

Pengaruh Ekstrak Kulit dan Jus Buah Delima Putih (*Punica granatum L.*) Terhadap Titer Antibodi Ayam Kampung Super yang Divaksin *Newcastle Disease*

(EFFECT OF WHITE POMEGRANATE (*Punica granatum l.*) SKIN EXTRACT AND JUICE ON KAMPUNG SUPER CHICKEN ANTIBODY TITER VACCINATED BY NEWCASTLE DISEASE)

Anlisia Rahmawati^{1*}, Nanik Sianita Wijaya², Muhammad Thohawi Elziyad Purnama³, Jola Rahmahani², Aditya Yudhana⁴, Maya Nurwartanti Yunita⁵

¹Bachelor of Veterinary Medicine,

²Department of Veterinary Microbiology,

³Department of Veterinary Anatomy,

⁴Department of Parasitology,

⁵Department of Pathology,

Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga,
UNAIR C-Campus Mulyorejo, Surabaya, Jawa Timur, Indonesia, 60115
Telp. (031)5993016, Fax. (031)5993015

*Corresponding author: anlisia.rahmawati-2014@fkh.unair.ac.id

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak kulit dan buah delima terhadap titer antibodi ayam kampung super yang divaksin *Newcastle Disease*. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Sampel terdiri dari 40 ekor ayam kampung super yang dibagi acak menjadi 4 kelompok perlakuan. Perlakuan yang diberikan adalah K- tidak divaksin. K+, P1 dan P2 divaksin dengan ND Lasota. Kemudian setelah titer antibodi ayam rendah, K- diberikan aquadest steril, K+ diberikan CMC-Na 0,5 %, P1 diberikan ekstrak kulit delima (200 mg/kg BB), P2 diberikan jus buah delima (3 ml/kg BB). Sampel berupa serum di uji HI untuk mengetahui titer antibodi. Hasil rata-rata jumlah titer antibodi uji pertama pada K- yaitu (log 2) 1,10^a±0,994, pada K+ yaitu (log 2) 4,60^b±0,699, pada P1 yaitu (log 2) 5,90^c±0,876, dan pada P2 yaitu (log 2) 7,20^d±0,632. Dan pada uji kedua pada K- yaitu (log 2) 0,20^a±0,422, pada K+ yaitu (log 2) 4,90^b±0,876, pada P1 yaitu (log 2) 6,50^c±0,707, dan pada P2 yaitu (log 2) 8,00^d±0,816. Ada perbedaan yang nyata mengenai peningkatan titer antibodi pada masing-masing perlakuan. Berdasarkan hasil dapat disimpulkan bahwa ada pengaruh ekstrak kulit dan jus buah delima terhadap titer antibodi ayam kampung super yang divaksin *Newcastle Disease*. Penelitian disarankan untuk menggunakan jus buah delima karena lebih efektif.

Kata kunci: buah Delima Putih. *Punica granatum L.*, *Newcastle Disease*, titer antibodi

Abstract

This study aimed to determine the effect of peel extract and pomegranate juice on antibody titer of kampung super chicken vaccinated by Newcastle Disease. This study used a completely random design (CRD). The sample consisted of 40 kampung super chicken were randomized into four treatment groups. K- treatments were not vaccinated. K+, P1 and P2 vaccinated with ND Lasota. Then, after antibody titer is low, K- was given with sterile distilled water, K+ given with 0.5% CMC-Na, P1 given peel extract (200 mg/kg BB), P2 given with pomegranate juice (3 ml/kg BB). Samples of serum in HI test to determine antibody titer. Result obtained the average number of antibody titers in the first test for the K- is 1,10^a, K+ is 4,60^b, in P1 is 5,90^c, and P2 is 7,20^d. On the second test of antibody titer of K- is 0,20^a, K+ is 4,90^b, in P1 is 6,50^c, and P2 is 8,00^d. There was significant differences regarding an increase of antibody titer in each treatment. Based on the results it can be concluded that there was an influence of peel extract and pomegranate juice to kampung super chicken antibody titers vaccinated by Newcastle Disease. It is suggested to used pomegranate juice because it is more effective to increase antibody.

