

**TERAPI EKSTRAK ETANOL KULIT BIJI (*PERICARP*)
JAMBU METE (*Anacardium occidentale*) TERHADAP
GAMBARAN HISTOPATOLOGI DAN AKTIVITAS
AMILASE ILEUM TIKUS (*Rattus norvegicus*)
HASIL INFEKSI *Salmonella* sp.**

SKRIPSI

Oleh:

TAUFIQ TRIHADI UTOMO

115130100111061



PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN

PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2015

**TERAPI EKSTRAK ETANOL KULIT BIJI (*PERICARP*)
JAMBU METE (*Anacardium occidentale*) TERHADAP
GAMBARAN HISTOPATOLOGI DAN AKTIVITAS
AMILASE ILEUM TIKUS (*Rattus norvegicus*)
HASIL INFEKSI *Salmonella sp.***

SKRIPSI

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan**

Oleh:

TAUFIQ TRIHADI UTOMO

115130100111061



PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN

PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2015

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**TERAPI EKSTRAK ETANOL KULIT BIJI (*PERICARP*) JAMBU METE
(*Anacardium occidentale*) TERHADAP GAMBARAN HISTOPATOLOGI
DAN AKTIVITAS AMILASE TIKUS (*Rattus norvegicus*)
HASIL INFEKSI *Salmonella sp.***

Oleh:
TAUFIQ TRIHADI UTOMO
115130100111061

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 14 Agustus 2015
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 198802 2 001

Dyah Kinasih Wuragil S.Si.,MP.,M.Sc
NIP. 19820914 200912 2 004

Mengetahui,
Ketua Program Studi Kedokteran Hewan
Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : TAUFIQ TRIHADI UTOMO

NIM : 115130100111061

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

TERAPI EKSTRAK ETANOL KULIT BIJI (*PERICARP*)
JAMBU METE (*Anacardium occidentale*) TERHADAP
GAMBARAN HISTOPATOLOGI ILEUM TIKUS (*Rattus*
norvegicus) DAN AKTIVITAS AMILASE ILEUM TIKUS
HASIL INFEKSI *Salmonella sp.*”

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila di kemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 18 Agustus 2015

Yang menyatakan,

Taufiq Trihadi Utomo
NIM. 115130100111061

TERAPI EKSTRAK ETANOL KULIT BIJI (*PERICARP*) JAMBU METE
(*Anacardium occidentale*) TERHADAP GAMBARAN HISTOPATOLOGI
DAN AKTIVITAS AMILASE ILEUM TIKUS (*Rattus norvegicus*)
HASIL INFEKSI *Salmonella sp.*

ABSTRAK

Salmonella sp. merupakan bakteri Gram negative penyebab salmonellosis yang dapat menginfeksi hewan maupun manusia dan menyebabkan gangguan saluran pencernaan atau gastroenteritis, khususnya pada ileum. Ekstrak ethanol kulit biji (*Pericarp*) jambu mete (*Anacardium occidentale*) mengandung senyawa fenol asam anakardat yang berfungsi sebagai antibakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi ekstrak ethanol kulit biji jambu mete pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinfeksi *Salmonella sp.* Terhadap histopatologi dan aktivitas amilase ileum. Penelitian ini menggunakan tikus betina yang dibagi dalam 4 kelompok yaitu kelompok A adalah kelompok tikus kontrol, kelompok B adalah kelompok tikus salmonellosis, kelompok C dan D adalah kelompok tikus salmonellosis dan mendapat terapi kulit biji jambu mete 50mg/kg BB, dan 100 mg/kg BB. Infeksi *Salmonella sp.* Diberikan satu kali secara per oral dosis 10^8 cfu/ml/tikus. Aktivitas amylase diukur menggunakan metode Somogyi-Nelson sedangkan gambaran histopatologi ileum diamati secara kualitatif menggunakan mikroskop. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terapi ekstrak ethanol kulit biji jambu mete dapat memperbaiki vili-vili dan sel epitel kolumnar pada histopatologi ileum. Pemberian terapi berpengaruh signifikan terhadap aktivitas amilase ($p < 0,05$). Pemberian dosis 100 mg/kg BB menunjukkan penurunan aktivitas amilase sebesar 60,2%. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa terapi ekstrak ethanol kulit biji jambu mete berpotensi sebagai bahan terapi salmonellosis.

Kata kunci: *Salmonella sp.*, kulit biji jambu mete, histopatologi ileum, amilase.

repository.ub.ac.id

THE ETHANOLIC EXTRACT OF CASHEWS (*Anacardium occidentale*) NUT SHELL (*PERICARP*) EFFECT ON HISTOPATHOLOGY AND AMYLASE ACTIVITY OF ILEUM ON RATS (*Rattus norvegicus*) INFECTED BY *Salmonella Sp.*

ABSTRACT

Salmonella sp. is a Gram negative bacteria that causes salmonellosis in animals and human. It causes gastrointestinal disorders or gastroenteritis, especially in the ileum. The ethanolic extract of Cashew (*Anacardium occidentale*) nut shell (*Pericarp*) contains phenolic anacardic acid which acts as an antibacterial. This study aimed to determine the potential of ethanol extract of cashew nut shell in rats (*Rattus norvegicus*) infected by *Salmonella sp.* based on histopathology changes and amylase activity of ileum. This study used female rats which were divided into 4 groups; group A was group of control, group B was group of salmonellosis, groups C and D were group of salmonellosis and got the cashew nut shell therapy 50 mg/kg, and 100 mg/kg, respectively the infection of *Salmonella sp.* was given single dose of 10^8 cfu/m/rat PO. Amylase activity was measured using Somogyi-Nelson method while histopathology alteration of ileum observed using a microscope. The results showed that the ethanolic extract of cashew nut shell therapy could repair villi and epithelial columnar cell in ileum. This therapy resulted significantly effect on amylase activity ($p < 0.05$). Dose of 100 mg/kg showed decrease of amylase activity up to 60,2%. It was concluded that the ethanolic extract of cashew nut shell therapy has potential as therapeutic agent for salmonellosis.

Keywords: *Salmonella sp.*, cashew nut shell, histopathology ileum, amylase.

KATA PENGANTAR

Puji syukur alhamdulillah penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan Rahmat, Berkah Karunia dan Izin-Nya sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik. Shalawat dan salam kepada Nabi Muhammad SAW beserta keluarga, sahabat dan umatnya yang setia mengikuti ajarannya hingga akhir zaman.

Penelitian dengan judul “TERAPI EKSTRAK ETANOL KULIT BIJI (*PERICARP*) JAMBU METE (*Anacardium occidentale*) TERHADAP GAMBARAN HISTOPATOLOGI ILEUM TIKUS (*Rattus norvegicus*) DAN AKTIVITAS AMILASE ILEUM TIKUS HASIL INFEKSI *Salmonella sp.*” yang merupakan salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan Sarjana di Program Studi Kedokteran Hewan di Program Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya.

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada semua pihak yang telah membantu dalam penulisan skripsi ini, terutama kepada:

1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Dosen Pembimbing I yang telah memberikan kritik dan saran dalam penelitian dan penulisan skripsi serta bantuan dalam memberikan payung dosen sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian ini.
2. Ibu Dyah Kinasih Wuragil, S.Si., MP., M.Sc selaku Dosen Pembimbing II sekaligus dosen pembimbing akademik penulis yang telah memberikan kritik dan saran serta selalu memberi semangat dalam penelitian dan penulisan skripsi ini.
3. drh. Handayu Untari dan drh. Ani Setianingrum selaku dosen penguji yang telah memberikan nasihat, kritik dan saran dalam penulisan skripsi ini.
4. Dr. Agung Pramana Warih selaku Ketua Program Studi Pendidikan Kedokteran Hewan yang selalu memberikan dukungan demi kemajuan PKH UB tercinta.

5. Keluarga tercinta penulis, Bapak Muhadi dan Ibu Rukiyani yang senantiasa memberikan dorongan dan dukungan baik secara materi, semangat, dan doa yang tiada henti demi keberhasilan putra-putrinya. Mbak Ulfa dan Mas Putra yang telah memberikan dukungan semangat, dan doa yang selalu mengalir tanpa henti sehingga penulis mampu menyelesaikan studi.
6. Tim Penelitian CNSL “Sisil, Nela, Noni, Galih” atas inspirasi, kegembiraan dan semangat yang diberikan sehingga penelitian ini terselesaikan.
7. Mbak Reva, Mbak Vivi, dan Pak Mar yang telah membantu dalam penelitian ini sehingga dapat berjalan dengan lancar.
8. Teman-temanku semua kelas 2011C atas kekompakan, kebersamaan yang tiada duanya, dan dukungan selama empat tahun ini.
9. Kepada pengurus BEM Kooperatif 2013/2014, BEM Perspective 2014/2015, kakak tingkat 2010, rekan-rekan 2011, adek tingkat 2012, dan juga grup bermain 4sehat 5sempurna, KUPU, dan pejuang subuh serta teman-teman seperjuangan lain yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu terima kasih atas segala perhatian, dorongan, motivasi, bantuannya dan doa yang telah diberikan kepada penulis.
10. Semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan penulisan skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Akhir kata, penulis sampaikan terima kasih banyak. Penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan dan ketulusan yang telah diberikan. Semoga Tugas Akhir ini dapat bermanfaat dan menambah ilmu pengetahuan, tidak hanya pada penulis melainkan kepada pembaca.

Malang, Agustus 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
LEMBAR PERNYATAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Penelitian	3
1.4 Tujuan Penelitian	5
1.5 Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 <i>Salmonella sp.</i>	6
2.2 Salmonellosis	7
2.2.1 Patogenesa	7
2.3 Tikus Putih	9
2.4 Histologi Usus Halus	10
2.5 Enzim Amilase	11
2.6 Jambu Mete (<i>Anacardium occidentale</i>)	13
2.6.1 Taksonomi dan Morfologi	13
2.6.2 Kandungan dan Manfaat.....	14
BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
3.1 Kerangka Konsep Penelitian	16
3.2 Hipotesis Penelitian.....	17
BAB IV METODE PENELITIAN	19
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	19
4.2 Sample Penelitian	19
4.3 Rancangan Penelitian	20
4.4 Variabel Penelitian	20
4.5 Materi Penelitian	21
4.6 Tahapan Penelitian	21
4.6.1 Persiapan Hewan Coba	21
4.6.2 Pembuatan Sediaan Ekstrak Etanol Kulit Biji Jambu Mete.....	22
4.6.3 Dosis Ekstrak Kulit Biji Jambu Mete	22
4.6.4 Identifikasi <i>Salmonella sp.</i>	23
4.6.5 Penentuan Kurva Pertumbuhan.....	23

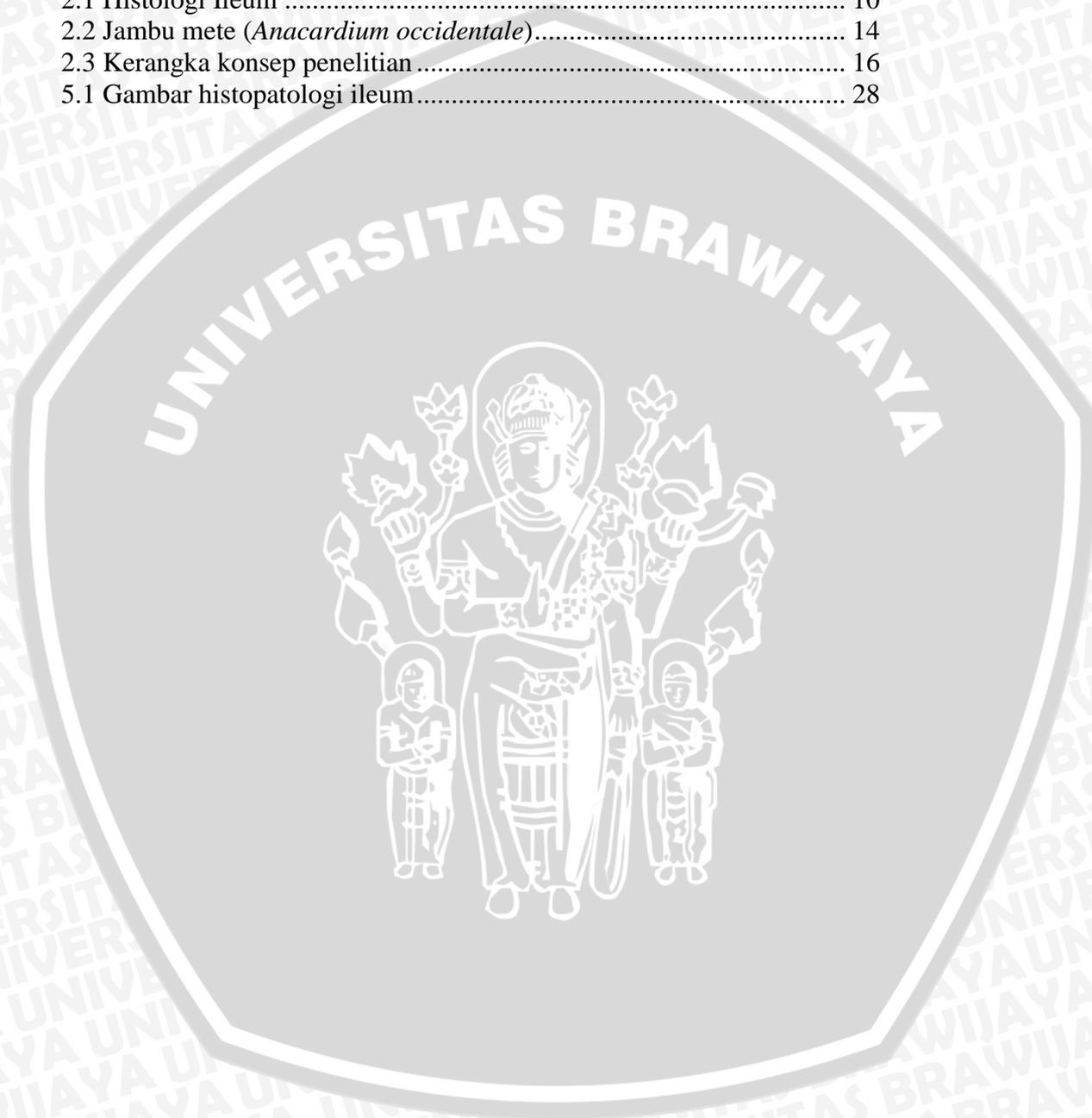


<i>Salmonella sp.</i>	24
4.6.6 Infeksi <i>Salmonella sp.</i> Pada Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	24
4.6.7 Terapi Tikus dengan Ekstrak Etanol Kulit Biji Jambu Mete.....	24
4.6.8 Tata laksana Pengambilan Organ Ileum dan Pembuatan Preparat Histopatologi	24
4.6.9 Pengamatan Histologis.....	25
4.6.10 Isolasi Amilase	25
4.6.11 Pengukuran Aktivitas Amilase.....	25
4.6.11.1 Pembuatan kurva standar glukosa	26
4.6.11.2 Pengukuran aktivitas amilase	26
4.7 Analisa Data	27
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	28
5.1 Gambaran histopatologi ileum	28
5.2 Aktifitas amilase.....	32
BAB VI PENUTUP	37
6.1 Kesimpulan	37
6.2 Saran.....	37
DAFTAR PUSTAKA	38
LAMPIRAN	41



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Histologi Ileum	10
2.2 Jambu mete (<i>Anacardium occidentale</i>).....	14
2.3 Kerangka konsep penelitian	16
5.1 Gambar histopatologi ileum.....	28



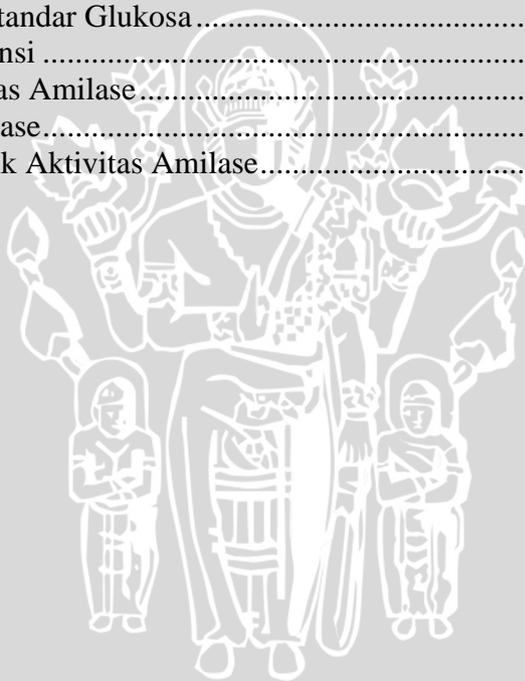
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Rancangan Penelitian	21
5.1 Aktifitas amilase ileum tikus perlakuan	33



