

**UJI AKTIVITAS IMUNOSTIMULATOR FRAKSI ETIL ASETAT
EKSTRAK TEMU KUNCI (*Boesenbergia pandurata* Roxb) TERHADAP
LEUKOSIT, LIMFOSIT, DAN EOSINOFIL PADA *Coturnix japonica* YANG
TERINDUKSI VAKSIN H5N1**

*Immunostimulatory Activity Test Of Ethyl Acetate Fraction Extracted From The Rhizomes
Fingerroot Of (*Boesenbergia Pandurata* (Roxb.)) (Zingiberaceae) On The Number Of
Leukocytes, Lymphocytes And Eosinophils In *Coturnix Japonica* Induced By avian
Influenza Vaccines*

Pharmacy Study Programme, Faculty of Medicine and Health Science
Muhammadiyah University of Yogyakarta
Dini Mardhiyani¹, Puguh Novi Arsito²
Email: dinimardhiyani7@gmail.com

ABSTRACT

*Avian influenza (AI) is a disease that can cause death in humans. One of the efforts prevention of AI in avian that can be done is by active or assive vaccination but response of titer antibody is still low. Another alternative prevention is increasing the non-specific immunity what through the immune system. Boesenbergia pandurata Roxb has strog antioxidant effects in vitro and it can increase the number of lymphocytes, specific antibodies, and kill cancer cells. The purpose of this research was to observe the effect of ethyl acetate fraction of (*Boesenbergia pandurata* Roxb) extract toward the immune system represented by the number of leukocytes, lymphocytes, and eosinophils in the blood sample of quail that induced by H5N1 vaccines.*

*Twenty five animal test (*Cortunix japonica*), 12th week in age, were divided into 5 groups. There were zero control group; negative control group; and treatment groups was given ethyl acetate fraction extract (*Boesenbergia pandurata* Roxb) supplementation dose 15,6 mg/quail; 39 mg /quail; 62,5 mg/quail. Vaccination had given in 1st, 3rd, and 6th week. Blood sampling was performed at 12th week. The parameters tested are leukocytes, lymphocytes, and eosinophils were obtained after treatment compared with zero and negative controls.*

Kruskal-Wallis test on leukocytes showed significantly difference ($P < 0,05$) in decrease the number of leukocytes in the treatment group. The analysis is based One Way Anova test is parameters lymphocytes and eosinophils was not a significant difference ($P > 0,05$). This research note that the ethyl acetate fraction extract could not increase the number of leukocytes, lymphocytes, eosinophils in avian that were induced H5N1 vaccines.

Keywords: *Avian influenza, Boesenbergia pandurata Roxb, Coturnix japonica, leukocytes, lymphocytes, eosinophils.*

INTISARI

Avian influenza (AI) merupakan salah satu penyakit yang dapat menyebabkan kematian pada manusia. Salah satu upaya pencegahan dari penyakit AI pada unggas dilakukan vaksinasi aktif maupun pasif namun kelemahan vaksinasi aktif yaitu respon titer antibodi unggas terhadap vaksinasi ini masih rendah. Upaya alternatif pencegahan lain yaitu dengan meningkatkan kekebalan non spesifik yaitu melalui sistem imun. Temu kunci memiliki efek antioksidan yang kuat dan secara *in vitro* temu kunci dapat meningkatkan jumlah limfosit, antibodi spesifik, dan dapat membunuh sel kanker. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian fraksi etil asetat ekstrak temu kunci (*Boesenbergia pandurata* Roxb) terhadap sistem imun melalui gambaran jumlah leukosit, limfosit, dan eosinofil, pada sampel darah puyuh yang terinduksi vaksin AI subtipe H5N1.

Sebanyak 25 ekor hewan uji Puyuh (*Coturnix japonica*) berumur 12 minggu dibagi 5 kelompok: kontrol nol, kontrol negatif, dan kelompok perlakuan disuplementasi fraksi etil asetat ekstrak temu kunci dosis 15,6 mg/puyuh; 39 mg/puyuh; 62,5 mg/puyuh. Vaksinasi dilakukan pada minggu ke-1, minggu ke-3, dan minggu ke-6. Pengambilan sampel darah dilakukan pada minggu ke-16. Parameter yang diuji adalah jumlah leukosit, limfosit, dan eosinofil yang diperoleh setelah perlakuan dibandingkan dengan kontrol nol dan negatif.

Uji *Kruskal-Wallis* pada leukosit menunjukkan ada perbedaan yang bermakna ($P < 0,05$) pada penurunan jumlah leukosit dari kelima kelompok yang diuji. Adapun berdasar uji analisis *One Way Anova* parameter limfosit dan eosinofil tidak berbeda bermakna ($P > 0,05$). Dari penelitian ini diketahui bahwa fraksi etil asetat temu kunci tidak memberikan pengaruh pada peningkatan jumlah leukosit, limfosit, eosinofil pada puyuh yang divaksin.

Kata kunci: Avian influenza, *Boesenbergia pandurata* Roxb, *Coturnix japonica*, leukosit, limfosit, eosinofil.

PENDAHULUAN

Penyakit avian influenza (AI) H5N1 pada unggas telah meluas ke beberapa benua yang meningkatkan risiko zoonosis pada manusia. Avian influenza merupakan salah satu penyakit yang dapat menyebabkan kematian pada manusia. Pada pertengahan tahun 2003 di Indonesia, virus AI H5N1 kembali muncul dan terus menyebar.

Tahun 2004, subtype H5N1 dan H7N2 telah menginfeksi puluhan penduduk Vietnam, Thailand, dan Kanada. Virus H5N1 lebih patogen dan berpotensi sebagai penyakit epizootik sehingga disebut dengan *Highly Pathogenic H5N1 Avian Influenza* (HPAI) (Radji, 2006).

Salah satu tindakan pencegahan dari penyakit AI pada unggas adalah dengan meningkatkan kesehatan pada sistem kekebalan yang spesifik (antibodi) dengan vaksinasi (Capua dan Marangon, 2006). Namun adanya kendala pemberian vaksinasi aktif pada manusia, karena belum memenuhi semua persyaratan, baik secara eksperimental maupun komersial (Mohammad, 2006), maka tidak dianjurkan untuk imunisasi aktif dan lebih pada imunisasi pasif.

