

**EFEK PREVENTIF PEPTIDA ANTIMIKROBIAL LENDIR
LELE (*Clarias sp*) TERHADAP ENTERITIS PADA
HEWAN MODEL *Mus musculus* YANG
DIINFEKSI *Escherichia coli* DILIHAT
DARI HISTOPATOLOGI
DAN EKSPRESI TNF- α
DUODENUM**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:
ANIS ANIQOH
145130100111033



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Efek Preventif Peptida Antimikrobal Lendir Lele (*Clarias sp*) Terhadap Enteritis pada Hewan Model *Mus Musculus* yang Diinfeksi *Escherichia coli* Dilihat dari Histopatologi dan Ekspresi TNF- α Duodenum

Oleh :
ANIS ANIQOH
145130100111033

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji pada tanggal 8 Agustus 2018 dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. Sri Murwani, drh., MP
NIP. 19630101 198903 2 001

drh. Dahliatul Qosimah, Mkes
NIP. 19820127 201504 2 001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

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

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini :

Nama : Anis Aniqoh

NIM : 145130100111033

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

Efek Preventif Peptida Antimikrobial Lendir Lele (*Clarias sp*) Terhadap Enteritis pada Hewan Model *Mus musculus* yang Diinfeksi *Eschericia coli* Dilihat dari Histopatologi dan Ekspresi TNF- α Duodenum

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 termasuk di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian 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, 8 Agustus 2018

Yang menyatakan,

(Anis Aniqoh)

NIM. 145130100111033

Efek Preventif Peptida Antimikrobal Lendir Lele (*Clarias Sp*) Terhadap Enteritis pada Hewan Model *Mus musculus* yang Diinfeksi *Escherichia coli* Dilihat dari Histopatologi dan Ekspresi TNF- α Duodenum

ABSTRAK

Escherichia coli bersifat patogen menyebabkan enteritis ketika menginfeksi saluran pencernaan. Penanganan yang dilakukan sampai saat ini masih menggunakan antibiotik, tetapi memiliki resiko terjadinya resistensi bakteri terhadap antibiotik. Oleh karena itu, dibutuhkan alternatif lain yang dapat digunakan tanpa menimbulkan resiko terjadinya resistensi seperti peptida antimikrobal. Peptida antimikrobal dapat ditemukan di lendir lele (*Clarias sp*) yang memiliki sifat bakterisidal. Tujuan penelitian ini yaitu mengetahui efek preventif peptida antimikrobal lendir lele terhadap enteritis yang disebabkan oleh *Escherichia coli* terhadap histopatologi dan ekspresi *Tumor Necrosis Factor* (TNF- α) duodenum. Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan RAL ragam One Way ANOVA dibagi dalam lima kelompok, yaitu K-, K+ dan kelompok preventif peptida antimikrobal lendir lele konsentrasi 20%, 30%, 40% yang diberikan secara per oral pada hari ke 8-14. *Escherichia coli* yang digunakan untuk menginfeksi dosisnya 3×10^8 CFU/mL dengan sonde lambung sebanyak 1 mL pada hari ke 15-17. Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah histopatologi dan ekspresi TNF- α duodenum. Hasil penelitian menunjukkan bahwa peptida antimikrobal lendir lele konsentrasi 30% merupakan konsentrasi terbaik yang mampu menghambat kerusakan duodenum serta menurunkan ekspresi TNF- α ($57,4900 \pm 8,73$). Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa peptida antimikrobal lendir lele dapat digunakan sebagai preventif terhadap enteritis infeksi *Escherichia coli* dengan konsentrasi terbaik 30%.

Kata kunci : peptida antimikrobal, lendir lele (*Clarias sp*), *Escherichia coli*, duodenum, *Tumor Necrosis Factor* (TNF- α)

Effect Preventive of Antimicrobial peptides Mucus Catfish (*Clarias sp*) to Enteritic in mice (*Mus musculus*) Infection by *Escherichia coli* Seen from Histopathology and Expression of TNF- α Duodenum

ABSTRACT

Escherichia coli pathogen can cause enteritic. Handling do it to date using antibiotics, but antibiotics have a risk of bacterial become resistance. Therefore, need alternative to this problem can be used without risk resistance such antimicrobial peptides. Antimicrobial peptides found in mucus catfish (*Clarias sp*) which has bactericidal. The purpose this research to know effect preventive antimicrobial peptides mucus catfish to enteritic cause *Escherichia coli* with observed histopathology and expression of *Tumor Necrosis Factor* (TNF- α) duodenum. This research is an experimental using completely Randomized Design (CRD) using *One Way ANOVA* and consist of five groups, that is K-, K+, and preventive with different concentrations of antimicrobial peptides mucus catfish that are 20%, 30%, 40%. Preventive antimicrobial peptides mucus catfish that is given orally on the eighth to fourteen day of the research. Infection of *Escherichia coli* with a dose 3×10^8 CFU/mL was orally 1mL on the fifteen to seventeen day of the research. The observed parameters in this research is the histopathology and expression TNF- α duodenum. The results of this study showed concentration 30% antimicrobial peptides mucus catfish can inhibit damage in duodenum and decrease expression TNF- α ($57,4900 \pm 8,73$). This result can be conclude that antimicrobial peptides mucus catfish can be used preventive enteritic infection by *Escherichia coli* with concentration 30% is the best.

Keywords : Antimicrobial peptides, mucus catfish (*Clarias sp*), *Escherichia coli*, duodenum, *Tumor Necrosis Factor* (TNF- α)

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT Yang mengatur segala urusan manusia dan atas segala limpahan rahmat, taufik, serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir ini yang berjudul Efek Preventif Peptida Antimikrobal Lendir Lele (*Clarias Sp*) terhadap Enteritis pada Hewan Model *Mus Musculus* yang Diinfeksi *Escherichia coli* Dilihat dari Histopatologi dan Ekspresi TNF- α Duodenum. Sholawat dan salam semoga tetap tercurah kepada Nabi Agung Muhammad SAW. Selama penelitian dan penyusunan laporan skripsi ini, halangan, dan rintangan terus menerus terjadi pada diri penulis, sehingga dalam penulisannya melibatkan banyak pihak. Oleh karena itu penulis menyampaikan terimakasih dan penghargaan setinggi-tingginya kepada:

2. Dr, Sri Murwani, drh., MP selaku pembimbing I yang banyak memberikan bimbingan, nasihat, dan arahan kepada penulis.
3. drh. Dahliatul Qosimah, M.kes selaku pembimbing II yang banyak memberikan bimbingan, nasihat, dan arahan kepada penulis.
4. drh. Dodik Prasetyo, M.Vet selaku penguji I yang telah banyak memberikan saran dan kritik yang membangun kepada penulis.
5. drh. Indah Amalia Amri, M.Sc selaku penguji II yang telah banyak memberikan saran dan kritik yang membangun kepada penulis.
6. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Dekan FKH UB yang selalu memberikan dukungan tiada henti demi kemajuan kampus tercinta.
7. Ayah dan Ibu tercinta serta seluruh keluarga besar yang telah memberikan do'a, kasih sayang, dan dukungan yang tak terhingga kepada penulis.
8. Seluruh staf dan karyawan FKH, yang telah membantu proses administrasi dalam membuat tugas akhir.
9. Keluarga besar Kertopamuji 51, Siti Barokah, Lutfiana Pratiwi, Anganti Setyo Ayu, Sabrina Doloksaribu, Sutarso, Dendi Aris, Caesarin Nirwanarti, Winda Hermin, Nadila Dwi A, Ajeng Gradianti, Wafa Agya yang telah menjadi pendorong dalam meraih kesuksesan di FKH UB.

10. Ucapan terimakasih kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian karya tulis ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Akhirnya hanya kepada Allah SWT kita kembalikan semua urusan dan semoga karya tulis ini dapat bermanfaat bagi semua pihak, khususnya bagi penulis dan para pembaca pada umumnya, semoga Allah SWT meridhoi.

Malang, 8 Agustus 2018

Anis Aniqoh



DAFTAR ISI

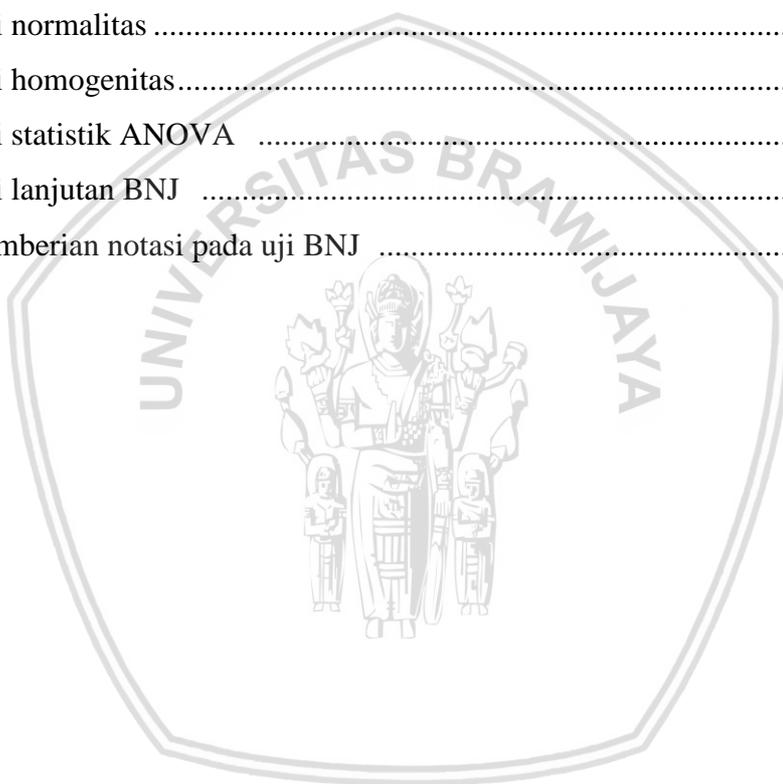
	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xiii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Batasan Masalah	5
1.4 Tujuan	6
1.5 Manfaat	6
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Mencit (<i>Mus musculus</i>)	7
2.1.1 Taksonomi	7
2.1.2 Morfologi dan fisiologi	9
2.2 Bakteri <i>E. coli</i>	10
2.2.1 Karakteristik	10
2.2.2 Infeksi <i>E. coli</i>	12
2.2.3 Sistem Pertahanan <i>E. coli</i>	17
2.2.4 Sistem Pertahanan pada Saluran Pencernaan Hospes	17
2.3 Peptida antimikrobial	18
2.3.1 Definisi	18
2.3.2 Mekanisme Terhadap Bakteri	19
2.4 Lele	21
2.5 Gambaran Histopatologi Duodenum	22
2.6 Proses Terjadinya Inflamasi	23
2.7 TNF- α	24
BAB 3. KERANGKA KONSEP	26
3.1 Kerangka Konsep	26
3.2 Hipotesa	31
BAB 4. METODOLOGI PENELITIAN	32
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	32
4.2 Sampel Penelitian	32
4.3 Rancangan Penelitian	33
4.4 Variabel Penelitian	34
4.5 Materi Penelitian	34



4.5.1 Alat	34
4.5.2 Bahan	35
4.6 Tahapan Penelitian	35
4.6.1 Pembagian Kelompok Mencit	35
4.6.2 Aklimasi	36
4.6.3 Penanaman bakteri pada media EMBA	36
4.6.4 Ekstrak lendir lele	37
4.6.5 Pembuatan Suspensi dan Inokulasi Bakteri <i>E.coli</i>	37
4.6.6 Pengambilan Duodenum Mencit	38
4.6.7 Pembuatan preparat histopatologi duodenum	38
4.6.8 Pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE)	39
4.6.9 Pengamatan histopatologi	40
4.6.10 Pembuatan preparat ekspresi TNF- α metode IHK	40
4.7 Analisis Data	41
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN	42
5.1 Induksi Enteritis oleh <i>Escherichia coli</i>	42
5.2 Hasil Preventif Lendir Lele pada Enteritis yang Diinfeksi <i>Escherichia coli</i>	42
5.3 Efek Preventif Peptida Antimikrobia Lendir Lele (<i>Clarias sp</i>) Terhadap Mencit (<i>Mus musculus</i>) yang Diinfeksi <i>Escherichia coli</i> Dilihat dari Histopatologi Duodenum	43
5.4 Efek Preventif Peptida Antimikrobia Lendir Lele (<i>Clarias sp</i>) Terhadap Enteritis pada Mencit (<i>Mus musculus</i>) yang Diinfeksi <i>Escherichia coli</i> Dilihat dari Ekspresi TNF- α Duodenum	52
BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN	62
6.1 Kesimpulan	62
6.2 Saran	62
DAFTAR PUSTAKA	63
LAMPIRAN	70

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Volume maksimum yang diberikan pada hewan	8
4.1 Rancangan Penelitian	33
5.1 Data perhitungan rata-rata ekspresi TNF- α hasil uji Tukey HSD	59
7.1 Uji normalitas	77
7.2 Uji homogenitas.....	77
7.3 Uji statistik ANOVA	77
7.4 Uji lanjutan BNJ	78
7.5 Pemberian notasi pada uji BNJ	79



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Morfologi Mencit (<i>Mus musculus</i>)	9
2.2 Bakteri <i>Escherichia coli</i>	12
2.3 Intestinal babi yang terinfeksi <i>E.coli</i>	15
2.4 Lesi khas di intestinal yang terinfeksi EPEC	15
2.5 Mekanisme persebaran bakteri resisten terhadap antibiotik	16
2.6 Mekanisme peptida antimikrobal membunuh bakteri	20
2.7 Ikan lele (<i>Clarias sp</i>)	22
2.8 Gambaran histologi duodenum	23
5.1 Intestin mencit kontrol negatif dan kontrol positif	43
5.2 Gambaran Histopatologi duodenum kontrol positif	45
5.3 Gambaran Histopatologi duodenum kontrol negatif	47
5.4 Gambaran Histopatologi duodenum kontrol P1	48
5.4 Gambaran Histopatologi duodenum kontrol P2	49
5.4 Gambaran Histopatologi duodenum kontrol P3	50
5.5 Gambaran imunohistokimia duodenum kontrol negatif	53
5.6 Gambaran imunohistokimia duodenum kontrol positif	54
5.7 Gambaran imunohistokimia duodenum perlakuan 1 (20%).....	55
5.8 Gambaran imunohistokimia duodenum perlakuan 2 (30%).....	56
5.9 Gambaran imunohistokimia duodenum perlakuan 3 (40%).....	56
5.10 Histogram nilai <i>mean</i> dan standar deviasi TNF- α duodenum	57

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Kerangka Operasional Penelitian	70
2. Perhitungan Konsentrasi	71
3. Pengambilan Organ Duodenum	72
4. Pewarnaan Histopatologi Duodenum	73
5. Immunohistokimia untuk Ekspresi TNF- α	74
6. Data Ekspresi TNF- α dengan immunoratio	75
7. Data Statistik IHK TNF- α	76
8. Surat Keterangan Kesehatan Hewan Coba	79
9. Keterangan Kelaikan Etik	80
10. Dokumentasi Penelitian	81

DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

%	: Persen
°C	: Derajat Celcius
/	: per
BB	: Berat Badan
CD	: Cluster of Differentiation
CFU/ml	: Colony Forming Unit/ml
DAB	: Diaminobenzidine
EMBA	: Eosin Methylene Blue Agar
EPEC	: Enteropathogenic Escherichia coli
g	: Gram
HE	: Hematoxylen Eosin
LPB	: Lipopolysaccharide Binding Protein
LPS	: Lipopolisakarida
MDR	: Multiple Drug Resistant
mL	: Mililiter
MN	: Mononuclear
NaCl	: Natrium klorida
NF-kB	: Nuclear Factor kappa B
°C	: Derajat Celsius
PBS	: Phosphate Buffer Saline
PMN	: Polimorfonuclear
RAL	: Rancangan Acak Lengkap RAL
rpm	: Rotasi per menit
sp.	: Spesies
TLR	: Toll Like Reseptor
TNF- α	: <i>Tumor necrosis factor alpha</i>
x	: kali

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Laporan bertajuk *The Review on Antimicrobial Resistance* menyoroti penggunaan antibiotik yang berlebihan tidak hanya untuk menangani infeksi tetapi juga untuk mencegah infeksi atau bahkan menaikkan berat badan hewan. Di Amerika Serikat, antibiotik digunakan pada hewan mencapai 8.893 ton. Sedangkan manusia hanya sekitar 3.379 ton. Diperkirakan pada tahun 2050 menyebabkan orang berpotensi meninggal akibat dari resistensi antibiotik (O'Neill, 2015; Verraes *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2017). Menurut *World Health Organization* (2017), juga berpendapat bahwa pemberian antibiotik terhadap ternak memberikan resiko berbahaya bagi manusia yang mengkonsumsinya karena menimbulkan resistensi antibiotik terhadap bakteri.

Nurmala dkk. (2015), menyatakan saat ini banyak bakteri gram-negatif yang mengalami resistensi terhadap antibiotik sebesar 70,7% seperti bakteri *Escherichia coli*, *C. freundii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* dan lain-lain. Pada penelitian ini bakteri *E. coli* dipilih sebagai bakteri penyebab penyakit karena bakteri *E. coli* dapat bertahan di lingkungan dan bersifat patogen. Setiap bakteri memiliki resisten terhadap antibiotik tertentu, untuk bakteri *E. coli* sudah bersifat *Multiple-drug resistant* (MDR) seperti golongan gentamisin, trobamisin, sulfonamide, dan fluoroquinolon (Gibson *et al.*, 2010).

Menurut Suwito (2009), prevalensi gastroenteritis yang disebabkan *E. coli* pada hewan non-ruminansia sebesar 0,1-87% sedangkan pada ruminansia sebesar 0,3-87%. Bakteri *E. coli* mampu menginfeksi hospes sampai menyebabkan terjadinya sepsis syok. Menurut Bashahun and Amina (2017), diare pada anak sapi dengan gejala klinis sepsis memiliki prevalensi sebanyak 30%.

Escherichia coli merupakan bakteri flora normal di gastrointetinal hewan dan manusia yang bersifat anaerob fakultatif, berbentuk batang, mempunyai flagella untuk alat gerak. *Escherichia coli* dibagi menjadi 2 jenis yaitu patogen (EPEC, EHEC, ETEC, EAEC, EIEC, AIEC) dan non-patogen (flora normal). *Escherichia coli* yang memiliki sifat patogen, ketika masuk ke dalam tubuh akan menyebabkan terjadinya infeksi sedangkan bakteri non-patogen (flora normal) bisa membahayakan sel hospes apabila bakteri tersebut tinggal di luar gastrointestinal (saluran perkencingan, saluran reproduksi) (Verhaegen *et al.*, 2015; Elfidasari dkk, 2011).

Menurut Abrar (2009), bakteri masuk ke dalam tubuh akan melakukan adhesi sehingga mengawali proses pathogenesis kemudian melakukan kolonisasi di sel epitel usus. Infeksi *E. coli* di usus halus dapat menyebabkan erosi pada epitel permukaan usus. Jika bakteri merusak jaringan sel hospes, maka akan menimbulkan reaksi imunitas yang menyebabkan terjadinya inflamasi dan kerusakan jaringan semakin besar. Saat terjadinya proses inflamasi dapat ditemukannya sitokin salah satunya sitokin proinflamasi yaitu TNF- α . Sitokin tersebut dapat ditemui pada sel fagositosis seperti makrofag, monosit, neutrofil. Apabila jumlah bakteri yang menginfeksi berkurang, maka ekspresi TNF- α

menurun dan kerusakan jaringan akan berkurang (Murphy and Weaver, 2017; Abbas *et al.*, 2007)

Fitri (2012), beranggapan bahwa peptida antimikrobial dapat digunakan sebagai obat antibakteri tanpa menimbulkan resistensi karena peptida antimikrobaial dapat ditemukan pada sel-sel dan jaringan makhluk hidup. Menurut Benhamed *et al.* (2014), peptida antimikrobial dapat ditemukan di dalam lendir lele. Oleh karena itu, lendir lele dapat menggantikan antibiotik yang berbahaya. Peptida antimikrobial dapat dijadikan sebagai pertahanan tubuh karena tersusun oleh molekul yang mempunyai efek sebagai antibakteri dengan cara membunuh pathogen tersebut sehingga menghambat proses terjadinya adhesi, invasi dan kolonisasi.

Peptida antimikrobial bekerja dengan menembus lipopolisakarida, kemudian terjadi kerusakan di membran sel bakteri. Kerusakan membran sel bakteri terjadi akibat adanya pengikatan hidrofobik oleh peptida antimikrobial (Ladram and Nicolas, 2016). Peptida ini memiliki sifat selektif yang tinggi sehingga bisa membedakan target sel hospes dan sel bakteri karena adanya perbedaan muatan antara sel bakteri dengan peptida antimikrobial. Peptida antimikrobial memiliki muatan positif sedangkan bakteri memiliki muatan negatif sehingga bakteri diikat oleh peptida antimikrobial karena adanya reaksi elektrostatik (Jakel *et al.*, 2012).

Peptida antimikrobial sebagai preventif dapat membantu tubuh hospes untuk melawan agen infeksius. Adanya antimikroba berkaitan erat dengan tingkat kerusakan sel-sel hospes. Sehingga kerusakan sel-sel hospes akibat infeksi dapat

dicegah. Kerusakan sel hospes akibat infeksi bakteri akan memicu respon imunitas dengan mengeluarkan sitokin seperti TNF- α sehingga terjadi inflamasi. Peptida antimikrobal memiliki fungsi lain yaitu sebagai antiinflamasi. Oleh karena itu, peneliti tertarik untuk melakukan penelitian yang berjudul “Efek Preventif Peptida Antimikrobal Lendir Lele (*Clarias Sp*) terhadap Enteritis pada Hewan Model *Mus Musculus* yang Diinfeksi *Eschericia coli* Dilihat dari Histopatologi dan Ekspresi TNF- α Duodenum”.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui :

1. Apakah pemberian peptida antimikrobal lendir lele (*Clarias sp*) memiliki efek preventif enteritis pada hewan coba yang diinfeksi *E. coli* berdasarkan gambaran histopatologi duodenum?
2. Apakah pemberian peptida antimikrobal lendir lele (*Clarias sp*) memiliki efek preventif enteritis pada hewan coba yang diinfeksi *E. coli* berdasarkan penurunan ekspresi TNF- α duodenum?