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Keterangan Laik Etik	42
2. Hasil determinasi Kulit Biji Jambu Mete.....	43
3. Hasil Uji FTIR.	44
4. Skema Kerja Penelitian	45
5. Perhitungan Dosis	46
6. Uji Biokimia <i>Salmonella sp.</i>	47
7. Hasil Uji Konfirmasi <i>Salmonella sp.</i>	50
8. Monitoring tikus.....	51
8. Perhitungan pertumbuhan <i>Salmonella sp.</i>	53
9. Langkah pembuatan preparat histologi	54
10. Langkah Pengukuran Aktivitas Amilase	56
11. Pembuatan Kurva Standar Glukosa	58
12. Tabel Data Absorbansi	60
13. Perhitungan Aktivitas Amilase	61
14. Data Aktivitas Amilase.....	62
15. Data dan Uji Statistik Aktivitas Amilase.....	64



DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN

Simbol/Singkatan	Keterangan
CNSL	<i>Cashew NutShell Liquid</i>
ANOVA	Analisis of Variant
BNJ	Beda Nyata Jujur
<i>Ad libitum</i>	TidakTerbatas
RAL	Rancangan Acak Lengkap
Cfu	<i>Colony forming unit</i>
<i>Sp.</i>	<i>Spesies</i>
μl	Mikroliter
OD	<i>Optical Density</i>
TSIA	<i>Triple Sugar Iron Agar</i>
MR	<i>Methyl Red</i>
Rpm	<i>Rotation per minute</i>
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i>
Th	<i>T helper</i>
IFN	Interferon
IL	Interlekuin
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
MHC	Major Histocompatibility Complex
Ig	Imunoglobulin
LPS	Lipopolisakarida
HE	Hematoksilin-Eosin
NaCl	Natrium Clorida
PBS	Phospate Buffer Saline
PFA	Paraformaldehid

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Salmonella sp. merupakan salah satu penyebab infeksi yang sering dijumpai pada hewan dan manusia. Penyakit yang disebabkan oleh *Salmonella sp.* disebut salmonellosis. Infeksi *Salmonella sp.* pada manusia dan hewan dapat mengakibatkan penyakit dengan gangguan pada bagian saluran pencernaan atau gastroenteritis. Seperti halnya semua bakteri basil enterik, *Salmonella sp.* menghasilkan endotoksin berupa senyawa lipopolisakarida (LPS) yang dihasilkan dari lisisnya sel bakteri dan merupakan faktor virulensi utama pada sel inang.

Salmonella sp. bersifat patogen enterik dan penyebab utama *foodborne disease* (Klotchko, 2011). *Salmonella sp.* juga berperan penting dalam penyakit zoonosis di dunia, dimana selama beberapa dekade terakhir ini indikasi infeksi gastroenteritis yang disebabkan *Salmonella sp.* terus meningkat. Patogenesis dari *Salmonella sp.* yaitu masuk secara oral yang akan menembus epitel intestinal menyebabkan terjadinya pergerakan sel fagosit ke tempat infeksi untuk mengeliminasi *Salmonella sp.* di usus halus, jika sel fagosit tidak mampu melawan maka *Salmonella sp.* akan berkolonisasi di usus halus. Bakteri ini akan berkembang biak di dalam alat pencernaan penderita, sehingga terjadi radang usus (enteritis).

Inflamsi usus dan penghancuran lamina propria alat pencernaan oleh proliferasi *Salmonella sp.* inilah yang menimbulkan diare, karena *Salmonella sp.* menghasilkan racun yang disebut endotoksin (Dharmojo, 2001). Usus

halus merupakan bagian dari saluran pencernaan yang terletak di antara lambung dan usus besar (Guyton *et al.*, 2006). Infeksi *Salmonella sp.* sangat beresiko menyerang organ usus halus khususnya ileum, dimana infeksi dari *Salmonella sp.* dapat mengakibatkan banyak kasus dalam saluran pencernaan, seperti *S.pullorum*, *S.thyphoid*, dan juga *S.enteritidis*.

Penyakit-penyakit tersebut terjadi akibat adanya inflamasi pada usus halus yang menyebabkan tidak optimalnya proses metabolisme lemak, protein, dan karbohidrat pada saluran cerna khususnya di ileum. Gangguan pencernaan karbohidrat sangat dipengaruhi oleh aktivitas enzim karbohidrase dan salah satunya adalah amilase. Amilase adalah enzim pemecah karbohidrat dari bentuk kompleks menjadi bentuk yang lebih sederhana, contohnya adalah pati dan glikogen yang dipecah menjadi maltosa, maltotriosa atau oligosakarida. Enzim ini terdapat dalam air liur (ptialin) dan getah pankreas yang membantu pencernaan karbohidrat dalam makanan (Reddy *et al.*, 2000). Peningkatan enzim ini dapat mengindikasikan adanya inflamasi yang terjadi pada usus.

Penggunaan antibiotik sebagai terapi dalam membunuh bakteri yang berlebihan dapat beresiko menimbulkan residu yang ditinggalkan, sehingga diperlukan adanya alternatif yang berasal dari bahan alami. Salah satu alternatif bahan alami untuk mencegah infeksi *Salmonella sp.* adalah dengan penggunaan ekstrak etanol dari kulit biji (*Pericarp*) jambu mete (*Anacardium Occidentale*). Kulit biji (*Pericarp*) jambu mete (*Anacardium occidentale*) memiliki kandungan asam anakardat yang memiliki efek sebagai antibakteri

dengan bekerja sebagai surfaktan yang dapat merusak dinding sel bakteri (Kubo *et al.*, 2003).

Berdasarkan latar belakang di atas, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui tingkat efektifitas dari ekstrak etanol kulit biji (*pericarp*) jambu mete (*Anacardium occidentale*) yang digunakan sebagai antibiotika alami dalam menghambat infeksi *Salmonella sp.* sehingga tidak terjadi kerusakan pada ileum dan peningkatan aktivitas amilase.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang diuraikan peneliti dapat ditarik rumusan masalah sebagai berikut:

1. Apakah ekstrak etanol kulit biji (*Pericarp*) jambu mete (*Anacardium occidentale*) dapat memperbaiki kerusakan histopatologi ileum tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinfeksi *Salmonella sp* ?
2. Apakah ekstrak etanol kulit biji (*Pericarp*) jambu mete (*Anacardium occidentale*) dapat menurunkan aktivitas amilase pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinfeksi *Salmonella sp* ?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka penelitian ini dibatasi pada :

1. Hewan yang digunakan yaitu tikus (*Rattus norvegicus*) betina strain Wistar yang didapat dari UPHP UGM Yogyakarta, pada umur 8-12 minggu dengan berat badan antara 150-250 gram. Penggunaan hewan

coba sudah mendapatkan persetujuan laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya No:284-KEP-UB.

2. Hewan model dibuat dengan menginfeksi *Salmonella sp.* secara peroral dengan dosis 10^8 cfu/ml/ekor. Infeksi dilakukan 1 kali dengan masa inkubasi 3 hari (Havelaar *et al.*, 2010).
3. Kulit biji (*pericarp*) jambu mete (*Anacardium occidentale*) diperoleh dari perkebunan jambu mete di Yogyakarta. Kulit biji (*pericarp*) jambu mete (*Anacardium occidentale*) diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol di Laboratorium Kimia Politeknik Negeri Malang. Determinasi spesies dan kandungan bahan aktif dilakukan di UPT Materia Medika Batu, Malang. Uj FTIR di Laboratorium Kimia FMIPA Brawijaya.
4. Terapi ekstrak kulit biji (*pericarp*) jambu mete (*Anacardium occidentale*) dilakukan dengan pemberian dosis 50 dan 100 mg/kg BB secara per oral selama 14 hari.
5. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah gambaran histopatologi ileum berupa bentukan vili, sel epitel, dan lamina propria secara kualitatif menggunakan mikroskop dan aktivitas amilase menggunakan metode *Somogyi-Nelson*.

1.4 Tujuan Penelitian

Sesuai dengan masalah yang dirumuskan, maka penulisan ini bertujuan yaitu sebagai berikut:

1. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol kulit biji jambu mete terhadap perbaikan histopatologi ileum *Rattus norvegicus* yang di infeksi *Salmonella sp.*
2. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol kulit biji jambu mete terhadap penurunan aktivitas amilase *Rattus norvegicus* yang di infeksi *Salmonella sp.*

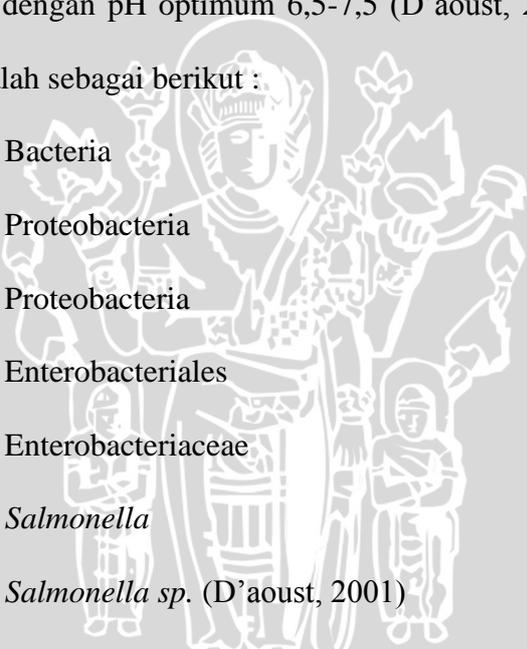
1.5 Manfaat Penelitian

Melalui penelitian ini dapat dibuktikan potensi dari ekstrak etanol kulit biji (*Pericarp*) jambu mete (*Anacardium occidentale*) sebagai terapi pada tikus (*Rattus norvegicus*) dalam menghambat pertumbuhan *Salmonella sp.* berdasarkan gambaran histopatologi ileum dan aktivitas amilase.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Salmonella sp.*

Salmonella sp. adalah bakteri Gram negatif berukuran 1-2 μm , dengan flagella petritika (Brooks, 2004). *Salmonella sp.* merupakan bakteri anaerob fakultatif yang temperatur pertumbuhan optimumnya pada 38°C. *Salmonella sp.* dapat tumbuh pada aktivitas air yang rendah ($a_w \leq 0,93$) yang responnya tergantung strain dan jenis pangan. *Salmonella sp.* dapat tumbuh pada pH 3,6 –9,5 dengan pH optimum 6,5-7,5 (D'aoust, 2001). Taksonomi *Salmonella sp.* adalah sebagai berikut :



Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Proteobacteria
Class	: Proteobacteria
Ordo	: Enterobacteriales
Family	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Salmonella</i>
Spesies	: <i>Salmonella sp.</i> (D'aoust, 2001)

Salmonella sp. diklasifikasikan dalam grup sesuai dengan klasifikasi berdasarkan pada antigen badan somatik O (ohne) dan antigen flagel H (hauch). Genus ini mempunyai struktur antigen yang tidak stabil dan dapat mengalami perubahan sewaktu-waktu. *Salmonella sp.* adalah penyebab utama dari penyakit yang disebarkan melalui makanan (*foodborne diseases*) sehingga menyebabkan penyakit pada organ pencernaan. Penderita yang mengalami salmonellosis dapat menunjukkan beberapa gejala seperti diare,

keram perut, dan demam dalam waktu 8-72 jam setelah mengonsumsi makanan yang terkontaminasi oleh *Salmonella*. Gejala lainnya adalah demam, sakit kepala, mual dan muntah-muntah (Bhunia, 2008).

2.2 Salmonellosis

Salmonella sp. terdapat pada bahan pangan mentah, seperti telur dan daging mentah. Infeksi yang diakibatkan oleh *Salmonella sp.* dinamakan salmonellosis. Salmonellosis bersifat zoonosis, yang artinya penyakit ini dapat ditularkan dari hewan ke manusia, dan juga tersebar di saluran pencernaan unggas, reptile, dan mamalia. Lingkungan yang menjadi sumber *Salmonella sp.* yaitu tanah, air, kotoran hewan, daging maupun makanan mentah dan juga melalui perantara serangga. Salmonellosis terdiri atas tifoid dan non tifoid, salmonellosis tifoid disebabkan oleh *S.typhi*, sedangkan salmonellosis non tifoid disebabkan oleh serotip *Salmonella sp.* yang tidak mempunyai hospes spesifik seperti *S.enteritidis* (Portillo, 2000).

2.2.1 Patogenesis

Habitat *Salmonella sp.* berada di dalam alat pencernaan manusia, hewan, dan bangsa burung. Cara penularannya adalah melalui oral karena makanan atau minuman yang dikonsumsi terkontaminasi sehingga berinteraksi dengan sel epitel pada saluran pencernaan dan berkolonisasi yang kemudian menetrasi mukosa epitel usus halus sehingga terjadi kemotaksis heterofil dan makrofag sehingga terjadi peradangan (Gracia *et al*, 2003).

Salmonella sp. akan berkembang biak di dalam alat pencernaan penderita yang menyebabkan terjadinya radang usus (enteritis). Radang usus serta hemoragi *lamina propria* alat pencernaan oleh proliferasi *Salmonella sp.* inilah yang menimbulkan diare, karena menghasilkan racun yang disebut endotoksin (Dharmojono, 2001). Endotoksin mengaktifkan adenil siklase yang mengubah ATP menjadi cAMP, sehingga cAMP menjadi berlebih sehingga mengakibatkan diare mempengaruhi kemotaksis dan fungsi sel netrofil. Endotoksin yang dihasilkan karena invasi *Salmonella sp.* juga dapat menyebabkan kerusakan jaringan dan pengelupasan sel epitel usus.

Salmonella sp. dapat menyebabkan septikemia dan juga infeksi terlokalisir pada jaringan atau organ tertentu. Salah satu organ yang dapat diinfeksi adalah ileum. Pada awalnya *Salmonella sp.* Yang masuk ke dalam tubuh akan masuk ke lambung dan beberapa akan dieliminasi oleh adanya asam lambung. *Salmonella sp.* yang lolos akan menuju usus dan akan menghadapi mekanisme pertahanan dari usus berupa motilitas dan flora normal. Setelah itu *Salmonella sp.* yang masih bertahan hidup akan menempel pada permukaan mukosa usus halus dan mampu menembus epitel usus halus, dimana penetrasi ini akan menyebabkan kerusakan pada jaringan usus halus (Murray, 2009). Tingkat keparahan penyakit pada individu dengan Salmonellosis tidak hanya ditentukan oleh faktor-faktor virulen tetapi juga sifat dari sel hostnya (Ohl, 2006).

2.3 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Klasifikasi tikus putih (*Rattus norvegicus*) adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Subordo	: Sciurognathi
Famili	: Muridae
Sub-Famili	: Murinae
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i> (Myres, 2004)

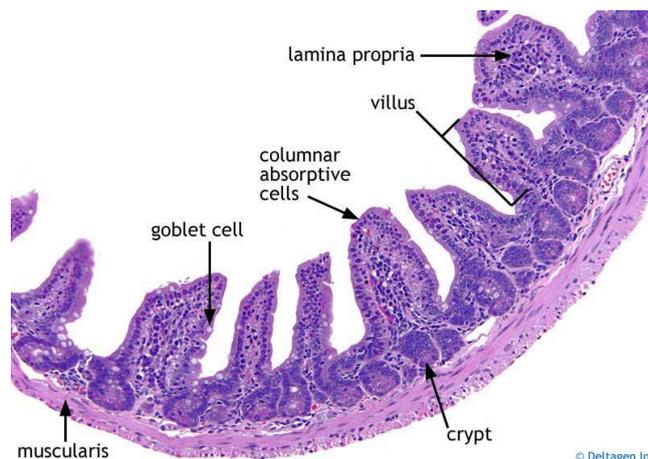
Tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang memiliki nama lain *Norway rat*, termasuk ke dalam hewan mamalia yang memiliki ekor panjang. Tikus ini memiliki ciri yaitu bertubuh panjang dengan kepala lebih kecil. Telinga tikus ini tebal dan pendek dengan rambut halus. Mata tikus putih berwarna merah. Ciri yang paling terlihat adalah ekornya yang panjang. Bobot badan tikus jantan pada umur dua belas minggu mencapai 240 gram sedangkan betinanya mencapai 200 gram. Tikus memiliki lama hidup berkisar antara 4 – 5 tahun dengan berat badan umum tikus jantan berkisar antara 267 - 500 gram dan betina 225- 325 gram (Sirois, 2005).