Adanya upaya pencegahan penyakit AI pada manusia yaitu dengan pemberian obat antiretroviral namun juga terdapat kendala yaitu terjadinya resistensi virus AI H5N1 terhadap obat antiretroviral, maka untuk solusinya dilakukan alternatif upaya pencegahan lain yaitu dengan meningkatkan kekebalan non spesifik yaitu melalui sistem imun dengan mekanisme perlawanan mikroorganisme secara umum sehingga organisme budidaya dapat lebih tahan terhadap berbagai jenis patogen yang menyerang (Direktorat Bina Farmasi Komunitas dan Klinik, 2007). Temu kunci merupakan salah satu tanaman untuk

mengobati berbagai macam penyakit, salah satunya sebagai antioksidan yang kuat (Shindo *et al.*, 2003). Pengujian secara *in vitro* menunjukkan temu kunci dapat meningkatkan jumlah limfosit, antibodi spesifik, dan dapat membunuh sel kanker (Hartono, 1999). Rimpang temu kunci mengandung beberapa jenis senyawa golongan minyak atsiri yaitu metilsinamat, kamper, sineol, dan terpena. Di samping minyak atsiri, temu kunci mengandung saponin dan flavonoid (Sjamsudin dan Hutapea *in Chairul et al.*, 1996). Fraksi etil asetat ekstrak temu kunci juga mampu meningkatkan Ig-Y anti AI pada ayam petelur (Miftah *et al.*, 2012).

Dari uraian di atas menggambarkan bahwa zat yang terkandung dalam temu kunci dapat berfungsi sebagai imunomodulator. Dari hal tersebut melatarbelakangi peneliti untuk melakukan penelitian mengenai aktifitas fraksi etil asetat ekstrak temu kunci untuk meningkatkan antibodi melalui mekanisme peningkatan jumlah leukosit, limfosit dan eosinofil pada burung puyuh setelah diinduksi vaksin H5N1 dan dari penelitian ini diharapkan dapat dimanfaatkan untuk memproduksi imunoterapi yang spesifik untuk melawan virus AI dengan hasil yang optimal.

METODE PENELITIAN

Ekstraksi

Rimpang temu kunci diperoleh di daerah Waduk Sermo, Wates, Kulonprog. Prosedur pembuatan sediaan ekstrak adalah sortasi, pencucian, pengeringan, pengghalusan, dan diekstraksi dengan menggunakan etanol 70 %, dan diekstaraksi kembali menggunakan etil asetat.

Pembuatan sediaan uji

Pembuatan sediaan kapsul : Fraksi etil asetat ekstrak temu kunci ditimbang sebanyak 0,9 gram dan untuk laktosa ditimbang sebanyak 2,2 kali dari berat fraksi etil asetat ekstrak temu kunci yaitu 1,98 gram. Setelah penimbangan dilakukan, dicampur homogen dengan digerus dengan laktosa sedikit demi sedikit kedalam. Fraksi kering ditimbang sesuai dengan dosis dan dikapsulasi menggunakan kapsul ukuran 03 dengan 3 seri dosis yaitu dengan berat 50 mg (dosis 15,6 mg/kapsul), 125 mg (dosis 39 mg/kapsul), dan 200 mg (dosis 62,5 mg/kapsul).

Pengelompokan, perlakuan hewan uji dan induksi menggunakan vaksin H5N1

Puyuh (*Coturnix japonica*) berumur 12 minggu, kondisi sehat dan normal. Hewan uji pada kelompok III, IV, dan V dilakukan pengkondisian dengan cara disuplementasi fraksi etil asetat ekstrak temu kunci setiap hari pada jam 16.00 sore selama 7 hari berturut-turut. Semua kelompok puyuh divaksinasi dengan vaksin AI subtipe H5N1 produk dari PT Medion secara *intramuscular* dengan dosis 0.2 mL/puyuh. Vaksinasi dilakukan pada minggu ke 1, 3, dan 6 pada kelompok III, IV, dan V.

Berikut uraian lima kelompok perlakuan dari 25 ekor puyuh di dalam kandang:

1. Kelompok I : Burung puyuh tanpa diinduksi vaksin AI H5N1, tanpa suplementasi fraksi etil asetat ekstrak temu kunci sebagai kontrol nol (0).
2. Kelompok II : Burung puyuh diinduksi vaksin AI H5N1, tanpa suplementasi fraksi etil asetat ekstrak temu kunci sebagai kontrol negatif (-).
3. Kelompok III : Burung puyuh diinduksi vaksin AI H5N1, diberi suplementasi fraksi

etil asetat ekstrak temu kunci dosis 15,6 mg/puyuh/hari.

4. Kelompok IV : Burung puyuh diinduksi vaksin AI H5N1, diberi suplementasi fraksi etil asetat ekstrak temu kunci dosis 39 mg/puyuh/hari.

5. Kelompok V : Burung puyuh diinduksi vaksin AI H5N1, diberi suplementasi fraksi etil asetat ekstrak temu kunci dosis 62,5 mg/puyuh/hari.

Penelitian dilakukan selama 16 minggu, dengan pengukuran jumlah leukosit dan diferensial leukosit pada minggu ke 16. Sampel darah diambil melalui vena brachialis daerah sayap, sebanyak 2 mL menggunakan syringe 3 mL, kemudian dimasukkan kedalam tabung yang telah dibasahi antikoagulan (EDTA).

Penghitungan jumlah total leukosit

Prosedur pengukuran leukosit dengan cara : (1) menghisap darah dengan pipet leukosit sampai 0,5, (2) kemudian menambahkan larutan turk sampai angka 11, (3) mencampurkan sampai homogen dengan memutar pipet, (4) meneteskan sampel yang telah homogen ke dalam kamar hitung Neubauer, (5) melihat dan menghitung dengan menggunakan mikroskop perbesaran rendah pada empat bujur sangkar di sudut kamar hitung.

Pembuatan Preparat Ulas Darah dan Pewarnaan

Pembuatan Preparat Apus Darah dengan Gelas Obyek dengan cara : (1) sampel darah yang ada diambil dengan pipet kapiler/batang gelas, satu tetes kecil darah diletakkan dekat dengan ujung gelas (2) Gelas objek penutup diletakkan di atas gelas objek pertama, darah akan menyebar di antara kedua gelas objek tersebut, (3) Usapkan dengan gerakan sejajar dengan menarik penutup gelas obyek kesamping. (4) Ulas darah tersebut dibiarkan mengering di udara. (5) Setelah kering,

sampel darah puyuh difiksasi dengan metanol selama 5 menit, kemudian dikeringkan. (6) Selanjutnya ulas darah dilakukan pewarnaan giemsa 10% selama 1 jam (7) kemudian dicuci dengan air mengalir pada posisi miring dan dikeringkan di udara.

