

BAB III

METODE PENELITIAN

A. DESAIN PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan rancangan *repeated treatment design*.

B. TEMPAT DAN WAKTU

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penelitian Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, Laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada dan Balai Besar Veteriner, Wates, Yogyakarta. Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Mei 2014 hingga Januari 2015.

C. POPULASI DAN SAMPEL

Subjek penelitian ini berupa 15 ekor burung puyuh (*Cortunix sp.*). Dalam penelitian ini subjek dibagi menjadi 5 kelompok. Tiap kelompok terdiri dari 3 ulangan secara individual.

1. K0 : burung puyuh tanpa diinduksi vaksin AI H5N1, tanpa ekstrak ekstrak etanolik *Piper crocatum* sebagai kontrol nol (0).
2. VAI : burung puyuh diinduksi vaksin AI H5N1, tanpa ekstrak etanolik *Piper crocatum*.
3. VAI-EPC 10 mg/puyuh/hari : burung puyuh diinduksi vaksin AI H5N1, diberi ekstrak etanolik *Piper crocatum* dosis 10 mg/puyuh/hari.
4. VAI-EPC 20 mg/puyuh/hari : burung puyuh diinduksi vaksin AI H5N1, diberi ekstrak etanolik *Piper crocatum* dosis 20 mg/puyuh/hari.

5. VAI-EPC 30 mg/puyuh/hari : burung puyuh diinduksi vaksin AI H5N1, diberi ekstrak etanolik *Piper crocatum* dosis 30 mg/puyuh/hari.

D. KRITERIA INKLUSI DAN EKSKLUSI

1. Kriteria inklusi
 - a. Kondisi fisik burung puyuh sehat tidak terkena penyakit.
 - b. Berat burung puyuh normal \pm 145gr.
 - c. Umur burung puyuh dewasa (16 minggu).
 - d. Daun sirih merah dewasa (> 4 minggu).
2. Kriteria eksklusi
 - a. Burung puyuh dalam keadaan cacat.
 - b. Burung puyuh mati pada saat penelitian.
 - c. Daun sirih merah berjamur dan busuk.
 - d. Daun sirih merah tidak dalam satu perkebunan yang sama.

E. VARIABEL PENELITIAN

1. Variabel Bebas

Dosis ekstrak etanolik daun sirih merah.
2. Variabel Perancu
 - a. Dapat dikendalikan : jenis kelamin, umur, berat badan, kondisi fisik burung puyuh dan jenis pakan.
 - b. Tidak dapat dikendalikan : variasi kepekaan burung puyuh terhadap suatu zat.
3. Variabel Tergantung

Hasil pengukuran jumlah titer antibodi IgG burung puyuh.

F. DEFINISI OPERASIONAL

1. Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*)

Daun sirih merah (*Piper crocatum*) diekstraksi menggunakan cairan penyari etanol 70%. Ekstraksi *Piper crocatum* ini akan melarutkan senyawa bioaktif. Metode yang digunakan dalam ekstraksi ini adalah maserasi, ekstrak dibuat di Laboratorium Penelitian Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UMY.

Pemberian ekstrak *Piper crocatum* melalui peroral yang sebelumnya telah digranulasi menggunakan laktosa dan dimasukkan ke dalam cangkang kapsul. Penentuan dosis efektif pada *Cortunix cortunix* antara 10 mg/puyuh/hari hingga 30 mg/puyuh/hari.

2. Analisis Kualitatif Kromatografi Lapis Tipis

Penentuan senyawa yang terkandung di dalam *Piper crocatum* dengan fraksinasi menggunakan etanol 96% melalui lempeng KLT Silika Gel GF254. Fase gerak yang digunakan yaitu etil asetat dan n-heksan (2:4). Pengamatan dilakukan dibawah sinar UV 254 nm dan 366 nm. Analisis dilakukan dengan melihat bercak, perubahan warna dan menghitung harga Rf-nya. Semakin banyak bercak menandakan bahwa komponen senyawa yang terkandung juga semakin banyak. Kemudian warna bercak dan Rf dibandingkan dengan pustaka.