2.4 Histologi Usus Halus (Ileum)

Usus halus merupakan bagian dari saluran pencernaan yang terletak di antara lambung dan usus besar, terbagi menjadi tiga bagian yaitu duodenum, jejunum, dan ileum. Dinding usus halus melepaskan lendir yang melumasi isi usus dan air yang membantu melarutkan pecahan-pecahan makanan yang dicerna. Dinding usus halus juga melepaskan sejumlah kecil enzim yang membantu proses pencernaan (Guyton *et al.*, 2006).

Ileum adalah bagian akhir dari usus halus, bentuk vilinya seperti ibu jari dengan jumlah kelenjar liberkun yang sedikit. Usus halus memiliki struktur utama yang meliputi lamina propria, submukosa, membran mukosa, jaringan limfatik, serosa dan lapisan muskuler. Sel Goblet, sel absorbtif, dan sel M merupakan tiga macam jenis sel pada bagian mukosa (Guyton *et al.*, 2006).

Pada bagian mukosa usus halus terbentuk bagian khusus yaitu vilivili, dan kripta-kripta usus seperti yang terlihat pada **Gambar 2.1**.



Gambar 2.1 Histologi ileum yang meliputi sel goblet, lamina propria, vilivili usus, dan epitel usus (Deltabase, 2006)

Vili pada mukosa usus berfungsi untuk memperluas area lumen serta mengefisienkan proses absorpsi. Kripta merupakan kelenjar-kelenjar pada submukosa yang memiliki bentuk tubular sederhana. Ciri khas pada ileum adalah adanya nodus limfatikus pada mukosa, dimana ditemukan nodul-nodul limfatik yang beragregasi membentuk *Peyer's patches*. Lapisan submukosa terdiri atas jaringan ikat, pembuluh darah, dan pembuluh limfatik (Xu & Cranwell, 2003). Pada keadaan infeksi akan didapatkan edema yang merupakan tanda adanya inflamasi pada bagian muskularis dan submuskularis, erosi dari sel epitel bentukan vili usus serta hemoragi pada lamina propria (Singh, 2003).

2.5 Enzim Amilase

Nama enzim terdiri dari 2 bagian, nama pertama menunjukkan substrat, dan nama kedua yang berakhiran -ase, menyatakan tipe reaksi. Amilase adalah kelompok enzim yang memiliki kemampuan untuk memutuskan ikatan glikosida yang terdapat pada molekul amilum. Hasil hidrolisis atau pemecahan molekul amilum adalah molekul-molekul yang lebih kecil seperti maltosa, dekstrin dan terutama molekul glukosa sebagai unit terkecil (Reddy *et al.*, 2000). Aktivitas enzim dipengaruhi oleh suhu, pH dari lingkungan tempat enzim bekerja, konsentrasi substrat, aktivator dan inhibitor enzim.

Pencernaan utama karbohidrat terjadi di usus halus dan enzim yang berperan adalah amilopsin, yaitu enzim amilase yang berasal dari pankreas, dan enzim-enzim disakaridase yang dihasilkan oleh mukosa usus sendiri.

Hasil akhir pencernaan karbohidrat adalah monosakarida (glukosa, fruktosa, galaktosa) yang kemudian diserap melalui mukosa usus halus, dibawa ke sistem darah venaportal (Sumardjo, 2006).

Amilase adalah enzim pemecah karbohidrat dari bentuk kompleks menjadi bentuk yang lebih sederhana. Enzim ini terdapat dalam air liur (ptialin) dan getah pankreas. Darah normal juga mengandung sedikit amilase dari hasil pemecahan sel yang berlangsung secara normal. Pada penyakit radang pankreas, radang usus, dan kencing mani kadar amilase dalam darah mengalami peningkatan (Aiyer, 2005). Radang usus dapat memicu peningkatan aktivitas amilase, dimana pada keadaan ileum yang mengalami inflamasi kadar aktivitas amilase semakin meningkat dikarenakan produksi enzim yang dihasilkan oleh pankreas tidak diimbangi dengan optimalnya penyerapan yang terjadi pada organ ileum.

Pada kelompok hewan α -amilase merupakan enzim pencerna amilum yang utama. Enzim α -amilase merupakan kelompok metaloenzim yang tidak dapat bekerja sama sekali bila tidak ada ion kalsium. Disebut juga dengan 1,4- α -D-glukan glukonohidrolase atau glukogenase. Enzim ini bekerja memutus ikatan α -1,4 glikosida pada amilum secara acak terutama pada rantai yang panjang sehingga menghasilkan maltotriosa dan maltosa dari polimer amilosa pada amilum dan menghasilkan glukosa dan sedikit dekstrin dari polimer amilopektin penyusun amilum. Karena sifatnya yang dapat memutus ikatan glikosida secara acak, enzim ini bekerja lebih cepat dibanding amilase lainnya (Aiyer, 2005).

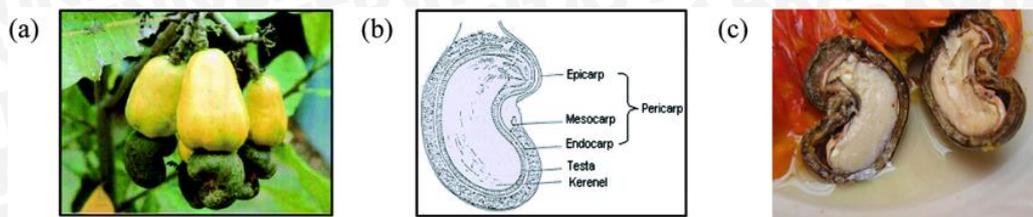
2.6. Kulit Biji (*Pericarp*) Jambu mete (*Anacardium occidentale*)

2.6.1 Taksonomi dan Morfologi Jambu Mete (*Anacardium occidentale*)

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Superdivisio	: Spermatophyta
Divisi	: Magoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Sapindales
Family	: Anacardiaceae
Genus	: <i>Anacardium</i>

Species : *Anacardium occidentale* (Cahyono, 2005)

Tanaman jambu mete yang bernama latin *Anacardium occidentale* merupakan tanaman buah berupa pohon yang berasal dari Benua Amerika, yaitu bagian Brasil Tenggara. Disebutkan oleh Nunung (2000) Jambu mete memiliki daun tunggal yang berbentuk bulat panjang hingga oval dan membulat hingga meruncing dibagian ujungnya. Batang tanaman ini merupakan batang sejati, berkayu dan keras yang memiliki banyak ranting sehingga dapat membentuk mahkota yang tinggi dan indah. Panjang batang bisa mencapai 7-10 m, jambu mete termasuk tanaman yang berbiji dua. Memiliki akar tunggang dan akar serabut, akar tunggang menembus tanah menuju pusat bumi hingga kedalaman 5 m lebih sedangkan akar-akar serabut tumbuh menyebar dalam tanah secara horizontal.



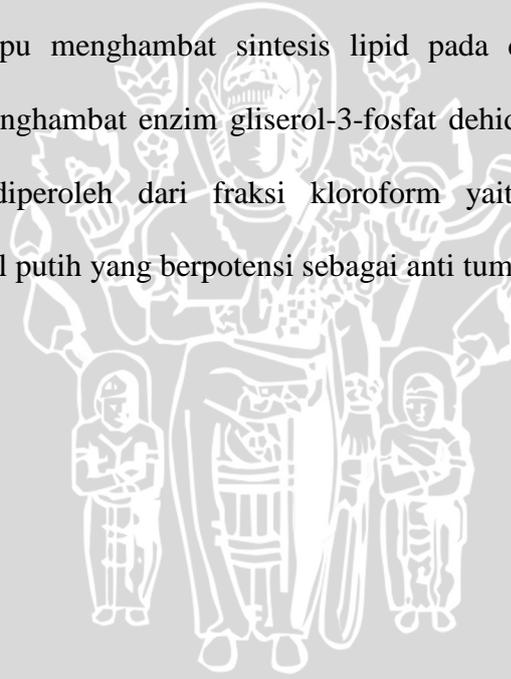
Gambar 2.2 (a) Buah semu dan Buah sejati/Biji mete, (b) bagian biji mete, (c) Kulit biji mete (Yuniarti, 2008).

Bunga tanaman jambu mete tumbuh pada ujung tunas atau ranting yang baru terbentuk sehingga buah muncul pada permukaan luar tajuk tanaman. Pembungaan tanaman jambu mete dapat terjadi sepanjang tahun atau dua kali dalam setahun yang tergantung tergantung pada iklim. Bunga jambu mete berwarna putih dan memiliki bentuk yang beragam. Buah jambu mete terdiri dari dua bagian, yaitu buah sejati dan buah semu. Bagian jambu mete yang ternyata belum banyak dikenal masyarakat luas adalah potensi yang dimiliki kulit bijinya (Simpen, 2009).

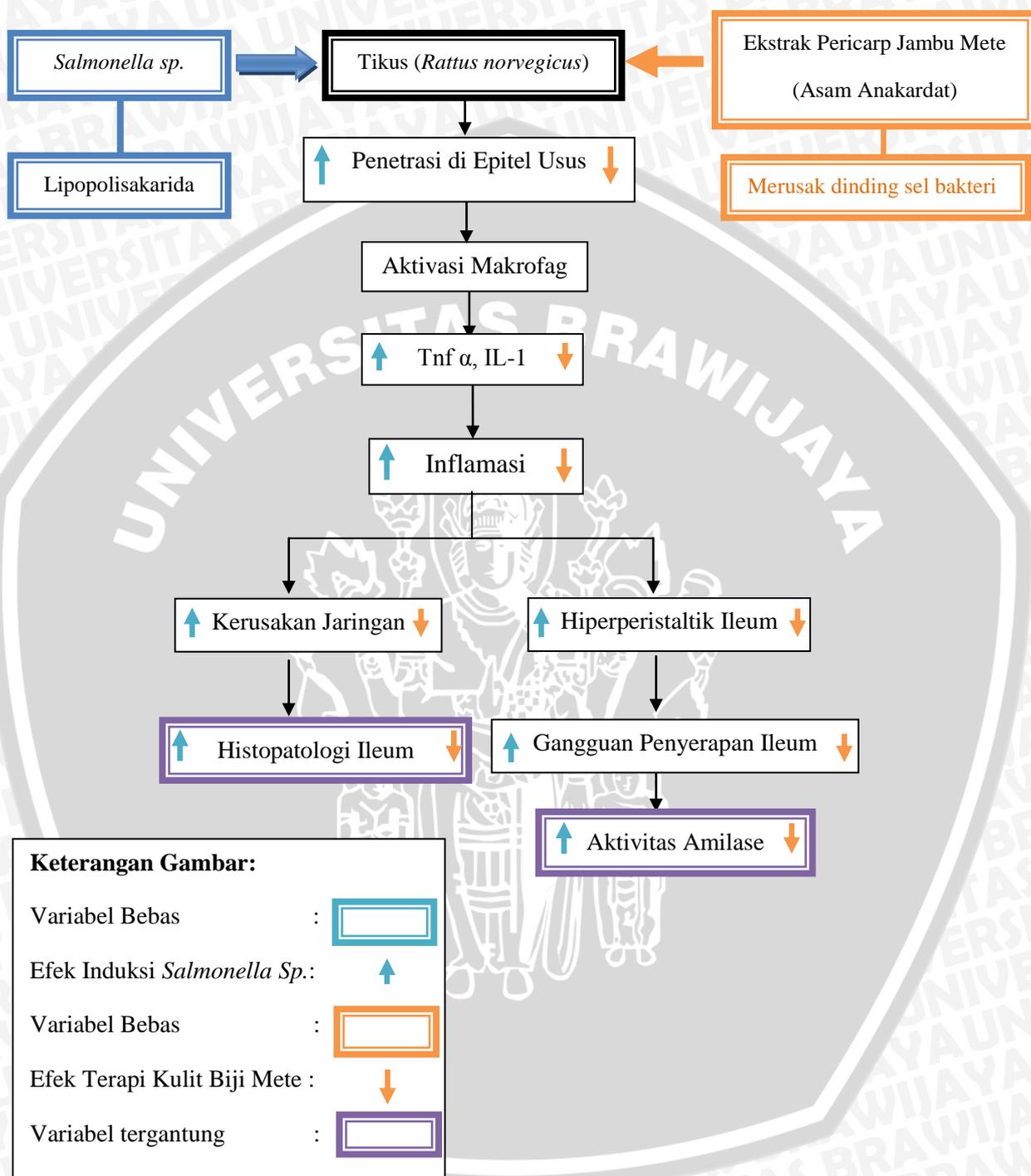
2.6.2 Kandungan Kulit biji (*pericarp*) jambu mete (*Anacardium occidentale*).

Tanaman jambu mete terdiri dari 70% kulit biji dan 30% daging biji. Kulit biji (*pericarp*) jambu mete memiliki kandungan minyak 50% yang terdiri dari 90% asam anakardat. Minyak kulit biji jambu mete dikenal dengan istilah CNSL atau *Cashew Nut Shell Liquid*. Kulit biji (*pericarp*) jambu mete (*Anacardium occidentale*) mengandung senyawa fenolik rantai panjang yaitu asam anakardat (Simpen, 2009). Pemberian terapi Ekstrak kulit biji (*Pericarp*) Jambu Mete (*Anacardium occidentale*) dengan pelarut etanol dapat membunuh bakteri *Salmonella sp.* pada konsentrasi 30 % secara *in vitro* (Rosyadi dkk, 2012).

Ekstrak *pericarp* Jambu mete dengan pelarut etanol diketahui mengandung asam anakardat sebanyak lebih dari 70% dari seluruh komponen bioaktif dalam *pericarp* jambu mete (Kubo *et al*, 2003). Asam anakardat diketahui memiliki efek bakterisida pada *Staphylococcus aureus* yang bekerja sebagai surfaktan merusak dinding sel bakteri. Telah terbukti secara *In vitro* bahwa asam anakardat menghambat enzim sulfhidril yaitu ATPase dan gliserol-3-fosfat dehidrogenase dengan hambatan yang bersifat reversible (Budiati, 2003). Kubo *et al* (2003) menyebutkan bahwa asam anakardat mampu menghambat sintesis lipid pada dinding sel bakteri dengan cara menghambat enzim gliserol-3-fosfat dehidrogenase. Senyawa fenolat yang diperoleh dari fraksi kloroform yaitu asam anakardat berbentuk kristal putih yang berpotensi sebagai anti tumor/kanker.



BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN



Gambar 3.1 Kerangka konsep penelitian

Salmonella sp. diinfeksi ke tikus melalui rute oral (*gastrointestinal tract*). Penetrasi *Salmonella sp.* yang lolos dari kondisi asam lambung akan menempel pada permukaan usus halus, sehingga memicu aktivasi dari makrofag dan netrofil ke tempat infeksi untuk melakukan eliminasi. Jika sel-sel fagosit tidak mampu meeliminasi, maka *Salmonella sp.* akan berkolonisasi di usus halus, khususnya pada ileum. Penetrasi dan kolonisasi *Salmonella sp.* ini melepaskan endotoksin berupa lipopolisakarida.

Endotoksin yang dihasilkan *Salmonella sp.* memiliki kemampuan untuk melakukan penetrasi terhadap mukosa usus halus (ileum) sehingga akan mendestruksi sel epitelial dan berlanjut menembus membran basalis dan akan menyebabkan hemoragi lamina propria. Hal ini dikarenakan adanya LPS *Salmonella sp.* yang menyebabkan terjadinya proses infeksi pada ileum tikus sehingga menyebabkan produksi sitokin proinflamasi seperti TNF α dan IL-1 dalam keadaan yang berlebih. Inflamasi yang terjadi menyebabkan daya tahan trans epitelial usus semakin berkurang dan berujung pada kerusakan jaringan pada organ ileum serta akan menyebabkan hiperperistaltik meningkat pada ileum sehingga proses absorpsi dan sekresi terganggu yang berpengaruh pada kenaikan kadar aktivitas amilase karena produksi amilase tidak diimbangi proses penyerapan pada ileum yang optimal.

Ekstrak kulit biji jambu mete diketahui mengandung senyawa fenolik rantai panjang asam anakardat yang memiliki efek sebagai antibakteri. Senyawa ini akan bekerja sebagai surfaktan untuk merusak dan menghambat sintesis lipid pada dinding sel bakteri. Asam anakardat memiliki mekanisme

biokimia dalam menghambat enzim sulfhidril yang berfungsi untuk menghambat metabolisme dengan merusak dinding sel bakteri. Pemberian terapi dengan pemberian ekstrak etanol kulit biji jambu mete akan menghambat sintesis lipid pada dinding sel bakteri sehingga dapat memberikan kesempatan bagi stem *cell* untuk beregenerasi sehingga dapat memperbaiki histopatologi ileum dan menghambat hiperperistaltik ileum yang menyebabkan terjadinya penurunan kadar aktivitas amilase.