Penghitungan diferensiasi leukosit (limfosit dan eosinofil)

Preparat ulas darah yang telah diwarnai diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 1000X, menggunakan minyak emersi. Jumlah eosinofil dan limfosit dihitung dalam 100 leukosit dengan menggunakan *blood counter*. Leukosit dibedakan berdasarkan ukuran sel, warna dan granulasi sitoplasma, bentuk kromatin, jumlah gelambir inti dan bentuk inti. Nilai relatif yang diperoleh dinyatakan dalam satuan persen, sedangkan nilai absolut dari tiap jenis leukosit (nilai limfosit dan eosinofil) diperoleh dengan cara mengalikan persentase dengan jumlah total leukosit (Sastradipraja *et al.* 1989).

Cara Analisis

Langkah pertama yang dilakukan yaitu menguji distribusi data dengan uji *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel kurang dari atau sama dengan 50, kemudian dilanjutkan dengan *Levene Test* untuk melihat homogenitas varian. Bila data homogen ($P > 0,05$), analisis data dilakukan dengan *Oneway-ANOVA* dengan taraf kepercayaan 95%. Jika data tidak terdistribusi normal, maka dianalisis dengan uji statistik non-parametrik *Kruskal-Wallis*. Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan, dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Hasil penghitungan terhadap jumlah total leukosit, limfosit dan eosinofil pada puyuh setelah pemberian fraksi etil asetat ekstrak temu (*Boesenbergia pandurata* Roxb) terhadap total jumlah leukosit, limfosit, eosinofil selama 16 minggu:

Tabel 1. Total jumlah leukosit, limfosit, eosinofil puyuh percobaan pada minggu ke 16 setelah pemberian fraksi etil asetat ekstrak temu kunci yang diinduksi vaksin H5N1 (rerata \pm SD).

No	Kelompok	Leukosit (sel/mm ³)	Limfosit (%)	Eosinofil (%)
1	Kontrol (-)	30520 \pm 2886	60,0 \pm 11,33	10,2 \pm 8,64
2	K 0	20560 \pm 5507	55 \pm 12,32	15,0 \pm 6,16
3	K 15,6 mg	26320 \pm 14547	57 \pm 12,21	8,0 \pm 5,24
4	K 39 mg	19240 \pm 5466	61,4 \pm 9,65	4,0 \pm 4,00
5	K 62,5 mg	16480 \pm 3662	60,6 \pm 3,2	6,8 \pm 3,27

Keterangan : Kelompok K - : Tanpa pemberian kapsul ekstrak temu kunci dan diinduksi vaksin AI H5N1; Kelompok K 0 : Tanpa pemberian kapsul ekstrak temu kunci dan tanpa diinduksi vaksin AI H5N1; K 15,6 mg, K 39 mg, dan K 62,5 mg, berurutan diberi kapsul ekstrak temu kunci 15,6 mg/ekor, 39 mg/ekor, 62,5 mg/ekor dan semuanya diberi vaksin AI H5N1.

Pengaruh pemberian fraksi etil asetat ekstrak temu kunci terhadap sel darah putih (Leukosit)

Berdasarkan uji *Shapiro-Wilk* setelah perlakuan dari keseluruhan data jumlah leukosit diperoleh nilai $0=0,006$ ($P<0,05$) dapat disimpulkan bahwa jumlah total leukosit tidak terdistribusi normal dan dilanjutkan dengan melakukan uji *Kruskal-*

Wallis yang merupakan uji turunan non parametrik dari uji *One-Way Anova*. Dengan melakukan uji *Kruskal-Wallis*, dapat diketahui perbedaan nilai dari kelima kelompok sekaligus. Dari hasil *Kruskal-Wallis* diperoleh nilai $p=0,026$ ($P<0,05$) yang berarti terdapat perbedaan jumlah leukosit yang bermakna dari kelima kelompok yang diuji.

Tabel 2. Nilai signifikansi jumlah leukosit dengan menggunakan uji Mann-Whitney

	K N	K0	K15,6	K39	K62,5
K N	-	0,016*	0,117	0,009*	0,008*
K 0	0,016*	-	0,602	0,675	0,402
K 15,6	0,117	0,602	-	0,465	0,117
K 39	0,009*	0,675	0,465	-	0,465
K 62,5	0,008*	0,402	0,117	0,465	-

Keterangan : * $P<0,05$: Terdapat perbedaan yang bermakna

Pengaruh pemberian fraksi etil asetat ekstrak temu kunci terhadap limfosit

Pada uji normalitas *Shapiro-Wilk* setelah perlakuan (post) dari keseluruhan data jumlah sel limfosit yang diperoleh dari lima kelompok diperoleh nilai $P=0,966$ ($P>0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa jumlah sel limfosit terdistribusi normal dan syarat untuk dilakukannya uji varian satu jalan (*one way anova*) sudah terpenuhi.

Berdasarkan uji anova menghasilkan nilai probabilitas $\text{Sig} > 0,05$ yaitu diperoleh nilai $p=0,862$, dari hasil tersebut diambil kesimpulan bahwa dari kelima rata-rata sampel adalah sama atau tidak ada perbedaan hasil perlakuan fraksi etil asetat ekstrak temu kunci terhadap jumlah limfosit dari masing-masing kelompok. Data dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 3. Uji *One way Anova* jumlah limfosit puyuh pada minggu ke-16 setelah pemberian fraksi etil asetat ekstrak temu kunci yang diinduksi vaksin H5N1.

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	136,24	4	34,06	0,319	0,862
Within Groups	2133,6	20	106,68		
Total	2269,84	24			

Keterangan : Df= *degree of freedom*; F=nilai F hitung; Sig.= *significant*

Tabel 4. Hasil uji *post hoc* jumlah limfosit

	K N	K0	K15,6	K39	K62,5
KN	-	0,453	0,717	0,832	0,928
K0	0,453	-	0,695	0,339	0,401
K15,6	0,717	0,695	-	0,567	0,651
K39	0,832	0,339	0,567	-	0,904
K62,5	0,928	0,401	0,651	0,904	-