3. Peningkatan Jumlah Titer Antibodi IgG

Darah burung puyuh (*Cortunix sp.*) yang sudah diambil melalui sayap dimasukkan ke dalam *ependorf tube* diukur peningkatan titer

antibodi IgG dengan uji *haemagglutination inhibition* dengan prinsip aglutinasi sel darah ayam oleh virus/ antigen AI dapat dihambat oleh antibodi atau zat kebal spesifik terhadap virus AI. Titer HI dianggap positif jika ada inhibisi pada pengenceran serum 1/16 (2^4 atau $\log_2 4$ dimana dinyatakan berbanding terbalik (OIE, 2000).

4. Analisis Data

Analisis statistik dilakukan untuk mengetahui lebih lanjut peningkatan titer antibodi IgG pada *Cortunix sp.* Pemilihan metode statistik tergantung dari normalitas persebaran data terlebih dahulu agar dapat dilakukan pemilihan analisis data yang sesuai. Jika data sudah memenuhi uji normalitas dan terbukti positif maka selanjutnya bisa menggunakan analisis parametrik. Namun, jika hasilnya tidak sesuai maka menggunakan analisis non-parametrik.

G. ALAT DAN BAHAN

1. Alat

Pada penelitian ini alat-alat yang digunakan adalah *Becker glass* 100 ml, bejana, *blue tip* dan *yellow tip*, cawan porselen, gelas ukur, gunting steril, mikrodiluter 25 μm , mikropipet *multichanel* ukuran 25 μm , mikropipet *single chanel* ukuran 25 μm , mikroplate 96 sumuran, mikrotip, mortir dan stamper, neraca elektrik (Shimada[®]), oven, pipet, plat silica gel 60F₂₅₄, seperangkat alat ekstraksi, seperangkat alat pemeliharaan burung puyuh, sinar UV 254 nm dan 366 nm, spuit injeksi, tabung reaksi, tempat pereaksi.

2. Bahan

a. Preparasi ekstrak

Daun sirih merah (*Piper crocatum*) yang siap dipanen diambil dari Bantul, Yogyakarta. Etanol 70 %, laktosa, kapsul ukuran 03 (Brataco®).

b. Hewan uji

Burung puyuh (*Coturnix sp*) berumur 16 minggu, berstrain cortunix dengan berat \pm 145 gr yang berasal dari perusahaan peternakan. Pakan puyuh BR AD2® dengan kandungan PK 15,57%, ME 2.850,25 kcal/kg, Ca 3,27% dan P 1,08%. Vaksin AI H5N1 (Medivac®) produk dari PT. Medion.

c. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Menggunakan fase gerak n-heksan dan etil asetat (4:2) dan fase diam menggunakan lempeng silika 60 F₂₅₄, penyemprot vanilin sulfat dan sitroborat.

d. *Haemagglutination Inhibittion*

Suspensi virus standar (4HAU), kontrol serum positif dan negatif, suspensi sel darah merah 1%, *phospat buffer saline solution* (PBS).

H. PROSEDUR KERJA DAN ALUR PENELITIAN

1. Pengeringan dan Pembuatan Serbuk

Daun sirih merah pada bulan Mei 2014 diambil di daerah Bantul, Yogyakarta. Selanjutnya dibersihkan dari bahan-bahan pengotor dengan menggunakan air. Daun yang telah dibersihkan tersebut lalu dikeringkan

di bawah matahari dengan dilapisi kain hitam selama pagi sampai sore hari, kemudian dilanjutkan dalam oven pada suhu 50°C hingga kering. Simplisia daun sirih merah yang telah kering kemudian diserbuk menggunakan blender.

2. Pembuatan Ekstrak Etanolik Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*)

Pembuatan ekstraksi daun sirih merah menggunakan metode maserasi, yaitu proses ekstraksi simplisia menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengadukan dengan temperatur ruang. Penggunaan pelarut menggunakan perbandingan 5:1.