3.2 Hipotesa Penelitian

Berdasarkan kerangka konsep yang telah diuraikan didapatkan hipotesa penelitian sebagai berikut :

1. Terdapat perbaikan histopatologi ileum pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinfeksi *Salmonella sp.* setelah mendapat terapi ekstrak etanol kulit biji (*Pericarp*) jambu mete (*Anacardium occidentale*).
2. Terdapat penurunan aktivitas amilase organ ileum tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinfeksi *Salmonella sp.* setelah mendapat terapi ekstrak etanol kulit biji (*Pericarp*) jambu mete (*Anacardium occidentale*).

Salmonella sp. diinfeksi ke tikus melalui rute oral (*gastrointestinal tract*). Penetrasi *Salmonella sp.* yang lolos dari kondisi asam lambung akan menempel pada permukaan usus halus, sehingga memicu aktivasi dari makrofag dan netrofil ke tempat infeksi untuk melakukan eliminasi. Jika sel-sel fagosit tidak mampu megeliminasi, maka *Salmonella sp.* akan berkolonisasi di usus halus, khususnya pada ileum. Penetrasi dan kolonisasi *Salmonella sp.* ini melepaskan endotoksin berupa lipopolisakarida.

Endotoksin yang dihasilkan *Salmonella sp.* memiliki kemampuan untuk melakukan penetrasi terhadap mukosa usus halus (ileum) sehingga akan mendestruksi sel epitelial dan berlanjut menembus membran basalis dan akan menyebabkan hemoragi lamina propria. Hal ini dikarenakan adanya LPS *Salmonella sp.* yang menyebabkan terjadinya proses infeksi pada ileum tikus sehingga menyebabkan produksi sitokin proinflamasi seperti TNF α dan IL-1 dalam keadaan yang berlebih. Inflamasi yang terjadi menyebabkan daya tahan trans epitelial usus semakin berkurang dan berujung pada kerusakan jaringan pada organ ileum serta akan menyebabkan hiperperistaltik meningkat pada ileum sehingga proses absorpsi dan sekresi terganggu yang berpengaruh pada kenaikan kadar aktivitas amilase karena produksi amilase tidak diimbangi proses penyerapan pada ileum yang optimal.

Ekstrak kulit biji jambu mete diketahui mengandung senyawa fenolik rantai panjang asam anakardat yang memiliki efek sebagai antibakteri. Senyawa ini akan bekerja sebagai surfaktan untuk merusak dan menghambat sintesis lipid pada dinding sel bakteri. Asam anakardat memiliki mekanisme

biokimia dalam menghambat enzim sulfhidril yang berfungsi untuk menghambat metabolisme dengan merusak dinding sel bakteri. Pemberian terapi dengan pemberian ekstrak etanol kulit biji jambu mete akan menghambat sintesis lipid pada dinding sel bakteri sehingga dapat memberikan kesempatan bagi stem *cell* untuk beregenerasi sehingga dapat memperbaiki histopatologi ileum dan menghambat hiperperistaltik ileum yang menyebabkan terjadinya penurunan kadar aktivitas amilase.

3.2 Hipotesa Penelitian

Berdasarkan kerangka konsep yang telah diuraikan didapatkan hipotesa penelitian sebagai berikut :

1. Terdapat perbaikan histopatologi ileum pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinfeksi *Salmonella sp.* setelah mendapat terapi ekstrak etanol kulit biji (*Pericarp*) jambu mete (*Anacardium occidentale*).
2. Terdapat penurunan aktivitas amilase organ ileum tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinfeksi *Salmonella sp.* setelah mendapat terapi ekstrak etanol kulit biji (*Pericarp*) jambu mete (*Anacardium occidentale*).

BAB IV METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2014 –Maret 2015 di Laboratorium Farmakologi FK UB, Laboratorium Organik FMIPA UB, Laboratorium Biokimia FMIPA UB, dan Laboratorium Mikrobiologi LSIH UB.

4.2 Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan Tikus (*Rattus norvegicus*) betina strain Wistar umur 8-12 minggu dengan rata-rata beratnya 200 gram dan dipelihara selama 21 hari. Pemberian pakan dan air minum *ad libitum*. Penghitungan Perkiraan besar sampel menggunakan rumus Kusriningrum (2010) sebagai berikut :

$$t(n-1) \geq 15$$

$$4(n-1) \geq 15$$

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

$$n = 5$$

Keterangan :

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan tersebut di atas, untuk 4 macam kelompok perlakuan dibutuhkan jumlah ulangan sebanyak lima kali pada setiap kelompok sehingga dibutuhkan 20 ekor tikus.

4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) menggunakan 20 ekor tikus yang dibagi menjadi 4 kelompok. Skema kerja penelitian ini terdapat pada **Lampiran 4**.

Tabel 4.1 Rancangan Penelitian

Kelompok A	Golongan tikus yang tidak diberi perlakuan apapun (Kontrol negatif).
Kelompok B	Golongan tikus yang diberi perlakuan infeksi <i>Salmonella sp.</i> tanpa pemberian terapi (Kontrol Positif).
Kelompok C	Golongan tikus infeksi <i>Salmonella sp.</i> yang diterapi dengan ekstrak etanol kulit biji jambu mete dosis 50 mg/kg BB.
Kelompok D	Golongan tikus infeksi <i>Salmonella sp.</i> yang diterapi dengan ekstrak etanol kulit biji jambu mete dosis 100 mg/kg BB.

4.4 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah

Variabel bebas : Pemberian ekstrak kulit biji jambu mete, infeksi *Salmonella sp.*

Variabel tergantung : Histopatologi ileum dan aktivitas amilase.

Variabel kontrol : Tikus *Rattus norvegicus* betina strain Wistar tanpa perlakuan, *Salmonella sp.*, ekstrak etanol kulit biji mete dan kondisi eksperimental.

4.5 Materi Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang tikus, tempat pakan dan minum, termometer, spuit (1 mL dan 5 mL), timbangan, tabung erlenmeyer, gelas ukur, *rotary evaporator*, *scalpel*, gunting, gelas objek, *coverglass*, *laminar air flow*, mikroskop olympus BX51, mortar dan pestle, termometer, pH meter digital, *ependorf*, pipet mikrootomatis, *sentrifuge*, *shaker bath*, *water bath*, inkubator, *autoclave*, timbangan analitik, magnetik stirrer, kompor listrik, pembakar spirtus, dan spektrofotometer,

Sedangkan bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina strain Wistar berat 150-200 gram, desinfektan, pakan dan air minum tikus, etanol 90%, aquades, dan kulit biji jambu mete yang sudah dihaluskan, organ ileum, NaCl fisiologis, PFA 4%, ethanol 70% 80% 90% 95%, ethanol absolute I II III, Xylol I II III, paraffin cair, akuades, pewarna histologi hematoxilin eosin (HE), organ ileum, buffer asetat, kapas, *starch* agar, iodine, larutan pati 1%, reagen arseno molibdat, dan akuades.

4.6 Tahapan Penelitian

4.6.1 Persiapan Hewan Coba

Tikus yang digunakan sebagai hewan coba penelitian diberi pakan standar dan pemberian minum tikus secara *ad libitum* pada semua tikus. Kandang tikus disesuaikan dengan jumlah tikus yang digunakan. Kandang tikus terbuat dari bak dengan penutup terbuat dari kawat dan beralaskan sekam. Tikus diletakkan pada tempat yang terbebas dari

asap industri, polutan, ataupun suara bising. Temperatur ruangan optimum untuk tikus adalah 22-24°C dengan kelembaban udara 50-60% disertai ventilasi yang cukup.

4.6.2 Pembuatan Sediaan Ekstrak Etanol Kulit Biji Jambu Mete

(Rosyadi dkk, 2012).

Pembuatan sediaan ekstrak etanol membutuhkan 2 proses, yakni proses ekstraksi dan proses evaporasi. Diawali dengan mencuci dan mengeringkan kulit biji jambu mete, bila sudah kering dilanjutkan dengan menghaluskannya dengan mesin penggiling. Kulit biji jambu mete ditimbang 100 gram, kemudian dimasukkan kedalam labu Erlenmeyer 1000 mL. Ditambahkan etanol 90 % hingga volume mencapai 1 liter dan diaduk selama ± 30 menit, lalu dibiarkan mengendap selama ± 48 jam. Cairan rendaman ekstrak dimasukkan ke dalam labu evaporasi 1 liter dan dilakukan evaporasi pada suhu 40-45°C untuk menguapkan etanol. Apabila etanol sudah tidak menetes di tabung pendingin, maka yang tersisa dalam labu evaporator adalah hasil ekstraksi yang akan digunakan untuk penelitian. Ekstrak yang dihasilkan dalam penelitian ini sebanyak 45 mL yang dianggap sebagai konsentrasi 100%.

4.6.3 Dosis Ekstrak Kulit Biji Jambu Mete

Kandungan minyak pada kulit biji jambu mete disebut *cashew nut shell liquid* (CNSL). Mengacu pada *Screening Level Hazard* kulit biji

metode U.S.EPA (2009) toksik pada tikus yaitu 150 mg/kg-hari. Pada penelitian ini, dosis ekstrak etanol kulit biji (*pericarp*) jambu mete (*Anacardium occidentale*) yang digunakan adalah 50 mg/kg BB per ekor tikus dengan berat rata-rata 200 gram dan 100 mg/kg BB per ekor tikus dengan berat rata-rata 200 gram. Diberikan secara peroral (PO) menggunakan sonde sebanyak satu kali dalam sehari. Penghitungan dosis dapat dilihat pada **lampiran 5**.

4.6.4 Identifikasi *Salmonella sp.*

Identifikasi *Salmonella sp.* bertujuan untuk mengetahui sifat morfologi dan biokimia. Untuk mengetahui sifat morfologi bakteri secara mikroskopis dilakukan pewarnaan gram. Karakterisasi secara biokimiawi dilakukan melalui sepuluh uji biokimia yang terdiri dari *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), uji katalase, uji methyl red (MR), Uji Citrate, Uji *Phenol Red Lactose Broth*, Uji *Phenol Red Sucrose Broth*, Uji *Phenol Red Maltose Broth*, dan Uji *Phenol Red Manitol Broth*. Prosedur melakukan uji secara lengkap terdapat pada **Lampiran 6**.

4.6.5 Penentuan Kurva Pertumbuhan *Salmonella sp*

Penentuan pertumbuhan *Salmonella sp.* dilakukan menggunakan metode Paul and Janet (2010) yaitu menghitung *Total Plate Count* (TPC) dengan cara menginokulasi *Salmonella sp.* pada Nutrient Agar (NA) dan melakukan pengukuran *Optical Density* (OD) dengan

menggunakan media *Nutrient Broth*(NB). Kurva pertumbuhan *Salmonella sp.* dapat dilihat pada **Lampiran 9**.

4.6.6 Infeksi *S almonella sp.* Pada Tikus Putih(*Rattus norvegicus*)

Dosis infeksi *Salmonella sp.* pada tikus putih adalah 10^8 cfu/ml peroral dan menunjukkan adanya gejala infeksi setelah 12-72 jam pemberian (Havelaar, 2001). Sehingga dalam penelitian dosis perbenihan cair *Salmonella sp.* yang diberikan pada kelompok B,C, dan D adalah sebesar 10^8 cfu/ml/ekor secara peroral selama satu hari dengan menggunakan sonde.

4.6.7 Terapi Tikus dengan Ekstrak Etanol Kulit Biji Jambu Mete

Hasil ekstraksi kulit biji jambu mete disimpan di dalam *freezer* agar tetap memiliki kandungan zat yang stabil. Metode pemberian terapi yaitu dengan pemberian secara per oral dengan bantuan sonde, dosis yang diberikan adalah sesuai kelompok perlakuan yang telah dijelaskan pada kelompok perlakuan C dan D. Terapi dilakukan pada hari ke 11 hingga pada hari ke 24.

4.6.8 Pengambilan Organ Ileum dan Pembuatan Preparat Histopatologi

(Junquiera dan Carneiro, 2007).

Proses pembuatan preparat histologi ileum diawali dengan pemingsanan tikus dengan klorofom di *Laminar Air Flow* (LAF), kemudian dilakukan pembedahan. Pemingsanan bertujuan agar dapat mengambil *sample* darah hewan coba. Pembedahan pada kelompok A dan B dilakukan pada hari ke 4, sedangkan pada kelompok perlakuan C

dan D pada hari ke 17. Prosesnya yaitu organ ileum diambil, lalu dicuci dengan NaCl fisiologis. Setelah itu dilanjutkan dengan proses fiksasi, dehidrasi dan infiltrasi, penjernihan, infiltrasiparafin, *embedding*, *sectioning*, penempelan di gelas objek, serta pewarnaan HE (*Hematoxylin-Eosin*) dan siap dievaluasi, langkah secara lengkap tertulis dalam **Lampiran 10**.

4.6.9 Pengamatan gambaran histopatologi ileum

Pengamatan histopatologi ileum dilakukan dengan mikroskop cahaya Olympus BX 51 melalui pembesaran 400x. Pengambilan gambar histopatologi menggunakan kamera dilakukan setelah mendapat gambar preparat yang diinginkan. Pengamatan yang diamati meliputi perubahan vili, destruksi epitel dan juga adanya hemoragi.

4.6.10 Isolasi Amilase

Sampel dari organ ileum dalam larutan PBS dihancurkan menggunakan mortar atau blender, kemudian ditambahkan 5 mL buffer asetat untuk setiap 1 gram sampel. Setelah itu diinkubasi selama 10 menit dan disaring filtrat yang didapat, selanjutnya disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 2000 rpm untuk mendapatkan ekstrak enzim amilase. Prosedur secara sistematis dapat dilihat pada **lampiran 11**.

4.6.11 Pengujian aktivitas amilase

4.6.11.1 Pembuatan kurva standar glukosa

Dilartukan 250 mg glukosa dalam 250 mL akuades. Larutan tersebut kemudian diencerkan sehingga diperoleh stok standar dengan konsentrasi 1000 ppm. Dari larutan stok dibuat variasi konsentrasi larutan standar glukosa 200, 300, 350, 400, 450, 500 ppm. Diambil 250 μ l ditambah dengan amilum 250 μ l, lalu diinkubasi dengan suhu 30°C selama 20 menit. Kemudian larutan stok standar glukosa ditambah dengan 500 μ l DNS. Larutan tersebut dipanaskan selama 10 menit dan didinginkan dengan air mengalir. Diukur absorbansinya pada panjang gelombang 550 nm. Proses pembuatan **secara sistematis dapat dilihat pada Lampiran 11.**

4.6.11.2 Pengukuran aktivitas amilase

Prinsip uji aktivitas enzim amilase di dasarkan pada perhitungan gula pereduksi dari hasil hidrolisis pati dengan metode Nelson-Somogyi. Prosesnya yaitu diambil filtrate enzim hasil isolasi sebanyak 1mL dan ditambahkan dengan larutan pati 1% sebanyak 0,5 mL dan 0,5 mL buffer fosfat, kemudian diinkubasi pada suhu 100°C selama 10 menit. Setelah itu ditambahkan 1mL reagen dan dididihkan selama 5 menit, lalu ditambahkan 1mL reagen arsenomolibdat dan diaduk hingga homogen. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 550 nm. Aktivitas enzim amilase dapat dihitung dengan persamaan berikut:

$$\text{Aktivitas enzim amilase} = \frac{C}{T} \times 1 \text{ unit}/1\mu\text{mol}(1)$$

C = Konsentrasi glukosa per mL ekstrak enzim (μ mol)

T = Waktu inkubasi (menit)

1 unit enzim amilase = besarnya aktivita senzim yang dibutuhkan untuk membebaskan 1 μ mol glukosa per menit per mL enzim. Tahap tahap prosedur uji aktivitas enzim amilase dapat dilihat pada **Lampiran 11**.