Key words: white pomegranate, *Punica granatum L.*, *Newcastle Disease*, antibody titers

PENDAHULUAN

Newcastle Disease (ND) merupakan salah satu penyakit infeksius yang penting dalam industri perunggasan. *Newcastle Disease* dilaporkan sebagai penyakit endemis sejak tahun 1926 yang terjadi di beberapa negara di dunia termasuk Indonesia. *Newcastle Disease* menyebabkan kerugian yang sangat signifikan terhadap perekonomian di bidang perunggasan karena angka morbiditas dan angka mortalitas mencapai 100%. Peternakan unggas yang terserang penyakit *Newcastle Disease* juga berpengaruh terhadap penurunan produksi unggas (Ojok dan Brown, 1996; Aldous et al., 2003; Leuck et al., 2004).

Penyakit ND yang disebabkan oleh avian paramyxovirus dapat menginfeksi lebih dari 200 spesies unggas tetapi tingkat keparahan bervariasi tergantung dari inang dan strain virus. Strain velogenik tipe Asia sering menimbulkan wabah di Indonesia. Strain lentogenik (La Sota, B1, F) dan strain mesogenik (Komarov, Mukteswar, Roakin) dipakai untuk pembuatan vaksin. Ayam mengalami tingkat kepekaan yang paling parah dibandingkan dengan unggas lainnya yaitu kalkun, itik, angsa, dan entok (Tabbu, 2000). Respon kekebalan seluler dan kekebalan humoral berperan penting dalam melawan infeksi avian paramyxovirus (Hewajuli dan Dharmayanti, 2011).

Obat yang efektif untuk pengobatan ayam yang sudah terserang penyakit *Newcastle Disease* sampai saat ini masih belum ada. Pencegahan penyakit *Newcastle Disease* lebih efektif jika dilakukan dengan cara pemberian vaksin (Polana dan Fadilah, 2005). Beberapa jenis tanaman obat dapat menjadi alternatif pencegahan. Tanaman obat di Indonesia pernah dilaporkan memiliki potensi sebagai imunostimulant yakni buah delima putih (*Punica granatum L.*).

Delima putih (*Punica granatum L.*) diketahui mempunyai aktivitas antioksidan yang kuat yakni fenolik, flavonoid dan tanin. Kandungan tanin, alkaloid, glikosida, flavonoid dan senyawa fenolik sebagai antioksidan dalam jus, kulit, dan fraksi biji delima putih

(Hajimahmoodi et al., 2013). Delima putih mempunyai antioksidan kuat yang lebih unggul dari anggur merah dan teh hijau. (Mohammad dan Kashani, 2012).

Buah Delima putih (*Punica granatum L.*) dapat digunakan sebagai imunostimulant. Kandungan yang terdapat pada buah, biji, dan kulit dapat meningkatkan aktivitas imun. Peningkatan aktivitas imun dapat merangsang respon imun humoral yang dibuktikan dengan penghambatan serta meningkatkan migrasi leukosit dan meningkatkan titer antibodi. (Ross et al. 2001). Buah delima putih dapat merangsang produksi imunoglobulin dalam sel-sel pada limpa tikus dan dapat meningkatkan fungsi sel B in vivo (Yamasaki et al. 2006).

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan Penelitian

Sampel penelitian ini adalah 40 ekor ayam kampung super jantan. Alat yang digunakan untuk ekstraksi: corong *butchner*, labu *buchner*, kertas saring, *vacuum pump*, *rotary evaporator*, vial, toples kaca, pengaduk, alumunium foil. Alat yang digunakan untuk keperluan di Kandang: Kandang ayam, kardus, trash bag, tempat pakan, tempat minum, sekam padi, dan gayung. Alat yang digunakan untuk ambil darah dan Uji Hi: spuit 1 cc, spuit 3 cc, needle 27G, microtube, rak microtube, sentrifuse, waterbath, gelas ukur, baker glass, kulkas, *mikropipet* 25 µl dan 50 µl, *mikroplate* bentuk (V), *yellowtip*, baskom, label nama, pinset dan gunting.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah delima, serbuk kulit delima putih, Ayam kampung super, pakan konsentrat, air minum, alas kandang (erbuk padi dan kardus). Vaksin ND live (La Sota), etanol 96%, NaCl fisiologis, antigen ND 4 HA unit, dan eritrosit ayam 0,5 %.