Serbuk simplisia dimaserasi dengan etanol 70%, dibiarkan pada suhu kamar ($28^{\circ}\text{-}32^{\circ}\text{C}$) selama 5 hari ditempat yang terlindung dari cahaya dan sering diaduk, kemudian dipisahkan, ampas dimaserasi kembali dengan pelarut etanol 70% dan dilakukan dengan cara yang sama seperti di atas sampai diperoleh maserat jernih. Semua maserat diuapkan dengan bantuan alat kompor listrik sampai diperoleh ekstrak etanol kental, kemudian ekstrak dikeringkan di freeze dryer (-40°C). Ekstrak kental yang didapat diolah menjadi sediaan kapsul dengan penambahan laktosa sebanyak 2,2 kali bobot ekstrak etanolik *Piper crocatum*.

3. Kromatografi Lapis Tipis

Ekstrak kental yang diperoleh dari ekstraksi ditambahkan dengan etanol 96%. Kemudian gunakan pipet kapiler untuk mengambil bagian ekstrak untuk ditotolkan pada plat KLT. Kemudian dielusi dengan campuran fase gerak n-heksan: EtOAc (4:2). Fase diam yang digunakan

lempeng silika gel 60F2₅₄. Bercak yang terbentuk diamati dengan sinar tampak, lampu UV 254 nm dan UV 366 nm kemudian disemprot dengan reagen. Senyawa akan berwarna tergantung jenis senyawa setelah disemprot dengan masing-masing reagen ketika dipanaskan.

4. Pengelompokan dan Perlakuan pada Hewan Uji

Cortunix sp. yang digunakan sebanyak 15 ekor dalam kandang dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan. Tiap kelompok terdiri dari 3 ulangan secara individual.

- a. K0 : burung puyuh tanpa diinduksi vaksin AI H5N1, tanpa ekstrak ekstrak etanolik *Piper crocatum* sebagai kontrol nol (0).
- b. VAI : burung puyuh diinduksi vaksin AI H5N1 dan tanpa ekstrak etanolik *Piper crocatum*.
- c. VAI-EPC 10 mg/puyuh/hari : burung puyuh diinduksi vaksin AI H5N1, diberi ekstrak etanolik *Piper crocatum* dosis 10 mg/puyuh/hari.
- d. VAI-EPC 20 mg/puyuh/hari : burung puyuh diinduksi vaksin AI H5N1, diberi ekstrak etanolik *Piper crocatum* dosis 20 mg/puyuh/hari.
- e. VAI-EPC 30 mg/puyuh/hari : burung puyuh diinduksi vaksin AI H5N1, diberi ekstrak etanolik *Piper crocatum* dosis 30 mg/puyuh/hari.

Burung puyuh diberi pakan BR AD2[®] tanpa antibiotik dengan kandungan PK 15,57%, ME 2.850,25 kcal/kg, Ca 3,27% dan P 1,08 serta

diberi minum. Setelah pengkondisian dilakukan vaksinasi menggunakan vaksin AI H5N1 (0,2 ml/puyuh) secara intramuskular sebanyak 3 kali dalam jarak interval. Kapsul ekstrak etanolik *Piper crocatum* diberikan 1 kapsul setiap hari selama 12 minggu pada kelompok VAI-EPC 10mg/puyuh/hari, VAI-EPC 20mg/puyuh/hari, VAI-EPC 30mg/puyuh/hari.

5. Pengambilan Sampel

Pada penelitian ini perlakuan dilakukan selama 12 minggu, dengan pengukuran jumlah titer antibodi pada minggu ke-4, minggu ke-8, dan minggu ke-12. Menurut SOP (*Standard Operational Procedure*) untuk pengendalian penyakit AI yang diterbitkan oleh Direktorat Jenderal Peternakan Departemen Pertanian, yang menyatakan bahwa keberhasilan vaksinasi dapat diketahui dengan memeriksa adanya antibodi setelah 3 sampai 4 minggu setelah vaksinasi. Perulangan vaksinasi dilakukan setiap 3 hingga 4 bulan agar level antibodi tetap tinggi. Namun, pada penelitian ini perulangan vaksinasi dilakukan setiap 4 minggu berbeda dengan SOP tersebut. Hal ini dimaksudkan agar vaksinasi dapat lebih optimal memberikan perlindungan terhadap virus AI. Setiap kelompok perlakuan diambil darahnya pada minggu ke-4, minggu ke-8, dan minggu ke-12, untuk diambil serumnya dan dilakukan uji *haemagglutination inhibition*.