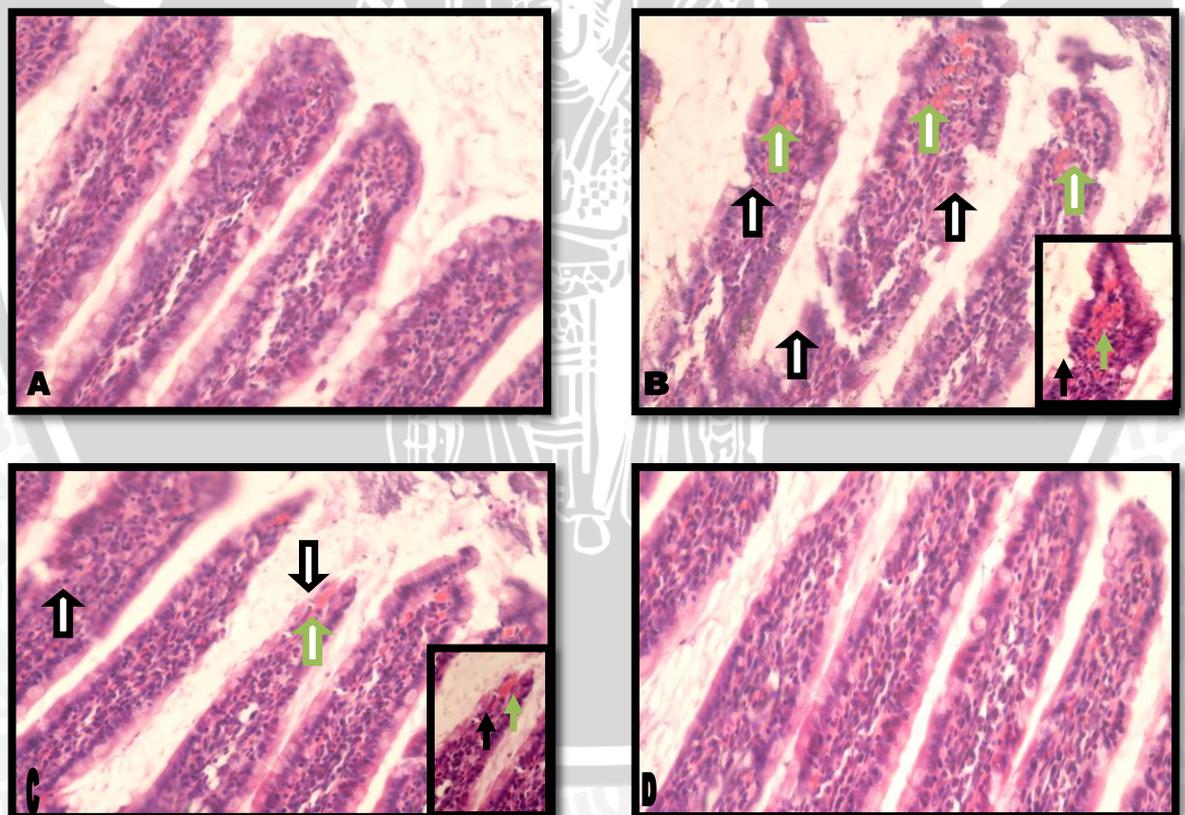
4.7 Analisa Data

Parameter yang digunakan dalam penelitian ini diamati gambaran histopatologi organ ileum dan aktivitas amilase. Analisa data yang digunakan dalam penelitian ini berupa data kualitatif berupa gambaran histopatologi ileum yang akan dianalisis dan disajikan secara deskriptif dan data kuantitatif untuk mengetahui aktivitas enzim amilase yang akan dianalisis dan disajikan dengan Uji ANOVA dan uji lanjutan BNJ dengan $\alpha = 0,05$ untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Gambaran Histopatologi Ileum pada Hewan Coba Tikus (*Rattus norvegicus*) Dengan Pewarnaan Hematoksilin Eosin

Hasil penelitian tentang histopatologi ileum tikus yang diinfeksi *Salmonella sp.* menunjukkan perubahan pada bentukan vili usus, destruksi pada sel-sel epitel kolumnar, dan adanya hemoragi pada lamina propria. Gambaran histopatologi keempat kelompok perlakuan dapat diamati pada **Gambar 5.1**.



Gambar 5.1 Gambar histopatologi ileum tikus (HE, 400x).

Keterangan : A) Tikus kontrol negatif, B) Tikus kontrol positif, C) Tikus di infeksi *Salmonella sp.* dengan terapi dosis 50 mg/kg BB, D) Tikus infeksi *Salmonella sp.* dengan terapi 100 mg/kg BB.

Tanda panah hitam : destruksi sel-sel epitel kolumnar

Tanda panah hijau : Hemoragi pada lamina propria

Histopatologi ileum dalam keadaan normal (**Gambar 5.1A**) menunjukkan vili-vili usus yang tersusun rapi, rapat dan juga teratur. Didukung dari pernyataan Dunlop *and* Melbert (2004) yang menyebutkan bahwa pada ileum normal dapat terlihat mukosa dengan vili yang panjang, sel-sel epitel kolumnar dan sel goblet. Histologi dari kelompok A dapat dijadikan sebagai acuan adanya perubahan dan kerusakan yang terjadi pada kelompok lain. Saluran pencernaan secara normal terdiri dari beberapa lapisan, yakni mukosa, submukosa, dan muskularis. Hasil ini sudah sesuai dengan kondisi histologi ileum dalam keadaan normal (Xu *and* Cranwell, 2003).

Hasil histopatologi dari kelompok B yang merupakan kontrol positif menunjukkan adanya kerusakan vili dikarenakan terjadinya inflamasi akibat penetrasi dari *Salmonella sp.* yang menyebabkan abnormalitas struktur vili, adanya destruksi sel-sel epitel kolumnar, dan hemoragi pada bagian lamina propria (**Gambar 5.1B**), sesuai dengan gejala salmonellosis pada kelompok B yang meliputi kenaikan suhu, diare, perubahan tingkah laku dan berkurangnya nafsu makan, data secara lengkap dapat dilihat pada **Lampiran 8**. Hal tersebut menjelaskan bahwa infeksi *Salmonella sp.* dengan dosis 10^8 cfu/ml/ekor dapat merusak jaringan ileum, didukung juga oleh pernyataan Mitchell *and* Cotran (2003) bahwa inflamasi pada ileum ditandai dengan hemoragi lamina propria serta kerusakan vili dan epitel. Epitel pada saluran pencernaan merupakan *barrier* pertama yang berinteraksi secara langsung terhadap antigen sehingga perubahan struktur pada epitel dapat

digunakan sebagai indikasi adanya infeksi (Jawetz *et al.*, 2005), dimana *Salmonella sp.* mempunyai 3 tahap dalam menginfeksi usus yaitu adhesi pada permukaan epitel usus, kolonisasi, dan melakukan invasi ke dalam mukosa usus dengan menembus sel epitel.

Invasi yang dilakukan *Salmonella sp.* pada permukaan usus mengeluarkan endotoksin yang dapat merusak struktur jaringan ileum. Endotoksin tersebut dapat menyebabkan kerusakan jaringan dan destruksi sel epitel usus. Penghambatan sintesis protein dalam sel epitel usus oleh endotoksin inilah yang dapat mengubah morfologi bagian mukosa usus yang meliputi vili, sel epitel dan lamina propria (Finlay *et al.*, 2003). Terjadinya hemoragi pada lamina propria ileum juga disebabkan karena infeksi *Salmonella sp.* yang memasuki fase histotrofik (fase jaringan) dan bersifat sitotoksik. Selama menjalani fase jaringan, endotoksin *Salmonella sp.* menginfeksi jaringan mukosa ileum sehingga menimbulkan hemoragi yang terjadi akibat kapiler darah melebar karena tekanan darah berlebih sehingga sel darah keluar dari kapiler darah.

Hasil pengamatan histopatologi ileum tikus salmonellosis yang mendapat terapi ekstrak etanol kulit biji jambu mete dosis 50mg/kg BB (**Gambar 5.1C**) menunjukkan adanya perbaikan yaitu pada bentukan vili yang mulai teratur, perbaikan sel-sel epitel kolumnar, berkurangnya hemoragi pada lamina propria dibandingkan kelompok B (salmonellosis). Pada dosis ekstrak etanol kulit biji jambu mete dosis 100mg/kg BB (**Gambar 5.1D**) menunjukkan gambaran yang hampir mendekati kelompok A (kontrol

negatif), bentukan vili-vili usus sudah kembali teratur, nampak perbaikan sel-sel epitel, dan tidak terlihat lagi adanya hemoragi pada lamina propria. Hal ini didukung oleh pernyataan Junquiera(2007) yang menyatakan bahwa pada intestinal terdapat sel-sel progenitor yang disebut stem sel usus atau sel induk usus. Stem sel usus terletak pada bagian submukosa yaitu kriptas yang merupakan sumber dari sel-sel pada lapisan mukosa maupun usus. Sel-sel ini dapat berproliferasi untuk mempertahankan populasinya dan membentuk sel-sel epitel, sel goblet dan sel enteroendokrin.

Ekstrak etanol kulit biji jambu mete mengandung senyawa asam anakardat yang memiliki fungsi utama sebagai antibakteri (**Lampiran 3**). Menurut Kubo *et al* (2003), asam anakardat bekerja sebagai surfaktan yang merusak dinding sel bakteri. Asam anakardat akan menghambat sintesis lipid pada dinding sel bakteri dengan cara menghambat enzim gliserol-3-fosfat dehydrogenase. Mekanisme biokimia asam anakardat berdasarkan kemampuannya menghambat enzim sulfhidril yaitu ATPase dan gliserol-3-fosfat dehydrogenase. Hambatan terhadap aktivitas enzim sulfhidril akan mempengaruhi proses metabolisme yaitu dengan menghambat enzim ATPase sehingga tidak ada perubahan ATP menjadi ADP dan menyebabkan krisis energi sel bakteri. Asam anakardat diketahui merupakan senyawa fenolik rantai panjang (polifenol) yang diketahui dapat mendenaturasi protein bakteri (Budiati, 2008). Pemberian terapi ini akan menghambat sintesis lipid pada dinding sel bakteri sehingga dapat mengurangi adanya kerusakan jaringan pada ileum dan juga mampu menghambat hiperperistaltik usus yang terjadi

akibat adanya inflamasi. Hal ini memberikan kesempatan pada stem sel usus halus untuk melakukan regenerasi dan proliferasi sel baru. Berkurangnya hemoragi pada lamina propria, diawali dengan terjadinya sintesis lipid pada dinding sel bakteri sehingga dapat menurunkan tekanan pada kapiler darah, sedangkan sel darah yang telah keluar dari kapiler akan mati dan difagosit oleh sel fagosit.

Terapi ekstrak etanol kulit biji jambu mete dapat memperbaiki kerusakan sel epitel usus dan mengurangi hemoragi akibat endotoksin (LPS) *Salmonella sp.* ditunjukkan dengan adanya perbaikan pada sel epitel ileum serta berkurangnya hemoragi pada lamina propria. Hasil terbaik ditunjukkan pada kelompok D salmonellosis yang diterapi ekstrak etanol kulit biji jambu mete dengan dosis 100mg/kg BB (Gambar 5.1D) yang mengalami perbaikan sel epitel kolumnar dan lamina propria mendekati normal.

5.2 Pengaruh Ekstrak Etanol Kulit Biji Jambu Mete Terhadap Aktivitas Amilase Ileum Tikus (*Rattus norvegicus*)

Amilase merupakan enzim yang memiliki kemampuan untuk memutuskan ikatan glikosida yang terdapat pada molekul amilum. Hasil hidrolisis atau pemecahan molekul amilum ini adalah molekul-molekul yang lebih sederhana seperti maltosa, dekstrin dan terutama molekul glukosa sebagai unit terkecil (Reddy *et al.*, 2000). Proses pencernaan utama karbohidrat yang terjadi pada usus halus membutuhkan enzim amilase yang berasal dari pankreas, dan enzim-enzim disakaridase yang dihasilkan oleh

mukosa usus. Hasil perhitungan aktivitas amilase ileum tikus (*Rattus norvegicus*) dapat dilihat pada **Tabel 5.1**

Tabel 5.1 Aktivitas amilase ileum tikus perlakuan

Kelompok	Aktivitas Amilase ($\mu\text{mol/mL.menit}$)	Aktivitas Amilase (%)	
		Peningkatan	Penurunan
Kelompok A (kontrol negatif)	0,090 \pm 0,0049 ^a	-	-
Kelompok B (kontrol positif)	0,284 \pm 0,0327 ^c	215,5	-
Kelompok C (salmonellosis+terapi 50 mg/kg BB)	0,218 \pm 0,0162 ^b	-	22,4
Kelompok D (salmonellosis+terapi 100 mg/kg BB)	0,113 \pm 0,0047 ^a	-	60,2

Keterangan: Notasi a,b, dan c menunjukkan perbedaan nyata antar perlakuan ($P < 0,05$).

Hasil analisa secara statistika menggunakan *One-Way ANOVA* menunjukkan bahwa ekstrak kulit biji jambu mete ($p < 0,05$) memberi pengaruh yang berbeda nyata antar perlakuan sebagaimana ditunjukkan pada Tabel 5.1, perhitungan statistika secara lengkap dapat dilihat pada **Lampiran 14**. Hasil lanjutan menggunakan uji *Tukey/Beda Nyata Jujur (BNJ)* menunjukkan bahwa rata-rata aktivitas amilase kelompok A (kontrol negatif) dan kelompok D (terapi 100 mg/kg BB) tidak berbeda signifikan ($p > 0,05$). Sehingga terapi ekstrak kulit biji jambu mete dengan dosis 100mg/kg BB merupakan dosis efektif dalam menurunkan aktivitas amilase tikus (*Rattus norvegicus*) salmonellosis.

Aktivitas amilase organ ileum pada kelompok A digunakan sebagai standar untuk menentukan adanya peningkatan atau penurunan yang terjadi karena pengaruh infeksi salmonella dan terapi. Amilase pada usus berperan dalam memecah karbohidrat dari bentuk kompleks menjadi bentuk sederhana yang kemudian diserap melalui mukosa usus halus (Sumarjo, 2006). Hal ini diperlukan bagi tubuh untuk dapat menyerap gula dan menggunakannya untuk menjadi energi.

Nilai aktivitas amilase kelompok B (kontrol positif) menunjukkan perbedaan secara nyata dari kelompok A (kontrol negatif), dan terjadi peningkatan sebesar 215,5%. Hal ini dikarenakan adanya LPSS *Salmonella sp.* menyebabkan produksi sitokin proinflamasi seperti TNF dan IL-1. TNF α dan IL-1 yang berlebih dapat menyebabkan terjadinya inflamasi pada ileum. Inflamasi pada ileum ini menyebabkan tidak optimalnya proses metabolisme karbohidrat. Infeksi *Salmonella sp.* juga mengakibatkan kontraksi usus yang berlebih sehingga menuntut adanya penambahan energi yang berasal dari pemecahan glukosa. Hiperperistaltik yang terjadi pada usus dapat mengakibatkan diare karena berkurangnya kesempatan usus untuk dapat menyerap makanan, sehingga pelintasan *chymus* (makanan yang belum dicerna dengan sempurna) dipercepat dan masih banyak mengandung air pada saat meninggalkan tubuh sebagai feses (De Carvalho, *et al.*, 2008). Selain itu, diare akibat salmonellosis juga disebabkan karena bertumpuknya cairan di usus akibat terganggunya keseimbangan absorpsi dan sekresi. Hal ini menyebabkan peningkatan aktivitas terjadi karena bertambahnya energi

kinetik yang diakibatkan adanya inflamasi mempercepat gerak rotasi enzim dengan substrat sehingga meningkatkan kecepatan reaksi enzim (Nofiana, 2002). Oleh karena itu nilai peningkatan aktivitas amilase dapat mengindikasikan adanya inflamasi pada ileum.

Aktivitas amilase pada kelompok C dan D yang mendapat terapi ekstrak kulit biji jambu mete dosis 50 mg/kg BB dan 100 mg/kg BB menunjukkan perbedaan yang nyata dari kelompok B (kontrol positif), dimana aktivitas amilase pada kelompok C mengalami penurunan 22,4% dan kelompok D sebesar 60,2% dari hasil aktivitas amilase kelompok kontrol positif, sehingga dapat dikatakan bahwa kelompok D merupakan perlakuan terapi dengan dosis yang paling efektif. Penurunan aktivitas amilase dalam penelitian ini diduga karena kandungan asam anakardat yang terdapat pada kulit biji jambu mete yang dapat dilihat pada **Lampiran 3**.

Minyak kulit biji jambu mete dikenal dengan istilah CNSL atau *Cashew Nut Shell Liquid*. Kulit biji (*pericarp*) jambu mete (*Anacardium occidentale*) mengandung senyawa fenolik rantai panjang yaitu asam anakardat (Simpen, 2009). Hasil analisa bioaktif FTIR menunjukkan adanya asam anakardat yang terkandung dalam ekstrak etanol kulit biji jambu mete, dimana asam anakardat merupakan senyawa fenolik rantai panjang (polifenol) yang diketahui dapat mendenaturasi bakteri (**Lampiran 3**). Asam anakardat berfungsi sebagai antibakteri dalam melawan *Salmonella sp.* karena mampu merusak dinding sel *Salmonella sp.* yang menyebabkan berkurangnya kolonisasi *Salmonella sp.* di usus (Budiati, 2008). Komponen fenolik

umumnya memiliki kemampuan berikatan dengan protein, sehingga keberadaannya dalam ekstrak kulit biji jambu mete dapat menghambat aktivitas enzim. Pemberian terapi ini akan menghambat sintesis lipid pada dinding sel bakteri akibat inflamasi pada ileum, ekstrak etanol kulit bijijambu mete juga dapat berperan sebagai inhibitor enzim amilase denganmemperlambat pencernaan pati dan penyerapan glukosa sehingga mengurangi hiperperistaltik yang terjadi serta memperbaiki fungsi ileum sebagai usus penyerapan dan mampu menurunkan kadar aktivitas amilase.

