-Whitney Test* dapat dilihat pada (lampiran 4). Dimana nilai signifikansi antara kelompok kontrol nol (tanpa perlakuan) dengan kelompok VAI adalah 0,317 yang berarti  $>0,05$  sehingga  $H_0$  diterima. Sehingga dapat dikatakan bahwa pemberian vaksin belum efektif mampu meningkatkan titer antibodi IgG pada *Cortunix sp.*

Selanjutnya, *Mann-Whitney Test* dilakukan untuk melihat perbedaan peningkatan jumlah titer antibodi IgG pada *Cortunix sp.* yang hanya diberikan vaksin (VAI) dengan *Cortunix sp.* yang diberikan vaksin dan ekstrak etanolik *Piper crocatum* (EPC) apakah berbeda signifikan atau tidak. Pada *Cortunix sp.* yang diberikan vaksin dan ekstrak etanolik *Piper crocatum* dengan dosis 10 mg memberikan nilai signifikansi 0,000 terhadap kelompok VAI. Hal ini menunjukkan bahwa  $H_1$  diterima sehingga pemberian ekstrak etanolik *Piper crocatum* dengan dosis 10 mg efektif meningkatkan jumlah titer antibodi IgG.

Pada perbandingan antara kelompok VAI dengan kelompok perlakuan yang diberikan vaksin dan ekstrak etanolik dengan dosis 20 mg tidak terdapat

perbedaan yang signifikan dalam meningkatkan jumlah titer antibodi IgG pada *Cortunix sp.* Hal tersebut diketahui dari nilai signifikansi antar kelompok yaitu sebesar 0,496 yang berarti  $H_0$  diterima karena  $> 0,05$ .

Kelompok perlakuan yang diberikan vaksin dan ekstrak etanolik *Piper crocatum* dosis 30 mg dibandingkan dengan kelompok VAI juga memberikan nilai signifikansi  $< 0,05$  yaitu 0,000. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanolik *Piper crocatum* dengan dosis 30 mg mampu meningkatkan jumlah titer antibodi IgG pada *Cortunix sp.*

Selain analisis dari total jumlah pengukuran titer antibodi, analisis juga dilakukan pada setiap pengukuran. Dari hasil uji hemaglutinasi pada setiap pengukuran didapatkan data peningkatan jumlah titer antibodi IgG pada *Cortunix sp.* hasil setiap pengukuran dirata-rata, sehingga didapatkan hasil seperti tercantum pada tabel 3. Dari analisis terlihat bahwa pada setiap pengukuran, data yang memiliki perbedaan signifikan terdapat pada kelompok VAI-EPC 10 mg/puyuh/hari dan VAI-EPC 30 mg/puyuh/hari.

**Tabel 3. Hitung rata-rata titer antibodi IgG pada pengukuran minggu ke-4, 8 dan 12**

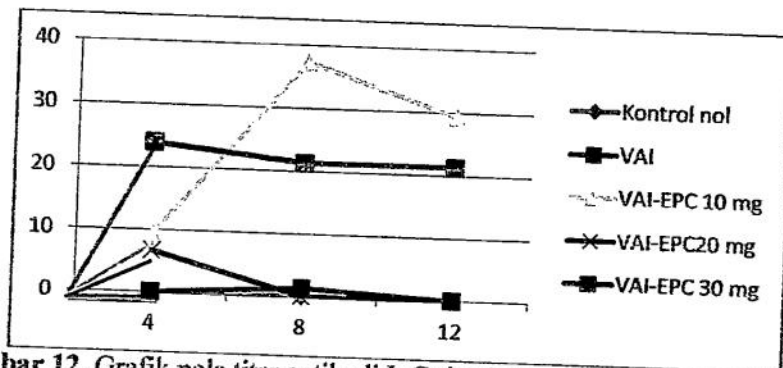
Kelompok	Minggu		
	ke-4	ke-8	ke-12
K0	0 <sup>a</sup> ±0	0 <sup>c</sup> ±0	0 <sup>e</sup> ±0
VAI	0 <sup>a</sup> ±0	1,33 <sup>c</sup> ±2,30	0 <sup>e</sup> ±0
VAI-EPC 10 mg/puyuh/hari	9,33 <sup>b</sup> ±6,11	37,33 <sup>d</sup> ±24,44	29,33 <sup>f</sup> ±30,28
VAI-EPC 20 mg/puyuh/hari	6,66 <sup>a,b</sup> ±8,32	0 <sup>c</sup> ±0	0 <sup>e</sup> ±0
VAI-EPC 30 mg/puyuh/hari	24 <sup>b</sup> ±13,85	21,33 <sup>d</sup> ±9,23	21,33 <sup>f</sup> ±9,23

Keterangan :

Data disajikan dengan 3x pengukuran.