*P<0,05: Terdapat perbedaan yang bermakna

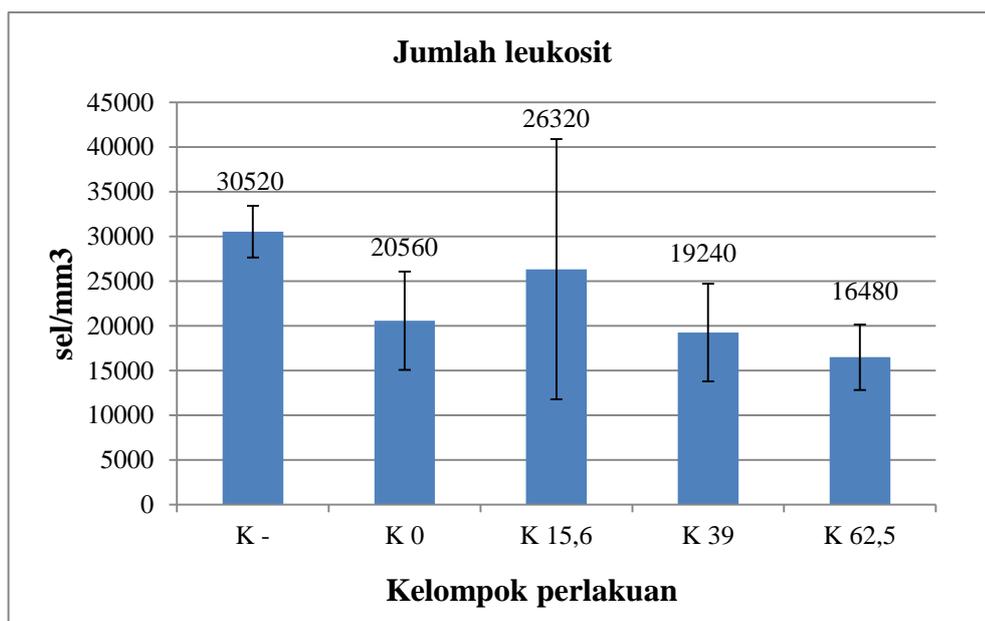
Pengaruh pemberian fraksi etil asetat ekstrak temu kunci terhadap eosinofil

Pada uji normalitas *Shapiro-Wilk*, setelah perlakuan (post) dari keseluruhan data jumlah eosinofil yang diperoleh dari lima kelompok diperoleh nilai $P=0,149$ ($P>0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa jumlah eosinofil terdistribusi normal. Berdasarkan uji anova menghasilkan nilai

probabilitas Sig $>0,05$ yaitu diperoleh nilai $p=0,072$, dari hasil tersebut diambil kesimpulan bahwa dari kelima rata-rata sampel adalah sama atau tidak ada perbedaan hasil perlakuan fraksi etil asetat ekstrak temu kunci terhadap jumlah eosinofil dari masing-masing kelompok. Data dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Uji *One way Anova* jumlah eosinofil puyuh pada minggu ke-16 setelah pemberian fraksi etil asetat ekstrak temu kunci yang diinduksi vaksin H5N1.

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	340,4	4	85,1	2,542	0,072
Within Groups	669,6	20	33,48		
Total	1010	24			



Gambar 6. Grafik rerata jumlah total leukosit dan SD pada setiap kelompok perlakuan

Pembahasan

Pengaruh fraksi etil asetat ekstrak temu kunci (*Boesenbergia pandurata* Roxb) terhadap leukosit

Dari gambar 6 diatas terlihat bahwa rata-rata jumlah total leukosit yang memiliki nilai tertinggi pada perlakuan kontrol negatif ($30520/\text{mm}^3$), sedangkan jumlah leukosit terendah pada perlakuan puyuh yang diberi fraksi etil asetat ekstrak temu kunci 39 mg/puyuh/hari dan divaksin H5N1 ($19240/\text{mm}^3$). Secara umum terlihat telah terjadi penurunan jumlah leukosit pada kelompok yang diberi perlakuan fraksi etil asetat ekstrak temu kunci dibanding dengan kelompok kontrol negatif dan kontrol nol yang hanya divaksin H5N1. Semakin besar dosis ekstrak, semakin rendah jumlah sel leukosit yang ada pada darah puyuh. Namun penurunan jumlah total sel leukosit pada semua kelompok masih dalam kisaran jumlah total sel leukosit yang normal pada puyuh yaitu 20.000-40.000 sel/ mm^3 (Sturkie dan Griminger, 1976).

Adanya jumlah leukosit terendah pada perlakuan puyuh yang diberi fraksi etil asetat ekstrak temu kunci dosis 39 mg/puyuh/hari bisa disebabkan fraksi etil asetat ekstrak temu kunci mengandung zat aktif saponin yang dapat merangsang kekebalan tubuh puyuh, saponin berfungsi sebagai antifungal dan anti bakteri, selain itu juga saponin pada unggas dapat berfungsi sebagai bahan tambahan yang dapat merangsang sistem kekebalan tubuh (Cheke, 2000).

Namun hal ini bisa menjadi kebalikan dari fungsi saponin sendiri, apabila kandungan saponin melebihi batas toleransi pada puyuh diberikan, maka terjadi penekanan kekebalan tubuh puyuh. Dimana saponin dalam jumlah besar mampu membentuk ikatan kompleks dengan protein yang berakibat menurunnya protein yang dapat dicerna (Francis *et al.*, 2002). Protein yang dapat dicerna mengakibatkan protein globulin yang dibutuhkan rendah sehingga antibodi yang terbentuk sedikit. Dengan demikian dapat mempengaruhi jumlah leukosit, sehingga jumlah leukosit menurun yang dapat menyebabkan respon kekebalan tubuh menurun dan daya tahan tubuh menurun, namun penurunan leukosit pada hasil penelitian ini masih di batas kisaran normal jumlah leukosit.

Pada kelompok kontrol nol hewan uji tanpa diberi pemberian fraksi etil asetat ekstrak temu kunci dan juga tidak diinduksi vaksin H5N1, dimana kontrol nol ditujukan untuk melihat keberhasilan vaksinasi. Pada kontrol nol ($20560 \text{ sel}/\text{mm}^3 \pm 5507 \text{ sel}/\text{mm}^3$) jumlah total sel leukosit mengalami penurunan secara signifikan dibandingkan kelompok kontrol negatif ($30520 \text{ sel}/\text{mm}^3 \pm 2886 \text{ sel}/\text{mm}^3$).

Pada hasil uji *Kruskal-Wallis* diperoleh nilai $p=0,026$ dimana terdapat perbedaan yang signifikan dari kelima kelompok yang diuji, namun nilai signifikan yang diperoleh dari hasil analisis merupakan signifikan adanya penurunan jumlah total sel

leukosit yang terjadi bukan seperti yang diharapkan pada penelitian bahwa kelompok perlakuan dapat meningkatkan jumlah total sel leukosit dibanding kelompok kontrol negatif dan ini tidak sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa fraksi etil asetat ekstrak temu kunci dapat meningkatkan leukosit. Hal ini dapat disebabkan juga karena adanya efek antioksidan pada temu kunci yang memiliki manfaat sebagai imunomodulator dengan cara menstimulasi respon imun tetapi bisa sebaliknya juga dapat meregulasi respon imun yang berlebihan (Saxena Rahul *et al*, 2012).