1.3 Batasan Masalah

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

1. Hewan coba yang digunakan adalah Mencit (*Mus musculus*) jantan berumur 2 bulan strain Balb/C dengan berat badan 25-30 gram (Zhang *et*

al., 2008) yang diperoleh dari “*Animal Experiment*” di Singosari yang memiliki surat keterangan pemeriksaan kesehatan hewan dan telah memiliki sertifikat layak etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya No : 735-KEP-UB

2. Bakteri *E. coli* EPEC (Dewi dkk, 2013), yang digunakan dalam penelitian ini merupakan kultur yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
3. *Escherichia coli* diberikan sebanyak 1 ml dengan jumlah konsentrasi 3×10^8 CFU/ml (sesuai dengan Mc Farland 1) per ekor mencit per hari selama 3 hari. Pemberian secara per oral menggunakan sonde lambung (Harmita dan Radji, 2006; Dewi dkk, 2013)
4. Lele yang digunakan berumur 4-6 bulan dengan panjang ± 25 cm dan berat > 115 gram. Lendir diambil pada bagian punggungnya dengan cara dikerik dengan kondisi lele masih hidup setelah dipuasakan selama 1 hari (Loganathan *et al.*, 2011)
5. Koleksi lendir lele diberikan sebagai preventif dengan konsentrasi 20%, 30%, 40% sebanyak 1 ml selama 7 hari secara per oral menggunakan sonde lambung (Akunne *et al.*, 2016)
6. Ekspresi TNF- α diukur dengan menggunakan teknik Imunohistokimia. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan Immunoratio (Renshaw, 2017).

7. Gambaran histopatologi duodenum yang diamati dengan menggunakan pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE) dengan melihat sel epitel, vili usus, sel radang (Feneglio-Preiser *et al.*, 2008).

1.4 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui pengaruh pemberian peptida antimikrobal lendir lele (*Clarias sp*) untuk mencegah enteritis pada hewan coba yang di infeksi *E. coli* berdasarkan gambaran histopatologi duodenum.
2. Mengetahui pengaruh pemberian peptida antimikrobal lendir lele (*Clarias sp*) untuk mencegah enteritis pada hewan coba yang di infeksi *E. coli* berdasarkan penurunan ekspresi TNF- α duodenum.

1.5 Manfaat Penelitian

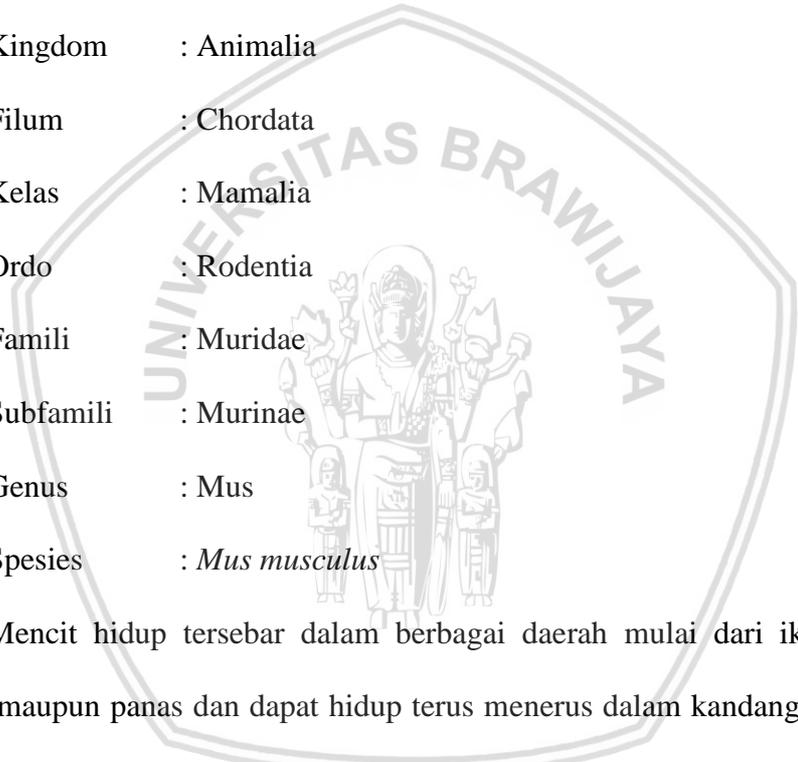
Sebagai sumber informasi untuk meningkatkan pengetahuan dalam pemanfaatan lendir lele bagi kesehatan manusia dan hewan serta menjadi acuan untuk penelitian selanjutnya.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Mencit (*Mus musculus*)

2.1.1 Taksonomi

Menurut Musser *et al.* (2016), berdasarkan taksonominya mencit digolongkan seperti berikut ini :



Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Famili	: Muridae
Subfamili	: Murinae
Genus	: Mus
Spesies	: <i>Mus musculus</i>

Mencit hidup tersebar dalam berbagai daerah mulai dari iklim dingin, sedang, maupun panas dan dapat hidup terus menerus dalam kandang atau secara bebas sebagai hewan liar. Mencit dapat digunakan sebagai hewan coba penelitian umumnya yang berwarna putih. Hewan ini banyak digunakan pada penelitian laboratorium dengan kisaran 47-63% (Hubrecht, 2014).

Mencit dipilih sebagai hewan coba untuk penelitian karena mudah dalam penanganan, harganya murah, siklus hidupnya pendek, pengadaan hewan ini tidak sulit, pola reproduksinya yang singkat, variasi sifat-sifatnya tinggi, serta sifat produksi dan reproduksinya yang menyerupai hewan mamalia lainnya. Selain itu

secara fisiologis, anatomi, dan patologisnya hampir sama dengan mamalia lainnya. Ada beberapa alasan lainnya yaitu masa hidupnya yang relatif pendek, jumlah anak per kelahiran banyak, memiliki variasi sifat yang beragam, memiliki struktur yang hampir sama dengan mamalia (Hartati dkk., 2015).

Menurut Harmita dan Radji (2006), setiap hewan memiliki batas volume maksimum untuk diberikan. Volume yang diberikan secara per oral tidak boleh melebihi volume standar yang sudah ada. Volume standar ini sudah sesuai dengan batas maksimal dari sistem pencernaan dalam menampung sesuatu. Kelebihan volume dapat memberikan resiko terhadap sistem pencernaannya. Batasan volume maksimum padatan atau larutan yang bisa diberikan pada hewan coba (mencit) dapat dilihat pada **Tabel 2.1**

Tabel 2.1 Volume maksimum padatan dan larutan yang diberikan pada hewan (Harmita dan Radji, 2006)

Hewan	volume maksimum (ml)				
	IV	IM	IP	SC	PO
Mencit (20-30g)	0,5	0,05	1	0,5-1	1
Tikus (100g)	1	0,1	2-5	0,5-5	5
Hamster (50g)	-	0,1	1-2	2,5	2,5
Marmut (250g)	-	0,25	2-5	5	10

2.1.2 Morfologi dan Fisiologi

Mencit (*Mus musculus*) merupakan golongan hewan rodensia seperti tikus maupun kelinci. Mencit memiliki bulu yang pendek, halus, berwarna putih, dan ekornya berwarna kemerahan dengan ukuran yang lebih panjang daripada bagian badan dan kepala seperti pada **Gambar 2.1**. Mencit termasuk dalam omnivora alami yang dapat hidup selama 1-3 tahun, mencit memiliki badan yang kecil, dan memiliki berat badan 20-40 gram untuk jantan dan 18-35 gram untuk betina, suhu normal yaitu 36,5-38°C. Mencit tergolong hewan nokturnal (beraktivitas pada malam hari). Kebutuhan pakan mencit yaitu sekitar 4-5 gram/hari. Kebutuhan minum pada mencit sekitar 4-8 ml/hari. Lama hidup mencit satu sampai tiga tahun, dengan masa kebuntingan yang pendek (18-21 hari) dan masa aktifitas reproduksi yang lama (2-14 bulan) sepanjang hidupnya. Mencit mencapai dewasa pada umur 35 hari dan dikawinkan pada umur delapan minggu baik pada pejantan maupun pada betina. siklus estrus 4-5 hari, fertilitas terjadi setelah 2 jam setelah kawin dan perkawinan terjadi pada waktu estrus. Kelahiran anak mencit memiliki berat 0,5-1,0 gram per ekor, berat saat disapih yaitu 18-20 gram per ekor (Hankenson, 2014; Muliani, 2011).



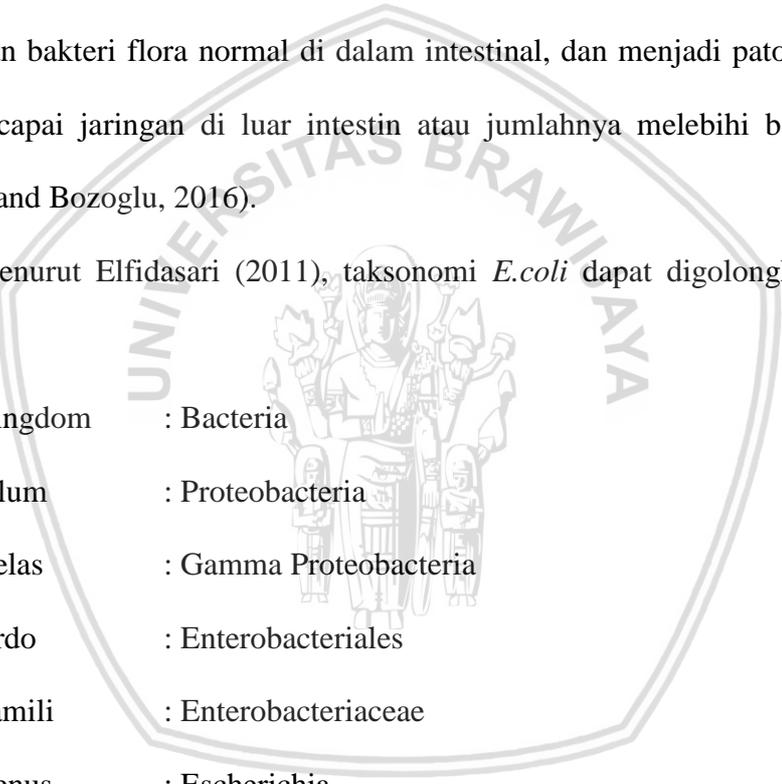
Gambar 2.1 Morfologi mencit (*Mus musculus*) (Hankenson, 2014).

2.2 Bakteri *E. coli*

2.2.1 Karakteristik

Bakteri *Escherichia coli* (*E. coli*) merupakan bakteri gram negatif, berbentuk batang. Bakteri *E. coli* bersifat anaerob fakultatif dan tidak memiliki spora. Bentuk koloninya bundar, cembung, dan halus dengan tepi yang nyata. Bisa tumbuh pada suhu 7-50°C dan optimum pada suhu 35°C. Bakteri *E. coli* merupakan bakteri flora normal di dalam intestinal, dan menjadi patogen apabila bisa mencapai jaringan di luar intestin atau jumlahnya melebihi batas normal (Erkmen and Bozoglu, 2016).

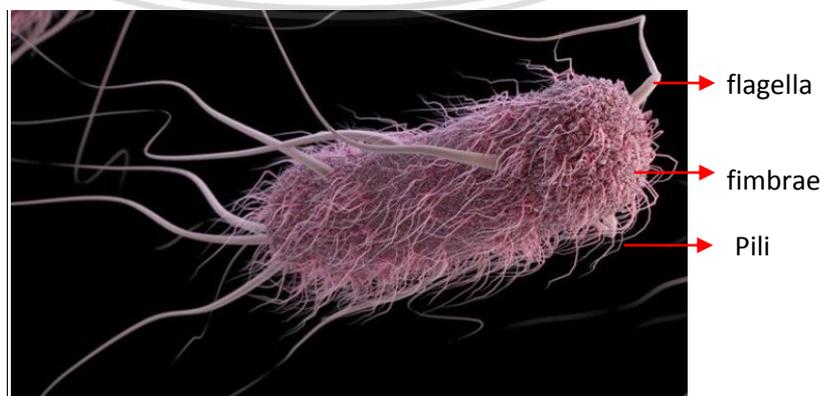
Menurut Elfidasari (2011), taksonomi *E.coli* dapat digolongkan sebagai berikut :



Kingdom	: Bacteria
Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Gamma Proteobacteria
Ordo	: Enterobacteriales
Famili	: Enterobacteriaceae
Genus	: Escherichia
Spesies	: <i>Escherichia coli</i>

Spesies *E. coli* bersifat motil karena bakteri ini memiliki flagel peritrik, tetapi beberapa dari bakteri ini ada yang bersifat nonmotil. Penentuan serotipe bakteri *E. coli* berdasarkan antigen dinding sel (O), kapsular (K), dan flagela (H). Diperkirakan terdapat 173 antigen O, 80 antigen kapsular (K), 56 antigen H yang telah diisolasi (Hussain, 2015).

Struktur sel *E. coli* dikelilingi oleh membran sel, terdiri dari sitoplasma yang mengandung nukleoprotein. Membran sel *E. coli* ditutupi oleh dinding sel berlapis kapsul. Flagela, fimbriae, dan pili *E. coli* menjulur dari permukaan sel (**Gambar 2.2**). Pili terbagi menjadi 2 jenis yaitu *common pili* dan *sex pili*. *Common pili* berfungsi untuk melakukan adhesi atau pelekatan sehingga bisa mengawali tahap melakukan infeksi, sedangkan *sex pili* berfungsi untuk mentransfer DNA dengan bakteri lain. Tiga struktur antigen utama permukaan yang digunakan untuk membedakan serotipe golongan *E. coli* adalah dinding sel, kapsul dan flagela. Dinding sel *E. coli* berupa lipopolisakarida yang bersifat pirogen dan menghasilkan endotoksin serta diklasifikasikan sebagai antigen O. Kapsul *E. coli* berupa polisakarida yang dapat melindungi membran luar dari fagositik dan sistem komplemen, diklasifikasikan sebagai antigen K. Flagela *E. coli* terdiri dari protein yang bersifat antigenik dan dikenal sebagai antigen H. Faktor virulensi *E. coli* juga disebabkan oleh enterotoksin, hemolisin kolisin, siderophor, dan molekul pengikat besi (aerobaktin dan entrobaktin) (Murwani, 2015).



Gambar 2.2 Bakteri *Escherichia coli* (Center for Disease Control and Prevention, 2013).

Escherichia coli termasuk kelompok bakteri koliform fekal, yang lebih tepatnya bakteri koliform fekal adalah bakteri indikator pencemar bakteri patogen. Selain itu, *E. coli* merupakan bakteri penyebab kolibacillosis pada hewan ternak, dan penyebab utama infeksi saluran kemih (*urinary tract infection/UTI*) serta menyebabkan meningitis akut, pneumonia, infeksi intra-abdominal, infeksi enterik (Novianti, 2015; Wibowo dan Wahyuni, 2008).

2.2.2 Infeksi *Escherichia coli*

Bakteri *E.coli* merupakan salah satu bakteri flora normal pada hewan dan manusia, tetapi mampu bersifat patogen dengan kondisi tertentu. Penularan dapat melalui rute horizontal, yang diawali dengan masuknya bakteri melalui pakan atau minum yang terkontaminasi *E.coli*. Selanjutnya bakteri masuk pada saluran pencernaan dan akan membelah diri. Jumlah bakteri di dalam tubuh yang melebihi normal menjadi bersifat patogen. Secara umum, bakteri *E. coli* yang melebihi jumlah batas normal dapat mengganggu sistem pencernaan dan merusak jaringan seperti vili usus (Elfidasari, 2011; (Erkmen and Bozoglu, 2016).

Verhaegen (2015), menyatakan bahwa bakteri *E.coli* memiliki beberapa sub tipe yang dapat menyebabkan diare dan memiliki sifat infeksi yang berbeda diantaranya yaitu ETEC, EPEC, EAEC, AIEC, EIEC, dan EHEC :

1. *Enterotoxigenic Escherichia coli* (ETEC) merupakan subtipe yang bersifat non-invasif, karena gejala klinisnya berupa diare tanpa demam. Diare yang disebabkan oleh subtipe ETEC dapat terjadi pada manusia, babi, domba, kambing, sapi, anjing dan kuda. Faktor virulensi dari ETEC dengan cara

adhesin yaitu melakukan adhesi pada epitel jaringan intestinal. Proses adhesin dapat terjadi karena adanya fimbriae di bagian tubuhnya. Toksin yang terdapat pada ETEC terbagi menjadi 2 macam yaitu protein besar dan protein kecil. Protein besar berupa LT enterotoxin yang mirip dengan toksin kolera baik secara strukturnya maupun fungsinya, sedangkan untuk protein kecil berupa ST enterotoxin yang dapat menyebabkan akumulasi cGMP didalam sel target dan diikuti oleh sekresi cairan maupun elektrolit ke dalam lumen intestinal (Mortezaei, 2014).

2. *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC) merupakan sub tipe dari *E. coli* yang bersifat invasif. Bakteri ini tidak memproduksi toksin ST dan LT, tetapi menggunakan adhesin untuk berikatan dengan sel intestinal hospes. Adhesi pada mukosa intestinal menyebabkan penyusunan kembali aktin dalam sel hospes dan menyebabkan deformasi sel intestinal yang merupakan penyebab utama diare.
3. *Enteraggative Escherichia coli* (EAEC) hanya terjadi pada manusia, belum ada indikasi secara spesifik yang ditemukan pada hewan. Bakteri ini memiliki fimbriae yang menyebabkan agregat sel pada kultur jaringan. Ikatannya dengan mukosa intestinal dan menyebabkan diare encer (*watery diarrhea*) tanpa demam. *Enteraggative Escherichia coli* (EAEC) bersifat (tetapi memproduksi hemolisin dan ST enterotoxin yang mirip dengan ETEC.
4. *Enteroinvasive Escherichia coli* (EIEC) sindroma yang identik dengan shigellosis, dengan diare profus dan demam tinggi. Bakteri ini dapat masuk ke dalam permukaan dinding usus dan menimbulkan gejala disentri ringan.

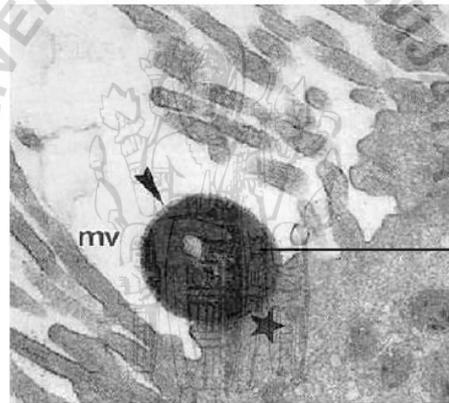
Kemampuan inilah yang sering menyebabkan kekeliruan terhadap penyakit disentri yang disebabkan oleh *Shigella* (Ud-din and Wahid, 2014).

5. *Adherent-Invasive Escherichia coli* (AIEC) mampu menginvasi epitelial intestinal dan mampu melakukan proliferasi lebih efektif dalam hospes yang mengalami defek imunitas alami. AIEC dihubungkan dengan mukosa ileal penderita *Crohn's disease* pada manusia.
6. *Enterohemorrhagic Escherichia coli* (EHEC) merupakan subtype dengan sifat invasif moderat dan kegagalan ginjal secara mendadak. Bakteri ini menggunakan fimbriae bakterial untuk melekat (*E. coli common pilus/ECP*). Anggota yang paling terkenal dari verotipe ini adalah O157:H7 yang menyebabkan diare berdarah tanpa demam dan dapat menyebabkan suatu wabah (Goldwater and Bettelheim, 2012).

Hewan yang terinfeksi bakteri *E. coli* memiliki gejala klinis secara umum yaitu diare berdarah, demam, vomit. Bakteri *E. coli* yang bersifat sistemik dapat merusak organ sehingga menimbulkan salpingitis, arthritis, perikarditis, koligranuloma, kerusakan karkas (Wibowo dan Wahyuni, 2008). Salah satu contoh hewan yang terinfeksi bakteri *E. coli* dapat dilihat pada **Gambar 2.3**, hewan tersebut ususnya mengalami dilatasi, edema, hemoragi (Luppi, 2017). Hewan yang terinfeksi *E. coli* secara histopatologi dapat dilihat pada **Gambar 2.4**.