Angka yang diikuti oleh huruf sama pada satu kolom menandakan nilai tidak berbeda signifikan, sedangkan angka yang diikuti oleh huruf berbeda menandakan terdapat perbedaan yang signifikan.

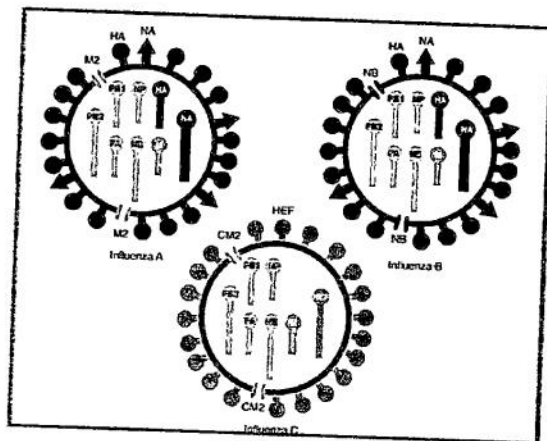
Pola peningkatan jumlah titer antibodi IgG pada *Cortunix sp.* dari minggu ke-4, minggu ke-8 dan minggu ke-12.



**Gambar 12. Grafik pola titer antibodi IgG tiap kelompok perlakuan selama 3x pengukuran pada minggu ke-4, 8 dan 12**

## B. PEMBAHASAN

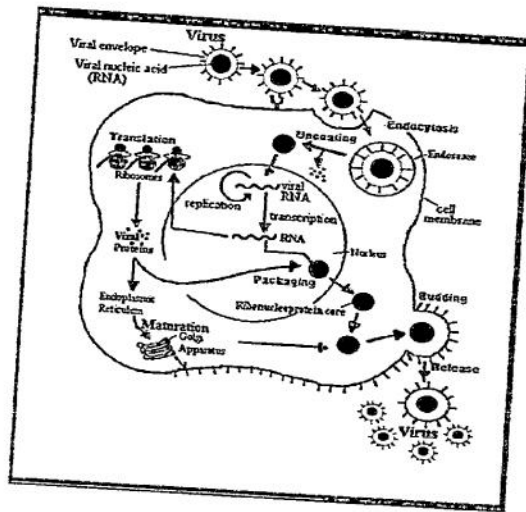
Virus influenza merupakan virus RNA berantai tunggal yang mempunyai envelop 8 segmen dan dibedakan berdasarkan antigen nukleoprotein dan matrix yang menyusunnya. Virus ini diklasifikasikan menjadi tipe A, B dan C. Virus influenza tipe A biasanya menyerang unggas, manusia, babi dan kuda. Sedangkan untuk virus influenza tipe B dan C hanya menyerang manusia. *Avian Influenza* merupakan penyakit yang disebabkan oleh virus influenza tipe A. Virus influenza tipe A yang menginfeksi manusia, babi dan kuda mempunyai protein HIA dan NA yang berbeda. Sedangkan pada burung ditemukan semua sub tipe HA dan NA, sehingga kemungkinan bisa ditemukan 144 kombinasi antigen yang mampu membentuk sub tipe yang berbeda (Halminton, 2007).



Gambar 13. Virus influenza tipe A, B dan C

Virus Avian Influenza dapat menyebabkan penyakit gangguan pernafasan sampai kematian pada berbagai unggas dan mamalia hingga manusia. Induk semang alami dari penyakit ini adalah bebek liar, burung camar dan burung-burung pantai. Flu burung sangat bersifat *zoonosis* yaitu penyakit infeksi yang