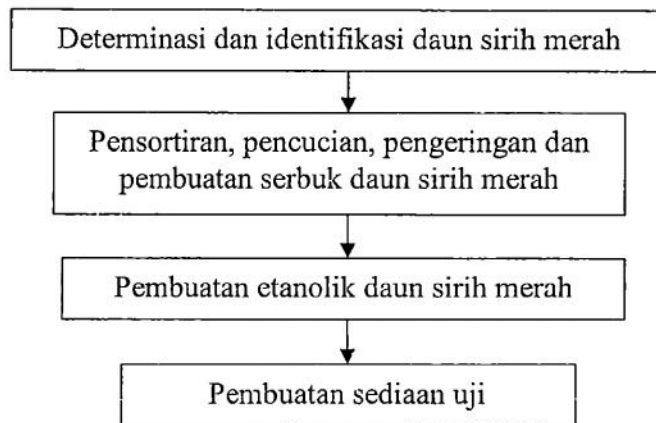
6. Pengukuran Jumlah Titer IgG dengan *Haemagglutination Inhibition*

Terdapat 12 sumur *microplate U bottom*, masing-masing diisi dengan 0,025 ml PBS, kemudian pada sumur 1 ditambahkan 0,025 ml

serum yang akan diuji dan dihomogenkan. Encerkan kelipatan dua dari 0,025 ml serum pada sumuran 2 hingga 11. Setelah itu suspensi virus standar (4HAU) ditambahkan sebanyak 0,025 ml pada setiap sumuran. Sumur ke-12 hanya diisi dengan 0,025 ml PBS dan 0,025 ml sel darah merah. *Microplate* di goyang-goyang dan diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. Setelah itu sebanyak 0,025 ml suspensi sel darah merah 1% ditambahkan ke dalam semua sumur. *Microplate* digoyang-goyang dan diinkubasi lagi selama 30 menit. Hasil dibaca setelah masa inkubasi tersebut (OIE, 2000).