Dari hasil uji post Hoc terdapat perbedaan bermakna ($P < 0,05$) pada kelompok kontrol negatif terhadap K 39 mg ($P = 0,031$) dan K 62,5 mg ($P = 0,009$), namun perbedaan bermakna yang dihasilkan bukan dari segi peningkatan jumlah total sel leukosit namun penurunan sehingga hipotesa mengenai pengaruh variasi peningkatan konsentrasi terhadap peningkatan jumlah total leukosit dalam hal ini difokuskan pada peningkatan jumlah total leukosit, hipotesa tidak dapat diterima karena tidak ada pengaruh dari fraksi etil asetat ekstrak temu kunci terhadap peningkatan jumlah total leukosit puyuh yang divaksin H5N1.

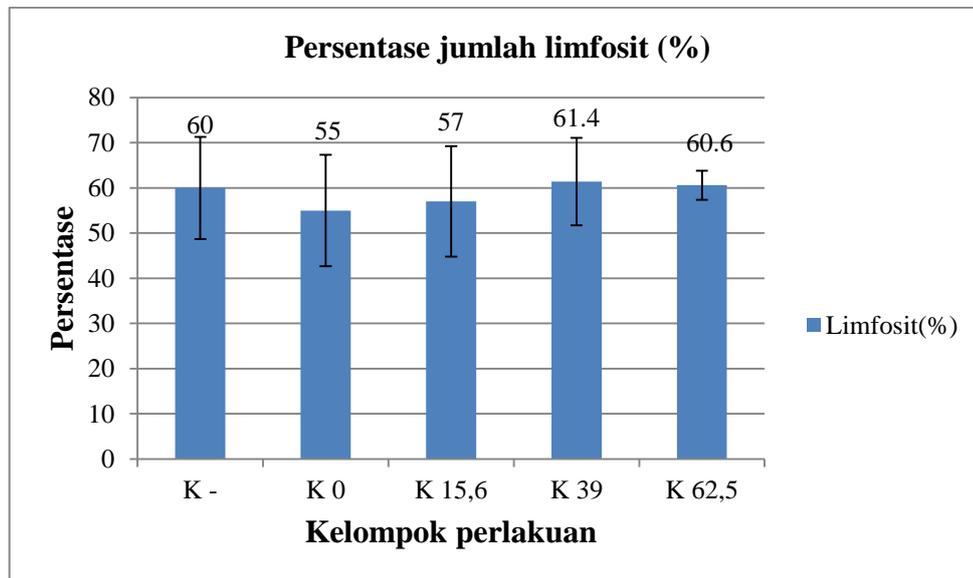
Adanya perubahan jumlah leukosit mengindikasikan terjadinya perubahan fungsi sistem tubuh puyuh. Menurut Dellmann dan Brown (1992), adanya fluktuasi jumlah total leukosit pada tiap individu cukup besar pada

kondisi tertentu, misalnya stress, aktivitas fisiologis, gizi, umur, dan lain-lain.

Aktifitas di dalam tubuh dapat mengakibatkan peningkatan yang signifikan pada darah, jumlah total leukosit dan diferensial leukosit. Faktor patologis dapat juga berpengaruh terhadap hasil interpretasi jumlah total leukosit, misalnya adanya penyakit yang disebabkan oleh suatu agen penyakit intoksikasi baik secara endogen maupun eksogen, protein asing dan endokrin. Adanya peningkatan atau penurunan salah satu jenis sel dari leukosit sudah dapat menyebabkan perubahan terhadap hasil interpretasi jumlah total leukosit (Schalm, *et al.*, 1975).

Leukosit atau sel darah putih merupakan unit aktif dari sistem pertahanan tubuh dalam melawan mikroorganisme (Guyton dan Hall, 1997). Jumlah leukosit pada umumnya dipengaruhi oleh jumlah netrofil ataupun limfosit dalam sirkulasi darah, karena kedua jenis leukosit tersebut jumlahnya lebih banyak dibandingkan dengan leukosit tipe lain (Kelly, 1984). Netrofil dan monosit merespon dengan melakukan aktifitas fagositosis, sedangkan limfosit memproduksi antibodi (Swenson, 1984). Adanya faktor fisiologis juga mempengaruhi pada interpretasi jumlah leukosit yang meliputi: umur, spesies hewan, tingkat eksitasi, aktifitas muskuler dan stadium makan (Coles, 1986).

**Pengaruh fraksi etil asetat ekstrak
temu kunci (*Boesenbergia
pandurata* Roxb) terhadap limfosit**



Gambar 7. Grafik rerata jumlah limfosit dan SD pada setiap kelompok perlakuan

Berdasarkan rata-rata jumlah limfosit pada gambar 7 diperoleh rata-rata jumlah limfosit tertinggi pada perlakuan dengan pemberian fraksi etil asetat ekstrak temu kunci dosis 39/mg/puyuh/hari yaitu sebesar 61,4%, sedangkan jumlah limfosit terendah pada puyuh tanpa perlakuan atau kontrol nol yang hanya divaksin H5N1 yakni dengan rata-rata jumlah 55%. Jika hasil pertambahan jumlah limfosit setiap perlakuan diurutkan dari yang terkecil sampai yang terbesar, maka urutannya adalah K 15,6 mg, K0, K(-), K 62,5 mg ,dan K 39 mg.

Limfosit memiliki fungsi utama memproduksi antibodi atau sebagai sel efektor khususnya dalam menanggapi antigen terikat makrofag. Tanggapan kebal yang terjadi jika adanya

lingkungan yang bisa terjadi interaksi yang efisien antara limfosit, makrofag, dan antigen. Limfosit merupakan jenis leukosit yang unggul pada darah unggas, termasuk puyuh (Schalm, 2010). Limfosit dibentuk di jaringan limfoid seperti limpa, tonsil, timus dan bursa fabricius. Peningkatan limfosit antara lain disebabkan terjadinya penurunan heterofil (sifatnya relatif), leukimia limfositik, inflamasi kronis (infeksi bakteri, virus, fungi protozoa), pengeluaran epinefrin, defisiensi kortikosteroid (*hypoadrenokorticism*), neoplasia (Dharmawan, 2002; Jackson, 2007).