Pemberian terapi yang efektif berdasarkan nilai penurunan aktivitas amilase adalah kelompok D dengan dosis 100mg/kg BB. Hal ini diketahui dari uji BNJ bahwa kelompok D tidak berbeda signifikan dan mendekati kelompok A yang merupakan kontrol negatif. Selain itu,terjadi penurunan aktivitas amilase pada kelompok D sebesar 60,2% terhadap kelompok kontrol positif salmonellosis(**Lampiran 14**) karena semakin tinggi dosis berarti semakin banyak kandungan asam anakardat yang berpotensi sebagai antibakteriyag dapat menurunkan aktivitas amilase pada ileum.Hasil tersebut juga didukung pada keadaan histopatologi ileum yang mengalami perbaikan jaringanyang meliputi sel epitel dan lamina propria ileum pada kelompok D.

BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa:

1. Terapi ekstrak etanol kulit biji (*Pericarp*) jambu mete (*Anacardium occidentale*) dengan dosis pemberian 50 mg/kg BB dan dosis 100 mg/kg BB mampu memperbaiki histopatologi ileum pada tikus (*Rattus norvegicus*) salmonellosis. yang ditunjukkan dengan perbaikan pada bentukan vili usus, sel epitel dan berkurangnya hemoragi pada lamina propria.
2. Terapi ekstrak etanol kulit biji (*Pericarp*) jambu mete (*Anacardium occidentale*) dengan dosis pemberian 50 mg/kg BB dan dosis 100 mg/kg BB mampu menurunkan aktivitas amilase pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinfeksi *Salmonella sp.* dimana dosis 100 mg/kg BB merupakan dosis efektif dalam memperbaiki histopatologi dan penurunan aktivitas amilase.

6.2 Saran

Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk penerapan sediaan ekstrak etanol kulit biji (*Pericarp*) jambu mete (*Anacardium occidentale*) dalam penggunaannya sebagai terapi salmonellosis.

DAFTAR PUSTAKA

- Aiyer, P.V. 2005. Amylases and their applications. *African Journal of Biotechnology*. 4: 125–1529.
- Bhunia, A. 2008. *Foodborne Microbial Pathogens*. Springer. USA.
- Budiati, T dan M. Ervina. 2008. Hubungan Antara Struktur Asam Anakardat Dan Aktivitas Antibakteri Terhadap *Staphylococcus Aureus*. *Jurnal: Obat Bahan Alam* 7(1): I08-114.
- Brooks, G.F., J.S. Butel, and S.A. Morse. 2004. *Jewetz, Melnick, & Adelberg Mikrobiologi Kedokteran*, Edisi 23. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran ECG: 251-264.
- Cahyono, B. 2005. *Manfaat Jambu Mente*. Tarat, Bandung.
- Deltabase. 2006. Digestive system. Deltagen Inc. <http://www.deltagen.com> [Accessed 18 Juli 2012].
- De Carvalho RV, Correa T & da Silva J. 2008. Properties of an amylase from thermophilic *Bacillus sp. Brazillian Journal of Microbiology*. 39: 102-107.
- Dharmojojo, 2001. *Kapita Selekta Kedokteran Veteriner (Hewan kecil 1)*. Pustaka Populer Obor. Jakarta.
- Dunlop, R.H and Melbert C.H. 2004. *Pathophysiology of the Gastrointestinal Tract. Veterinary Pathophysiology*. Iowa: Blackwell Publishing. Pp: 111-142
- D'aoust, J.V. 2001. *Salmonella. Guide to Foodborne Pathogens*. New York: A John Wiley & Sons, Inc., Publication. hlm 163-191.
- Guyton, A.C. and Hall, J.E. 2006. *Textbook of Medical Physiology*. 11th ed. Philadelphia, PA, USA: Elsevier Saunders.
- Havelaar, A.H, J. Garsen, K.Takumi, M.A Koedam, J.B Dufrenne, F.M van Leusden, L. De la Fonteyne, J.T Bousema and J.G Vos. 2001. A rat Model For Dose-response Relationship of Salmoneel Enteritidis Infection. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 442-452.
- Jawets, E., J.L. Melnick, E.A and Adelberg. 2005. *Microbiologia medica*. 18a ed. Mexico.
- Junqueira, L.C. 2007. *Persiapan Jaringan Untuk Pemeriksaan Mikroskopik*. *Histology Dasar: teks dan atlas*. Edisi 10. Jakarta : EGC. 3 – 5.

- Klotchko, A. 2011. *Salmonellosis*. Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/228174-overview>. [Accessed 19 April 2012]
- Kubo, I. K. Nihei, and K. Tsujimoto. 2003. Antibacterial Action of Anacardic Acid against Metichilin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *Journal Agrie Food Chem* 51: 7624-7628.
- Nofiana, R. 2002. Kloning Gen PDI-Like dari Bakteri Termofilik *B. acidocaldarius* RP 1. Tesis Program Pasca Sarjana ITB, Bandung.
- Nunung, 2000. Budidaya Jambu Mente. Bina Aksarah, Jakarta.
- Murray, R.K. 2009. *Medical Microbiology*. 6th ed. Mosby Elsevier: Philadelphia.
- Murray, R.K. 2009. Edisi Bahasa Indonesia Biokimia Harper. 27th edition. Alih bahasa Pendit, Brahm U. Jakarta : EGC pp 299.
- Mitchell, R.N and Cotran, R.S. 2003. Acute and chronic inflammation. Dalam S.L Robbins and V. Kumar, Robbins Basic Pathology (7th ed.). pp 35-39. Philadelphia:Elsevier Saunders.
- Myers, P. and D. Armitage. 2004, *Rattus norvegicus*, Animal Diversity Web, http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Rattus_norvegicus.html [21 April 2014].
- Ohl, M.E. and S.I. Miller. 2006. Salmonella: Model for Bacterial Pathogenesis. http://www.vmf.uni-leipzig.de/ik/wimmunologie/Lehre/SS06/SS06-1-10_Salmonella_Bacterial_pathogenesis.pdf [18 April 2012].
- Paul, G.E. and Janet. 2010. Burton's Microbiology for the Health Sciences. Lippincot William and Wilkins. Chapter 8: 139-135.
- Portillo, F.G. 2000. Molecular and cellular biology of Salmonella pathogenesis in microbial foodborne disease : Mechanisms of pathogenesis and toxin synthesis. Technomic Publishing Company. Inc. 851 New Holland Avenue Box 3535. Lancaster, Pennsylvania 17604 USA, pp 3-7.
- Reddy, N.S and A. Nimmagadda. 2003. The microbial Amylase family. *African Journal of Biotechnology*. 2: 645-648.
- Rosyadi, A.C., S.Murwani, dan P. Trisunuwati. 2012. Uji Potensi Ekstrak Kulit Biji (*Pericarp*) Jambu Mete (*Anacardium occidentale*) dengan Pelarut Etanol Terhadap Bakteri *Salmonella Enteritidis* SP-1-PKH secara *In Vitro*. Program Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya.

- Sirois, M. 2005. *Laboratory Animal Medicine: Principles and Procedure*. Missouri: Mosby Inc.
- Simpem, I.N. 2009. Isolasi Cashew Nut Shell Liquid Dari Kulit Niji Jambu Mete (*Anacardium occidentale* L.) Dan Kajian Beberapa Sifat Fisiko-Kimianya. *Jurnal Kimia* 2(2): 71-76.
- Singh, B.R. and V.D. Sharma. 2003. Relationship between pathogenic potential and surface characteristics of *Salmonella* serovars. *Pantnagar J. Res.*, 1: 53-58.
- Sumardjo, D. 2006. *Pengantar Kimia*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC;2006.
- Venturella, V.S. 2000. *Remington the Science and Practice of Pharmacy* 20th Edition. Philadelphia. 675-683.
- Xu, and P.D. Cranwell. 2003. *Gastrointestinal and Nutrition The Neonatal Pig*. United.
- Yuniarti, T. 2008. *Ensiklopedia Tanaman Obat Tradisional*. Yogyakarta: Media Pressindo.
- Zhuang, Jiang-Xing, Yong-Hua Hu, Mei-Hua Yang, Feng-Jiao Liu, Ling Qiu, Xing-Wang Zhou, and Qing-Xi Chen. 2010. Irreversible Competitive Inhibitory Kinetics of Cardol Triene on Mushroom Tyrosinase. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58: 12993-12998.



LAMPIRAN



Lampiran 1. Keterangan Laik Etik



KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARENCE"

No: 284-KEP-UB

KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:

PENELITIAN BERJUDUL : HISTOPATOLOGI HEPAR DAN AKTIVITAS ENZIM
PROTEASE PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*) YANG
DIINFEKSI *Salmonella* SP. SETELAH TERAPI EKSTRAK
ETANOL KULIT BIJI (PERICARP) JAMBU METE (*Anacardium occidentale*)

PENELITI : SISILIA DWI DAMAYANTI

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 24 November 2014

Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya



Prof. Dr. Aulanni'am, DES.
NIP. 19600903 198802 2 001

Lampiran 2. Hasil Determinasi Kulit Biji Jambu Mete



DINAS KESEHATAN PROPINSI JAWA TIMUR
UPT MATERIA MEDICA
 Jalan Lahor No.87 Telp. (0341) 593396 Batu (65313)
KOTA BATU

Nomor : 074 / 368 / 101.8 / 2014
 Sifat : Biasa
 Perihal : Determinasi Tanaman Jambu Mete

Memenuhi permohonan saudara :

Nama/ NIM : NELA DWI OKTAVIA / 115130101111054
 NONI SASANTI M. P. / 115130101111060
 GALIH BAGUS S. / 115130100111053
 TAUFIQ TRIHADI U. / 115130100111063
 SISILIA DWI D. / 115130101111071
 Fakultas : KEDOKTERAN, UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG

1. Perihal determinasi tanaman jambu mete

Kingdom : Plantae (Tumbuhan)
 Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
 Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)
 Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
 Kelas : Dicotyledonae
 Bangsa : Sapindales
 Suku : Anacardiaceae.
 Marga : *Anacardium*
 Jenis : *Anacardium occidentale* L.
 Nama Daerah : Jambu monyet, jambu mente (Indonesia), jambu mete (Jawa), jambu meo (Sunda), gaju (Lampung).

Kunci Determinasi : 1b-2b-3b-4b-6b-7b- 9b- 10b-11b-12b-13b-14a-15ba-197b-208b-219f-220b-224b-225b- 227b- 229b-230b-234b-235b-236b-237a-238b-1a-2b-2.

2. Morfologi

kotor. Daun: Tunggal, bulat telur, tepi rala, pangkal runcing, ujung membulat, panjang 8-22 cm lebar 5-13 cm, pertulangan menyirip, hijau. Bunga: Majemuk, bentuk malai, di ketiak daun dan di ujung cabang, daun pelindung bulat telur, panjang 5-10 mm, hijau, kelopak berambut, panjang 4-5 mm, hijau muda, mahkota runcing, masih muda putih setelah tua merah. Buah: Batu, keras melengkung, panjangnya ±3 cm, hijau kecoklatan. Biji : Bulat panjang, melengkung, pipih, putih. Akar: Tunggang, coklat.

3. Nama Simplisia

: *Anacardii Pericarpium*/ Kulit biji jambu mete.

4. Kandungan

: Kulit biji jambu mete mengandung senyawa kimia seperti tanin, anacard acid dan cardol, yang bermanfaat sebagai antibakteri dan antiseptik. Selain itu daun jambu monyet yang masih muda (100 gram) juga mempunyai komposisi kandungan kimia seperti vitamin A sebesar 2689 SI, vitamin C sebesar 65 gram, kalori 73 gram, protein 4,6 gram, lemak 0,5 gram, hidrat arang 16,3 gram, kalsium 33 miligram, fosfor 64 miligram, besi 8,9 miligram dan air 78 gram. Kulit batang mengandung alkaloida, flavonoida, tanin dan saponin.

5. Penggunaan

: Penelitian

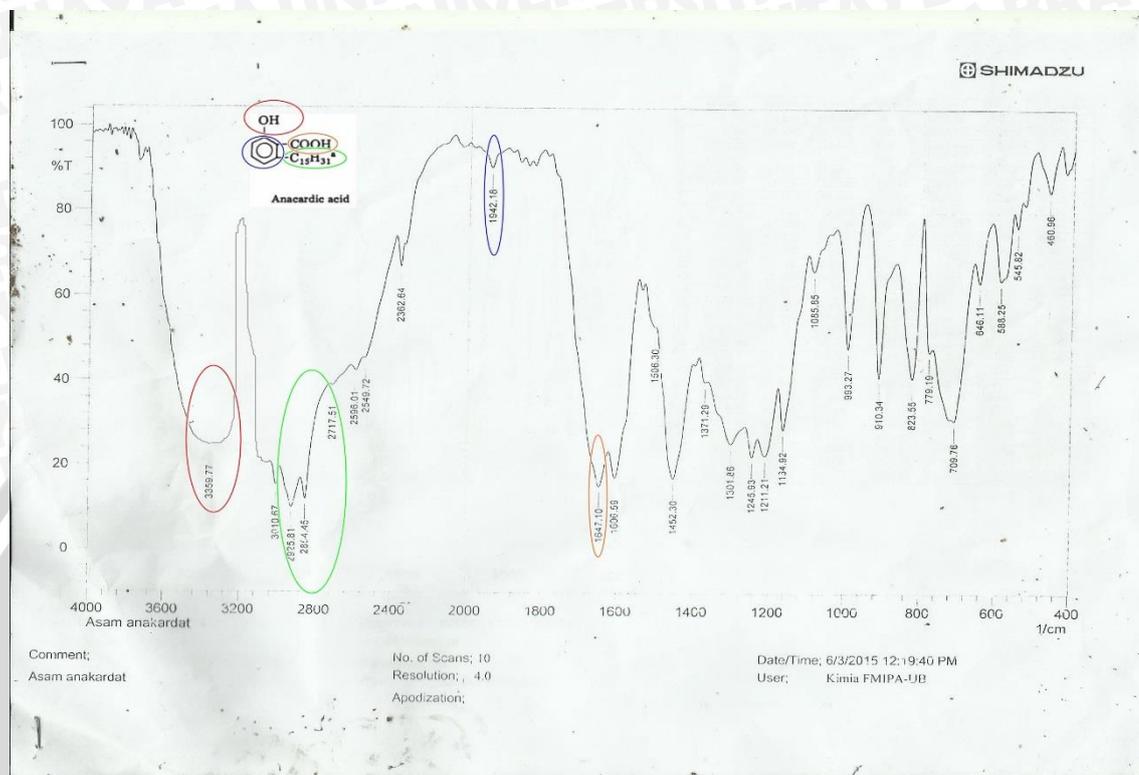
6. Daftar Pustaka

- Anonim. <http://www.iptek.net/jambumonyet>, diakses tanggal 20 Oktober 2010.
- Anonim. <http://www.plantamor.com/jambumonyet>, diakses tanggal 9 Desember 2010.
- Anonim. <http://www.warintek.com/jambumonyet>, diakses tanggal 30 Oktober 2010.
- Syamsuhidayat, Sri sugati dan Hutapea, Johnny Ria. 1991. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia IV*. Dep. Kesehatan Republik Indonesia: Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan.
- Van Steenis, CGGJ. 2008. *FLORA*. Pradnya Paramita, Jakarta.