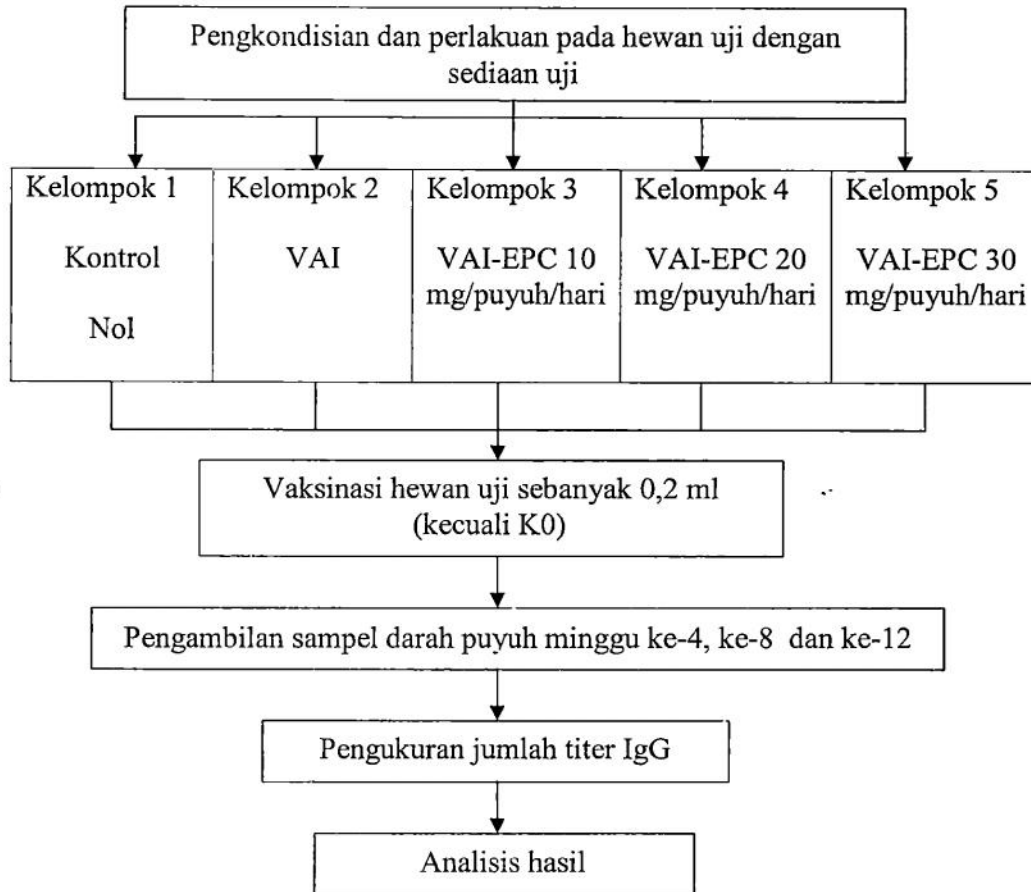
I. LANGKAH KERJA

1. Preparasi Ekstrak

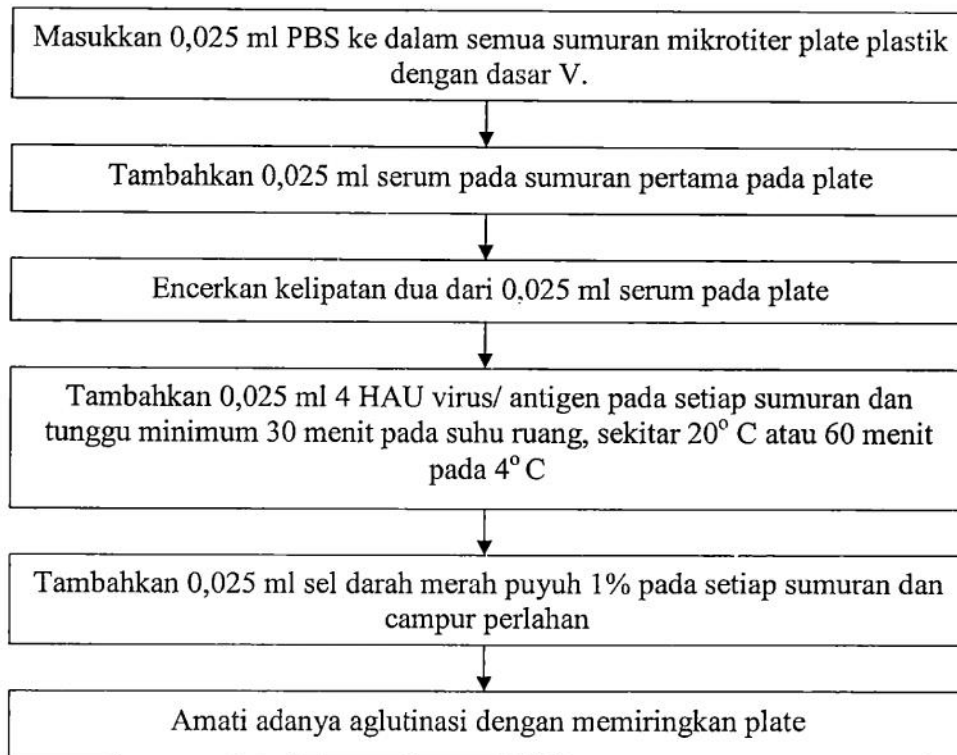


Gambar 7. Skema preparasi ekstrak etanolik *Piper crocatum*

2. Perlakuan Terhadap Hewan Uji

**Gambar 8.** Skema perlakuan hewan uji

3. *Haemagglutination Inhibittion*



Gambar 9. Skema *Haemagglutination Inhibittion*

J. ANALISIS STATISTIK

Data yang diperoleh dianalisis secara statistik menggunakan analisis non-parametrik yaitu Uji Mann-Whitney untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanolik 70% daun sirih merah antara kelompok perlakuan dengan kelompok VAI dan antara kelompok perlakuan itu sendiri. Sebelum melakukan Uji Mann-Whitney dilakukan uji normalitas terlebih dahulu menggunakan Uji Normalitas dengan Shapiro-Wilk karena sampel yang digunakan < 50 sampel.