Penurunan jumlah limfosit (limfositopenia) yang dapat terjadi ketika tubuh terserang HIV (*human immunodeficiency virus*) dan rusaknya

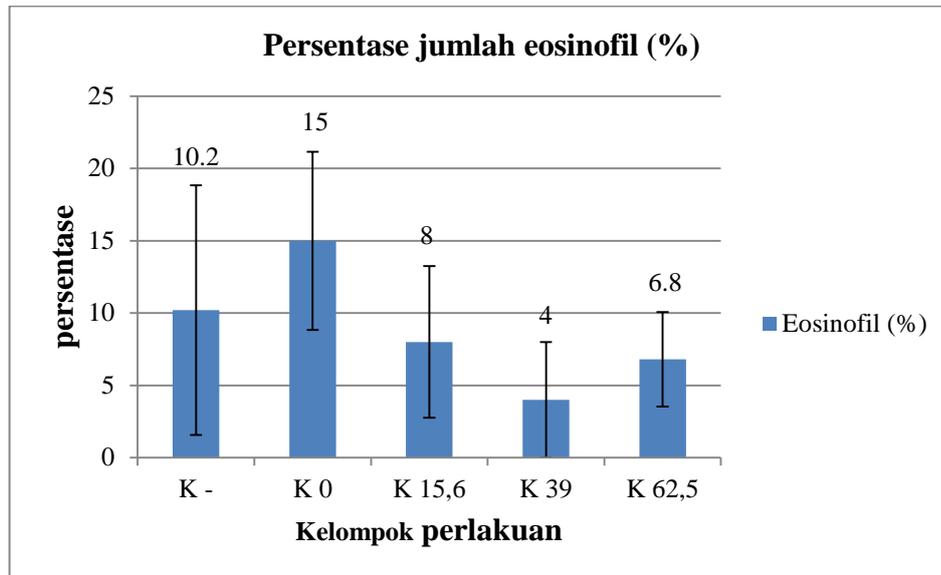
sel T (khususnya subgrup CD4⁺ dari limfosit T). Tanpa adanya persediaan sel T, tubuh akan menjadi mudah terserang penyakit/infeksi yang akan berdampak pada kesehatan individu. Limfositopenia juga dapat disebabkan oleh stress berkelanjutan atau pemberian preparat kortikosteroid dan juga merupakan hasil dari redistribusi atau lisisnya limfosit. Jumlah limfosit yang beredar dalam darah dapat dipengaruhi oleh jumlah produksi, resirkulasi dan proses penghancuran dari limfosit (Jain, 1993). Penurunan limfosit juga bisa disebabkan pada saat terjadi stress yang berkepanjangan akan meningkatkan kadar kortisol dalam darah dan limfosit yang ada didarah perifer ditarik dari sirkulasi kedalam jaringan yang mengalami peradangan, sehingga bisa menyebabkan hilangnya limfosit dalam sirkulasi darah dan organ limfoid (Tizard, 1982).

Berdasarkan hasil yang diperoleh jumlah limfosit tertinggi pada perlakuan dengan pemberian fraksi etil asetat ekstrak temu kunci dosis 39/mg/puyuh/hari bisa dikarenakan pengaruh konsentrasi ekstrak terhadap peningkatan kemampuan limfosit untuk berproliferasi. Sel limfosit yang diinduksi oleh concanavalin A atau lipopolisakarida dan menghasilkan *macrophage activating factors* (Kono *et al*, 2003).

teraktivasi oleh imunostimulan dapat meningkatkan aktivitas imunogenik Adanya pemberian dosis fraksi etil asetat ekstrak temu kunci 39/mg/puyuh/hari yang dapat dikatakan sebagai dosis yang ideal dan dosis yang ditoleransi oleh tubuh puyuh dalam meningkatkan sistem imunitas tubuh, sehingga pada pemberian dosis 62,5/mg/puyuh/hari terjadi penurunan jumlah limfosit, hal ini kemungkinan jika dosis yang diberikan terlalu tinggi akan menjadi bersifat toksik bagi sel limfosit karena terjadi penekanan proliferasi limfosit dan bisa juga terjadi terjadi limfopenia (penurunan jumlah limfosit dalam darah). Menurut Kresno (1991), imunogenitas suatu substansi ditentukan oleh cara masuknya substansi bersangkutan ke dalam tubuh dan besarnya dosis juga menentukan respon imun yang dihasilkan. Pada suatu konsentrasi tertentu juga suatu ekstrak yang bersifat sebagai antioksidan dapat bersifat prooksidan pada konsentrasi lain (Zakaria, 1996).

Dari hasil yang didapatkan pada diferensial sel limfosit tidak terdapat pengaruh fraksi etil asetat ekstrak temu kunci terhadap jumlah sel limfosit antar perlakuan ($P > 0,05$), sehingga dapat dikatakan bahwa fraksi etil asetat ekstrak temu kunci tidak berpengaruh terhadap jumlah sel limfosit dalam darah.

Pengaruh fraksi etil asetat ekstrak temu kunci (*Boesenbergia pandurata* Roxb) terhadap Eosinofil



Gambar 8. Grafik rerata jumlah eosinofil dan SD pada setiap kelompok perlakuan

Berdasarkan gambar 8 diperoleh bahwa rata-rata pertambahan jumlah eosinofil yang memiliki nilai tertinggi pada kontrol nol dengan tanpa pemberian fraksi etil asetat ekstrak temu kunci dan hanya divaksin H5N1 yaitu sebesar 15,0 % sedangkan jumlah limfosit terendah pada perlakuan dengan pemberian fraksi etil asetat ekstrak temu kunci 39/mg/puyuh/hari yakni sebesar 4,0 %. Jika hasil pertambahan jumlah eosinofil diurutkan dari yang terkecil hingga terbesar, maka urutannya adalah kelompok perlakuan K 39 mg, K 62,5 mg, K 15,6 mg, K(-), dan K0.

Eosinofil merupakan sel fagosit yang lemah, dan menunjukkan fenomena taksis. Eosinofil akan bermigrasi dalam jumlah besar saat

pasien terinfeksi parasit menuju jaringan yang terinfeksi. Eosinofil diduga mampu mendetoksifikasi beberapa zat pencetus peradangan yang disebabkan oleh sel mast dan basofil, dan juga memfagositosis, menghancurkan kompleks alergen-antibodi, sehingga mencegah penyebaran proses peradangan setempat (Guyton dan Hall, 2008).

Menurut Tizard (1982), eosinofil memfagositosis tidak seefisien neutrofil, tetapi memiliki lisosom dan mengadakan letupan pernafasan bila terangsang dengan tepat. Eosinofil juga mengandung histaminase, yang menginaktifkan histamin dan pelepasan serotonin dari sel tertentu, juga melepaskan *zinc* yang menghalangi agregasi trombosit (Brown 1989; Jain 1993).