Perlakuan

Ayam diadaptasikan dengan lingkungan selama 4 minggu sambil menunggu titer antibodi rendah, setelah titer antibodi rendah diberi perlakuan selama 35 hari atau 5 minggu.

Vaksinasi dengan ND La Sota dilakukan pada ayam kelompok K+, P1, dan P2 pada musculus pectoralis. Vaksinasi dilakukan dua kali. Vaksinasi pertama dilakukan pada ayam umur 5 minggu, dan vaksinasi kedua dilakukan pada ayam umur 7 minggu. Perlakuan yang dilakukan menurut Sibi dan Varghese (2014) adalah: (K-) Tidak divaksin ND+diberi aquadest steril; (K+) Divaksin ND+diberi CMC Na 0,5%; (P1) Divaksin ND+diberi ekstrak kulit delima putih dengan dosis 200 mg/kg BB; dan (P2) Divaksin ND+diberi jus buah delima putih dengan dosis 3 ml/ kg BB.

Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak kulit delima dapat dilakukan dengan cara memasukkan serbuk kulit delima putih sebanyak 500 gram ke dalam toples kaca dan dituangi etanol 96% sebanyak $\pm 1,5$ liter sampai terendam semua serta dilakukan pengadukan 3 jam sekali dalam waktu 2x24 jam. Larutan ekstrak disaring dengan corong *buchner* dengan menggunakan *vacuum pump*. Kemudian dipindahkan dalam *rotary evaporator* dengan suhu 60°C sampai didapatkan cairan ekstrak menjadi kental dan berwarna kecoklatan. Ekstrak kental didiamkan pada suhu ruang selama ± 2 minggu untuk menguapkan etanol yang terdapat pada ekstrak (Dewi, 2010).

Pembuatan Jus Buah Delima dapat dilakukan dengan cara mengupas kulitnya kemudian mencuci buah dengan air mengalir. Selanjutnya buah dimasukkan dalam *juicer* dan nyalakan. Biji akan terpisah secara otomatis dengan buah. Encerkan jus buah dengan aquadest steril dengan perbandingan 1:3. Kemudian simpan dalam kulkas.

Pengambilan Serum Darah

Pengambilan darah untuk memperoleh serum guna uji HI dilakukan dengan mengambil darah menggunakan spuit secara aseptik lalu darah yang ada didalam spuit tersebut kemudian dimasukkan dalam *microtube* dan didiamkan hingga terjadi pemisahan. Apabila serum darah yang didapatkan kurang jernih maka dilakukan sentrifuge dengan kecepatan 1500 rpm selama 10 menit. Selanjutnya serum diinktivasi

menggunakan waterbath dengan suhu 56°C selama 30 menit. Serum dapat disimpan pada suhu 4°C atau -20°C.

Suspensi eritrosit dengan konsentrasi 0,5% didapatkan dari darah ayam diambil dari *vena brachialis* secukupnya (± 3 ml) kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah diisi dengan EDTA. Darah tersebut kemudian di sentrifuse selama 10 menit dengan kecepatan 1500 rpm, setelah disentrifuse kemudian supernatannya dibuang dan disisakan endapannya. Selanjutnya pencucian terhadap endapan dengan NaCl fisiologis dan disentrifuse kembali selama 10 menit. Setelah terjadi endapan, supernatan dibuang lagi dan dilakukan pencucian lagi dengan NaCl fisiologis diulang sampai 3 kali seperti cara yang ada di atas. Untuk mendapatkan suspensi eritrosit 0,5% sebanyak 100 ml, maka endapan eritrosit murni diambil 0,5 ml kemudian di tambahkan NaCl fisiologis 99,5 ml.