dapat ditularkan dari hewan vertebrata ke manusia yang sangat berbahaya. Zoonosis ini dapat terjadi dimungkinkan karena terjadi mutasi. Virus avian influenza bermutasi melalui 2 cara, yaitu *antigenic drift* dan *antigenic shift*. *Antigenic drift* terjadi karena perubahan struktur antigen yang bersifat minor pada antigen permukaan HA atau NA. Pola mekanismenya hanya menyebabkan penambahan atau pengurangan urutan nukleotida antigen HA atau NA atau keduanya tanpa menghasilkan subtipe virus baru. *Antigenic shift* terjadi karena perubahan struktur antigen yang bersifat dominan pada antigen permukaan HA atau NA melalui aktivitas 2 macam subtipe virus AI sehingga mampu menghasilkan virus subtipe baru sebagai hasil rekombinasi genetik (Harder and Werner, 2006). Seperti halnya pada unggas terdapat reseptor asam sialat  $\alpha$ 2,3-galaktosa sedangkan pada manusia terdapat reseptor asam sialat  $\alpha$ 2,6-galaktosa. Sehingga, jika terjadi mutasi protein pengenal reseptor pada virus tersebut dapat menginfeksi manusia. Selain karena keganasan serangan penyakit pada ternak unggas, potensi mutasi yang dimiliki virus tersebut menjadi virus *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) sehingga virus ini bersifat sangat infeksius dan fatal.

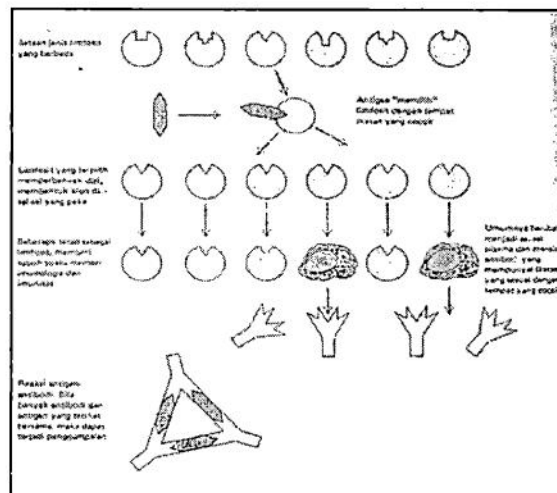


Gambar 16. Proses infeksi virus

Virus yang menginfeksi dapat berkembang biak di dalam sel yang terinfeksi sehingga dapat menimbulkan kerusakan sel dan penyakit melalui berbagai mekanisme. Oleh karena itu sistem imun diperlukan tubuh dalam mempertahankan keutuhannya terhadap bahaya yang dapat ditimbulkan. Virus yang melepaskan diri dari sel akan membentuk envelop, antigen envelop tersebut dapat dijadikan sasaran antibodi untuk mencegah infeksi penjamu. Respon imun terhadap protein virus melibatkan sel T dan sel B (Bratawidjaya, 2012). Antibodi dapat berperan sebagai opsonin yang meningkatkan eliminasi partikel virus oleh fagosit.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya peningkatan jumlah titer antibodi IgG, dimana imunoglobulin ini termasuk dalam sistem imun spesifik humoral yang dihasilkan dari sel B. Sel B berasal dari sel multipoten disussum tulang. Pada manusia sel ini berdiferensiasi pada sussum tulang, namun pada unggas pematangan *Bursal cell* atau sel B terjadi di dalam *Bursa Fabricus* yang terletak dekat kloaka. Sel B yang dirangsang oleh benda asing

akan berproliferasi, berdiferensiasi dan berkembang menjadi sel plasma yang memproduksi antibodi. Sel B yang dirangsang pertama kali akan menghasilkan IgM dan rangsangan ulang antigen yang sama akan mengalihkan sel B untuk memproduksi IgG atau IgA atau IgE (Bratawidjaya, 2012). Aktivitas yang ditimbulkan dari antibodi IgG inilah yang dapat menghambat ikatan virus dengan pada sel penjamu, sehingga mencegah infeksi atau reinfeksi. Selain itu, IgG juga dapat menghambat fusi envelop virus dengan membran plasma sel penjamu dan memacu fagositosis.



**Gambar 17.** Aktifitas sel B dalam reaksi antigen-antibodi

Selain sistem imun alami yang sudah ada di dalam tubuh, diperlukan juga antigen untuk mempertahankan kekebalan tubuh tersebut. Untuk dapat memberikan perlindungan penyakit AI pada unggas, dibutuhkan vaksin yang dapat menimbulkan antibodi sehingga mampu menetralkan protein hemaglutinin neuraminidase virus penyebab penyakit (Sudarisman, 2006). Vaksin homolog inaktif pada umumnya digunakan untuk mengendalikan wabah AI di Indonesia pada tahun awal ditemukannya virus ini. Vaksin homolog ini mengandung virus

mati dengan tipe H5N1, yaitu tipe yang sama dengan penyebab wabah AI di Indonesia. Bibit virus ini berasal dari isolat lokal virus penyebab wabah AI di Indonesia.