Eosinofil yang diproduksi di sumsum tulang belakang diinduksi oleh faktor pertumbuhan seperti interleukin-3 (IL-3) dan *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* (GM-CSF) (Meyer dan Harvey, 2009). Sel T yang teraktifasi akan memproduksi IL-5 sehingga mendorong pendewasaan eosinofil (Taku dan Kiyoshi, 2009). Penghambatan pembentukan eosinofil dilakukan oleh adanya IL-2 dan IFN- γ (Huan, 2004). Sehingga dalam hal ini di duga komponen yang terdapat pada fraksi etil asetat ekstrak temu kunci menstimulasi peningkatan IL-2 dan IFN- γ dalam sel yang bisa menurunkan jumlah eosinofil pada perlakuan yang diberi ekstrak temu kunci.

Temu kunci diketahui memiliki aktivitas imunostimulator melalui hasil penelitian pada ekstrak perasan jus temu kunci terhadap burung puyuh dengan perlakuan selama 3 bulan sebesar 4 ml secara *in vivo* mampu meningkatkan titer antibodi IgY pada burung puyuh petelur (Miftah *et al.*, 2012). Namun untuk fraksi etil asetat ekstrak temu kunci belum mampu secara efektif meningkatkan antibodi melalui parameter leukosit, limfosit dan eosinofil, dimana temu kunci pada penelitian sebelumnya hanya diproses sebagai jus temu kunci.

Beberapa kemungkinan yang menjadi penyebab fraksi etil asetat ekstrak temu kunci belum mampu secara efektif meningkatkan antibodi melalui parameter peningkatan proliferasi leukosit, limfosit dan

eosinofil, yaitu dikarenakan kandungan senyawa yang memiliki mekanisme peningkatan antibodi tidak terdapat pada fraksi etil asetatnya namun senyawa yang memiliki efek imunostimulator ada pada jus temu kunci yang telah dilakukan penelitian sebelumnya oleh Miftah *et al* (2012) dan juga kemungkinan senyawa yang memiliki efek terhadap antibodi pada temu kunci terdapat pada fraksinya yang lebih polar.

Penyebab kemungkinan lainnya yaitu dimana aktivitas imunostimulator pada temu kunci dalam mereaktivasi sistem imun dihasilkan dengan berbagai mekanisme. Mekanisme yang dihasilkan bisa melalui peningkatan jumlah produksi sel dengan proliferasi atau dengan jumlah sel yang tetap dalam jumlah normal namun kemampuan sel yang ada mampu mensekresi antibodi untuk meningkatkan sistem imun dan meningkatkan reaksi stimulus terhadap antigen. Fraksi etil asetat ekstrak temu kunci dalam penelitian ini diduga memiliki cara bukan melalui peningkatan proliferasi sel yang dilihat dari parameter leukosit, limfosit dan eosinofil tetapi mekanisme yang dihasilkan yaitu melalui peningkatan efektifitas imunologisnya misalnya melalui sel limfosit yang ada pada leukosit bekerja dengan meningkatkan sekresi IgY dimana IgY yang dihasilkan dibentuk dari diferensiasi sel.

Suatu agen imunomodulator yang berasal dari substansi alami

maupun sintetik, keduanya mempengaruhi sistem imun dan memberikan keuntungan untuk pengobatan. Keduanya masuk ke dalam tubuh kemudian mengaktifkan makrofag dan granulosit sehingga dapat meningkatkan fagositosis. Aktivasi makrofag yang dihasilkan dapat merubah sel sekretori sebagai sel efektor sitotoksik. Adanya perubahan sel sekretori dapat menstimulasi atau bahkan menekan sistem imun humoral dan selular (Saxena Rahul *et al*, 2012). Imunomodulator dapat membantu meregulasi atau menormalkan kembali sistem imun yang tidak seimbang, memperbaiki sistem imun yang lemah, dan sistem imun yang berlebihan.

Temu kunci diketahui memiliki kandungan utama senyawa golongan flavonoid, minyak atsiri dan saponin yang memiliki efek meningkatkan respon imun melalui mekanisme sesuai dengan kandungan senyawa didalamnya. Adanya berbagai macam kandungan senyawa yang terdapat pada temu kunci, maka terdapat berbagai mekanisme dari temu kunci sebagai imunostimulator. Namun dalam hal ini diduga kandungan yang paling banyak terkandung dalam fraksi etil asetat yaitu flavonoid.

Flavonoid diketahui memiliki aktivitas antimikroba yang bersifat lipofilik sehingga mampu merusak membran mikroba, mereduksi infektivitas serta memperlihatkan efek inhibitor terhadap berbagai virus (Naim, 2004 *dalam* Abdullah, 2008). Flavonoid yang terdapat pada suatu

tanaman bisa meningkatkan IL-2 dan proliferasi limfosit. Proliferasi limfosit akan mempengaruhi sel CD4, kemudian menyebabkan sel TH1 teraktivasi. Sel Th1 yang teraktivasi akan mempengaruhi molekul-molekul termasuk IFN- γ yang dapat mengaktifkan makrofag, sehingga makrofag mengalami peningkatan metabolik, motilitas dan aktivitas fagositosis secara cepat dan lebih efisien dalam membunuh, bakteri atau mikroorganisme patogen (Ukhrowi, 2011).

Dari berbagai macam mekanisme peningkatan sistem imun, dapat diambil salah satu mekanismenya melalui kandungan senyawa flavonoid yang terkandung di dalam temu kunci, dimana flavonoid dapat meningkatkan sistem imun melalui peningkatan IL-2 dan proliferasi limfosit maka temu kunci memiliki aktivitas peningkatan sistem imun melalui mekanisme biologi pembentukan limfokin atau interleukin.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

1. Pemberian fraksi etil asetat ekstrak temu kunci memberikan pengaruh yang tidak signifikan terhadap peningkatan jumlah leukosit, limfosit dan eosinofil .
2. Pengaruh variasi peningkatan konsentrasi terhadap peningkatan jumlah leukosit, limfosit dan eosinofil, hipotesis tidak dapat diterima karena tidak ada pengaruh dari fraksi etil asetat ekstrak temu kunci pada puyuh yang divaksin H5N1.