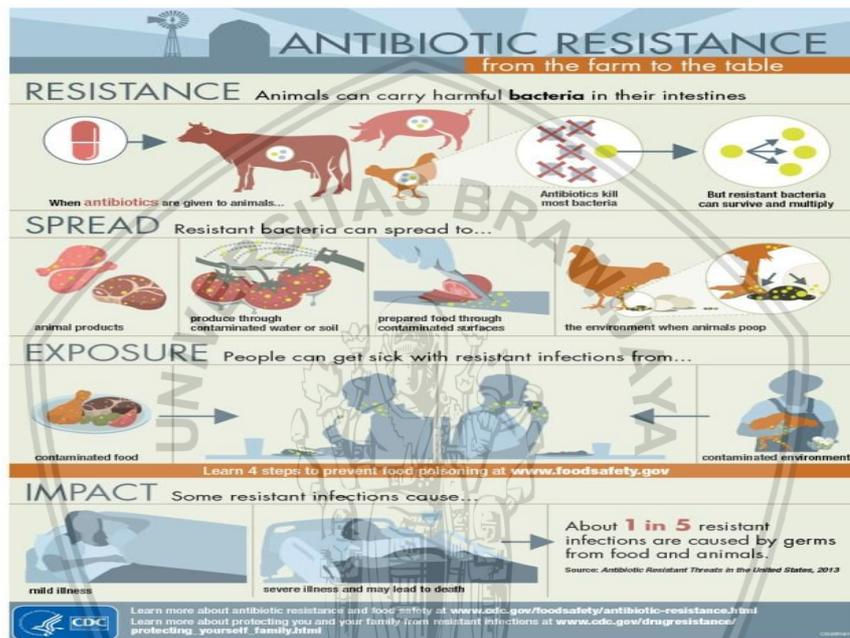
Gambar 2.3 intestinal babi yang terinfeksi *E. coli* (Luppi, 2017)



Gambar 2.4 Lesi khas di intestinal yang terinfeksi EPEC (Trabulsi *et al.*, 2002)

Menurut Putri dkk (2017), penularan utama bakteri yang telah resisten berasal dari faktor rantai pakan asal hewan. Penyebaran bakteri yang telah resisten terhadap antibiotik berasal dari hewan mencapai 80%. Mekanisme persebaran bakteri resisten dilihat pada **Gambar 2.5**. Center for Disease Control and Prevention (2013), menyatakan bahwa hewan ternak menjadi reservoir penyebaran penyakit. Penyebaran penyakit diawali ketika penggunaan antibiotik pada hewan tidak bisa dikontrol dan digunakan secara tidak efektif sehingga

menimbulkan adanya resistensi. Bakteri yang telah mengalami resistensi berada di tubuh hewan tersebut kemudian dikonsumsi oleh manusia, selain itu penyebaran bisa dilakukan dengan cara penggunaan feses hewan ternak sebagai pupuk organik karena bakteri yang telah resisten biasanya dikeluarkan bersama dengan feses.



Gambar 2.5 Mekanisme persebaran bakteri resisten terhadap antibiotik (Center for Disease Control and Prevention, 2015).

2.2.3 Sistem Pertahanan *Escherichia coli*

Pertahanan tubuh bakteri *E. coli* untuk menghindari dari sistem pertahanan tubuh hospes yaitu dengan cara memiliki muatan negatif yang sangat kuat pada membran luar dinding sel sehingga terhindar dari fagositosis dan respon komplemen, mampu mengeluarkan molekul hidrofobik untuk melindungi dari garam empedu, memiliki lipopolisakarida (LPS) yang terdiri dari antigen O dan lipid A. Antigen O bersifat tahan panas dan memiliki fungsi utama untuk

diferensiasi, sedangkan lipid A bersifat toksik dalam sirkulasi darah menyebabkan sepsis (dikeluarkan saat bakteri mengalami lisis). *Escherichia coli* memiliki antigen K yang berupa kapsul yang berupa polisakarida untuk melindungi bakteri dari fagosit dan komplemen, selain itu *E. coli* memiliki antigen H yang mengandung flagellin dan mampu bereaksi mengaglutinasi (Murwani, 2015; Cheng *et al.*, 2016).

2.2.4 Sistem Pertahanan pada Saluran Pencernaan Hospes

Sistem pertahanan tubuh dari hospes berfungsi untuk melindungi jaringan hospes dari agen penyakit. Sistem pertahanan tubuh hospes dibagi menjadi 2 yaitu spesifik dan non spesifik. Sistem pertahanan nonspesifik merupakan sistem pertahanan awal tanpa mengetahui spesifik antigen yang akan dilawannya. Sistem pertahanan non spesifik dibagi menjadi 3 bagian yaitu pertahanan fisik (selaput lendir, silia, reflek tubuh seperti batuk dan bersin), zat larut (lizosim, asam lambung, laktoferin, komplemen, APP, sitokin), pertahanan seluler (MN, PMN, sel NK, sel mast). Sedangkan pertahanan tubuh spesifik terdiri atas pertahanan humoral dan selular. Pertahanan humoral terdiri atas sel B, sitokin, antibodi (Ig A, Ig M, Ig E, Ig G, Ig D) sedangkan pertahanan seluler terdiri atas sel Th1, Th2, Tc, Natural Killer T (Baratawidjaja and Rengganis, 2016; Abbas *et al.*, 2007).

2.3 Peptida Antimikrobial

2.3.1 Definisi

Antimicrobial peptides (Peptida antimikrobial) adalah suatu grup molekul yang diproduksi oleh sel-sel dan jaringan dalam tubuh makhluk hidup yang berperan penting sebagai sistem pertahanan tubuh, mulai dari prokariot hingga eukariot diketahui memproduksi peptida antimikrobial di dalam tubuhnya. Peptida antimikrobial tersusun oleh asam amino tripsin, pepsin, kimosin atau alkalase. Peptida antimikrobial diketahui berperan aktif sebagai antibakteria dan anti jamur. Beberapa diantaranya bahkan mempunyai efek sebagai antivirus dan anti parasit (Fitri, 2012).

Peptida antimikrobial ini terdapat di dalam manusia maupun hewan tetapi jumlahnya terbatas dan tersebar di cairan mukosa tubuh. Biasanya terdapat di mukosa, sel-sel epitel pada gastrointestinal, sistem genital, sistem urinari. Peptida antimikrobial yang berada di dalam tubuh berfungsi sebagai sistem pertahanan nonspesifik untuk melawan infeksi (Park *et al*, 2011).

Peptida antimikrobial berukuran relatif kecil (6-100 molekul asam amino), bersifat amfipatik (memiliki kedua sifat hidrofilik dan hidrofobik dalam strukturnya) dengan urutan asam amino yang berbeda-beda. Peptida antimikrobial digolongkan berdasarkan struktur dan motif asam aminonya. Sebagian besar Peptida antimikrobial bersifat polar karena terpisahnya area yang bersifat hidrofobik dan bermuatan (Fitri, 2012).

Peptida antimikrobial tahan terhadap suhu panas $<90^{\circ}\text{C}$. Pada suhu rendah tidak mudah rusak. Peptida antimikrobial memiliki kestabilan yang optimal pada

suhu ruang. Peptida antimikrobia ada di dalam tubuh makhluk hidup dan membantu sistem imun untuk melawan antigen yang masuk dengan cara membunuh antigen tersebut. Kekuatan dalam membunuh antigen tergantung dengan jumlah konsentrasi yang digunakan oleh Peptida antimikrobia. Semakin tinggi konsentrasinya, maka kemampuan untuk membunuh antigen semakin tinggi (Momoh *et al.*, 2014).

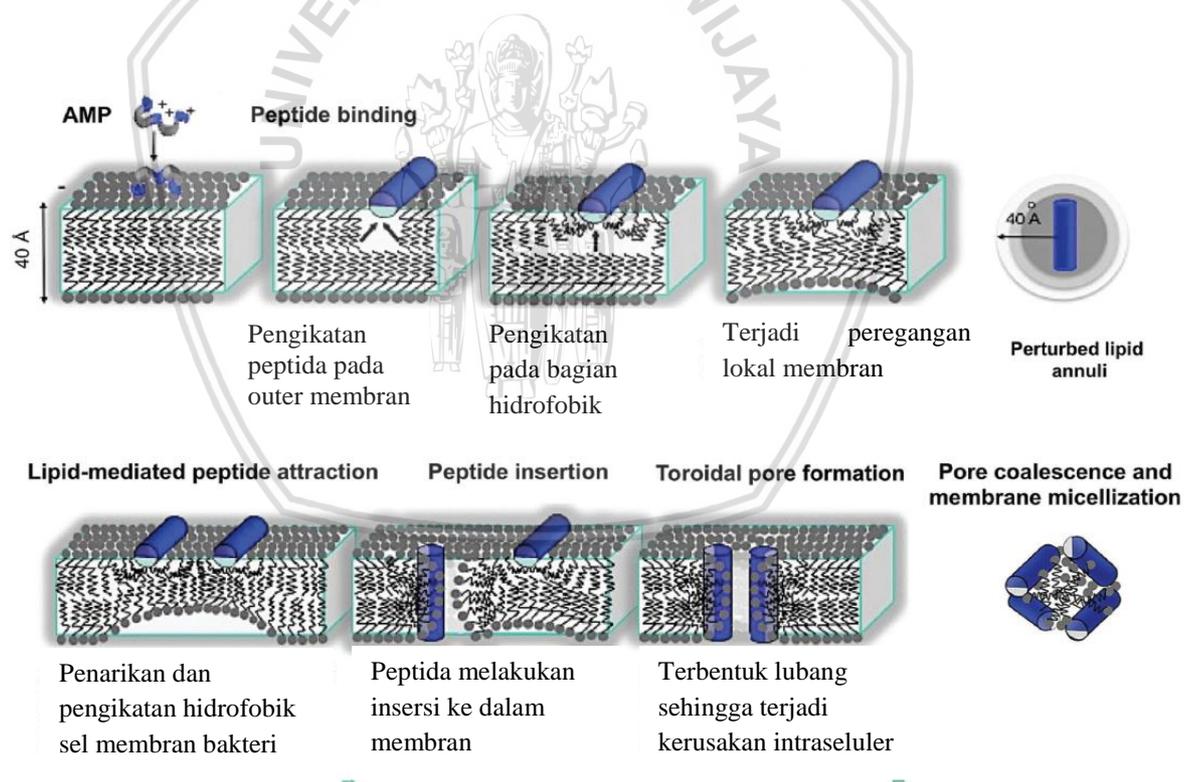
2.3.2 Mekanisme Antibakteri

Peptida antimikrobia dapat menetralkan endotoksin pada bakteri Gram-negatif. Tetapi bisa juga membunuh bakteri Gram-positif karena Peptida antimikrobia bersifat spektrum luas. Konsentrasi minimum penghambatan (*minimal inhibitory concentration/MIC*) diketahui berhimpitan dengan konsentrasi bakterisidal minimal (*minimal bactericidal concentrations/MBC*). Hal ini berarti bahwa peptida antimikrobia mempunyai efek bakterisidal (Fitri, 2012).

Peptida antimikrobia tidak hanya bertindak sebagai antimikroba tetapi dapat sekaligus sebagai penghambat *angiotensin-converting enzyme*, antioksidan, immunomodulator dan antiinflamasi. Peptida antimikrobia ini bisa digunakan untuk membunuh bakteri yang resisten, tetapi tidak menimbulkan resistensi seperti obat kimia (Bahar and Ren, 2013).

Semua jenis ikan lele memiliki Peptida antimikrobia pada bagian lendirnya. Tipe Peptida antimikroba pada lendir lele yaitu alpha helical kationik linear karena mengandung amphipatic α -helical peptides, dermaseptin, pardaxin, pleurocidin, parasin 1, hipposin, ceratotoxin dan magainin (Loganathan *et al.*,

2011; Benhamed *et al.*, 2014). Menurut Esteban (2012), selain peptida antimikrobal, lendir lele mengandung protease (serine, cysteine, aspartic, metalloproteases), lectin (galectine, pufflectin). Tipe Peptida antimikroba pada lendir lele memiliki mekanisme dalam membunuh antigen yang mirip dengan mekanisme detergen yaitu dengan merusak membran sel **Gambar 2.6** (Ladram and Pierre, 2016). Peptida antimikrobal ini dapat masuk ke sitoplasma dan kemudian terjadilah pelepasan lipida. Setelah berhasil masuk ke dalam sitoplasma akan mengakibatkan kerusakan intraseluler. Adanya kerusakan intraseluler maka perkembangan dari bakteri terhambat dan mati (Kusumaningtyas, 2012).



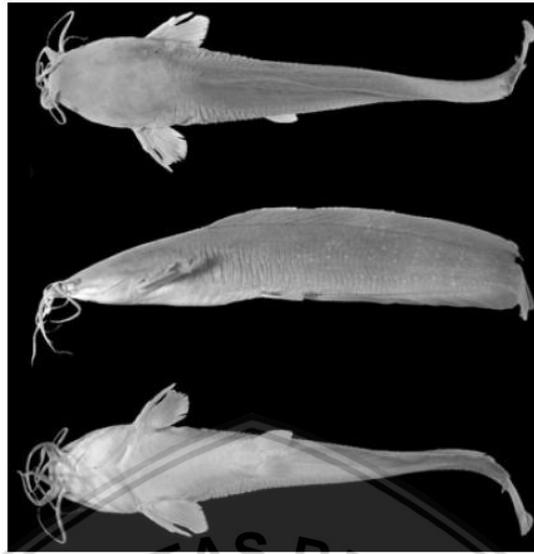
Gambar 2.6 Mekanisme Peptida antimikroba membunuh bakteri (Ladram and Pierre, 2016).

2.4 Lele

Menurut Hee and Kottelat (2008), berdasarkan taksonominya ikan lele digolongkan seperti berikut ini :

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordata
Class	: Actinopterygii
Order	: Siluriformes
Family	: Clariidae
Genus	: Clarias
Spesies	: <i>Clarias sp</i>

Lele merupakan sejenis ikan yang hidup di air tawar memiliki tubuh yang licin dan pada badiannya terdapat kumis yang panjang (**Gambar 2.7**). Lele tubuhnya licin disebabkan karena adanya cairan sisa metabolisme dari tubuhnya, seperti keringat jika pada manusia, tetapi lendir lele ini sangatlah khas, bisa digunakan sebagai pelindung tubuh dari paparan mikroorganismenya. Oleh karena itu ikan lele jarang sekali mengalami sakit walaupun di lingkungan yang sangat kotor maupun lingkungan yang terpapar banyak mikroorganismenya. Di dalam lendir lele tersebut mengandung zat Peptida antimikrobial. Zat inilah yang akan melawan mikroorganismenya yang ada di lingkungan sekitarnya, sehingga lele dapat bertahan hidup dengan baik. Jumlah zat Peptida antimikrobial di lendir lele lebih banyak daripada pada ikan lainnya (Zhao *et al.*, 2015).



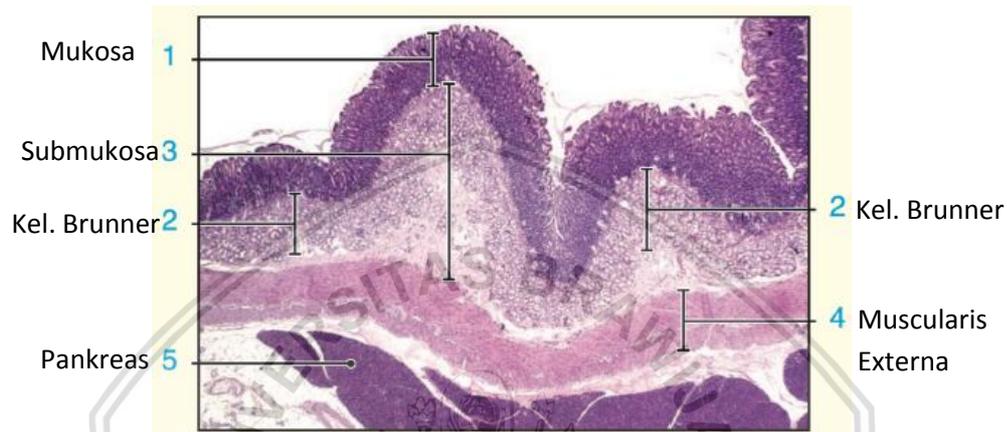
Gambar 2.7 Ikan lele (*Clarias batrachus*) (Hee and Kottelat, 2008).

2.5 Duodenum

Duodenum merupakan usus halus yang biasa disebut sebagai usus dua belas jari. Usus ini terhubung dengan lambung dan jejunum. Secara kimia bersifat basa dan mudah terinfeksi atau terpapar benda asing dari luar yang telah menembus lambung. Morfologi dari masing-masing bagian intestinal tidak sama. Duodenum tersusun 4 lapisan yang terdiri dari mukosa, submukosa, muscularis dan serosa secara histologi dapat dilihat pada **Gambar 2.8**. Secara histologi, duodenum memiliki ciri khas dan adanya perbedaan dengan usus halus lainnya diantaranya :

1. Terdapat plika sirkularis kerkringi yang panjang, semakin ke distal jumlahnya semakin berkurang.
2. Epitelnya simple kolumner, sel goblet makin ke distal bertambah (Gulwani, 2012)

3. *Kripte Lieberkuhn* makin ke distal bertambah (Ross *et al.*, 2009).
4. Submukosa : kelenjar Bruner yang berfungsi untuk mensekresikan cairan alkali sehingga bisa melindungi epitel gastrik dan duodenum bagian proximal (Ross *et al.*, 2009).



Gambar 2.8 Gambaran histologi duodenum (Ross *et al.*, 2009)

2.6 Proses Terjadinya Inflamasi

Inflamasi biasa disebut dengan peradangan. Inflamasi merupakan respon vaskuler dan seluler dari jaringan hidup akibat adanya cedera, infeksi, benda asing dan lain sebagainya. Peradangan berfungsi untuk menghancurkan dan mengeliminasi agen penyebab. Ciri-ciri inflamasi yaitu rubor, dolor, calor, tumor, dan functio laesa (Hidayati dkk., 2008).

Proses terjadinya radang meliputi :

1. Agen kausatif : respon jaringan sekitar agen serta sel nekrotik di daerah radang akan menghasilkan mediator inflamasi (histamin, serotonin, bradikinin, prostaglandin, TNF, c3, c5, IL-1, PAF) (Baratawidjaja and Rengganis, 2016; Wojdasiewicz *et al.*, 2014).

2. Mediator inflamasi : menginduksi vaskular, aliran darah, dan mengaktifkan leukosit.
3. Terjadinya vasodilatasi arterioli maupun kapiler disekitar daerah radang menimbulkan perlambanan aliran darah dan leukosit mengalir ditepi lumen vaskuler (Aliran non axial) (Subowo, 2010).
4. Endotel kapiler meregang, timbul rongga, permeabilitas meningkat, plasma darah keluar terakumulasi di jaringan perivaskuler (Grainger *et al.*, 2017).
5. Leukosit menggelinding (Rolling) kemudian melekat (adhesi) pada permukaan endotel (Ley *et al.*, 2007).
6. Leukosit masuk ruang antar endotel (diapedesis) dan keluar dari vaskuler (ekstravasasi).
7. Leukosit akan bergerak (migrasi) menuju agen kausatif inflamasi

2.7 TNF- α

TNF- α merupakan sitokin proinflamasi dan disekresikan ketika terjadi infeksi di dalam tubuh. TNF- α berperan penting dalam sistem inflamasi sebagai mediasi inflamasi akut. Selain itu, TNF- α berperan untuk menstimulasi inflamasi pada sel endotel dan berfungsi sebagai chemoattractant untuk sel darah putih (Ishartadiati, 2010).

Tinggi rendahnya kadar TNF- α dipengaruhi oleh sistem imun. Sistem imun yang menurun dapat mengakibatkan tubuh menjadi mudah terserang penyakit. Kemudian sistem imunitasnya menjadi lemah untuk melawan suatu infeksi. Hal ini akan menyebabkan TNF- α diproduksi secara berlebihan sehingga kadar TNF-

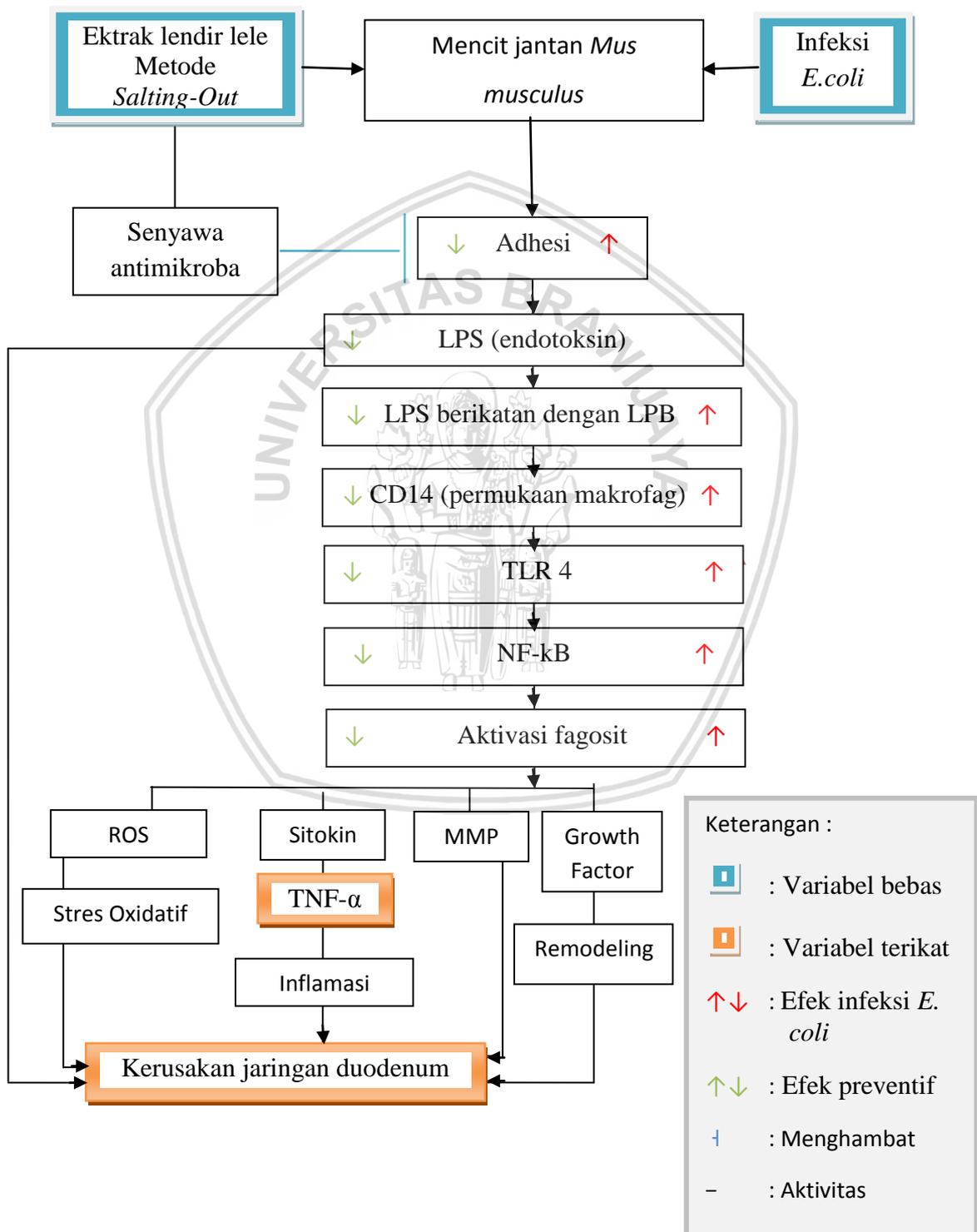
α menjadi meningkat. Ada beberapa yang mempengaruhi tingkat kenaikan kadar TNF- α , salah satunya adalah faktor stres. Ketika terjadi stres, hormon glukokortikoid dan kortisol memicu reaksi anti-inflamasi di dalam sistem imun sehingga TNF- α menjadi meningkat (Supit dkk., 2014).