Dari hasil pengamatan dilaboratorium dan lapangan, ternyata vaksin AI yang baik harus memenuhi beberapa persyaratan yaitu dapat melindungi terhadap timbulnya gejala klinis dan kematian, mengurangi *shedding* virus lapangan jika unggas yang divaksin terserang AI, dapat mencegah penularan kontak dengan virus lapangan, memberikan paling sedikit 20 minggu proteksi sesudah vaksinasi tunggal atau dengan ulangan, melindungi terhadap tantangan dosis rendah sampai tinggi dari virus lapangan, melindungi terhadap adanya perubahan pada virus lapangan dan meningkatkan daya tahan terhadap infeksi virus influenza (Swayne, 2005).

Apabila titer antibodi ayam menunjukkan positif meningkat mencapai  $2^4$  atau lebih, ayam tersebut dinyatakan sebagai ayam yang memiliki kekebalan yang protektif terhadap serangan Avian Influenza. Sedangkan ayam yang memiliki titer antibodi kurang dari  $2^4$  tidak memiliki kekebalan yang protektif.

Vaksin yang digunakan dalam penelitian ini adalah subtipe H5N1 inaktif dengan merk dagang Medivac<sup>®</sup>. Vaksin ini mengandung virus AI subtipe H5N1 inaktif yang diemulsikan ke dalam adjuvan minyak mineral untuk meningkatkan dan memperpanjang daya kerja vaksin. Pemberian dosis tiap ekornya minimal mengandung potensi virus AI 50 PD<sub>50</sub>. Vaksin ini mengandung isolat lokal sehingga memiliki keunggulan seperti optimal melindungi unggas dari serangan virus AI H5N1, kualitas terjamin dan partikel adjuvant vaksin halus dan homogen.



Burung puyuh yang digunakan pada penelitian ini hendaknya belum pernah mendapat vaksinasi sebelumnya. Baik vaksin AI maupun yang lainnya sehingga dapat diasumsikan bahwa burung puyuh tersebut tidak memiliki titer antibodi terhadap virus AI dan belum pernah pula terpapar virus AI. Namun pemberian vaksin tidak lantas dapat meningkatkan antibodi secara signifikan sehingga diperlukan penambahan adjuvan sebagai agen imunostimulator yang dapat membantu meningkatkan titer antibodi.

Dewasa ini ilmu pengetahuan semakin berkembang, salah satunya dibidang pengobatan. Seperti dalam bidang farmakologi yang masih dalam tingkat eksplorasi dan perdebatan adalah imunomodulator (*immunomodulating agents*), dimana yang menjadi penekanan adalah pengembangan bahan- bahan yang dapat meningkatkan respon imun. Cara kerja bahan- bahan yang dapat berfungsi sebagai imunomodulator adalah dengan mengembalikan fungsi sistem imun yang terganggu (imunorestorasi), memperbaiki fungsi sistem imun (imunostimulasi) dan menekan respon imun (imunosupresi).

Senyawa-senyawa yang dapat meningkatkan sistem imun tersebut dapat diperoleh dari tumbuhan. Mengingat Indonesia adalah negara yang beriklim tropis sehingga memiliki aneka ragam tumbuhan, yang mana sebagian dapat digunakan sebagai obat tradisional. Tumbuhan obat tradisional tersebut dapat mempengaruhi mekanisme pertahanan tubuh atau sistem imun tubuh yang meliputi sistem imun spesifik dan non-spesifik. Seperti pada penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa tanaman meniran (*Phyllanthus niruri L.*) yang mengandung flavonoid memiliki kemampuan dalam memperbaiki sistem imun. Penelitian mengenai

fungsi imunitas seluler yang dilakukan secara *in vivo* pada mencit membuktikan bahwa senyawa flavonoid dapat memacu proliferasi limfosit, meningkatkan jumlah sel T dan meningkatkan aktivitas IL-2. Flavonoid berpotensi bekerja terhadap limfokin yang dihasilkan oleh sel T sehingga akan merangsang sel-sel fagosit untuk melakukan respon fagositosis.