Uji Hemaglutinasi (HA)

Cara titrasi antigen 4 HA Unit sebagai berikut: 1) Mengisi lubang mikroplate dengan 25 μ l NaCl fisiologis mulai dari lubang 1-5 pada baris I dan II (titrasi duplikat); 2) Mengisi lubang 1 baris I dan II dengan antigen; 3) Mencampurkan antigen dan NaCl fisiologis pada lubang 1 dengan cara hisap-tiup, kemudian pindahkan ke lubang berikutnya. Demikian seterusnya sampai dengan lubang 4 dan lubang 5 digunakan sebagai kontrol eritrosit (tanpa antigen); 4) Mengisi semua lubang dengan eritrosit ayam 0,5 % dengan volume 50 μ l. 5) Inkubasi pada suhu kamar selama 30 menit, kemudian dibaca titernya. Bila antigen ND 4 HAU maka hemaglutinasi terjadi pada lubang nomer 1 dan 2. (Ernawati *et al.*, 2013).

Uji Hemaglutinasi Inhibisi (HI)

Metode dari Uji Hemaglutinasi Inhibisi (HI) mikroteknik adalah sebagai berikut: 1) Pada lubang nomer 1 sampai dengan lubang nomer 10 dan 12 dari mikroplate diisi NaCl fisiologis sebanyak 25 μ l; 2) Pada lubang 1 ditambahkan serum yang akan diuji sebanyak 25 μ l; 3) Micropipet di masukkan ke lubang nomor 1

untuk dilakukan mixing, kemudian dilakukan pengenceran secara seri dengan memindahkan micropipet 25 µl dari lubang 1 ke lubang 2 lalu dilakukan pencampuran dan dipindahkan lagi ke lubang ke 3 dan seterusnya sampai lubang nomer 10; 4) Pada lubang nomer 12 digunakan sebagai kontrol serum; 5) Lubang 1 sampai 10 diisi antigen 4 HAU sebanyak 25 µl lalu di inkubasi selama 30 menit pada suhu kamar; 6) Pada lubang 1 sampai lubang 10 dan 12 ditambahkan eritrosit ayam 0,5% sebanyak 50 µl. kemudian microplate digoyangkan secara perlahan lalu dibiarkan selama 30 menit atau sampai kontrol eritrosit dapat dibaca. Hambatan hemaglutinasi sempurna (100%) adalah terjadinya

pengendapan eritrosit pada dasar lubang microplate yang terlihat seperti pada kontrol. Titer antiserum adalah kebalikan dari pengenceran tertinggi antiserum yang masih mampu menghambat aglutinasi dengan sempurna (Ernawati *et al.*, 2013).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji HI dilakukan untuk analisa statistik kemudian dilakukan uji dengan *Analysis of Variance* satu arah (*one way ANOVA*). Jika terdapat perbedaan yang nyata dilanjutkan dengan uji Duncan. Hasil disajikan dalam tabel 1.

Tabel 1. Hasil analisa statistik rata-rata titer antibodi ayam umur 7 dan 9 minggu

Perlakuan	Titer Antibodi (log 2) Mean±SD	
	7 minggu	9 minggu
K-	1,10 ^a ±0,994	0,20 ^a ±0,422
K+	4,60 ^b ±0,699	4,90 ^b ±0,876
P1	5,90 ^c ±0,876	6,50 ^c ±0,707
P2	7,20 ^d ±0,632	8,00 ^d ±0,816

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antar perlakuan ($p < 0,05$)

Deteksi titer antibodi yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan uji HI. Prinsip uji HI adalah terdapat hambatan aglutinasi sel darah merah oleh virus akibat terikatnya virus dengan antibodi spesifik. Oleh sebab itu, uji HI hanya bisa digunakan untuk virus yang dapat mengaglutinasi sel darah merah. Virus *paramyxoviridae* merupakan virus penyebab penyakit *Newcastle Disease* yang mempunyai sifat dapat mengaglutinasi sel darah merah. (Ernawati *et al.*, 2013).