Menurut Baratawidjaja and Rengganis (2016), TNF- α diproduksi oleh makrofag dan sel T yang mempunyai banyak fungsi dalam sistem imun. Efek dari TNF- α terjadi adanya necrosis sel hospes yang nantinya akan mengalami perbaikan dan sel tersebut menjadi kebal terhadap patogen. TNF- α memiliki efek secara biologik diantaranya yaitu :

1. Pengerahan neutrofil dan monosit ke tempat infeksi serta mengaktifkan sel-sel tersebut untuk menyingkirkan mikroba.
2. Memacu ekspresi molekul adhesi sel endotel vaskuler terhadap leukosit
3. Merangsang makrofag mensekresikan kemokin dan menginduksi kemotaksis dan pengerahan leukosit (Abbas *et al.*, 2007).
4. Merangsang hipotalamus yang menginduksi panas dan oleh karena itu disebut pirogen endogen. Panas ditimbulkan atas pengaruh prostaglandin yang diproduksi oleh sel hipotalamus yang dirangsang TNF. Inhibitor sintesis prostaglandin seperti aspirin, yang menurunkan panas. TNF dapat meningkatkan sintesis protein serum tertentu oleh hepatosit (Ishartadiati, 2010).

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Lendir lele mengandung peptida antimikrobal berfungsi sebagai bakterisidal yang dapat menghambat proses terjadinya adhesi, invasi, dan kolonisasi yang dilakukan oleh bakteri *E. coli*. Peptida antimikrobal pada lendir lele termasuk ke dalam tipe peptida alpha helical kationik linear karena mengandung amphipathic α -helical peptides, *dermaseptin*, *ceratotoxin* dan *magainin*. Peptida antimikrobal akan mengikat sel bakteri kemudian menghancurkan membran selnya. Kerusakan membran sel bakteri menyebabkan terjadinya deformasi dan terjadinya kerusakan di bagian dalam sel, oleh karena itu bakteri menjadi tidak stabil sehingga lisis.

Ikatan antara peptida antimikrobal dengan bakteri terjadi karena adanya perbedaan muatan sehingga menyebabkan reaksi elektrostatis. Peptida antimikrobal memiliki muatan positif (+) sedangkan bakteri memiliki muatan negatif (-). Peptida antimikrobal yang berhasil berikatan dengan bakteri akan menghancurkan membran sel dari bakteri tersebut. Kerusakan membran sel bakteri terjadi karena peptida antimikrobal mampu menarik dan mengikat hidrofobik yang dimiliki oleh membran sel bakteri. Membran sel bakteri mengalami kerusakan sehingga bakteri menjadi mati. Selain itu Peptida antimikrobal berfungsi sebagai antiinflamasi dengan cara menetralkan LPS pada bakteri gram negatif (-).

Pelekatan (adhesi) terjadi karena adanya interaksi antara adhesin pada bakteri (sebagai ligan) dengan reseptor hospes yang berada di permukaan sel. Adhesin patogen terutama tersusun dari protein struktural (glikoprotein atau lipoprotein). *Escherichia coli* melekat menggunakan pili, fimbriae, dan flagella.

Pili pada bakteri dibagi menjadi 2 macam yaitu *common pili* dan *sex pili*. Pili yang digunakan untuk melakukan adhesi yaitu *common pili*, sedangkan *sex pili* berfungsi untuk melakukan transfer materi genetik dengan bakteri lain. Tindakan adhesi dilakukan untuk menghindari *Physical removal*. Adhesin *E. coli* berinteraksi secara spesifik dengan reseptor sel hospes yang berupa D-manosa. Setelah proses adhesi berhasil, selanjutnya bakteri *E. coli* melakukan multiplikasi dan kolonisasi.

Escherichia coli masuk ke dalam intestinal secara per oral. Flagella yang dimiliki *E. coli* berfungsi untuk motilitas yang akan membantu bakteri untuk mendekat ke bagian sel hospes. Bakteri *Escherichia coli* mempunyai enzim protease ekstraseluler untuk mendegradasi mucin pada mukosa, sehingga proses pelekatan menjadi lebih mudah. Setelah itu bakteri menghancurkan microvili intestinal dan melekat pada sel target.

Bakteri *E. coli* akan mengeluarkan toksin untuk pertahanan dan mengganggu fagosit. Toksinnya dibagi menjadi 2 jenis yaitu enterotoksin dan endotoksin. Enterotoksin pada bakteri *E. coli* dikeluarkan dari tubuhnya pada fase eksponensial. Enterotoksin akan mengaktifkan enzim siklik adenilase yang mengubah ATP menjadi cAMP sehingga cAMP menjadi berlebihan dan menyebabkan ion klorida serta bikarbonat dikeluarkan dalam jumlah besar. Adanya enterotoksin menyebabkan hospes diare secara terus menerus. Endotoksin *E. coli* berupa Lipopolisakarida (LPS) dan dikeluarkan saat bakteri lisis. Toksin dari bakteri dapat menyebabkan kerusakan pada jaringan duodenum. Adanya kerusakan duodenum menyebabkan terjadinya reaksi imunitas.

Lipopolisakarida (LPS) yang berada di jaringan akan diikat oleh LPS-Binding Protein (LBP) yang berfungsi membawa LPS ke sel makrofag. Setelah bertemu dengan makrofag, LPS akan ditangkap oleh reseptor permukaan makrofag yang berupa CD14 yang akan memberikan sinyal dengan ke *Toll Like Reseptor 4* (TLR4). Jika TLR4 mengenali LPS, maka akan mengaktifkan My88 (sebagai adaptor) dan caspase-1, kemudian NF- κ B dan AP-1 dilepaskan.

Nuclear factor kappa B (NF- κ B) merupakan faktor transkripsi yang mengontrol sejumlah gen penting dalam proses imunitas dan inflamasi. *Nuclear factor kappa B* (NF- κ B) berada di sitoplasma akan masuk ke nukleus sehingga menyebabkan transkripsi gen-gen dan makrofag teraktivasi. Makrofag yang teraktivasi akan mensekresi sitokin, mensekresi MMP, memproduksi ROS serta mengaktifkan growth factor. Sitokin proinflamasi yang disekresikan makrofag berupa TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8. Sitokin proinflamasi yang paling utama saat terjadi infeksi bakteri yaitu TNF- α .

Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) bekerja pada sel endothelial di *postcapillary venules* dan menginduksi molekul adhesi seperti E-selectin, ICAM-1, dan VCAM-1. Leukosit yang berada di pembuluh darah akan mengekspresikan ligan karbohidrat untuk mengikat selektin endothelial E dan P (*tethering*). Leukosit akan melekat dengan kuat dan migrasi sel menuju ke daerah luka.

Sel fagosit akan memfagositkan bakteri. Proses fagositosis terjadi karena sel fagosit membentuk tonjolan *pseudopodi* pada membran plasmanya membentuk kantong (fagosom). Fagosom mengalami fusi dengan lisosom membentuk fagolisosom setelah itu terjadi proses degranulasi dan pembunuhan

bakteri. Pembunuhan bakteri dilakukan oleh enzim lisosom dan terjadi peningkatan ROS. Peningkatan ROS di dalam sel menyebabkan terjadinya stres oksidatif yang bisa menimbulkan kerusakan jaringan duodenum.

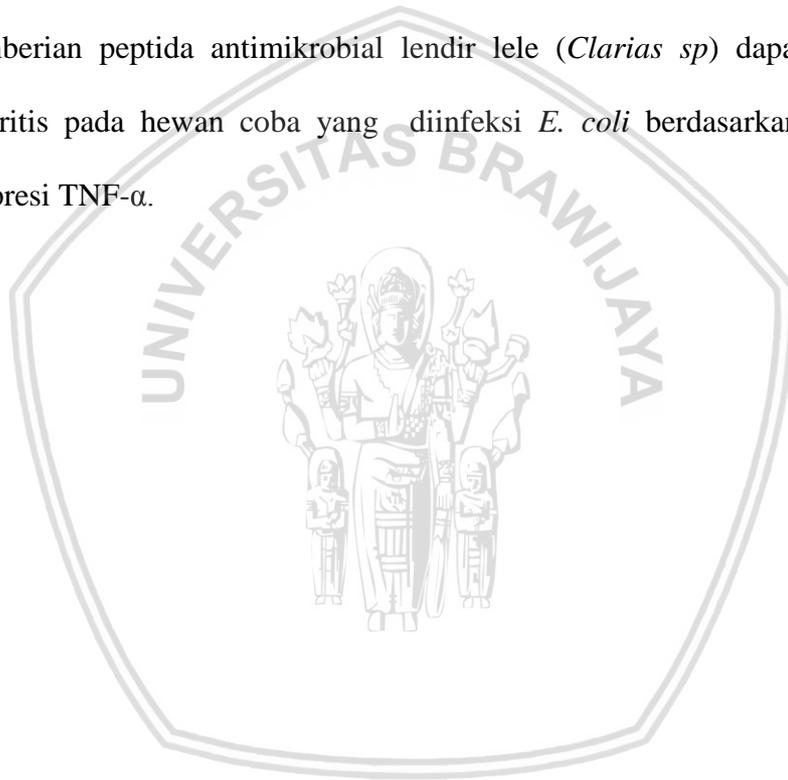
Makrofag akan mensekresikan *Matric Metalloproteinase* (MMP) yang merupakan enzim untuk mendegradasi jaringan yang rusak. Selain itu, makrofag akan mengaktifkan growth factor dengan cara melepas ligan *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR). Daerah yang mengalami kerusakan akan mengalami hipoksia sehingga menstimulasi aktivasi fibroblast dan menginisiasi proliferasi selular.

Pemberian lendir lele diharapkan dapat digunakan sebagai preventif terhadap penyakit enteritis yang disebabkan oleh *E. coli* karena memiliki kandungan peptida antimikrobia. Jika bakteri dapat dibunuh oleh peptida antimikrobia ketika masuk ke dalam tubuh, maka bisa menurunkan reaksi imunitasnya sehingga kerusakan jaringan akan menurun. Selain itu diharapkan bahwa peptida antimikrobia mampu menetralkan LPS bakteri yang dikeluarkan saat lisis. Jika LPS mampu dinetralkan maka aktivasi makrofag mengalami penurunan yang menyebabkan sekresi sel radang juga ikut menurun.

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah ada, maka hipotesis pada penelitian ini yaitu:

1. Pemberian peptida antimikrobia lendir lele (*Clarias sp*) dapat mencegah enteritis pada hewan coba yang diinfeksi *E. coli* berdasarkan gambaran histopatologi duodenum.
2. Pemberian peptida antimikrobia lendir lele (*Clarias sp*) dapat mencegah enteritis pada hewan coba yang diinfeksi *E. coli* berdasarkan penurunan ekspresi TNF- α .



BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini berlangsung dari bulan April sampai bulan Juni 2017. Pembuatan ekstrak lendir lele dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan. Perlakuan ke hewan coba dan pengambilan sampel dilakukan di Laboraturium Fisiologi Hewan FMIPA Universitas Islam Negeri Malang. Pembuatan preparat histopatologi duodenum dan Imunohistokimia TNF- α dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.2 Sampel Penelitian

Mencit yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) jantan berumur 2 bulan dengan berat badan rata-rata 20-25 gram. Penelitian terdiri dari 5 kelompok perlakuan. Estimasi besar sample dihitung berdasarkan rumus Frederer (Ridwan, 2013) :

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

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

t = Jumlah kelompok perlakuan

n= jumlah ulangan yang diberikan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk perlakuan sejumlah 5 macam diperlukan jumlah ulangan minimal 4 kali dalam setiap kelompok. Sehingga total tikus yang dibutuhkan adalah 20 ekor.

4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental yang menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan membagi hewan coba menjadi 5 kelompok perlakuan, yaitu perlakuan 1 (kontrol negatif), perlakuan 2 (kontrol positif), perlakuan 3 (P3), perlakuan 4 (P4), perlakuan 5 (P5) pada **Tabel 4.1** :

Tabel 4.1 Rancangan Penelitian

Kelompok	Keterangan
P- (Kontrol Negatif)	Kontrol, mencit hanya diberikan pakan dan minum <i>ad libitum</i> selama 18 hari tanpa perlakuan
P+ (Kontrol Positif)	Mencit diberikan induksi bakteri <i>Escherichia coli</i> sebanyak 1mL dengan dosis 3×10^8 CFU/mL selama 3 hari berturut-turut
P1	Mencit diberikan peptida antimikrobal dari ekstrak lendir lele dengan konsentrasi 20% selama 7 hari yang diberikan pada hari ke 8-14 dan pemberian bakteri <i>E. coli</i> dengan dosis 3×10^8 CFU/mL sebanyak 1mL selama 3 hari yang diberikan pada hari ke 15-17 dan dilakukan pembedahan pada hari ke 18
P2	Mencit diberikan peptida antimikrobal dari ekstrak lendir lele dengan konsentrasi 30% selama 7 hari yang diberikan pada hari ke 8-14 dan pemberian bakteri <i>E. coli</i> dengan dosis 3×10^8

CFU/mL sebanyak 1mL selama 3 hari yang diberikan pada hari ke 15-17 dan dilakukan pembedahan pada hari ke 18

P3 Mencit diberikan peptida antimikrobial dari ekstrak lendir lele dengan konsentrasi 40% selama 7 hari yang diberikan pada hari ke 8-14 dan pemberian bakteri *E. coli* dengan dosis 3×10^8 CFU/mL sebanyak 1mL selama 3 hari yang diberikan pada hari ke 15-17 dan dilakukan pembedahan pada hari ke 18

4.4 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati pada penelitian ini yaitu :

Variabel bebas : *Escherichia coli* dan ekstrak lendir lele.

Variabel tergantung : Histopatologi duodenum dan ekspresi TNF- α duodenum.

Variabel kendali : Homogenisitas mencit (berat badan, umur, jenis kelamin), suhu, minum, pakan, kelembaban, dan kondisi kandang.

4.5 Materi Penelitian

4.5.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain yaitu kandang mencit berupa bak yang ditutup berupa kawat, tempat pakan dan tempat minum setiap kandang, seperangkat alat bedah, papan bedah, sarung tangan, *masker*, gelas ukur, cawan petri, ose, inkubator, seperangkat alat sentrifugasi, tabung valcon, pipet tetes, gelas objek, pot organ, mikroskop cahaya, *cover glass*, sonde,

autoclave, papan kayu, *aluminium foil*, seperangkat alat mikropipet, *freezer*, *ice box*, pot sample, spuit 1 cc, spuit 3 cc, spuit 5 cc.

4.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain yaitu Mencit (*Mus musculus*) jantan berumur 2 bulan, pakan mencit, bakteri *E. coli* EPEC, media Eosin Methylen Blue Agar (EMBA), aquadest, NaCl fisiologis, xylol bertingkat, alkohol bertingkat, Hematoxyline Eosin (HE), blok parafin, alkohol 70%, alkohol 90%, alkohol 95%, ikan lele, antibodi TNF- α , buffer formlain 10%.

4.6 Tahapan Penelitian

4.6.1 Pembagian Kelompok Mencit

Mencit yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 20 ekor berjenis kelamin jantan yang dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan, masing-masing perlakuan terdiri dari 4 ekor tikus.

1. Kontrol negative (P-) adalah mencit yang diberi perlakuan yaitu diberikan akuades.
2. Kontrol positif (P+) adalah mencit yang diberikan air akuades dan di induksi dengan bakteri *E. coli* tanpa perlakuan.
3. Perlakuan 3 (P1) adalah mencit yang diberikan ekstrak lendir lele dengan konsentrasi 20% selama 7 hari dan diinfeksi dengan bakteri *E. coli* menggunakan sonde lambung.

4. Perlakuan 4 (P2) adalah mencit yang diberikan ekstrak lendir lele dengan konsentrasi 30% selama 7 hari dan diinfeksi dengan bakteri *E. coli* menggunakan sonde lambung.
5. Perlakuan 5 (P3) yaitu mencit yang diberikan ekstrak lendir lele dengan konsentrasi 40% selama 7 hari dan diinfeksi dengan bakteri *E. coli* menggunakan sonde lambung.

4.6.2 Aklimatisasi

Aklimatisasi hewan coba selama 7 hari dengan tujuan mengadaptasikan pada lingkungan yang baru. Lingkungan yang diberikan memiliki suhu rata-rata 20-24°C (Hubrecht, 2014). Pemberian pakan berupa ransum 4g-5g/ekor/hari dan minum sebanyak 4-8ml/ekor/hari ditempatkan dalam kandang dengan kondisi bersih, bebas dari kebisingan dan jauh dari polusi industri (Hankenson, 2014).

4.6.3 Penanaman bakteri pada media EMBA untuk uji konfirmasi

Penanaman bakteri pada media EMBA bertujuan untuk memastikan bakteri yang digunakan *E. coli* tanpa tercemar bakteri lain. *Escherichia coli* pada media EMBA dapat ditandai dengan warna hijau metalik. Penanaman bakteri dilakukan dengan cara menginokulasikan pada media, kemudian di inkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C (Suardana dkk., 2014).

4.6.4 Koleksi lendir lele

Lendir lele diambil dengan cara dikerik pada bagian dorsal menggunakan ose bulat setelah itu dilakukan pemisahan zat dengan sentrifuge. Pemisahan peptida dilakukan dengan metode *Salting-out* yaitu proses yang terjadi karena zat terlarut tertentu mempunyai tingkat kelarutan yang lebih besar dibanding dengan

zat utama, sehingga menyebabkan penurunan kelarutan zat utama atau terbentuknya endapan karena ada reaksi kimia. Metode *salting-out* dilakukan dengan menambahkan NaCl fisiologis. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Setelah itu, diambil bagian supernatan dan disimpan di freezer pada suhu 4°C (Nwabueze, 2014). Metode salting out lebih efektif dengan menggunakan konsentrasi garam yang tinggi namun konsentrasi garam yang tinggi mampu menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara menyebabkan adanya osmosis cairan tubuh bakteri sehingga bakteri kehilangan cairan dan mengalami kematian. Oleh karena itu metode salting out yang dilakukan menggunakan NaCl fisiologi karena NaCl mampu memisahkan peptida antimikrobal dengan zat lainnya namun tidak memiliki efek sebagai antibakteri (Uroкова *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012)

Ekstrak lendir lele diberikan setiap hari selama 7 hari. Pemberian sebanyak 1ml/hari dengan konsentrasi yang sesuai dengan perlakuan. Pemberian ekstrak lendir lele menggunakan sonde lambung dengan cara per oral dan dimasukkan sampai ke lambung (Hankenson, 2014).

4.6.5 Pembuatan Suspensi dan Inokulasi Bakteri *E. coli*

Pembuatan suspensi bakteri *E. coli* dilakukan untuk menyetarakan konsentrasi mikroba dengan Mc Farland. Bakteri diinokulasikan kemudian tingkat kekeruhannya disetarakan dengan standar Mc Farland 1 yang berarti konsentrasi bakterinya sama dengan 3×10^8 CFU/ml. Penginfeksi hewan coba dengan cara menggunakan bakteri *E. coli* EPEC yang dilakukan secara per oral. Pemberian

sebanyak 1ml/hari dengan konsentrasi 3×10^8 CFU/ml selama 3 hari berturut-turut (Nuraida dkk, 2012).

4.6.6 Pengambilan Duodenum Mencit

Pengambilan organ duodenum diawali dengan melakukan euthanasia dengan cara *dislocatio cervicalis* dan dilakukan nekropsi pada mencit yang dijadikan sebagai hewan coba. Prosedur yang dilakukan yaitu mencit diletakkan ventrodorsal pada papan bedah, kemudian dilakukan pembedahan menggunakan *disetting set*. Selanjutnya diinsisi bagian abdominal hingga thorax dan diambil bagian duodenum. Dibilas dengan NaCl fisiologis 0,9% dan dimasukkan dalam buffer formalin (Hubrecht and Kirkwood, 2010).

4.6.7 Pembuatan Preparat Histopatologi Duodenum

Organ duodenum yang sudah dikoleksi dimasukkan kedalam formaldehid 4% kemudian di dehidrasi dengan alkohol bertingkat dengan konsentrasi 70% selama 24 jam, etanol 80% selama 2 jam, etanol 90%, 95% dan etanol absolut selama 20 menit. Selanjutnya dilakukan perendaman dengan larutan xylol I selama 20 menit dan xylol II selama 30 menit guna penjernihan (Widarma, 2016). Ifitrasi dan embedding dalam blok paraffin $56-58^{\circ}\text{C}$. Organ duodenum di sayat dengan ketebalan 5 mikron menggunakan mikrotom putar. Setiap ulangan dibuat 4 sayatan dengan interval 10 sayatan dan diletakkan diatas kaca benda yang sudah diberi larutan perekat. Selanjutnya di warnai dengan pewarnaan Haematoxylin eosin (HE) (Bacha and Bacha, 2000).