Demikian surat keterangan determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

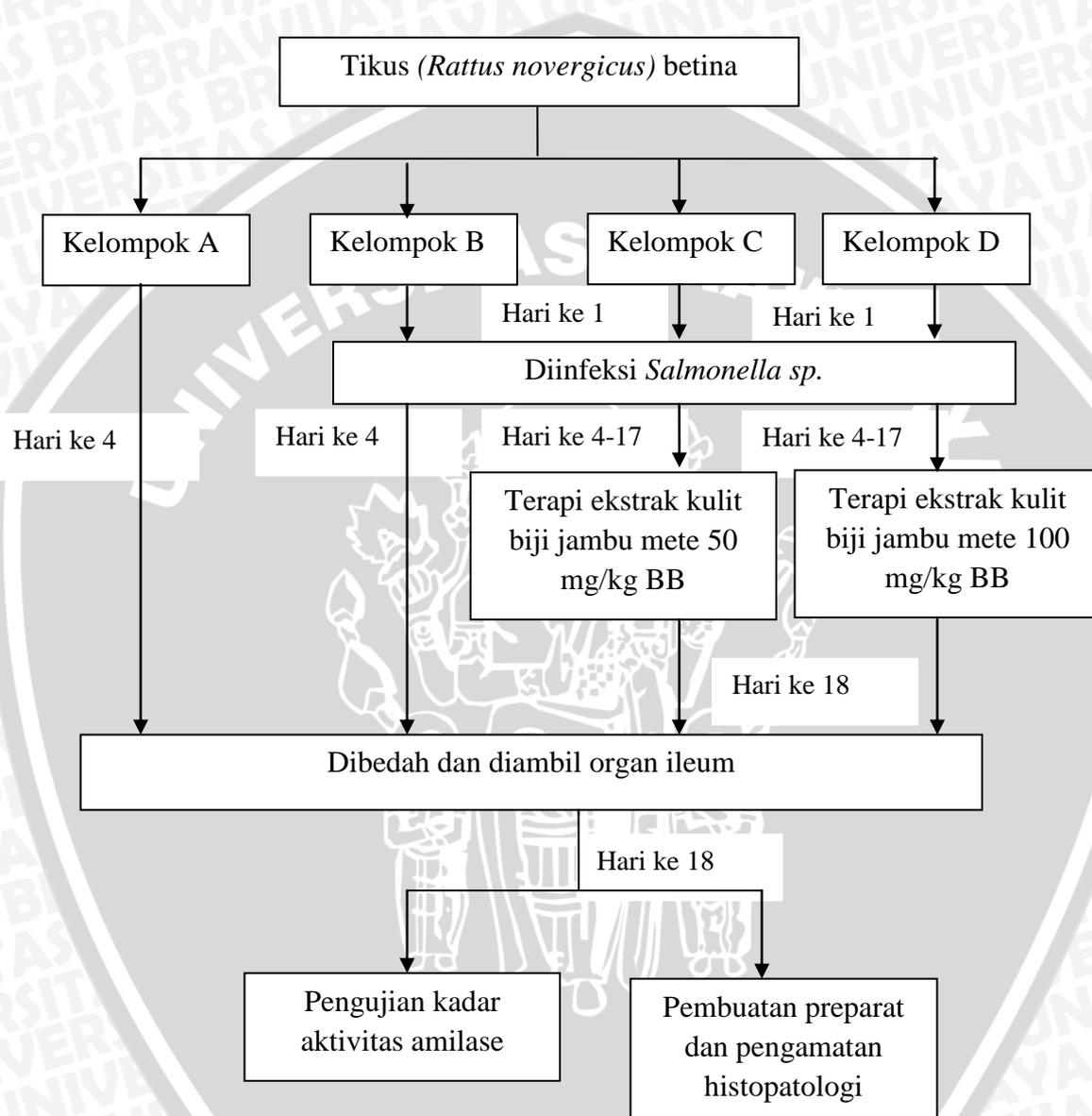
Batu, 04 November 2014
 Kepala UPT Materia Medica Batu

Drs. Husin RM. Apt. MKes.
 NIP.19611102 199103 1 003

Lampiran 3. Hasil Uji FTIR Ekstrak Kulit Biji Jambu Mete

Berdasarkan spektrum FTIR yang ditunjukkan pada gambar tersebut dapat diketahui bahwa pada panjang gelombang $3.359,77\text{ cm}^{-1}$ terdapat gugus O-H golongan senyawa fenol. Panjang gelombang $2.925,81\text{ cm}^{-1}$ dan $2.717,51\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya gugus C-H sp^3 . Pada panjang gelombang $1.942,18$ menunjukkan adanya cincin aromatis. Untuk panjang gelombang $1.647,10\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya ikatan rangkap C=O. Dari interpretasi FTIR tersebut diketahui bahwa senyawa yang terkandung dalam ekstrak kulit biji jambu mete memiliki gugus fungsi yang sesuai dengan struktur kimia asam anakardat.

Lampiran 4. Skema Kerja Penelitian



Lampiran 5. Perhitungan Dosis

Dosis ekstrak etanol kulit biji jambu mete yang digunakan adalah 50 mg/kgBB, dan 100 mg/kgBB (U.S. EPA, 2009) dengan rata-rata berat badan tikus 200 gr, maka:

➤ Dosis 50 mg/kgBB

Ekstrak etanol kulit biji jambu mete yang ditimbang

$$\begin{aligned} &= \text{Dosis} \times \text{BB tikus} \times 5 \text{ ekor} \times \text{Lama Pemberian} \\ &= 50 \text{ mg/kgBB} \times 0,2 \text{ kg} \times 5 \text{ ekor} \times 2 \text{ hari} \\ &= 100 \text{ mg} = 0,1 \text{ g} \end{aligned}$$

➤ Dosis 100 mg/kgBB

Ekstrak etanol kulit biji jambu mete yang ditimbang

$$\begin{aligned} &= \text{Dosis} \times \text{BB tikus} \times 5 \text{ ekor} \times \text{Lama Pemberian} \\ &= 100 \text{ mg/kgBB} \times 0,2 \text{ kg} \times 5 \text{ ekor} \times 2 \text{ hari} \\ &= 200 \text{ mg} = 0,2 \text{ g} \end{aligned}$$

- Lama pemberian dimaksudkan untuk pembuatan suspensi ekstrak etanol kulit biji jambu mete yang dilakukan setiap dua hari sekali selama 2 minggu, hal ini bertujuan agar ekstrak yang dibuat dalam keadaan *fresh*.

Ekstrak etanol kulit biji jambu mete hasil evaporasi yang telah ditimbang sesuai dosis 50 mg/kgBB, dan 100 mg/kg BB, kemudian diencerkan dengan menggunakan DMSO sebanyak 2 mL pada setiap dosis dan ditambah akuades hingga volume menjai 10 mL dan digunakan untuk terapi selama 2 hari untuk masing-masing kelompok. Terapi dilakukan selama 14 hari sebanyak 1 mL/ekor/hari dengan menggunakan sonde.

Lampiran 6. Uji Biokimia *Salmonella sp.*

1) Uji *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA)

- Diambil satu ose isolat yang diduga *Salmonella sp.* lalu diinokulasikan ke TSIA dengan cara ditusuk ke dasar media agar, selanjutnya pada media agar miring.
- Tabung ditutup secara longgar untuk memelihara kondisi aerobik pada waktu inkubasi agar miring dan mencegah produksi H₂S berlebih. Diinkubasi pada temperatur 37°C selama 24 jam.

2) Uji Indole

- Diinokulasikan koloni *Salmonella sp* dari media TSIA menggunakan ose ke dalam media *tryptophan broth* dan diinkubasikan pada temperatur 37°C selama 24 jam.
- Ditambahkan 3-4 tetes reagen kovac melalui dinding tabung reaksi.
- Interpretasi indol terhadap uji spesifik *Salmonella sp.* adalah negatif yaitu adanya cincin hijau di permukaan media.

3) Uji MR-VP

- Biakan dari media TSIA diambil dengan ose dan diinokulasi ke dalam tabung yang berisi 10 mL media MR-VP.
- Diinkubasi pada temperatur 37°C selama 48 jam. Ditambahkan 5-6 tetes indikator *methyl red* pada tabung.

4) Uji Citrate

- Koloni dari TSIA positif diinokulasi kedalam *Simon Citrate Agar* (SCA) dengan cara ditusuk dan digores menggunakan ose.

5) Uji *Phenol Red Lactose Broth*

- Koloni dari TSIA miring diinokulasikan ke dalam *Phenol Red Lactose Broth*.
- Diinkubasi pada temperature 37⁰C dan diamati setiap 24 jam selama 48 jam. Hasil reaksi positif ditandai dengan produksi asam (warna kuning) dengan atau tanpa gas. *Salmonella sp.* memberikan hasil reaksi negative ditandai dengan tidak adanya perubahan warna dan pembentukan gas.

6) Uji *Phenol Red Sucrose Broth*.

- Koloni dari TSIA miring diinokulasikan ke dalam *Phenol Red Sucrose Broth*
- Diinkubasi pada temperatur 37⁰C dan diamati setiap 24 jam selama 48 jam. Hasil reaksi positif ditandai dengan produksi asam (warna kuning) dengan atau tanpa perubahan warna kuning dan pembentukan gas.

7) Uji *Phenol Red Glukosa Broth*.

- Koloni dari TSIA miring diinokulasikan ke dalam *phenol redglukosa broth* kemudian diinkubasikan pada 37⁰C selama 48 jam.
- Interpretasi *Salmonella sp.* ditandai hasil reaksi positif yaitu ada perubahan warna dan pembentukan gas.

8) Uji *Phenol Red Manitol Broth*.

- Koloni dari TSIA miring diinokulasikan ke dalam *phenol red manitol broth* kemudian diinkubasikan pada 37⁰C selama 48 jam.

- Interpretasi *Salmonella sp.* ditandai hasil reaksi positif yaitu ada perubahan warna dan pembentukan gas.

9) Uji Katalase

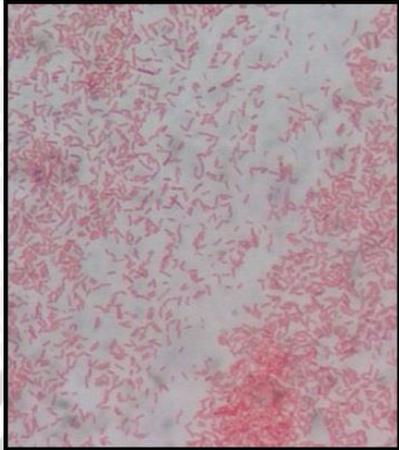
- Diambil satu ose isolat yang diduga *Salmonella sp.* lalu dioleskan pada *object glass*. *Object glass* ditetesi dengan larutan H₂O₂ 3% 2-3 tetes.
- Preparat diamati terbentuknya gelembung gas pada preparat. Jika terjadi reduksi H₂O₂ akan terlihat gelembung O₂ di sekeliling pertumbuhan bakteri.

10) Uji Pengujian Sulfur Indol Motility (SIM)

- Diinokulasikan koloni *Salmonella sp* dari media TSIA menggunakan ose ke dalam media SIM dan diinkubasikan pada temperatur 37°C selama 24 jam.
- Ditambahkan 5 tetes reagen kovac melalui dinding tabung reaksi.
- Interpretasi SIM terhadap uji spesifik *Salmonella sp.* adalah positif yaitu perubahan warna media menjadi hitam.

Lampiran 7. Hasil Uji Konfirmasi *Salmonella sp.*

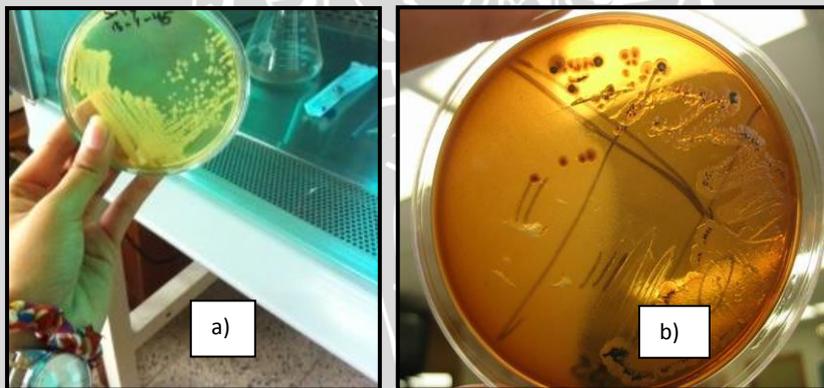
7.1 Uji Pewarnaan Gram



Gambar lampiran 7.1:

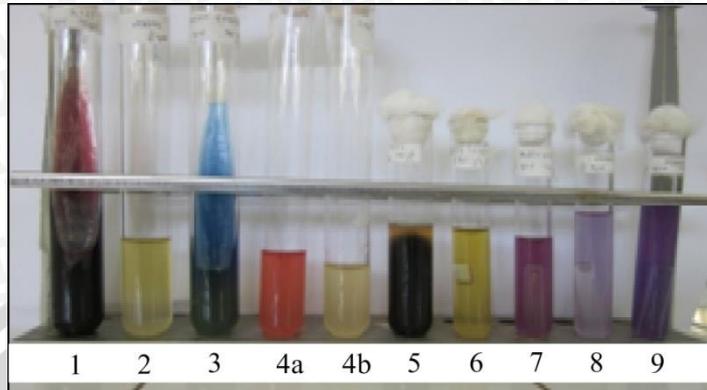
Pewarnaan Gram perbesaran 1000x tampak koloni berwarna merah dan berbentuk *bacillus*, menunjukkan bahwa bakteri yang diidentifikasi adalah Gram negatif sesuai dengan ciri *Salmonella sp.*

7.2 Penanaman pada *Nutrient Agar (NA)* dan *Salmonella Shigella Agar (SSA)*



Gambar Lampiran 7.2 : (a) Media NA tampak koloni *Salmonella sp.* berwarna bening dan *smooth*, (b) media SSA tampak koloni *Salmonella sp.* berwarna hitam (*black spot*).

7.3 Uji Biokimia



Hasil Uji Biokimia *Salmonella sp.* berdasarkan SNI 2897:2008

No.	Uji	Hasil
1	<i>Triple Sugar Iron Agar</i>	+
2	Indol	-
3	<i>Simon Citrate Agar</i>	+
4a	Methyl red	+
4b	Voges-Proskauer	-
5	Motilitas	+
6	<i>Phenol Red Manitol Broth</i>	+
7	<i>Phenol Red Sucrose Broth</i>	-
8	<i>Phenol Red Lactose Broth</i>	-
9	<i>Phenol Red Glucose Broth</i>	+
10	Katalase	+



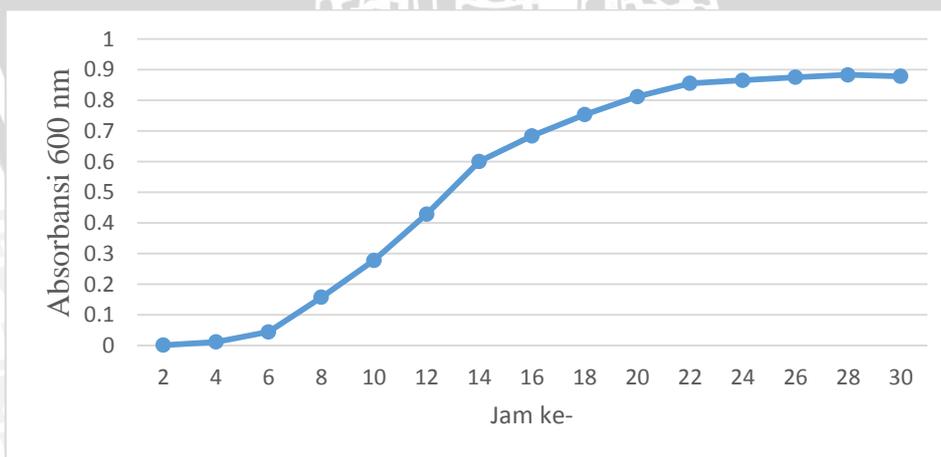


Lampiran 9. Perhitungan Pertumbuhan *Salmonella sp.*

Tabel Hasil Perhitungan *Total Plate Count* (TPC) dan *Optical Density* (OD)

Jam ke-	Nilai OD	Σ TPC
2	0.002	1,1 x 10 ⁵
4	0.012	2,4 x 10 ⁵
6	0.045	4,5 x 10 ⁶
8	0.158	8,9 x 10 ⁶
10	0.278	1,3 x 10 ⁶
12	0.429	2,8 x 10 ⁶
14	0.601	4,0 x 10 ⁷
16	0.684	5,7 x 10 ⁷
18	0.753	6,2 x 10 ⁷
20	0.812	1,3 x 10 ⁷
22	0.855	2,6 x 10 ⁸
24	0.865	3,1 x 10 ⁸
26	0.875	3,4 x 10 ⁸
28	0.883	4,1 x 10 ⁸
30	0.878	4,3 x 10 ⁸