Senyawa khas pada buah delima putih (*Punica granatum L.*) yakni ellagitannin, granatin A, dan granatin B. Granatin merupakan salah satu bentuk senyawa dari ellagitannin yang terdapat dalam buah delima putih (*Punica granatum L.*). Granatin terbagi menjadi 2 yakni granatin A dan granatin B. Granatin A terdapat pada kulit buah dan granatin B terdapat dalam buah delima (Romeo *et al.*, 2015).

Mekanisme pembentukan imun dalam tubuh ayam dilakukan oleh sistem imun humoral yakni

limfosit B (sel B). Sel B berkembang dalam bursa fabrisius, yang timbul dari epitel kloaka. Setelah matang, sel B bergerak ke alat-alat seperti limpa, kelenjar limfoid dan tonsil. Atas pengaruh antigen melalui sel T, sel B berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel plasma yang mampu membentuk dan melepas Ig dengan spesifitas yang sama seperti reseptor yang ada pada permukaan sel prekusornya. Sebagian sel yang dibentuk akan kembali ke dalam fase istirahat. Sel B yang matang sebagai sel B memori dapat memberikan respon imun yang lebih cepat. Sel B merupakan 5-15% dari jumlah seluruh limfosit dalam sirkulasi. Dungsi utamanya ialah memproduksi antibodi (Tizard, 1988).

Pada ayam yang tidak divaksin (K-) mengalami penurunan pada uji HI pada umur 9 minggu (2 minggu setelah vaksinasi kedua). K- merupakan ayam kampung super yang tidak divaksin dan diberi aquadest steril. Penurunan titer antibodi yang terjadi pada kelompok K-

disebabkan oleh menurunnya titer antibodi maternal dalam tubuh ayam. Hal ini sesuai dengan pernyataan Indriani dan Darmiento (2000) yakni antibodi asal induk ayam (maternal) akan turun secara linier seiring bertambahnya umur ayam.

Pengaruh ekstrak kulit dan jus buah delima putih terhadap titer antibodi sesuai dengan pendapat Sibi dan Varghese, (2014) yang menyatakan bahwa penelitian secara laboratoris kandungan senyawa flavonoid dapat meningkatkan proliferasi dan diferensiasi limfosit B dan limfosit T.

Ekstrak Kulit dan buah delima putih memiliki kandungan yang sama tetapi berbeda pada persentase kandungannya. Pada uji aktivitas antioksidan (DPPH) pada buah delima putih menyatakan bahwa kandungan pada buah delima putih jauh lebih baik daripada ekstrak kulit delima putih. Hal ini sesuai dengan pernyataan Mootal dan Shaker (2011). Sehingga titer antibodi pada jus buah delima putih memiliki titer antibodi yang lebih tinggi daripada ekstrak kulit delima putih.

Faktor pendukung yang dapat membantu peningkatan titer antibodi diantaranya yaitu pemenuhan kebutuhan pakan, sistem pemeliharaan yang baik, vaksinasi, dan faktor lingkungan. Faktor-faktor tersebut merupakan kesatuan sistem. Apabila salah satu faktor terabaikan maka penanganan terhadap faktor yang lain tidak dapat memberikan hasil yang maksimal (Chopra dan Robert, 2001).