4.6.8 Pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE)

Menurut Ross *et al.* (2009), Pewarnaan Hemtoxylin Eosin dilakukan dengan cara :

1. Deparafinisasi, yaitu melarutkan dan menghilangkan parafin yang terdapat pada jaringan dengan cara menggunakan larutan xylol bertingkat I, II, dan III selama 5 menit.
2. Rehidrasi, dengan memasukkan pada alkohol bertingkat mulai alkohol 95%, 90%, 80% dan 70% masing-masing selama 5 menit dan direndam menggunakan aquades selama 5 menit.
3. Pewarnaan I, bertujuan untuk memberikan warna biru pada inti sel yang dilakukan dengan menggunakan *hematoxyline* selama 10 menit.
4. Differensiasi, bertujuan untuk menghilangkan warna biru yang pekat pada inti sel dan sitoplasma. Dengan cara menggunakan larutan HCL 0,6 % selama 1 menit. Kemudian dicuci dengan air mengalir.
5. Blueing, bertujuan untuk memperjelas warna biru pada inti sel dengan cara memasukkan Lithium carbonat 0,5% selama 3 menit. Kemudian dicuci dengan air mengalir
6. Pewarnaan kedua bertujuan untuk memberikan warna merah muda pada sitolasma dengan menggunakan eosin selama 3 menit.
7. Dehidrasi, bertujuan untuk menghilangkan air pada jaringan. Caranya dengan memasukkan alkohol secara bertingkat mulai 70%,80%.90%, dan 95% selama masing-masing 5 menit
8. Clearing, memasukkan pada larutan xylol I dan II selama 1 menit.

9. Mounting, bertujuan mengawetkan jaringan yang sudah terwarnai dengan memberikan Entella atau canada balsem dan ditutup dengan cover glass (Bacha and Bacha, 2000).

4.6.9 Pengamatan histopatologi

Pengamatan preparat histologi menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 40x-400x . Pengamatan yang dilakukan meliputi bentuk vili, sel epitel dan sel radang (Bao *et al.*, 2012).

4.6.10 Pembuatan Preparat Ekspresi TNF- α dengan Metode IHK

Pewarnaan imunohistokimia bertujuan untuk mengidentifikasi komponen jaringan yang memiliki ciri tertentu dengan menggunakan interaksi antigen target dan antibodi spesifik yang diberi label. Pembuatan preparat ini diawali dengan pembuatan blok parafin di organ yang kemudian dilakukan deparafinisasi untuk melarutkan parafin dari jaringan dengan menggunakan xylol. Selanjutnya dilakukan rehidrasi dengan alkohol bertingkat dan aquades. Kemudian ditetesi dengan PBS, diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit dan di buang. Preparat ditetesi peroxidase, diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit tanpa dibuang selanjutnya ditetesi PBS sebanyak 3x dan masing-masing di inkubasi selama 5 menit lalu dibuang. Preparat direaksikan dengan antibodi primer TNF- α yang ditetaskan sebanyak 100 μ L+FBS 10% disimpan selama 24 jam dengan suhu 4°C. Setelah itu preparat direaksikan dengan antibodi sekunder, *anti mouse labelled biotin* dalam *blocks buffer* selama 2 jam dengan suhu 27°C dan dicuci PBS pH 7,4. Kemudian, ditambahkan sa-HRP selama 40 menit pada suhu 27°C dan dicuci

dengan PBS pH 7,4. Reaksi positif divisualisasikan dengan penambahan substrat Kromagn DAB (*3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride*). Selanjutnya dilakukan Counterstain dengan pewarna *mayer hematoxylen* selama 8-10 menit lalu dibilas dengan air mengalir 2x5menit dan aquades steril 3x5 menit lalu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan setelah itu dibiarkan dalam semalam di suhu 27⁰C. Dilakukan mounting dengan etilen dan ditutup dengan *cover glass* (Renshaw, 2017).

Ekspresi TNF- α dapat dilihat dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x. Ekspresi TNF- α ditandai dengan warna coklat pada sitoplasma. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan program Imunorasio.

4.7 Analisa data

Preparat histopatologi jaringan duodenum diamati secara deskriptif melalui pengamatan terhadap adanya histopatologi vili usus, sel epitel, dan infiltrasi sel radang menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 40x-400x. Sedangkan analisa data ekspresi TNF- α menggunakan *One Way Analysis Of Varian* (ANOVA). Jika ada perbedaan maka akan diuji menggunakan uji Turkey atau Beda Nyata Jujur (BNJ) menggunakan software SPSS for windows versinon 21,0 dengan $\alpha = 0,05$ untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan.

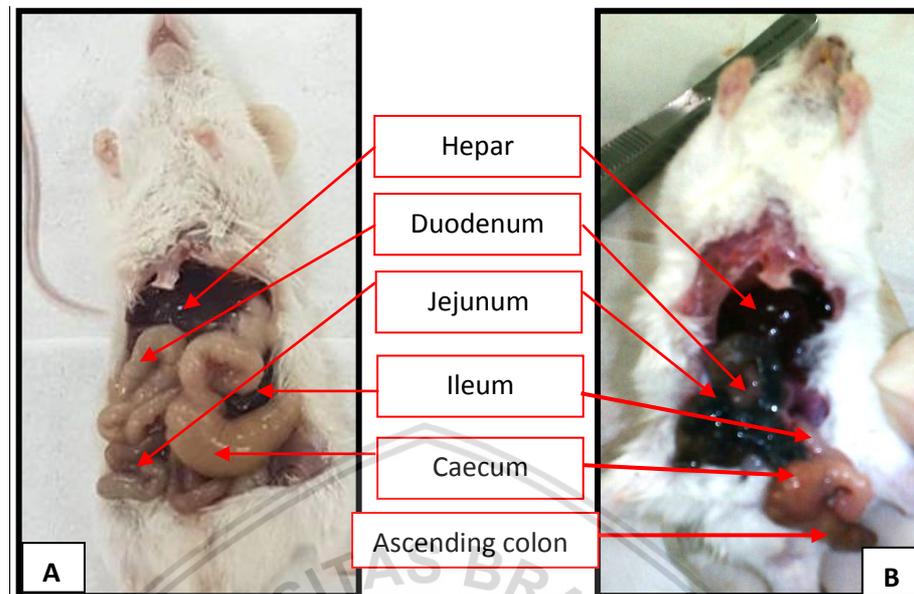
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Induksi Enteritis oleh *Escherichia coli*

Escherichia coli merupakan bakteri yang mampu menginfeksi hospes dan menyebabkan terjadinya enteritis (Rahmawamandani dkk., 2014). Mencit (*Mus musculus*) dapat dijadikan sebagai hewan model enteritis yang disebabkan oleh *E. coli* dengan cara diinduksi secara peroral menggunakan sonde lambung sebanyak 1 ml/hari selama 3 hari dengan konsentrasi 3×10^8 CFU/ml (Nuraida *et al*, 2012). Gejala klinis yang muncul tidak signifikan pada infeksi *E. coli* seperti nafsu makan berkurang yang dapat dilihat adanya sisa makanan yang telah diberikan, tubuhnya lemas ditandai dengan pergerakan yang pasif, dan terlihat lesu yang dapat diamati melalui kecerahan matanya.

5.2 Hasil Preventif Lendir Lele pada Enteritis yang Diinfeksi *Escherichia coli*

Peptida antimikrobal lendir lele digunakan sebagai preventif diberikan selama 7 hari (hari ke 8-14). Pemberian preventif dilakukan dengan perbedaan konsentrasi (20%, 30%, 40%) diberikan secara peroral menggunakan sonde lambung. Kemudian hewan coba diinfeksi menggunakan *E. coli* selama 3 hari (hari 15-17) dan di nekropsi pada hari ke 18. Hasil nekropsi menunjukkan adanya kongesti pada sistem pencernaan kontrol positif (K+), sedangkan hewan coba pada kontrol negatif (K-) tidak mengalami kongesti (**Gambar 5.1**).



Gambar 5.1 A. Intestin pada mencit K- terlihat normal dan tidak ditemukan adanya kongesti, B. Intestin pada mencit K+ mengalami kongesti.

Menurut Teixeira *et al.* (2015), gejala klinis pada infeksi EPEC menunjukkan terjadinya diare karena infeksi bakteri EPEC melibatkan gen EPEC *adherence factor* (EAF) yang menyebabkan kerusakan sehingga terjadi perubahan konsentrasi kalsium intraseluler dan arsitektur sitoskeleton di bawah membran microvilus. Hasil penelitian ini belum menunjukkan adanya gejala klinis berupa diare pada hewan coba. Tetapi hasil nekropsis hewan coba menunjukkan kongesti pada perlakuan kontrol positif (K+), hal ini menandai adanya kerusakan jaringan yang mampu mengawali terjadinya diare.

5.3 Efek Preventif Peptida Antimikrobal Lendir Lele (*Clarias sp*) terhadap Mencit (*Mus musculus*) yang Diinfeksi *Escherichia coli* Dilihat dari Histopatologi Duodenum

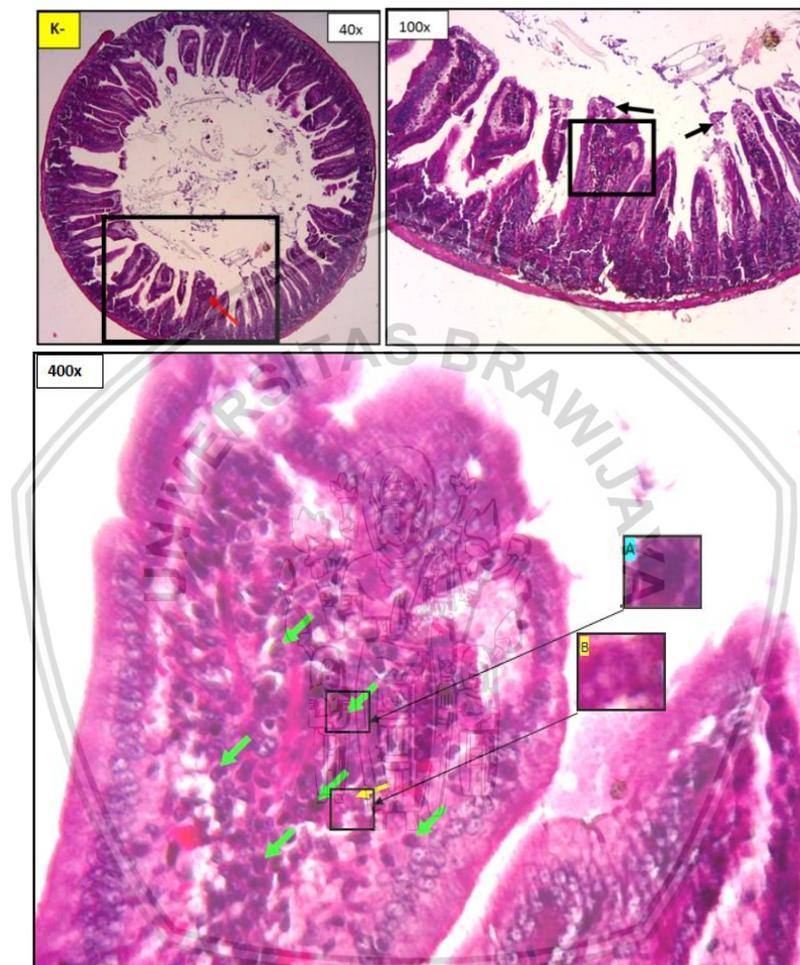
Duodenum merupakan usus halus bagian proximal yang berbentuk lebar dan terletak di abdomen setelah berbatasan dengan pylorus lambung (Perez and

Ungerfeld, 2012). Duodenum dapat ditandai secara mudah karena memiliki ciri mengelilingi bagian caput pankreas. Duodenum memiliki kelenjar brunner yang dapat menghasilkan glikoprotein netral untuk menetralkan HCl lambung (Patel *et al.*, 2006). Selain itu, di dalam duodenum terdapat sel goblet yang berfungsi untuk melindungi dan melumasi mukosa usus (Junqueira dan Carneiro, 2007).

Anatomi usus duodenum dibagi menjadi 4 lapisan yaitu mukosa, submukosa, muskularis, dan serosa. Bagian lapisan mukosa memiliki epitel kolumnar, lamina propia, dan muskularis mukosa. Pada lapisan submukosa terdapat pembuluh darah dan *pleksus miesner*. Selanjutnya pada lapisan muskularis terdapat *muscularis outer longitudinal* dan *muscular inner circular layer*, dimana diantara keduanya terdapat *pleksus mientericus/ouerbach* (Ross *et al.*, 2009). Kerusakan duodenum mencit model enteritis infeksi *E. coli* diamati secara histopatologi dengan pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE). Pewarnaan HE dapat menunjukkan perubahan histopatologi duodenum meliputi sel epitel, vili usus, dan sel radang (Pakurar and Bigbee, 2004).

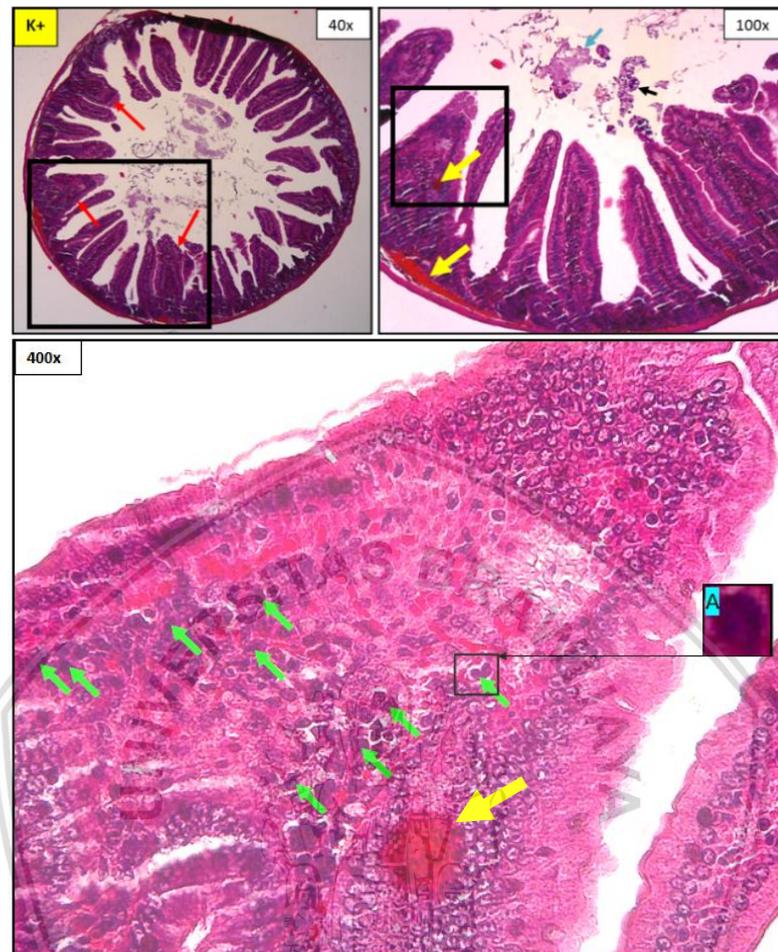
Berdasarkan hasil histopatologi pada perlakuan K- menunjukkan adanya infiltrasi sel radang yang didominasi oleh sel neutrofil (**Gambar 5.2**). Peradangan pada usus ditandai dengan adanya infiltrasi sel radang seperti MN (makrofag dan limfosit) dan PMN (neutrofil, basofil, eosinofil). Adanya infiltrasi sel radang yang didominasi neutrofil menunjukkan bahwa peradangan yang terjadi bersifat akut. Pada kondisi normal bisa ditemukan adanya infiltrasi sel radang karena inflamasi dapat terjadi sebagai bentuk pertahanan intestine terhadap patogen yang masuk secara peroral dan merusak jaringan, namun infiltrasi

tersebut masih dikatakan normal apabila tidak mempengaruhi fisiologis maupun fungsi organ pada tubuh mencit. Selain itu, pada duodenum K- ditemukan histopatologi berupa erosi sel epitel.



Gambar 5.2 Preparat histopatologi duodenum K- pewarnaan HE dengan perbesaran 40x (kiri atas), 100x (kanan atas), 400x (bawah). → : vili usus dengan infiltrasi sel radang, → : neutrofil, → : makrofag, → : erosi sel epitel, **A** : neutrofil, **B** : makrofag.

Histopatologi pada perlakuan K+ menunjukkan adanya infiltrasi sel radang yang lebih banyak dibandingkan dengan K-. Selain infiltrasi sel radang pada K+ ditemukan adanya perubahan histopatologi berupa erosi epitel, nekrosis dan kongesti (**Gambar 5.3**).

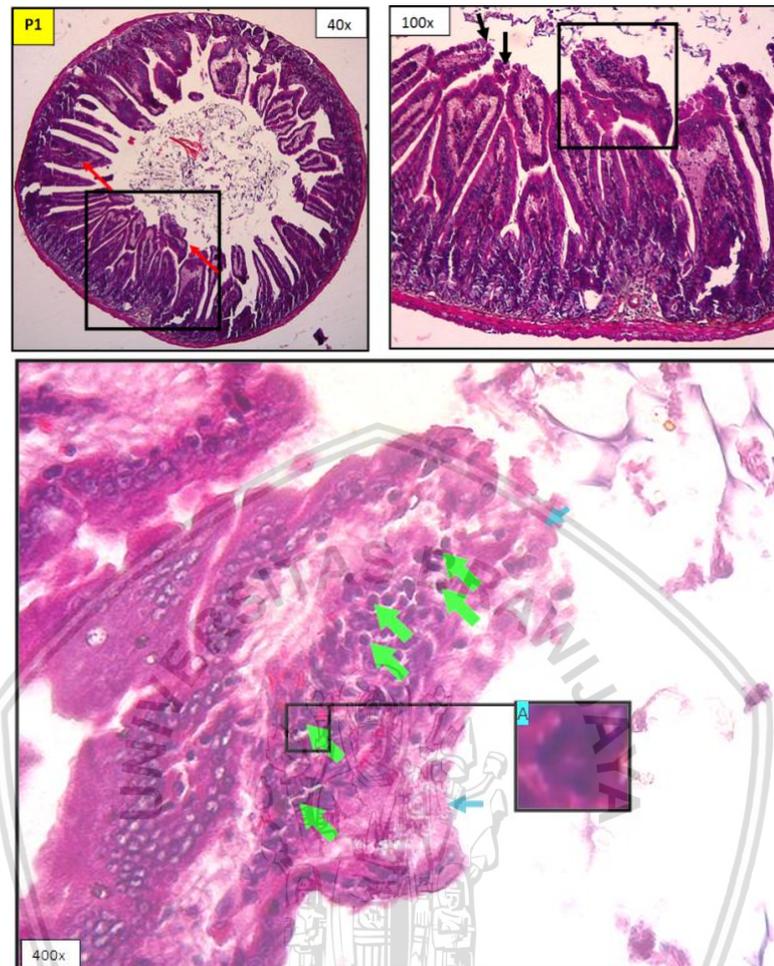


Gambar 5.3 Preparat histopatologi duodenum K+ pewarnaan HE dengan perbesaran 40x (kiri atas), 100x (kanan atas), 400x (bawah). → : vili usus dengan infiltrasi sel radang, → : neutrofil, → : kongesti, → : nekrosis, → : erosi sel epitel, A : neutrofil.

Adanya infiltrasi neutrofil yang ditunjukkan panah berwarna hijau (**Gambar 5.3**) mengindikasikan terjadinya inflamasi dimana neutrofil tersebut nantinya akan membantu proses fagositosis dan perbaikan jaringan. Reaksi inflamasi tersebut diawali dengan agen patogen yang mampu menginfeksi sehingga terjadi kerusakan vili usus (Shaw *et al.*, 2005). Perlakuan K+ menunjukkan infiltrasi yang lebih banyak dibandingkan dengan K- dan semua kelompok terapi. Hal tersebut dikarenakan perlakuan pada K+ yang diinfeksi *E. coli* namun tidak diberikan preventif peptida antimikrobal lendir lele, sehingga

dalam hal ini inflamasi yang ditunjukkan lebih tinggi. Reaksi inflamasi tersebut diawali dengan adanya agen patogen yang menginfeksi usus dan menyebabkan kerusakan jaringan. Histopatologi lain yang ditemukan pada K+ berupa kongesti (tanda panah kuning) mengindikasikan adanya akumulasi sel darah di dalam pembuluh darah akibat terjadinya inflamasi. Menurut Elziyad *et al.* (2013), kongesti menyebabkan aliran darah menjadi tidak lancar sehingga mampu menyebabkan nekrosis. Nekrosis yang terjadi ditunjukkan panah berwarna biru yang ditandai dengan inti sel hancur dan batas sel tidak teratur. Selain itu terdapat histopatologi berupa erosi epitel ditandai dengan lepasnya sel epitel pada bagian mukosa, dimana sel yang terlepas dapat terlihat pada lumen usus. Erosi terjadi karena bakteri *E. coli* melakukan adhesi pada permukaan vili kemudian berkolonisasi dan menginfeksi sehingga terjadi kerusakan.

Pada P1 menunjukkan infiltrasi sel radang yang lebih banyak dibandingkan K- dan P2, namun lebih sedikit dibandingkan dengan P3 dan K+. Infiltrasi sel radang tersebut terakumulasi secara jelas pada dua vili yang ditunjukkan oleh panah berwarna merah pada **Gambar 5.4**. Perubahan lainnya yang terjadi berupa nekrosis yang ditunjukkan oleh tanda panah berwarna biru dan erosi epitel dengan tanda panah berwarna hitam.