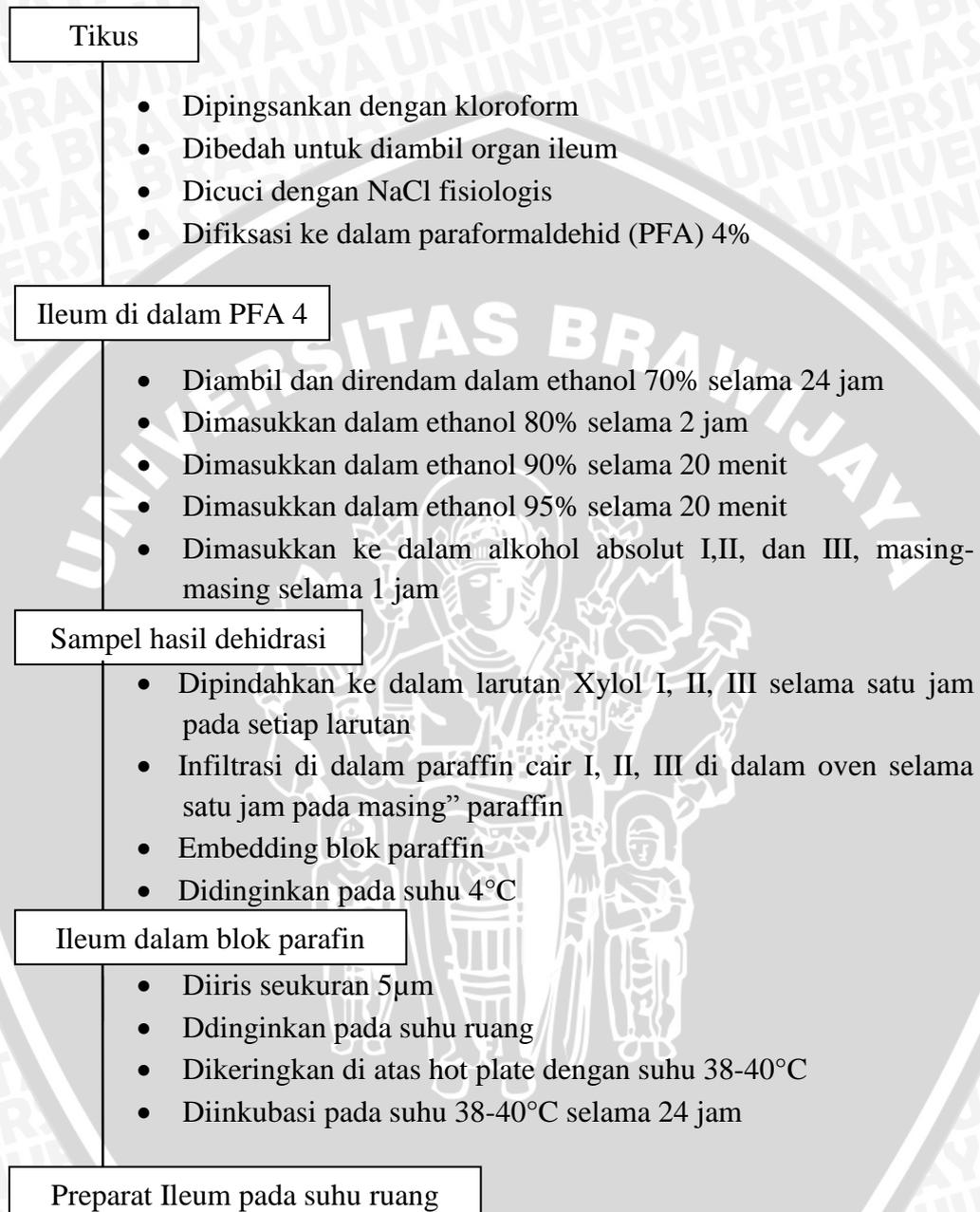
Keterangan : - Hasil perhitungan TPC pada koloni dengan jumlah 25-250 koloni
 - Hasil pengukuran OD pada panjang gelombang 600nm



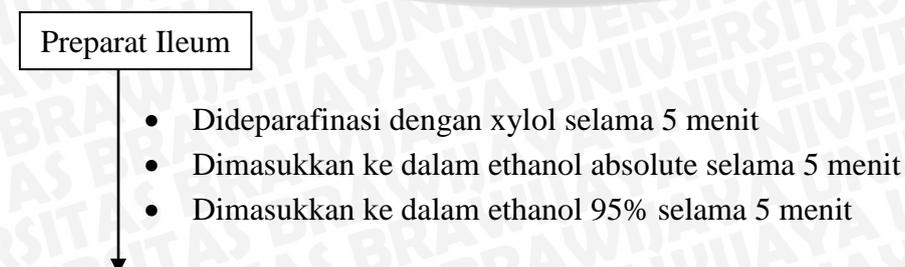
Gambar Lampiran 9.1 Kurva pertumbuhan *Salmonella sp.*

Lampiran 10. Langkah Langkah Pembuatan Preparat Histologi (Kiernan; Janqueira & Carneiro, 2007).

1. Pengambilan Sampel (Sampling), Pemoangan Organ, dan Fiksasi



2. Pewarnaan Hematoksilin-Eosin



- Dimasukkan ke dalam ethanol 90% selama 5 menit
- Dimasukkan ke dalam ethanol 80% selama 5 menit
- Dimasukkan ke dalam ethanol 70% selama 5 menit
- Dicuci dengan air mengalir selama 15 menit

Preparat Ileum

- Diwarnai dengan Hematoksilin selama 10 menit sampai diperoleh hasil pewarnaan yang terbaik
- Dicuci dengan air mengalir selama 30 menit
- Dibilas dan direndam dengan akuades selama 5 menit
- Diwarnai dengan Eosin selama 5 menit
- Direndam kembali kedalam akuades
- Dimasukkan ke dalam methanol selama 70% selama 10 menit
- Dimasukkan ke dalam methanol selama 80% selama 10 menit
- Dimasukkan ke dalam methanol selama 90% selama 10 menit
- Dimasukkan ke dalam methanol selama 95% selama 10 menit
- Dimasukkan ke dalam methanol absolute 3 x 5 menit
- Dimasukkan dalam larutan xylol selama 2 x 5 menit
- Dikeringkan
- Ditutup preparat dengan cover gelas

Preparat Ileum



Lampiran 11. Langkah-langkah pengukuran aktifitas amilase

1. Ekstraksi enzim amilase (Suarni dan Rauf , 2007)
 - a) Sampel dihaluskan/ dihancurkan dengan blender
 - b) Ditambah buffer asetat 0,2 M pH 5 (untuk setiap 1 gr sampel ditambah 5 MI buffer asetat).
 - c) Disimpan selama 10 menit, dengan sekali-sekali diputar.
 - d) Disaring dengan menggunakan kapas.
 - e) Filtrat disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 2000 rpm pada suhu 5^oC.
 - f) Supernatan (ekstrak enzim) yang dihasilkan diukur volumenya dan ditempatkan ke dalam wadah steril untuk dianalisis.
2. Pembuatan kurva standar glukosa

250 mg glukosa

- Dilarutkan dengan 250 mL akuades
- Diencerkan hingga diperoleh konsentrasi 500 ppm
- Dibuat variasi konsentrasi 200 ppm, 300 ppm, 350 ppm, 400 ppm, 450 ppm, 500 ppm
- Diambil 250µl dari tiap konsentrasi glukosa
- Ditambah 250 µl amilum
- Diinkubasi dengan suhu 30°C selama 20 menit
- Ditambah 500µl DNS dan dipanaskan selama 10 menit
- Larutan didinginkan dengan air mengalir
- Ditambah aquades 5 mL
- Diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 550 nm

Kurva standart glukosa

3. Uji aktivitas enzim amilase

Skema metode Somogyi-Nelson (Nelson 1944 dalam Breuil & Saddler 1985)

1 ml Enzim

- Larutan pati 1% sebanyak 0,5 mL dan 0,5 mL buffer fosfat 0,2 M pH 5,0
- Diinkubasi pada suhu 100°C selama 10 menit.
- Ditambahkan 1mL reagen Nelson-Somogyi
- Dididihkan selama 5 menit sehingga sama dengan suhu kamar
- Ditambahkan 5mL 1 mL reagen arseno molibdat
- Ditambahkan 7 mL air suling
- Dikocok hingga homogen
- Absorbansi diukur pada $\lambda 550$ nm
- Dihitung aktivitas amilase

Hasil

$$\text{Aktivitas enzim amilase} = \frac{C}{T} \times 1 \text{ unit}/1\mu \text{ mol}(1)$$

dimana:

C = Konsentrasi glukosa per mL ekstrak enzim (μ mol)

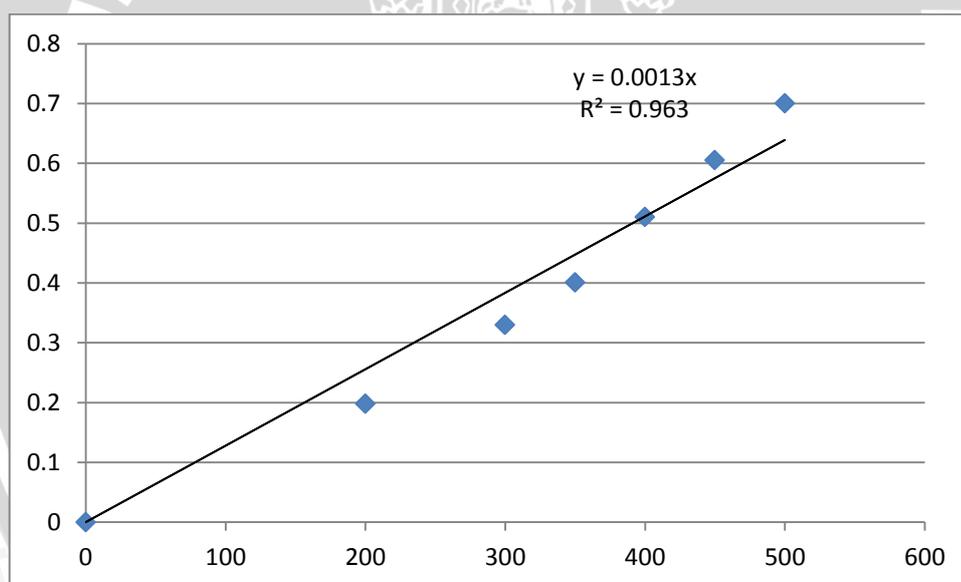
T = Waktu inkubasi (menit)

1 unit enzim amilase = besarnya aktivitas enzim yang dibutuhkan untuk membebaskan 1 μ mol glukosa per menit per mL enzim .

Lampiran 12. Pembuatan Kurva Standar

Absorbansi larutan standar glukosa

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
200	0.198
300	0.33
350	0.401
400	0.51
450	0.605
500	0.7



Gambar 13.1 Kurva standar glukosa

Lampiran 13. Tabel Data absorbansi

Kelompok	Absorbansi Glukosa				
Kelompok A	0.162	0.168	0.15	0.158	0.173
Kelompok B (salmonellosis)	0.558	0.545	0.56	0.453	0.442
Kelompok C (terapi 50 mg/kg BB)	0.365	0.363	0.392	0.428	0.416
Kelompok D (terapi 50 mg/kg BB)	0.198	0.207	0.203	0.194	0.216



Lampiran 14. Perhitungan Aktivitas Amilase

Rumus perhitungan

Misal : pengukuran aktivitas amilase kontrol dengan waktu inkubasi 10 menit dan suhu 37°C

Persamaan kurva baku : $y = 0,001x$

Dimana x = konsentrasi sampel

Maka :

$$y = 0,001x$$

$$0,162 = 0,001x$$

$$x = 0,162/0,001$$

$$x = 162 \mu\text{g/mL}$$

Untuk menentukan aktivitas amilase digunakan persamaan

Aktivitas enzim amylase = $C \times 1/T \times 1 \text{ unit}/1 \text{ mikromol}$

$$= 162 \mu\text{g/mL} \times 1/10 \text{ menit} \times 1 \text{ unit}/180$$

$$= 0,090 \text{ unit}$$

Keterangan:

C: Konsentrasi Sampel

T : Waktu Inkubasi

Lampiran 15. Data Aktivitas Amilase

Kontrol negatif	0.090
	0.093
	0.083
	0.088
	0.096
salmonellosis	0.310
	0.303
	0.311
	0.252
	0.246
Terapi 50 mg	0.203
	0.202
	0.218
	0.238
	0.231
Terapi 100 mg	0.110
	0.115
	0.113
	0.108
	0.120

Presentasi aktivitas amilase sebagai berikut:

Kelompok B (salmonellosis)

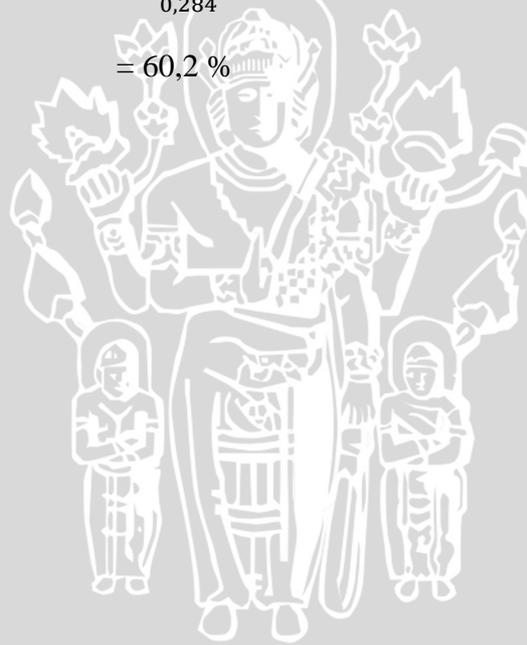
$$\begin{aligned}
 \text{Peningkatan aktivitas amilase} &= \frac{\text{rataan kelompok B} - \text{rataan kontrol}}{\text{rataan kontrol}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,284 - 0,090}{0,090} \times 100\% \\
 &= 215,5\%
 \end{aligned}$$

Kelompok C (terapi 50mg/kg BB)

$$\begin{aligned}\text{Penurunan aktivitas amilase} &= \frac{\text{rataan kelompok B} - \text{rataan kelompok C}}{\text{rataan kelompok B}} \times 100\% \\ &= \frac{0,284 - 0,218}{0,284} \times 100\% \\ &= 22,4 \%\end{aligned}$$

Kelompok D (terapi 100mg/kg BB)

$$\begin{aligned}\text{Penurunan aktivitas amilase} &= \frac{\text{rataan kelompok B} - \text{rataan kelompok D}}{\text{rataan kelompok B}} \times 100\% \\ &= \frac{0,284 - 0,113}{0,284} \times 100\% \\ &= 60,2 \%\end{aligned}$$



Lampiran 16. Data Dan Uji Statistik Aktivitas Amilase

Tabel Uji normalitas data

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		Aktivitas Amilase
N		20
Normal Parameters ^a	Mean	.17650
	Std. Deviation	.082686
Most Extreme Differences	Absolute	.253
	Positive	.253
	Negative	-.129
Kolmogorov-Smirnov Z		1.131
Asymp. Sig. (2-tailed)		.155
a. Test distribution is Normal.		

Tabel Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances			
Aktivitas Amilase			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
21.758	3	16	.151

Lampiran 17. Uji Statistik ANOVA

ANOVA							
Aktivitas Amilase			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	(Combined)		.124	3	.041	121.389	.000
	Linear Term	Contrast	.000	1	.000	.009	.924
		Deviation	.124	2	.062	182.079	.000
Within Groups			.005	16	.000		
Total			.130	19			

Uji Lanjutan BNJ

Multiple Comparisons

Aktivitas Amilase

Tukey HSD

(I) Kelompok Perlakuan	(J) Kelompok Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	salmonellosis	-.194400 [*]	.011691	.000	-.22785	-.16095
	dosis 50mg	-.128400 [*]	.011691	.000	-.16185	-.09495
	dosis 100mg	-.023200	.011691	.234	-.05665	.01025
salmonellosis	kontrol	.194400 [*]	.011691	.000	.16095	.22785
	dosis 50mg	.066000 [*]	.011691	.000	.03255	.09945
	dosis 100mg	.171200 [*]	.011691	.000	.13775	.20465
dosis 50mg	kontrol	.128400 [*]	.011691	.000	.09495	.16185
	salmonellosis	-.066000 [*]	.011691	.000	-.09945	-.03255
	dosis 100mg	.105200 [*]	.011691	.000	.07175	.13865
dosis 100mg	kontrol	.023200	.011691	.234	-.01025	.05665
	salmonellosis	-.171200 [*]	.011691	.000	-.20465	-.13775
	dosis 50mg	-.105200 [*]	.011691	.000	-.13865	-.07175

* . The mean difference is significant at the 0.05 level.

Pemberian notasi pada uji BNJ

Aktivitas Amilase

Tukey HSD

Kelompok Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
kontrol	5	.09000		
dosis 100mg	5	.11320		
dosis 50mg	5		.21840	
salmonellosis	5			.28440
Sig.		.234	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.