KESIMPULAN

Ekstrak kulit dan jus buah delima putih (*Punica granatum L.*) dapat meningkatkan titer antibodi ayam kampung super yang divaksin ND. Terdapat perbedaan yang nyata antara pemberian ekstrak kulit dan jus buah delima putih (*Punica granatum L.*) terhadap peningkatan titer antibodi ayam kampung super yang divaksin ND.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada kedua orang tua yang telah membiayai penelitian dan Prodi Kedokteran Hewan PSDKU Banyuwangi Universitas Airlangga atas fasilitas penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Aldous, E.W., J.K. Myno, J. Bank dan D.J. Alexander. 2003. A Molecular Epidemiological Study of Avian Paramyxovirus Tipe 1 (*Newcastle Disease Virus*) Isolates by Phylogenetic Analysis of A Partial Nucleotide Sequence of The Fusion Protein Gene. *Avian pathology*, 32(3): 239-257.
- Chopra, I. dan M. Robert. 2001. Tetracycline Antibiotic : mode in action, application, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistances. *Microbiol Mol Biol rev*, 62: 232-260.
- Dewi, F.K. 2010. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* Linnaeus) Terhadap Bakteri Pembusuk Daging Segar. Surakarta: Fakultas MIPA, Universitas Sebelas Maret Surakarta.
- Ernawati, R., A.P. Rahardjo, N. Sianita, J. Rahmahani, F.A. Rantam, dan Suwarno. 2013. Petunjuk Praktikum Pemeriksaan Virologik dan Serologik. Laboratorium Virologi dan Imunologi. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Hal.31.
- Hajimahmoodi, M., G. Moghaddam, A.M. Ranjbar, H. Khazani, N. Sadeghi, M.R. Oveisi, B. Jannat. 2013. Total Phenolic, Flavonoids, Tannin Content and Antioxidant Power of Some Iranian Pomegranate Flower Cultivars (*Punica granatum L.*). *Am J Plant Sci*, 4(09): 1815.
- Hewajuli, D.A. dan N.L.P.I. Dharmayanti. 2011. Patogenitas Virus Newcastle Disease Pada

- Ayam. Bogor: Balai Besar Penelitian Veteriner. *Wartazoa*, 21(2): 72-80.
- Indriani, R. Dan Darminto. 2000. Penyakit Infectious Bronchitis pada ayam dan cara mengendalikannya. *Wartazoa*, 5(2): 65-72.
- Leuck, D., M. Haley, and D. Harvey. 2004. US 2003 and 2004 Livestock and Poultry Trade Influenced by Animal Disease and Trade Restrictions. US Department of Agriculture, Economic Research Service.
- Mohammad, S.M., H.H. Kashani. 2012. Chemical composition of the plant *Punica granatum L.* (Pomegranate) and its effect on heart and cancer. *J Med Plants Res*, 6(40): 5306-5310.
- Motaal, A.A. and S. Shaker. 2011. Anticancer and Antioxidant Activities of Standardized Whole Fruit, Pulp, and Peel Extracts of Egyptian Pomegranate. *J Open Conf Proceed*, 2: 41-44.
- Ojok, L. and C. Brown. 1996. An Immunohistochemical Study of the Pathogenesis of Virulent Viscerotropic Newcastle Disease in Chickens. *J Comp Pathol*, 115: 221-227.
- Polana, A. dan R. Fadilah. 2005. Aneka Penyakit pada Ayam dan Cara Mengatasinya. Bandung : Agro Media Pustaka. Hal.14.
- Romeo, F.V., G. Ballistreri, S. Fabroni, S. Pangallo, M.G.L.D. Nicosia, L. Schena, and P. Rapisarda. 2015. Chemical characterization of different sumac and pomegranate extracts effective against *Botrytis cinerea* rots. *Molecules*, 20(7): 11941-11958.
- Ross, R.G., S. Selvasubramanian, S. Jayasundar. 2001. Immunomodulatory activity of *Punica granatum* in rabbits-a preliminary study. *J Ethnopharmacol*, 78(1): 85-87.
- Sibi, P.I. and P. Varghese. 2014. Evaluation of In Vivo Immunomodulatory Activity of *Punica Granatum Linn.* India. *J Res Ayuwerda Pharm*, 5(2): 175-178.
- Tabbu, C.R. 2000. Penyakit Ayam dan Penanggulangannya; Penyakit Bakterial, Mikal dan Viral. Volume I. Kanisius. Yogyakarta. Hal.232-244.
- Tizard. 1988. Pengantar Immunologi Veteriner. Airlangga University Press Surabaya. Hal.8-9.
- Yamasaki M., T. Kitagawa, and N. Koyanagi. 2006. Dietary Effect of Pomegranate Seed Oil on Immune Function and Lipid Metabolism in Mice. *Nutrition*, 22(1): 54-59.