Gambar 5.4 Preparat histopatologi duodenum P1 pewarnaan HE dengan perbesaran 40x (kiri atas), 100x (kanan atas), 400x (bawah). → : vili usus dengan infiltrasi sel radang, → : neutrofil, → : nekrosis, → : erosi sel epitel, A : neutrofil.

Secara histopatologi nekrosis ditandai dengan hilangnya inti sel pada sel epitel. Hilangnya inti sel disebabkan karena sel terkena toksin dari bakteri kemudian mengalami kematian. Kerusakan jaringan berupa erosi epitel diawali dengan pengikatan bakteri ke vili yang terlalu kuat sehingga sel epitel menjadi terlepas (Viswanathan *et al.*, 2009).

Berdasarkan hasil histopatologi pada P2 menunjukkan adanya infiltrasi sel radang dan erosi epitel yang lebih sedikit (satu bagian vili) dibandingkan dengan K+, P1, maupun P3 (**Gambar 5.5**). Hal tersebut menandakan bahwa preventif

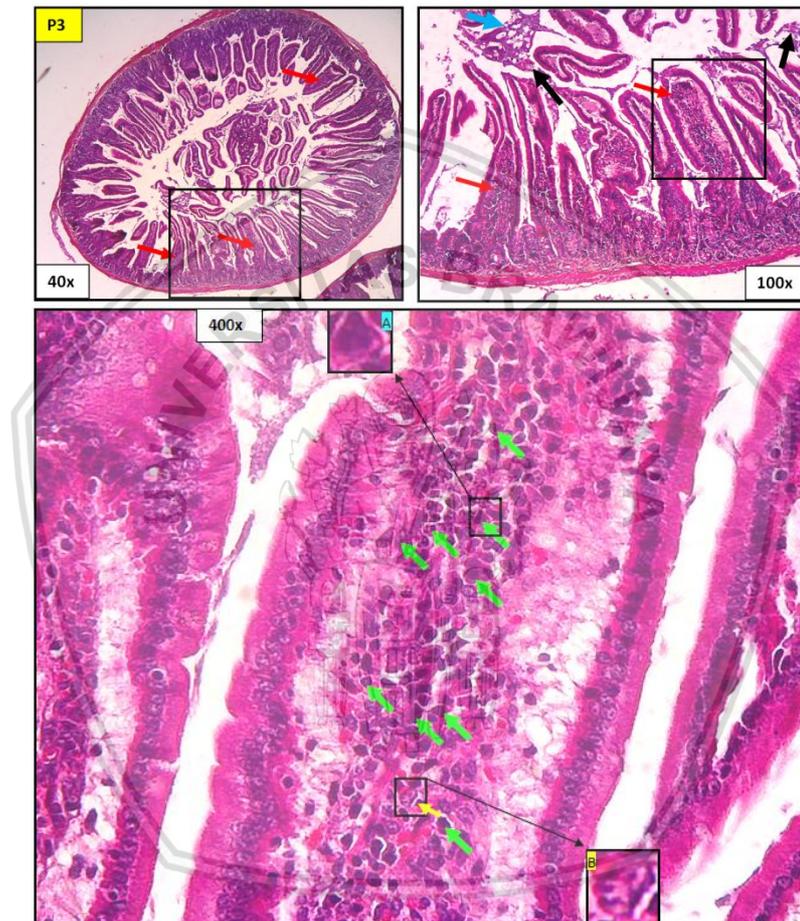
peptida antimikrobal lendir lele konsentrasi 30% berpengaruh dalam mencegah kerusakan jaringan yang disebabkan infeksi *E. coli*.



Gambar 5.5 Preparat histopatologi duodenum P2 pewarnaan HE dengan perbesaran 40x (kiri atas), 100x (kanan atas), 400x (bawah). → : vili usus dengan infiltrasi sel radang, → : neutrofil, → : makrofag, → : erosi sel epitel, **A** : neutrofil, **B** : makrofag.

Peptida antimikrobal lendir lele merupakan antibakteri yang bersifat bakteriosidal dimana mekanismenya yaitu dengan merusak membran sel bakteri sehingga bakteri akan lisis kemudian mati (Matsuzaki, 2009). Dalam hal ini dapat membuktikan bahwa peptida antimikrobal lendir lele mampu mencegah enteritis dengan fungsinya sebagai antibakteri.

Perlakuan P3 menunjukkan hasil yang hampir sama dengan K+ yaitu adanya infiltrasi sel radang yang lebih banyak dibandingkan K-, P1, dan P2. Kemudian perubahan lainnya berupa nekrosis dan erosi epitel yang ditunjukkan pada **Gambar 5.6**.



Gambar 5.6 Preparat histopatologi duodenum P3 pewarnaan HE dengan perbesaran 40x (kiri atas), 100x (kanan atas), 400x (bawah). → : vili usus dengan infiltrasi sel radang, → : neutrofil, → : nekrosis, → : erosi sel epitel, **A** : neutrofil, **B** : makrofag

Adanya nekrosis dan erosi epitel menunjukkan bahwa pada konsentrasi 40% masih kurang efektif dalam mencegah enteritis infeksi *E. coli*. Hal tersebut disebabkan karena pada konsentrasi 40% peptida antimikrobal lendir lele berpotensi menjadi toksik pada sel hospes. Potensi toksik tersebut terjadi karena

adanya pengikatan peptida antimikrobal lendir lele terhadap membran sel hospes yang menyebabkan sel tersebut rusak (Matsuzaki, 2009).

Inflamasi merupakan respon tubuh terhadap kerusakan jaringan. Inflamasi pada duodenum ditandai dengan adanya infiltrasi sel radang. Semakin banyak sel radang yang terinfiltrasi maka tingkat inflamasi di dalam usus semakin besar (Yulida dkk., 2013).

Hasil pengamatan menunjukkan jumlah vili yang mengalami infiltrasi sel radang pada K+ lebih banyak dibandingkan dengan K-. Infiltrasi sel radang dapat ditemukan pada K- meskipun hewan tersebut tanpa diberikan perlakuan infeksi *E. coli*, hal ini dikarenakan infiltrasi sel radang yang terjadi merupakan respon pertahanan tubuh terhadap agen patogen yang masuk secara peroral melalui makan maupun minuman yang terkontaminasi.

Perlakuan preventif mampu mencegah terjadinya peradangan di duodenum karena infeksi dari *E. coli* dapat dihambat. Hal ini dapat diamati dengan melihat histopatologi duodenum. Ketiga perlakuan preventif memiliki infiltrasi sel radang yang lebih rendah dibandingkan dengan K+. Kelompok preventif yang paling efektif berdasarkan infiltrasi sel radang yaitu perlakuan preventif dengan konsentrasi 30%. Perlakuan preventif dengan konsentrasi 30% memiliki infiltrasi sel radang yang mendekati kontrol negatif. Sedangkan perlakuan preventif 20% dan 40% memiliki infiltrasi sel radang lebih tinggi dibandingkan K- tetapi lebih rendah dibandingkan dengan K+. Dari ketiga konsentrasi yang digunakan memiliki konsentrasi yang paling baik yaitu konsentrasi 30% karena tingkat

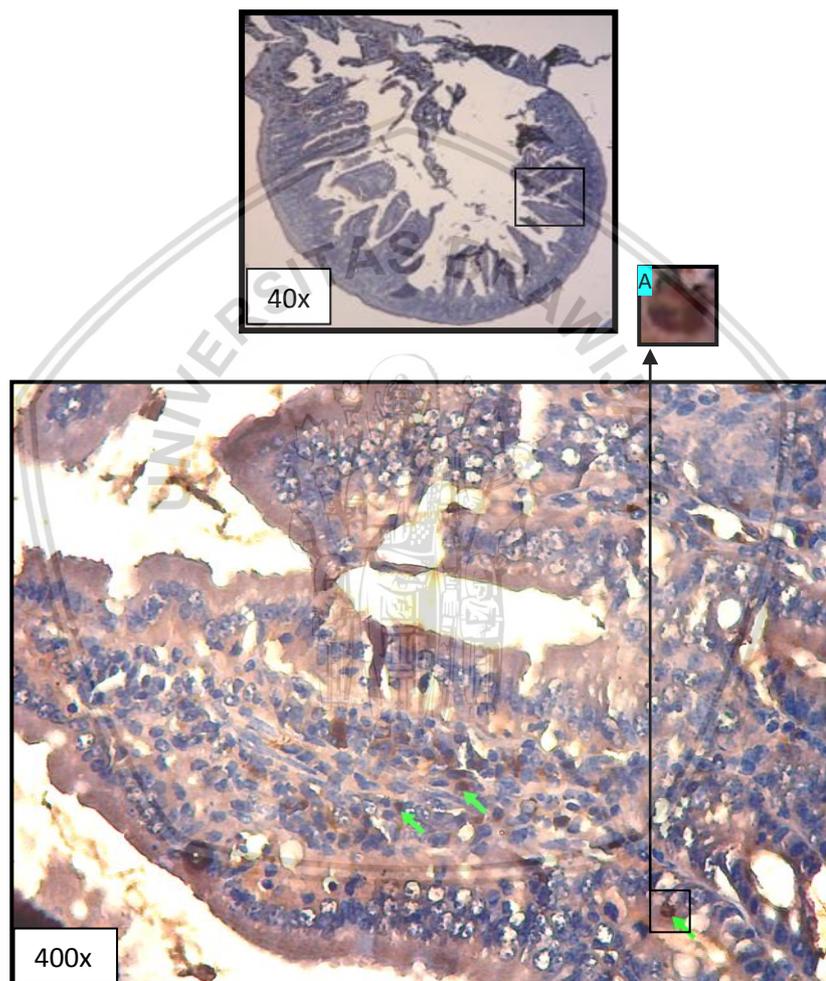
kerusakannya lebih sedikit dan mendekati K- dibandingkan dengan konsentrasi lainnya.

5.5 Efek Preventif Peptida Antimikrobal Lendir Lele (*Clarias sp*) terhadap Enteritis pada Mencit (*Mus musculus*) yang Diinfeksi *Escherichia coli* Dilihat dari Ekspresi TNF- α Duodenum

Menurut Subowo (2014), TNF- α merupakan sitokin proinflamasi dengan sumber utama sitokin TNF- α berupa mononuclear fagosit. Selain itu, TNF- α dapat disekresikan oleh sel T, sel NK, dan sel mast. *Tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) dihasilkan dari proses sintesis protein akibat teraktivasinya sel makrofag akibat stimulus lipopolisakarida bakteri *E. coli*. Setelah itu, hasil sintesis protein dibawa ke ribosom dan terjadi maturasi TNF- α di badan golgi (Duque and Descoteaux, 2014). Ribosom dan badan golgi berada di sitoplasma oleh karena itu ekspresi TNF- α dapat terlihat pada bagian sitoplasma sel tersebut.

Ekspresi TNF- α ditunjukkan dengan warna coklat yang dapat dilihat **Gambar 5.7**. Warna coklat disebabkan oleh kompleks antigen-antibodi. Pewarnaan dilakukan dengan metode imunohistokimia (IHK) dengan cara memberikan antibodi primer dan dilabel dengan menggunakan antibodi sekunder, setelah itu ditambahkan dengan substrat kromagen Diaminobenzidine (DAB) yang bertujuan untuk menghasilkan reaksi dengan warna coklat sehingga sitokin TNF- α dapat dilihat menggunakan mikroskop cahaya (Rahayu dan Auerkari, 2004).

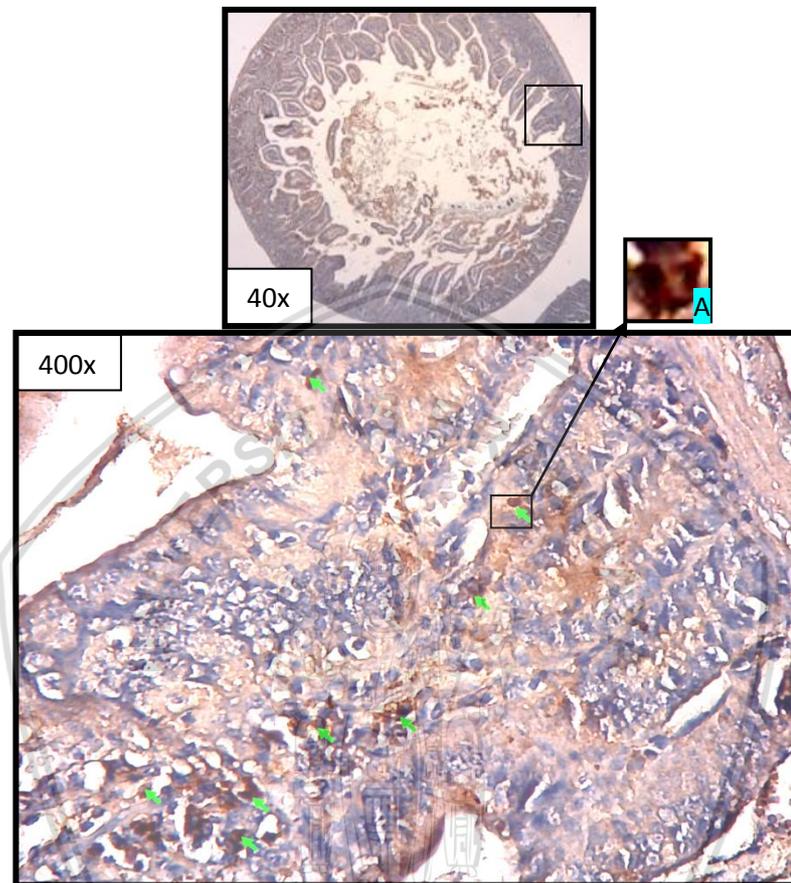
Ekspresi TNF- α pada K- lebih sedikit dibandingkan dengan K+, P1, P2, P3 (**Gambar 5.7**). Hal ini dikarenakan K- tidak diberikan perlakuan infeksi *E. coli*. Sehingga tidak ada kerusakan jaringan akibat infeksi *E. coli* dan respon imunitas di dalam tubuh semakin sedikit.



Gambar 5. 7 Gambaran imunohistokimia duodenum mencit (*Mus musculus*) pada K- dengan perbesaran 40x dan 400x., ekspresi TNF- α yang disekresi oleh \rightarrow neutrofil, **A**: neutrofil

Ekspresi TNF- α pada K- yang ditunjukkan oleh tanda panah berwarna hijau dan memiliki jumlah yang lebih sedikit dibandingkan pada K+, P1, P2, dan P3. Ekspresi TNF- α pada kondisi normal tetap ada karena TNF- α berperan dalam metabolisme tubuh seperti proliferasi, differensiasi, apoptosis, metabolisme lipid,

koagulasi, faktor angiogenesis, faktor pertumbuhan fibroblas (Kilapong dkk, 2015).

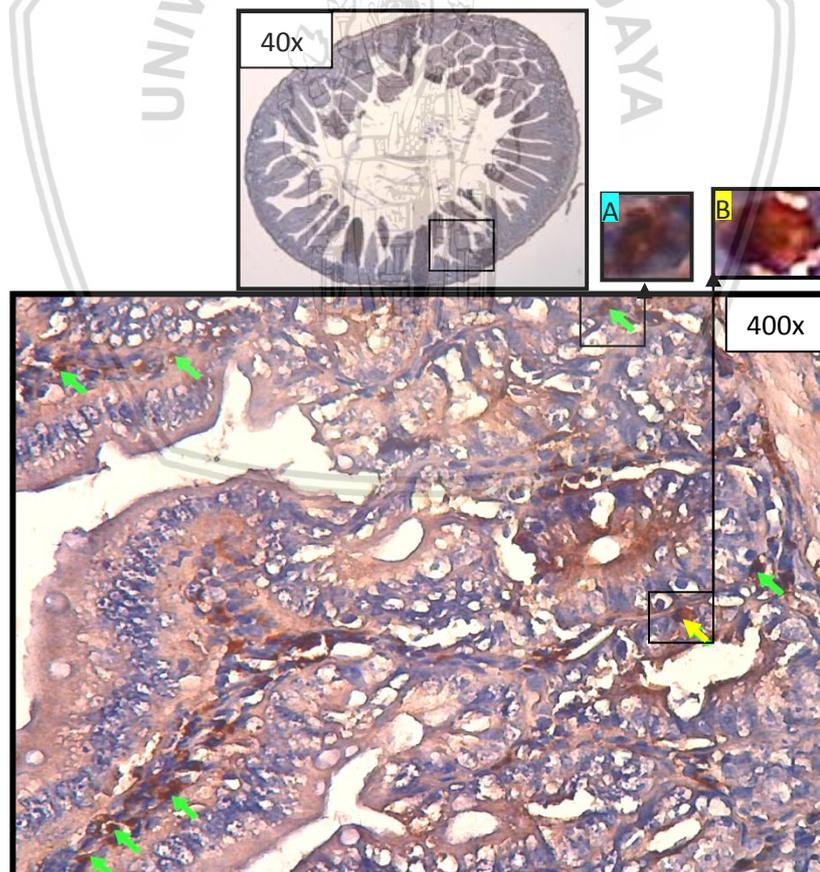


Gambar 5. 8 Gambaran imunohistokimia duodenum mencit (*Mus musculus*) pada K+ dengan perbesaran 40x dan 400x., ekspresi TNF- α yang disekresi oleh \rightarrow neutrofil, A : neutrofil.

Adanya ekspresi TNF- α yang ditunjukkan oleh tanda panah berwarna hijau (**Gambar 5.8**) mengindikasikan terjadinya reaksi imunitas sel hospes terhadap bakteri *E.coli*. Ekspresi TNF- α dapat terjadi karena neutrofil dan makrofag mensekresikannya. Selain sel tersebut, TNF- α dapat disekresikan oleh sel NK, sel mast dan sel T. *Tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) merupakan sitokin proinflamasi dengan sel targetnya berupa sel endotel. Menurut Parameswaran and Patial (2010), sekresi TNF- α memicu terjadinya inflamasi

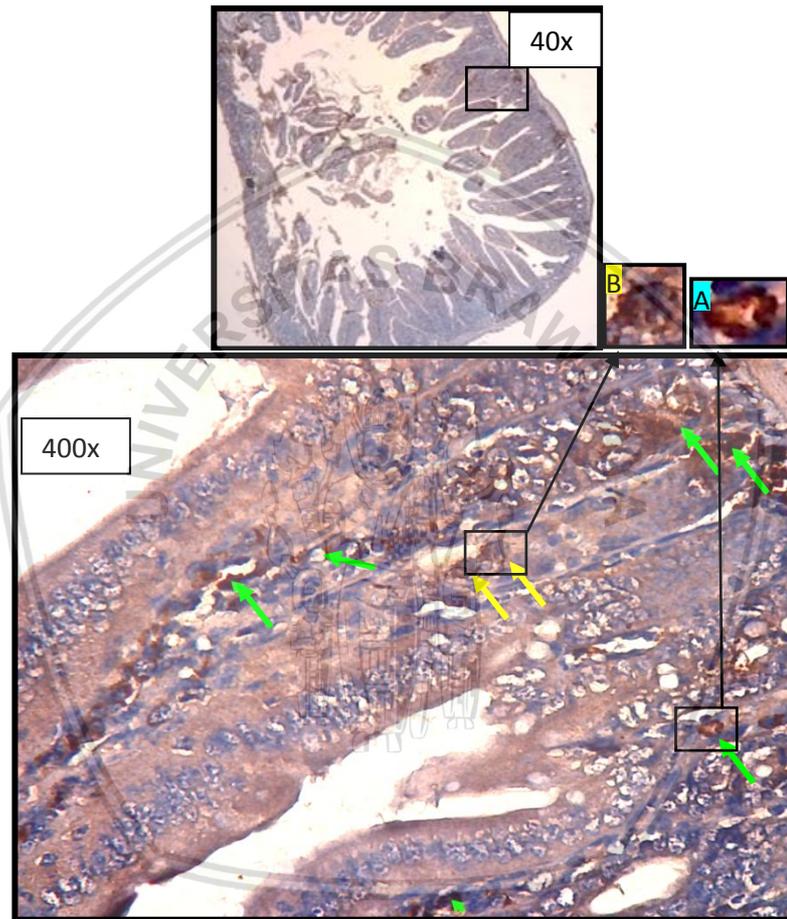
dengan cara membawa sinyal untuk menginduksi sel endotel. Sel endotel yang terinduksi akan mengekspresikan molekul permukaan (molekul adhesin) untuk memudahkan penempelan sel leukosit. Setelah melakukan penempelan pada sel endotel, leukosit tersebut akan melakukan ekstrasvasi menuju jaringan yang mengalami kerusakan dan melakukan kerja sesuai dengan fungsinya. Leukosit yang terinfiltrasi tersebut menyebabkan terjadinya inflamasi.

Ekspresi TNF- α pada P1 memiliki jumlah yang lebih sedikit dibandingkan K+ dan P3 (**Gambar 5.9**). Hal ini menandai bahwa pemberian preventif memberikan sebuah pengaruh dalam mencegah enteritis yang disebabkan oleh infeksi *E. coli*.