DAFTAR PUSTAKA

- Brown EM., 1989, Darah dan sumsum tulang. Di dalam: Dellmann HD, Brown EM., *Buku Teks Histologi Veteriner*, Ed ke-3, Hartono R, penerjemah Jakarta: UI-Press, Terjemahan dari: *Veterinary Histology*, Hlm 109-143
- Capua, L., dan Marangon, S., 2006, Control of Avian Influenza in Poultry, *Emerging Infections Disease*, 12:1319-1324
- Cheeke, 2000, Natural Toxicants in Feed and Poisonous Plants. Avi Publishing Company.Inc., Westport Connecticut.
- Coles. E. H., 1986, *Veterinary Clinical Pathology*, 2nded. W.B Saunders Company, Philadelphia London, Pp. 64-65, 68-69
- Dellman HD, Brown EM., 1992, *Histologi Veteriner*, Edisi ketiga, Jakarta: UI Press.
- Dharmawan SN., 2002, Pengantar Patologi Klinik Veteriner, Bukit Jumburan, Udayana Press.
- Direktorat Jenderal Peternakan Departemen Pertanian, 2006, *Prosedur Operasional Standar (SOP) Pengendalian Penyakit AI*, 25-26. Direktorat Jenderal Peternakan Departemen Pertanian, Jakarta.
- Francis, G., Z. Kerem. H. P. S, Makkar, dan K. Beker, 2002, *The biological action of saponin in animal system a review*, J. Brit. Of Nut., 88: 587-605
- Guyton AC, Hall JE., 1997, *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*, Ed ke-9, Setiawan I et al. Penerjemah; Setiawan I, editor, Jakarta: EGC. Terjemahan dari: *Textbook of Medical Physiology*.
- Guyton, A.C., dan Hall, J.E. 2008. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Edisi 11. Jakarta: EGC
- Hartono, A., 1999, *Terapi nutrisi dan herbal untuk kanker*. Intisari 435 (36): 44-53.
- Huan-Zhong Shi, 2004, *Eosinophils Function as antigen-presenting cells*, *J Leu Biol* 76:520-527.
- Jackson, M. L., 2007, *Veterinary Clinical Pathology: an Introduction*, Blackwell Publishing, USA.
- Jain NC, 1993, *Essentials of Veterinary Hematology*, Philadelphia USA: Lea & Febiger.
- Jain NC, 1993, *Essentials of Veterinary Hematology*, Philadelphia USA: Lea & Febiger.
- Kelly WR., 1984, *Veterinary Clinical Diagnosis*, Ed ke-3, London: Bailliere Tindall.
- Kono, Tomoya, Aranya Ponpornpisit, Masahiro Sakai, 2003, *The analysis of expressed genes in head kidney of common carp (Cyprinus carpio L.) Stimulated with peptidoglycan*, *Aquaculture* Vol. 25.P: 37-52.
- Kresno, S. B., 1991, *Imunologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*, Edisi Kedua, 16,130, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- Meyer DJ dan Harvey JW., 2009, *Veterinary Laboratory and Medicine: Interpretation and Diagnosis*, 3rdEd. Washington: Saunders.
- Miftah, Z., Miftah R., Ely M. L., Micki K., Fitriana F., 2012, Uji Aktivitas Imunostimulator Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb)) Pada *Coturnix coturnix* yang Terinduksi Vaksin AI (Avian Influenza) Subtipe H5N1 Melalui Pengukuran Titer Antibodi, PKM-P PIMNAS ke-25, Yogyakarta :

- Farmasi, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
- Miftah, Z., Miftah R., Ely M. L., Micki K., Fitriana F., 2012, Uji Aktivitas Immunostimulator Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb)) Pada *Coturnix coturnix* yang Terinduksi Vaksin AI(Avian Influenza) Subtipe H5N1 Melalui Pengukuran Titer Antibodi, PKM-P PIMNAS ke-25, Yogyakarta : Farmasi, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
- Mohamad, K., 2006, Flu burung, Adapted from www.influenzareport.com
- Radji, M., 2006, Avian Influenza A (H5n1) :Patogenesis, Pencegahan Dan Penyebaran Pada Manusia, *Majalah Ilmu Kefarmasian*, Vol. III, No.2, Agustus 2006, 55 – 65
- Sastradipradja D *et al.* 1989, *Penuntun Praktikum Fisiologi Veteriner*, Djojosoebagio S,penelaah; Pusat Antar Universitas Ilmu Hayat. IPB
- Saxena, R, Sharma, A, Bharti, M, Rathore, M, 2012, *Immunomodulator A New Horizon: An overview. Journal Of Pharmacy Research*, 5(4),2306-2310.
- Saxena, R, Sharma, A, Bharti, M, Rathore, M, 2012, *Immunomodulator A New Horizon: An overview. Journal Of Pharmacy Research*, 5(4),2306-2310.
- Schalm, 2010, *Schalm's Veterinary Hematology*, 6thEd. Editor: Douglas J, Weiss, K., Jane W. Blackwell Publishing Ltd, Oxford.
- Schalm, O. W., E. J. Carroll and N.C. Jain, 1975. *Vetrinary Hematology*, 3rd, Ed Lea and Fibiger. Philadelphia.
- Shindo, Kazutoshi., Kato, Miki., Kionoshita, Asuka., Kobayashi, Asami., Koike, Yukiko., 2003, *Analysis of Antioxidant Activities Contained in The Boesenbergia pandurata Schult, Rhizome*, Biosci. Biotechnol. Biochem. 70 (9), 2281-2284
- Sturkie, P. D. and P. Griminger, 1976. *Blood : physical characteristics, formed elements, hemoglobin and coagulation*. Dalam: Sturkie, P. D. (Editor). Avian Physiology, 3rd Edition. Springer-Verlag NewYork, Inc, Heidelberg, Berlin.
- Swenson MJ., 1984, Dukes' *Physiology of Domestic Animals*. Ed ke-10, Ithaca and London: Comstock Publishing Associates a division of Cornell University Press.
- Syamsuhidayat, S.S., Hutapea, J.R., 1991, *Inventaris Tanaman Obat Indonesia I*, Depkes RI, Jakarta, 92-93.
- Taku K dan Hiyoshi T., 2009, *IL-5-and eosinophil-mediated inflammation: from discovery to therapy*. Oxford J Intl Immunol 21(12):1303-1309.
- Tizard IR., 1982, An Introduction of Veterinary Immunology. W. B. Saunders Company. P.254-257.
- Tizard IR., 1982, An Introduction of Veterinary Immunology. W. B. Saunders Company. P.254-257.
- Ukhrowi, 2011, Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Umbi Bidara Upas (*Merremia mammosa*) Terhadap Fagositosis Makrofag dan Produksi Nitrit Oksida (NO) Makrofag, *Tesis*, Magister Ilmu Biomedik, Universitas Diponegoro, Semarang.
- Zakaria. F R., 1996, *Sintesis Senyawa Radikal dan Elektrofil dalam dan oleh Komponen Pangan Di Dalam : Prosiding Seminar Radikal Bebas dan Sistem Pangan*. Reaksi Biomolekul, Dampak terhadap Kesehatan dan Penangkalnya

Kerjasama Pusat Studi Pangan dan Gizi IPB dengan Kedutaan Besar Perancis, Jakarta. Zakaria (ed) 4 april 1996, Bogor.