Pada penelitian ini agen imunostimulator yang digunakan adalah daun sirih merah (*Piper crocatum*). Menurut penelitian sebelumnya *Piper crocatum* memiliki kandungan seperti flavonoid, alkaloid, tanin dan minyak atsiri. Setelah dilakukan uji kromatografi lapis tipis (KLT), *Piper crocatum* positif mengandung flavonoid dan terpenoid. Sehingga diharapkan pemberian ekstrak etanolik *Piper crocatum* dengan flavonoid yang terkandung didalamnya memiliki aktivitas sebagai imunostimulator seperti pada penelitian terdahulu. sehingga diharapkan dengan ini mampu meningkatkan jumlah titer antibodi.

Unggas mempunyai kelenjar hadrian di daerah nasotrakheal dan *Bursa Fabricius* yang memungkinkan unggas sangat responsif terhadap berbagai protein asing, selain itu di bursa fabricus juga tempat memproduksi sel B. Setiap antigen yang masuk melalui jalan selain intravena akan bermuara pada kelenjar getah bening (Bratawijaya, 2012). Vaksinasi virus AI subtipe H5N1 pada penelitian ini menggunakan injeksi intramuscular, sehingga asumsinya antigen akan menuju kelenjar getah bening . Pemberian vaksin diikuti dengan pemberian ekstrak etanolik daun sirih merah. Titer antibodi diukur pada minggu ke 4 setelah vaksinasi mengacu kepada SOP Direktorat Jenderal Peternakan Departemen

Pertanian yang menyebutkan bahwa keberhasilan vaksinasi dapat diketahui dengan memeriksa adanya antibodi setelah 3 sampai 4 minggu setelah vaksinasi.

Pengukuran titer antibodi IgG dilakukan pada sampel burung puyuh (*Cortunix sp.*) sebanyak 15 ekor yang terbagi dalam 5 kelompok perlakuan. Pada penelitian ini segala variabel harus dapat dikendalikan agar hasil riset yang di dapat tidak bias. Variabel yang dimaksud seperti strain, umur, keadaan lingkungan dan pakan dikondisikan dalam keadaan yang sama.

Uji hambatan aglutinasi sel darah merah (*Haemagglutination Inhibitor*) antibodi AI yang dikenal dengan uji HI-AI adalah uji serologis kuantitatif untuk mengukur titer antibodi terhadap virus A.I tipe A subtipe H5. Prinsip dari uji ini adalah aglutinasi sel darah unggas oleh virus/ antigen A.I dapat dihambat oleh antibodi/ zat kebal spesifik terhadap virus A.I. Titer HI pada pengenceran serum tertinggi menyebabkan penghambatan sempurna dari antigen 4 HAU, adanya aglutinasi dilihat dengan memiringkan *plate*. Hanya sumuran yang memiliki aliran sel darah merah yang sama dengan sumuran kontrol yang memperlihatkan hambatan.

Validasi hasil dinilai terhadap serum kontrol negatif yang tidak memberikan titer  $> 2^2$  dimana dinyatakan berbanding terbalik dan titer serum kontrol positif berada dalam satu pengenceran dari titer yang diketahui. Titer HI dianggap positif jika ada inhibisi pada pengenceran serum  $2^4$  atau lebih dari 4 HAU antigen. Uji dinyatakan valid/ berlaku jika sel darah merah unggas pada sumuran 12 setelah masa inkubasi mengendap dengan sempurna dan hasil uji serum kontrol positif dan negatif baik (ada hambatan aglutinasi sel darah merah pada serum kontrol dan

tidak ada hambatan aglutinasi sel darah merah pada serum kontrol negatif). Jika pada sumuran (kecuali sumuran 12) terjadi aliran sel darah merah maka dinyatakan pada sumuran tersebut terjadi hambatan aglutinasi sel darah merah, artinya pada sumuran tersebut terdapat antibodi terhadap virus A.I sub tipe H5 (uji HI positif). Sebaliknya, jika pada sumuran tidak terjadi aliran sel darah merah berarti pada sumuran tersebut tidak terjadi hambatan aglutinasi sel darah merah karena pada sumuran tersebut tidak terjadi antibodi spesifik terhadap virus A.I sub tipe H5 (uji HI negatif) (OIE, 2000).