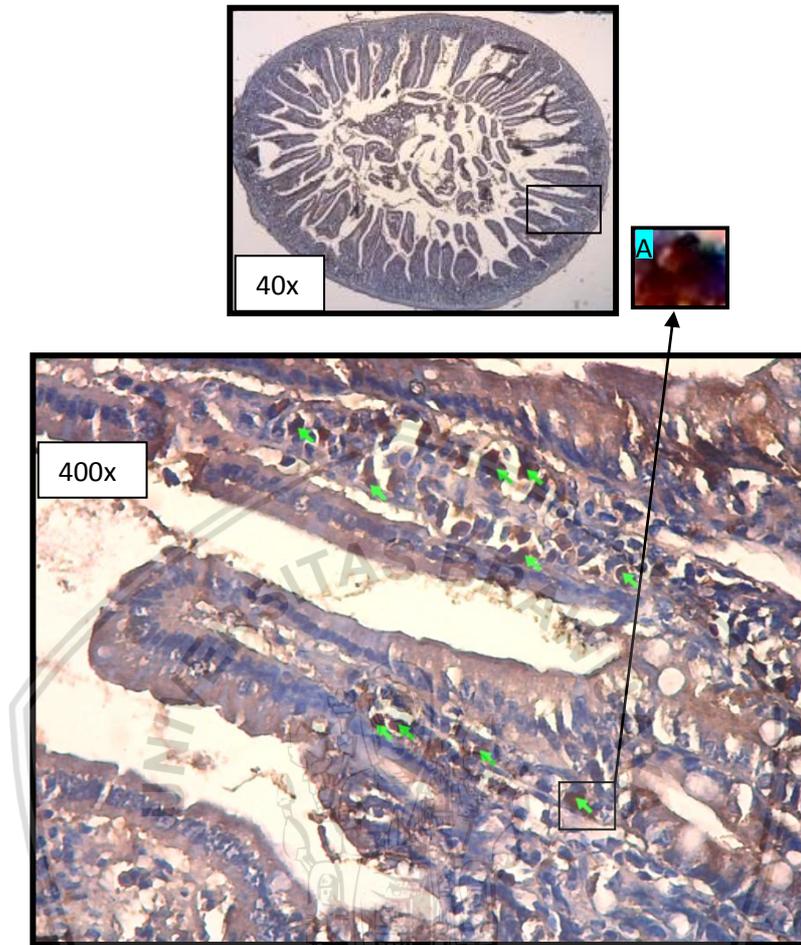
Gambar 5. 9 Gambaran imunohistokimia duodenum mencit (*Mus musculus*) pada P1 dengan perbesaran 40x dan 400x., ekspresi TNF- α yang disekresi oleh → neutrofil, → makrofag, **A** : neutrofil, **B** : makrofag.

Ekspresi TNF- α pada P2 menunjukkan hasil yang lebih sedikit daripada kelompok K+, P1, dan P3 (**Gambar 5.10**). Hal ini membuktikan bahwa pemberian preventif konsentrasi 30% memiliki pengaruh untuk mencegah enteritis.

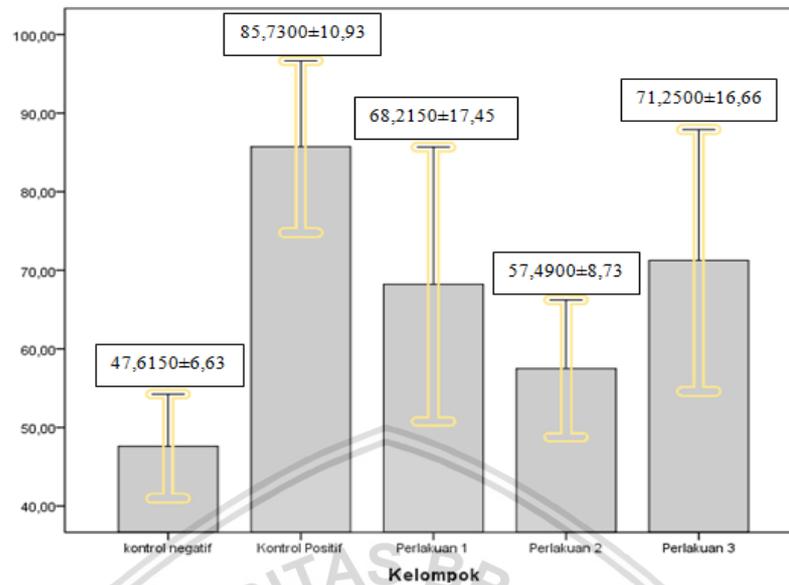


Gambar 5. 10 Gambaran imunohistokimia duodenum mencit (*Mus musculus*) pada P2 dengan perbesaran 40x dan 400x., ekspresi TNF- α yang disekresi oleh → neutrofil, → makrofag, **A** : neutrofil, **B** : makrofag.

Ekspresi TNF- α pada P3 menunjukkan hasil yang lebih sedikit daripada kelompok K+ (**Gambar 5.11**). Hal ini membuktikan bahwa pemberian preventif konsentrasi 40% memiliki pengaruh untuk mencegah enteritis.



Gambar 5. 11 Gambaran imunohistokimia duodenum mencit (*Mus musculus*) pada P3 dengan perbesaran 40x dan 400x., ekspresi TNF- α yang disekresi oleh \rightarrow neutrofil, **A** : neutrofil.



Gambar 5.11 Histogram nilai *mean* dan standar deviasi ekspresi TNF- α duodenum

Berdasarkan **Gambar 5.11** diatas, menunjukkan jumlah rata-rata ekspresi TNF- α duodenum memiliki nilai standar deviasi yang lebih rendah dibandingkan dengan nilai *mean*. Hal ini mencerminkan bahwa penyimpangan data yang terjadi memiliki tingkat yang rendah (Priyatno, 2014).

Berdasarkan statistik deskriptif yang dilakukan menunjukkan bahwa semua perlakuan Nilai presentase ekspresi TNF- α paling tinggi dimiliki oleh K+ dengan nilai sebesar 98,70%, dan nilai terendah dimiliki oleh K- dengan nilai sebesar 38,28%. Nilai presentase dari semua perlakuan di analisis secara kuantitatif statistik dengan uji *one way ANOVA*. Sebelum dilakukan uji *one way ANOVA* dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas.

Uji Normalitas untuk mengetahui distribusi normal dari data parameter yang akan di analisis. Hasil uji Normalitas ekspresi TNF- α dapat dilihat pada **Lampiran 7.1**. Didapatkan hasil ($p > 0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa data

terdistribusi normal dan syarat uji statistik untuk uji *one way ANOVA* telah terpenuhi.

Uji homogen digunakan untuk mengetahui data kelompok tersebut memiliki varian yang sama/homogen atau tidak sama/tidak homogen. Hasil uji homogenitas dari data ekspresi TNF- α duodenum mencit dapat dilihat pada **Lampiran 7.2**, didapatkan nilai signifikansi $0,061 > 0,05$. Nilai signifikansi $p > 0,05$ berarti varian kelompok data tersebut adalah sama/homogen, sehingga bisa dilanjutkan dengan uji statistik *one way ANOVA* karena data yang homogen telah memenuhi asumsi dasar dari uji statistik *one way ANOVA* (Priyatno, 2014).

Uji selanjutnya yang dilakukan yaitu Uji *One Way Analysis of Variance (ANOVA)*. Uji *one way ANOVA* digunakan untuk menguji perbedaan rata-rata tiga atau lebih kelompok data yang independen. Hipotesis dari uji *one way ANOVA* ini yaitu H_0 dan H_a yang. H_0 memiliki hipotesis bahwa tidak ada perbedaan ekspresi TNF- α antara K-, K+, P1, P2, P3, dan H_a memiliki hipotesis bahwa ada perbedaan ekspresi TNF- α antara K-, K+, P1, P2, P3. Perbedaan dari ekspresi TNF- α pada kelompok perlakuan Kontrol Negatif (K-), Kontrol Positif (K+), P1, P2, P3 dianalisis menggunakan uji *one way ANOVA* dan didapatkan hasil (**Lampiran 7.3**) bahwa $F_{hitung} > F_{tabel}$ ($5,063 > 3,05$) dengan angka signifikansi $< 0,05$ ($0,009 < 0,05$) yang berarti H_0 ditolak. Jadi dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan ekspresi TNF- α antara K-, K+, P1, P2 dan P3.

Hasil uji *one way ANOVA* menunjukkan adanya perbedaan ekspresi TNF- α pada kelompok penelitian, oleh karena itu diperlukan uji lanjutan dengan menggunakan uji Tukey untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki

perbedaan. Hasil uji Tukey dapat dilihat pada **Lampiran 7.4**, menunjukkan adanya data yang memiliki perbedaan nyata dan ada data yang tidak memiliki perbedaan nyata.

Tabel 5.1 Data perhitungan rata-rata ekspresi TNF- α dan hasil uji Tukey HSD

Kelompok	Rata-rata ekspresi TNF- α
Kontrol Negatif (K-)	47,6150 \pm 6,63 ^a
Kontrol Positif (K+)	85,7300 \pm 10,93 ^b
Preventif 20% (P1)	68,2150 \pm 17,45 ^{ab}
Preventif 30% (P2)	57,4900 \pm 8,73 ^a
Preventif 40 % (P3)	71,2500 \pm 16,66 ^{ab}

Keterangan : perbedaan notasi menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antara kelompok perlakuan ($p < 0,05$).

Berdasarkan **Tabel 5.2** diatas, rata-rata ekspresi TNF- α pada K+ (85,7300 \pm 10,93) lebih tinggi dan berbeda signifikan ($p < 0,05$) dibandingkan semua kelompok terapi. Hal ini menunjukkan sekresi TNF- α lebih banyak dibandingkan dengan kelompok yang lain. Semakin banyak TNF- α yang disekresikan maka kerusakan jaringan yang terjadi semakin besar dan inflamasi yang akan terjadi menjadi semakin besar pula (Sedger and McDermott, 2014). Sekresi yang tinggi pada K+ dapat terjadi karena kelompok ini merupakan kelompok perlakuan tanpa diberikan namun diberikan infeksi dengan menggunakan *E. coli*.

Kontrol negatif (K-) menunjukkan rata-rata ekspresi TNF- α yang lebih rendah (47,6150 \pm 6,63) dibandingkan K+, P1, P2 dan P3. Secara normal sekresi TNF- α dapat terjadi karena memiliki fungsi dalam kegiatan metabolisme, proses proliferasi, apoptosis, faktor angiogenesis (Subowo, 2014).

Kelompok P1 menunjukkan rata-rata ekspresi TNF- α sebesar (68,2150 \pm 17,45) yang merupakan rata-rata lebih rendah dibandingkan dengan P3 (71,2500 \pm 16,66) dan K+ (85,7300 \pm 10,93). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian preventif dengan konsentrasi 20% berpengaruh dalam mencegah enteritis infeksi *E. coli*. Selain itu, pemberian preventif konsentrasi 20% lebih efektif digunakan dibandingkan dengan pemberian preventif konsentrasi 40%.

Kelompok P2 menunjukkan rata-rata ekspresi TNF- α sebesar (57,4900 \pm 8,73)% yang memiliki rata-rata lebih rendah secara signifikan dibandingkan P1 (68,2150 \pm 17,45), P3 (71,2500 \pm 16,66) dan K+ (85,7300 \pm 10,93). Ekspresi yang ditunjukkan semakin sedikit berarti tingkat kerusakan yang terjadi semakin sedikit dan inflamasi di dalam jaringan juga lebih rendah. Jumlah rata-rata ekspresi TNF- α pada P2 membuktikan bahwa peptida antimikrobal lendir lele mampu membunuh bakteri *E. coli* sehingga tingkat kerusakan di dalam duodenum dapat dicegah. Selain itu, pemberian preventif dengan konsentrasi 30% memiliki pengaruh yang lebih baik dibandingkan pemberian preventif lainnya dalam mencegah enteritis yang disebabkan oleh infeksi *E. coli*.

Kelompok perlakuan P3 menunjukkan rata-rata ekspresi TNF- α sebesar (71,2500 \pm 16,66) yang memiliki rata-rata lebih rendah dibandingkan dengan K+ (85,7300 \pm 10,93). Pemberian preventif dengan konsentrasi 40% ini berpengaruh dalam menghambat kerusakan akibat infeksi *E. coli*, namun hasilnya kurang efektif karena pemberian dengan konsentrasi 40% berpotensi menimbulkan toksisitas yang mengakibatkan sel hospes mengalami kerusakan.

Ekspresi TNF- α mengalami penurunan setelah pemberian preventif lendir lele, karena lendir lele mengandung peptida antimikrobal yang bersifat bakterisidal sehingga infeksi akibat *E. coli* dapat dikurangi. Jika agen infeksi berkurang maka tingkat kerusakan yang akan terjadi menjadi berkurang dan sekresi sitokin (TNF- α) juga akan berkurang. Konsentrasi yang paling baik yang digunakan sebagai preventif yaitu konsentrasi 30%. Konsentrasi 20% dan 40% memiliki pengaruh untuk menurunkan ekspresi TNF- α namun hasilnya masih kurang efektif karena konsentrasi rendah memiliki kemampuan yang masih kurang dalam membunuh bakteri sedangkan pada konsentrasi yang tinggi memiliki kemampuan toksik pada sel hospes. Menurut Masso-Silvi and Diamond (2014), konsentrasi peptida antimikrobal yang rendah kurang kemampuan bakterisidal terhadap bakteri akan semakin rendah. Penggunaan peptida antimikrobal dengan konsentrasi yang rendah hanya mampu menghambat sintesis makromolekul bakteri, tetapi tidak mampu untuk merusak membran sel bakteri dengan baik. Menurut Giuliani *et al.* (2007), dosis yang tinggi peptida antimikrobal sangat baik digunakan untuk hewan coba yang bersifat infeksius, namun penggunaan dosis yang tinggi memiliki potensi yang berbahaya karena ada kemampuan bersifat toksik. Menurut Matsuzaki (2009), peptida antimikrobal pada konsentrasi tinggi bersifat toksik karena memiliki kemampuan untuk merusak eritrosit sehingga menyebabkan hemolisis yang bisa berefek menimbulkan berbagai macam penyakit seperti anemia hemolitik. Hemolisis terjadi saat peptida antimikrobal berikatan dengan membran sel eritrosit. Peptida antimikrobal mengikat eritrosit karena membran sel eritrosit bersifat *zwitterionic*.

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah disampaikan dapat diambil kesimpulan bahwa:

1. Pemberian preventif peptida antimikrobia lendir lele berpengaruh mencegah enteritis pada hewan coba yang diinfeksi *Escherichia coli* berdasarkan gambaran histopatologi duodenum dengan konsentrasi terbaik 30% yang ditandai dengan berkurangnya infiltrasi sel radang, tidak adanya nekrosis sel.
2. Pemberian preventif peptida antimikrobia lendir lele berpengaruh mencegah enteritis pada hewan coba yang diinfeksi *Escherichia coli* dengan konsentrasi 30% pada mencit (*Mus musculus*) yang diinfeksi *Escherichia coli* merupakan konsentrasi terbaik dibandingkan konsentrasi 20% dan 40% yang dapat menurunkan ekspresi TNF- α ($57,4900 \pm 8,73$).

6.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai penggunaan konsentrasi optimum sebagai preventif pada hewan model enteritis yang diinfeksi *Escherichia coli*.
2. Perlu dilakukannya penelitian lebih lanjut mengenai efek negatif dari pemberian antimikrobia mikrobial peptida lendir lele.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A. K., A. H. Lichtman, and S. Pilai. 2007. *Cellular and Molecular Immunology, 6th Ed.* Saunders Elsevier., Philadelphia. 1-15, 21-47, 56-101.
- Abrar, M. 2009. Peranan Hemagglutinin *Escherichia coli* dalam proses Adhesi. *Jurnal Kedokteran Hewan* 3 (1) : 194-198.
- Bacha, W. J., and L. M. Bacha. *Color Atlas of Veterinary Histology second Ed.* Lippincott William and Wilkins., Philapeldia. 1-7.
- Bahar, A. A and D. Ren. 2013. Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals* 6 : 1543-1575.
- Baratawidjaja, K. G., and I. Rengganis, 2016. *Imunologi Dasar, Ed 11th.* Balai Penerbit FKUI., Jakarta. 29-43.
- Bashahun, G. M., and A. Amina. Colibacillosis in Calves : a Review of Literature. *Journal of Animal and Veterinary Medicine* 2 : 62-71.
- Bao, F., P. H. R. Green, and G. Bhagat. 2012. An Update on Celiac Disease Histopathology and the Road Ahead. *Arch Pathology Laboratory Medicine* 136 : 735-745.
- Benhamed , S., F. A. Guardiola, M. Mars, and M. A. Esteban. 2014. Pathogen bacteria adhesion to skin mucus of fishes. *Journal Veterinary Microbiology* 171 : 1-12.
- Center for Disease Control and Prevention (CDC). 2013. *Antibiotic Resistance Threats in The United State.* U.S Departement of Health and Human Service.
- Center for Disease Control and Prevention (CDC). 2015. Antibiotic Resistance : From Farm to Table. <https://www.cdc.gov/foodsafety/pdfs/ar-infographic-508c.pdf>. [5 Agustus 2017].
- Cheng, K., Y. M She, H. Chui, L. Domish, A. Sloan, D. Hernandez, S. McCorrister, J. Ma, B. Xu, A. Reimer, D. J. Knox, and G. Wang. 2016. Mass Spectrofotometry-based *Escherichia coli* H Antigen/Flagella Typing: Validation and Comparison with Traditional Serotyping. *Clinical Chemistry, Molecular Diagnostics and Genetics* 62 (6) : 839-847.
- Dewi, E., Khairil, dan Mutdatsir. 2013. Analisis Potensi Antibakteri Teh Rosela Terhadap Paparan Enteropathogenic *Escherichia Coli* (EPEC) pada Mencit (*Mus musculus*). *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala* 13 (2) : 77-85.



- Duque, G. A., and A. Descoteaux. 2014. *Macrophage Cytokines : Involvement in Immunity and Infectious Disease*. Frontiers in Immunology, Molecular Innate Immunity, Canada.
- Elfidasari, D. 2011. Perbandingan Kualitas Es di Lingkungan Universitas Al Azhar Indonesia dengan Restoran Fast Food di Daerah Senayan dengan Indikator Jumlah *Escherichia coli* Terlarut. *Jurnal Al-Azhar Indonesia Seri Sains dan Teknologi*, 1 (1) : 18-23.
- Erkmen, O., and T. F. Bozoglu. Food Microbiology, Principles into Practice. John Willey and Sons, India. 145-150.
- Esteban, M. A. 2012. An Overview of The Immunological Defenses in Fish Skin. *International Scholarly Research Network*, Spain. 1-29.
- Feneglio-Preiser, C. M., A. E. Noffsinger, P. E. Lantz, G. N. Stemmermann, and P. G. Isaacson. 2008. *Gastrointestinal Pathology : an Atlas and Text*. Lippincott Williams and Wilkins., Phidelpia. 275-496.
- Fitri, N. 2012. *Antimicrobial Peptides* sebagai Obat Alternatif pada Resistensi Antibiotik. *Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbang Kesehatan Kementerian Kesehatan RI*, 2 (2) : 62-67.
- Gibson, J. S., R. N. Cobbold, and D. J. Trott. 2010. Characterization of multidrug resistant *Escherichia coli* isolated from extraintestinal clinical infections in animals. *Journal of Medical Microbiology* 59 : 592-598.
- Giuliani, A., G. Pirri, S. F. Nicoletto. 2007. Antimicrobial Peptides : an Overview of a Promising Class of Therapeutics. *Central European Journal of Biology* 2 (1) : 1-33.
- Goldwater, P. N., and K. A. Bettelheim. 2012. Treatment of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) Infection and Hemolytic Uremic Syndrome (HUS). *Biomed Central Medicine* 10 (12) : 1-8.
- Grainger, J.R., J. E. Konkel, T. Z. Murray, and T. N. Shaw. 2017. Macrophages in Gastrointestinal Homeostasis and Inflammation. *Springer, Pflugers Arch Eur Journal Physiol* 469 : 527-539.
- Gulwani, Hanni. 2012. Normal Hystology. <http://www.pathologyoutlines.com/topic/smallbowelsuperpagenontumor.html>. [10 Juni 2017].
- Hankenson, F. C. 2014. *Mice and Rats : Critical Care Management for Laboratory*. Taylor and Francis Group LLC., New York. 21, 27-28.
- Hartati., Rusny, dan M. Masri. 2015. Pengaruh Pemberian Bubuk Kunyit (*Curcuma domestica*) Terhadap Pertumbuhan Mencit (*Mus musculus L.*) ICR dari Hasil Perkawinan Outbreeding. Prosiding Seminar Nasional Mikrobiologi Kesehatan dan Lingkungan, Makassar. 126-131.

- Harmita., dan M. Radji., 2006. *Kepekaan Terhadap Antibiotik. Dalam: Buku Ajar Analisis Hayati, Ed.3.* EGC., Jakarta.
- Hee, H. N. G and M. Kottelat. 2008. The Identity of *Clarias Batrachus* (Linnaeus, 1758), With the Designation of a Neotype (*Teleostei: Clariidae*). *Zoological Journal of the Linnean Society* 153 : 725-732.
- Hidayati, N.A., S. Listyawati, dan A. D.Setyawan. 2008. Kandungan kimia dan Uji Antiinflamasi Ekstrak Etanol *Lantana camara* L. Pada Tikus Putih (*Rattus novergicus* L.) Jantan. *Bioteknologi* 5 (1) : 10-17.
- Hubrecht, R. C., and J. Kirkwood. 2010. *The Care and Management of Laboratory and Other Research Animal 8th Ed.* Wiley-Blackweel, Singapore. 778.
- Hubrecht, R. C. 2014. *The Welfare of Animals Use in Research : Practice and Ethics.* Wiley-Blackweel, India. 76.
- Hussain, T. 2015. An Introduction to The Serotypes, Pathotypes and Phylotypes of *Escherichia coli*. *International Journal of Microbiology and Allied Sciences (IJOMAS)* 2 (1) : 9-16.
- Ishartadiati, K. 2010. *Peranan TNF, IL-1, dan IL-6 pada Respon Imun Terhadap Protozoa.* Laporan Penelitian, Dosen Fakultas Kedokteran, Universitas Wijaya Kusuma Surabaya.
- Jakel, C. E., K. Meschenmoser, Y. Kim, H. Weiher, and I. G. H. Schmidt-Wolf. 2012. Efficacy of a Proapoptotic Peptide towards Cancer cells. *International Journal of Experimental and Clinical Pathophysiology and Drugs Research* 2 (3) : 419-426.
- Junquera C. K and J. Carneiro. 2007. *Basic Histology : Text and Atlas, 11th Ed.* Tata McGraw-Hill.
- Kilapong, R. B. J. D., S. Supit, dan J. J. V. Rampengan. 2015. Pengaruh Latihan Beban pada Lansia Terhadap kadar TNF- α . *Jurnal e-Biomedik (eBM)* 3 (3) : 681-685.
- Kusumaningtyas, E. 2012. Peran Peptida Susu Sebagai Antimikroba untuk Meningkatkan Kesehatan. *Wartazoa* 33 (2) : 63-75.
- Ladram, A and P. Nicolas. 2016. Antimicrobial Peptides from Skin Frog: Biodiversity and Therapeutik Promises. *Frontiers in Bioscience* 21 : 1341-1371.
- Ley, K., C. Laudanna, M. I. Cybulsky, and S. Nourshargh. 2007. Getting to The Site of Inflammation : The Leukocyte Adhesion Cascade Update. *Nature Reviews Immunology* 7 : 678-689.