Pada penelitian terdahulu, aktivitas imunomodulator *Piper crocatum* secara in vivo menunjukkan bahwa ekstrak etanol maupun n-heksana mampu meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag akan tetapi tidak berpengaruh terhadap proliferasi limfosit (Apriyanto, 2011; Indriyani, 2011; Ardianto, 2013). Secara in vitro, senyawa hasil isolasi dari ekstrak etanol *Piper crocatum* pada dosis 5 µg/ml dapat meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag. Terdapat dua isolat yang diidentifikasi sebagai neolignan mempunyai struktur kimia yang mirip, isolat pertama mempunyai gugus asetil dan isolat kedua memiliki gugus hidroksil (Kustiawan, 2012). Uji titer imunoglobulin G (IgG) dari ekstrak n-heksana *Piper crocatum* pada tikus yang diinduksi vaksin hepatitis B menunjukkan adanya efek immunosupresan pada dosis 10 mg/kgBB, tetapi pada dosis 100 mg/kgBB menunjukkan efek immunostimulan (Wahyudi, 2010) dan ekstrak etanol *Piper crocatum* pada dosis 10, 100, 300 mg/kgBB tidak berpengaruh terhadap titer IgG (Wiweko, 2010).

Variasi hasil penelitian ini dengan penelitian sebelumnya mungkin karena terdapat faktor pengganggu yang diketahui maupun yang tidak diketahui peneliti, belum optimalnya dosis yang diberikan, sediaan masih berbentuk ekstrak maka efeknya lemah sehingga perlu diisolasi untuk mendapatkan senyawa yang dapat digunakan sebagai agen imunostimulator. Selain itu, juga bisa disebabkan karena perbedaan hewan uji yang digunakan. Seperti penelitian yang telah dilakukan oleh Nugraha (2010), menyimpulkan bahwa ekstrak etanol *Piper crocatum* menyebabkan perubahan patologis pada organ hati dan ginjal ayam yakni berupa kongesti, degenerasi dan nekrosis meskipun mampu menghambat kematian hewan yang diuji dengan virus *Avian Influenza* H5N1. Hal tersebut berbeda dengan efek pada hati dan ginjal tikus yang diinduksi vaksin hepatitis B, pada dosis 300 mg/kgBB ekstrak n-heksan maupun ekstrak etanol *Piper crocatum* tidak menyebabkan kerusakan pada kedua organ tersebut (Wahyudi, 2010; Wiweko, 2010).

Hewan uji yang sudah dikelompokkan menjadi kontrol nol, VAI, VAI-EPC 10 mg, VAI-EPC 20 mg dan VAI-EPC 30 mg memberikan perbedaan jumlah titer antibodi IgG pada *Cortunix sp.* kontrol nol sebagai kontrol hewan uji yang tidak diberi perlakuan. VAI hanya diinduksi vaksin H5N1 sebagai kontrol yang akan dibandingkan dengan hewan yang diberi perlakuan. Pemberian perlakuan disini adalah hewan uji yang diinduksi vaksin H5N1 dan diberikan ekstrak etanolik *Piper crocatum*. Variasi dosis yang digunakan adalah 10 mg, 20 mg dan 30 mg.

Hasil analisis statistik menunjukkan jumlah pengukuran titer antibodi IgG pada *Cortunix sp.* setelah pemberian ekstrak etanolik *Piper crocatum*.

Keberhasilan pemberian vaksin dapat diketahui dari kontrol nol dan VAI. Pada penelitian ini vaksin belum mampu meningkatkan jumlah titer antibodi IgG secara signifikan. Hewan uji yang diberi perlakuan dengan dosis 10 mg dan 30 mg mampu meningkatkan jumlah titer antibodi IgG secara signifikan. Namun, pada dosis 20 mg belum mampu meningkatkan jumlah titer antibodi IgG. Ekstrak etanolik *Piper crocatum* dosis 10 mg adalah dosis optimal untuk meningkatkan jumlah titer antibodi IgG.

Perlakuan hewan uji dilakukan selama 12 minggu. Minggu ke-8 adalah puncak dari peningkatan jumlah titer antibodi IgG. Faktor yang mungkin menyebabkan penurunan jumlah titer antibodi pada pengukuran minggu ke-12 adalah penurunan kondisi hewan uji, terganggunya variabel bebas dan faktor - faktor lain yang belum diketahui.