- Loganathan, L., M. Muniyan, A. A. Prakash, P. S. Raja, and M. Prakash. 2011. Studies on the Role of Mucus From *Clarias Batrachus* (Linn) Against Selected Microbes. *International Journal of Pharmaceutical Applications* 2 (3) : 202-206.
- Luppi, A. 2017. Swine Enteric Colibacillosis: Diagnosis, Therapy, and Antimicrobial Resistance. *Porcine Health Management* 3 (16) : 1-18.
- Masso-Silvi, J. A., and G. Diamond. 2014. Antimicrobial Peptides from Fish. *Pharmaceutical* 7 : 265-310.
- Matsuzaki, K. 2009. Control Cell Selectivity of Antimicrobial Peptides. *Elsevier: Biochimica et Biophysica Acta* 1788 : 1687-1692. Doi: 10.1016/j.bbamem.2008.09.13.
- Momoh, M. A., A. T Mora, J. D. N Ogbonna, and A. A Agboke. 2014. In Vitro Evaluation of Antimicrobial Activity of Cat Fish Slime Mucin on Selected Micro-organisms by Agar Diffusion Method. *Pakistan J. Zool* 46(6) : 1747-1751.
- Mortezaei, N., C. R. Epler, P. P. Shao, M Shirdel, B Singh, A. McVeigh, B. E. Uhlin, S. J. Savarino, M. Andersson, and E. Bullitt. 2014. Structure and Function of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Fimbriae from Differing Assembly Pathways. *National Institutes of Health Mol Microbiol* 95 (1) : 116-126.
- Muliani, H. 2011. Pertumbuhan Mencit (*Mus musculus L.*) Setelah Pemberian Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas L.*). *Buletin Anatomi dan Fisiologi* 19 (1) : 44-54.
- Murphy, K., and C. Weaver. 2017. *Janeway's Immunology, Ed 9th*. Garland Science., News York and London. 1-77, 345-532.
- Murwani, S. 2015. *Dasar-dasar Mikrobiologi Veteriner*. UB Press., Malang. 25-44, 76-96.
- Musser, G., R. Hutterer, B. Krystufek, N. Yigit, and G. Mitsain. 2016. *Mus musculus*, House Mouse. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T13972A22405706.en>. [4 Agustus 2017].
- Novianti, D. 2015. Pemeriksaan Kandungan Bakteri *Escherichia coli* pada Jajanan Bakso Tusuk di Pasar Tradisional Kota Palembang. *Jurnal Sainmatika* 12 (2) : 1-7.
- Nuraida, L., Hana, A. W. Hartanti, dan E. Prangdimurti. 2012. Potensi Lactobacillus yang Diisolasi dari Air Susu Ibu untuk Mencegah Diare. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan* 23 (2) : 158-164.

- Nurmala., I.G.N Virgiandhy, Andriani, dan D. F. Liana. 2015. Resistensi dan Sensitivitas Bakteri terhadap Antibiotik di RSUD dr. Soedarso Pontianak Tahun 2011-2013. *eJournal Kedokteran Indonesia (eJKI)* 3 (1) : 21-28.
- Nwabueze, A. A. 2014. Antimicrobial Action of Epidermal Mucus Extract of *Clarias Gariepernus* (Burchell, 1822) Juveniles-Fed Ginger Inclusion in Diet. *International Journal of Biology* 6 (2) : 42-48.
- O'Neill, J. 2015. Antimicrobials in Agriculture and the Environment : Reducing Unnecessary Use and Waste. *The Review on Antimicrobial Resistance, Tracking drug-resistance Infections Globally* : UK Government. 1-38.
- Pakurar, Alice S and Bigbee John W. 2004. *Digital Histologi : An Interactive CD Atlas*. Canada : Willey-Liss.
- Parameswaran, N., and S. Patial. 2010. Tumor Necrosis Factor- α Signaling in Macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 20 (2) : 87-103.
- Park, S.C., Park Y, and Hamh K. S. 2011. The Role of Antimicrobial Peptides in Preventing Multidrug-Resistant Bacterial Infections and Biofilm Formation. *International Journal of Molecular Sciences* 12 : 5971-5992.
- Patel, N. D., A. D. Levy, A. K. Mehrotra, and L. H. Sobin. 2006. Brunner's Gland and Hamartoma : Imaging Features with Clinicopathologic Correlation. *American Journal of Roentgenology* 187 (3) : 715-722.
- Perez, W., and R. Ungerfeld. 2012. Gross Anatomy of the Stomach of the Pampas Deer, *Ozoteceros bezoarticus* (Artiodactyla: Cervidae). *Zoologia* 29 (4) : 337-342.
- Priyatno, D. 2014. SPSS 22 : Pengolahan Data Terpraktis. Penerbit Andi Yogyakarta, Indonesia. 30, 69-84, 180-189.
- Putri, A.R., E. Suswati, dan L. Indreswari. 2017. Resistensi *Escherichia coli* dari Isolat Daging Ayam Broiler Terhadap Tetrasiklin. *Journal of Agromedicine and Medical Science* 4 (1) : 38-44.
- Rahayu, Y. C., dan E. I. Auerkari. Teknik Imunohistokimia Sebagai Pendeteksi Antigen Spesifik Penyakit Infeksi. *Indonesian Journal of Dentistry* 11 (2): 76-82.
- Rahmawamandani, F. I., I. M. Kardena, dan I. K. Berata. 2014. Gambaran Patologi Kasus Kolibasilosis pada Babi *Landrace*. *Indonesia Medicus Veterinus* 3 (4) : 300-309.
- Renshaw, S. 2017. *Immunohistochemistry and Immunocytochemistry : Essential Methods, Second Edition*. Willey-Blacwell., UK. 36-76, 173-174.
- Ridwan, E. 2013. Etika Pemanfaatan Hewan Percobaan dalam Penelitian Kesehatan. *Jurnal Indon Med Assoc* 63 (3) : 112-116.

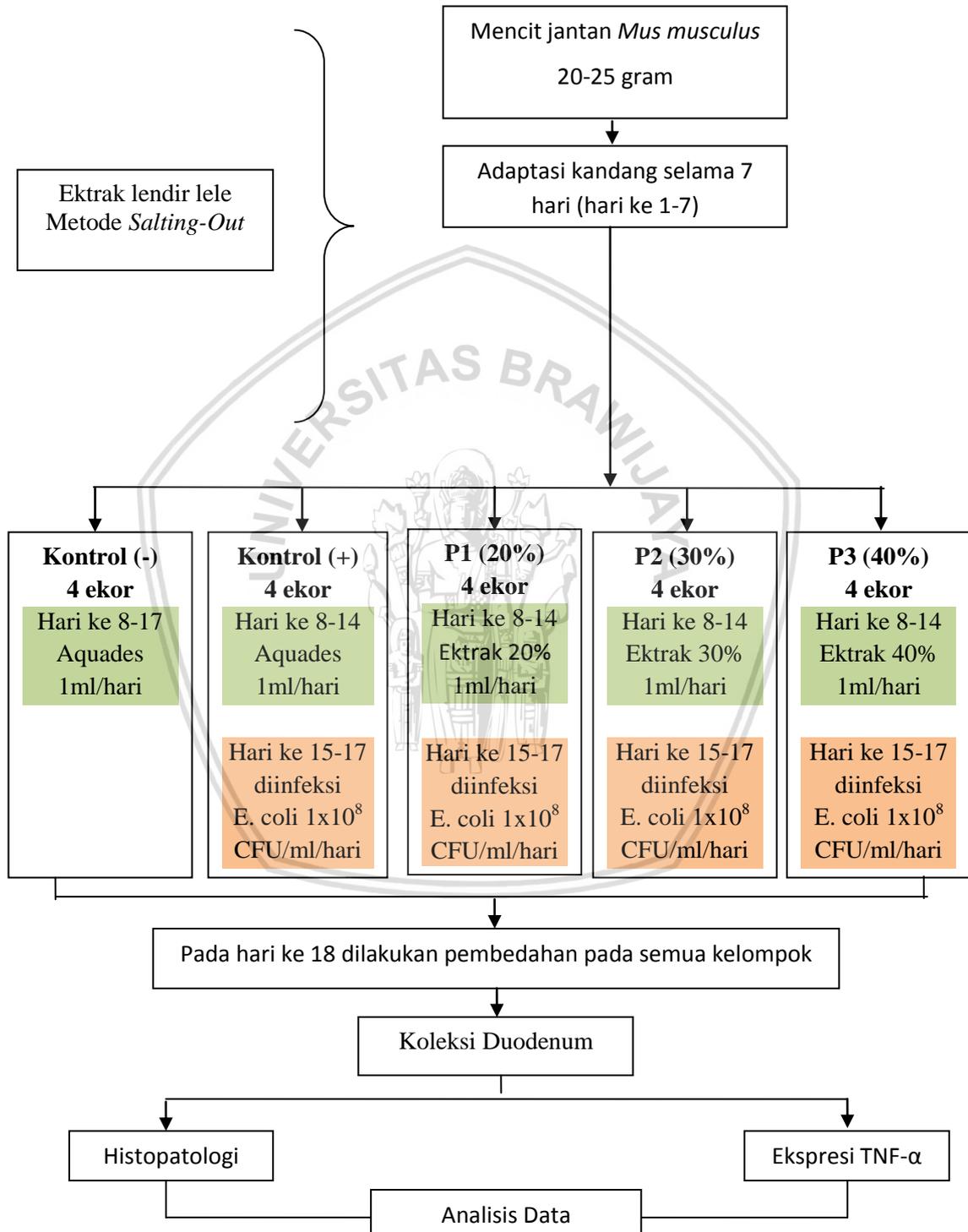
- Riede, U. N., and M. Werner. 2004. *Color Atlas of Pathology*. Thieme Stuttgaerd, New York. 424.
- Ross, M.H., W. Pawlina, and T. A. Barnash. 2009. *Atlas of Descriptive Histology*. Sinauer Associates, Inc. Publisher., Massachusets U.S.A. 4-6, 200-202.
- Sedger, L. M., and M. F. McDermott. TNF and TNF-receptor: From Mediator of Cell Death and Inflammation to Therapeutic Giants past, present and future. *Elsevier: Cytokine and Growth Factor Reviews* 25 : 453-472.
- Shaw, R. K., J. Cleary, M. S. Murphy, G. Frankel, and S. Knutton. 2005. Interaction of *Enteropathogenic Escherichia coli* with Human Intestinal Mucosa: Role of Effector Protein in Brush Border Remodeling and Formation of Attaching and Effacing Lesions. *Infection and Immunity* 73: 1243-1251. Doi: 10.1128/IAI.73.2.1243-1251.2005.
- Suardana, I. W., I. H. Utama, P. A. S. Putriningsih, dan M. D. Rudyanto. 2014. Uji Kepekaan Antibiotika Isolat *Escherichia coli* O157:H7 Asal Feses Ayam. *Buletin Veteriner Udayana* 6 (1) : 19-27.
- Subowo. 2010. *Imunologi Klinik : Hipersensitivitas, Ed 2nd*. Sagung Seto., Jakarta.
- Subowo. 2014. *Imunobiologi Edisi 3*. CV Sagung Seto, Jakarta. 157-161.
- Supit, I. A., D. H. C. Pangemanan, dan S. R. Marunduh. 2014. Profil Tumor Necrosis Factor (TNF- α) Berdasarkan Indeks Massa Tubuh (IMT) pada Mahasiswa Fakultas Kedokteran UNSRAT angkatan 2014. *Jurnal e.Biomedik (eBm)* 3 (2) :640-643.
- Suwito, W. 2009. Dampak Verotoksigenik dan Enterohemoragik *Escherichia coli* (VTEC dan EHEC) Pada Hewan, Manusia dan Makanan. Balai Perkajian Teknologi Pertanian Yogyakarta. *WARTAZOA* vol. 19 (2) : 53-63.
- Tang, K. L., N. P. Caffrey, D. B. Nobrega, S. C. Cork, P. E. Ronksley, H. W. Barkema, A. J. Polachek, H. Ganshorn, N. Sharma, J. D. Kellner, and W. A. Ghali. 2017. Restricting the Use of Antibiotics in Food-Producing Animal and its Associations with Antibiotic Resistance in Food-Producing Animal and Human beings : a Systematic Review and Meta-analysis. *The Lancet Journal Planet Health* 1 (8) : e316-e327.
- Teixeira, N. B., T. C. G. Rojas, W. D. D. Silveira, C. M. Guimaraes, N. P. Silvi, and I. C. A. Scaletsky. 2015. Genetic Analysis of *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC) Adherence Factor (EAF) Plasmid Reveal a New Deletion within the EAF Probe Sequence Among O119 Typical EPEC Strains. *Bio Medicine Central* 15 (200) : 1-9.
- Trabulsi, L. R., R. Keller, and T. A. T. Gomest. 2002. Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Disease* 8 (5) : 508-513.

- Ud-din, A., and S. Wahid. 2014. Relationship Among *Shigella spp.* And Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and Their Differentiation. *Brazillian Journal of Microbiology* 45 (4) : 1131-1138.
- Verhaegen, B., K. D. Reu, M. Heyndrickx, and L. D. Zutter. 2015. Comparison of Six Chromogenic Agar Media for the Isolation of a Broad Variety of Non-O157 Shigatoxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) Serogroups. *International Journal Environmental Research and Public Health* 12 : 6965-6978.
- Verraes, C., S. V. Boxstael, E. V. Meervenne, E. V. Coillie, P. Butaye, B. Catry, M. A. D. Schaetzen, X. V. Huffel, H. Imberechts, K. Dierick, G. Daube, C. Saegerman, J. Dewulf, and L. Herman. 2013. Antimicrobial Resistances in the Food Chain : A Review. *International Journal of Enviromental Research and Public Health* 10 : 2643-2669.
- Viswanathan, V. K., K. Hodges, and G. Hecht. 2009. Enteric Infection Meets Intestinal Function: How Bacterial Pathogens cause Diarrhoea. *Nat Rev Microbiol* 7 (2) : 110-119. Doi: 10.1038/nrmicro2053.
- Wibowo, M. H., dan A. E. T. Wahyuni. 2008. Studi Patogenisitas *Escherichia coli* Isolat Unggas pada Ayam Pedaging Umur 15 Hari. *Indonesian Veterinary Journal* 9 (2) : 87-93.
- Wojdasiewicz, P., L. A. Poniatowski, and D. Szukiewicz. 2014. The Role of Inflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in The Pathogenesis of Osteoarthritis, Hindawi Publishing Corporation. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/561459>. [14 November 2017].
- World Health Organization (WHO). 2017. Antimicrobial Resistance in the Food Chain. http://www.who.int/foodsafety/areas_work/antimicrobial-resistance/amrfoodchain/en/. [15 November 2017].
- Yulida, E., I. K. Oktaviyanti, dan L. Rosida. 2013. Gambaran Derajat Infiltrasi Sel Radang dan Infeksi *Helicobacter Pylori* pada Biopsi Lambung Pasien Gastritis. *Berkala Kedokteran* 9 (1) : 51-65.
- Zhang, P., Steve N., Gregory J. B., Robert S. H., Judd E., Shellito., David A.W. 2008. Thelinage – c-Kit+Sca-1+ Cell Response to *Escherichia coli* Bacteremia in Balb/c Mice. *Stem Cell, Tissue-Spesific Stem Cell* 26 : 1778-1786
- Zhao, H., C. Li, B. H. Beck, R. Zhang, W. Thongda, D. A. Davis, and E. Peatman. 2015. Impact of Feed Additives on Surface Mucosal Health and Columnaris Susceptibility in *Channel catfish fingerlings, Ictalurus punctatus*. *Fish & Shellfish Immunology* 46 : 624-637.

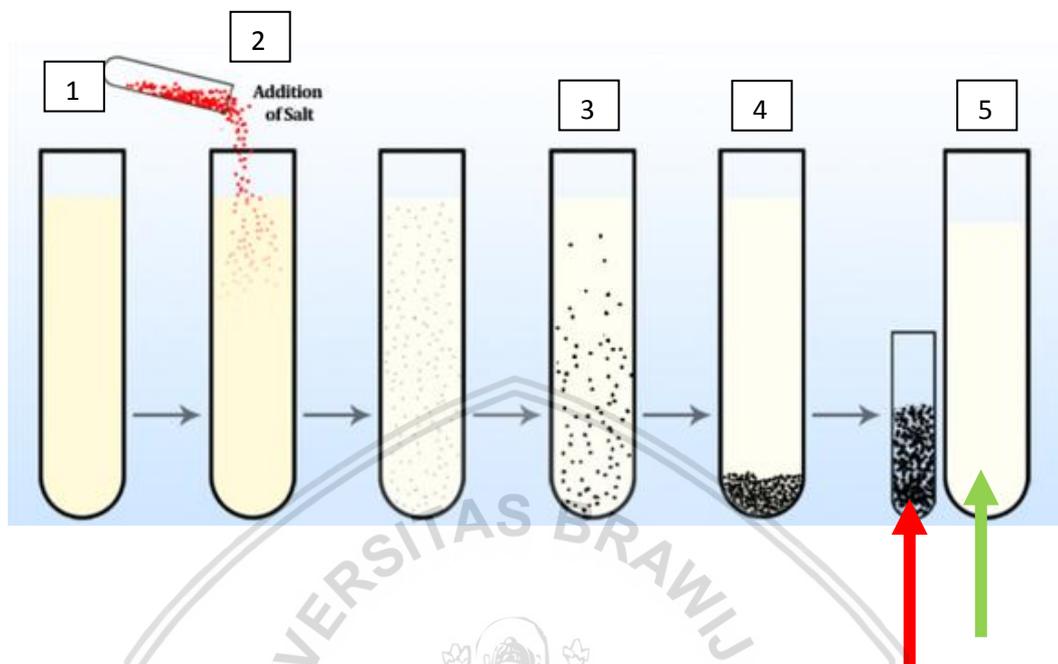


LAMPIRAN

Lampiran 1. Kerangka Operasional Penelitian



Lampiran 2. Metode Salting out



1. Isolasi lendir lele
2. Lendir lele ditambahkan dengan NaCl 0,85%
3. Disentrifugasi
4. Adanya pemisahan antara presipitasi dan supernatan
5. Tanda panah merah berupa presipitasi, dan tanpa panah hijau berupa supernatan. Presipitasi berupa protein dengan berat molekul yang tinggi, sedangkan supernatan berisi peptida karena peptida antimikrobia memiliki berat molekul yang kecil dengan berat molekul 10 kDa (Nwabueze, 2014; Wang *et al*, 2012)

Lampiran 3. Perhitungan Konsentrasi

1. Peptida antimikrobal lendir lele

Mencit yang memiliki berat badan 20-30 gram diberikan ekstrak lendir lele secara peroral dengan volume sebanyak 1 ml/ekor mencit melalui perbedaan konsentrasi sebagai berikut :

a. Konsentrasi yang diberikan pada P3 (20%)

Konsentrasi 20% = ekstrak + aquades
 = 2 ml + aquades 8 ml
 = 10 ml

b. Konsentrasi yang diberikan pada P4 (30%)

Konsentrasi 30% = ekstrak + aquades
 = 3 ml + aquades 7 ml
 = 10 ml

c. Konsentrasi yang diberikan pada P5 (40%)

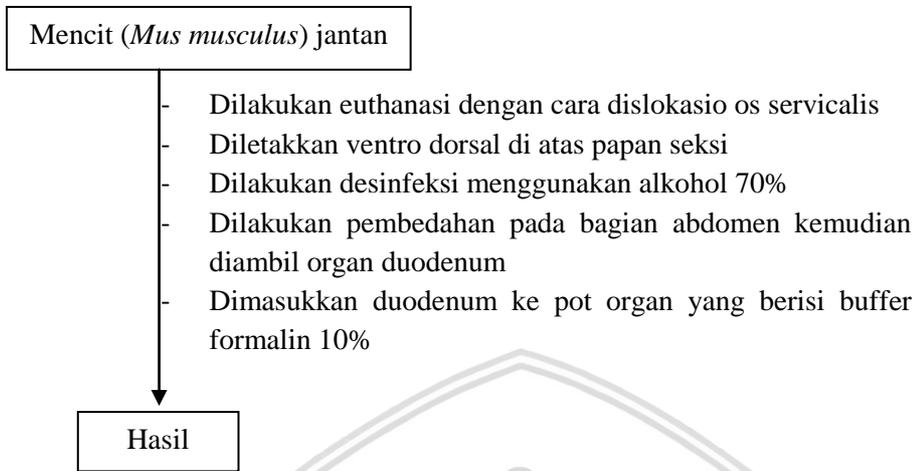
Konsentrasi 40% = ekstrak + aquades
 = 4 ml + aquades 6 ml
 = 10 ml

2. Dosis *E. coli* : 10^8 CFU/ml (1ml) per ekor mencit

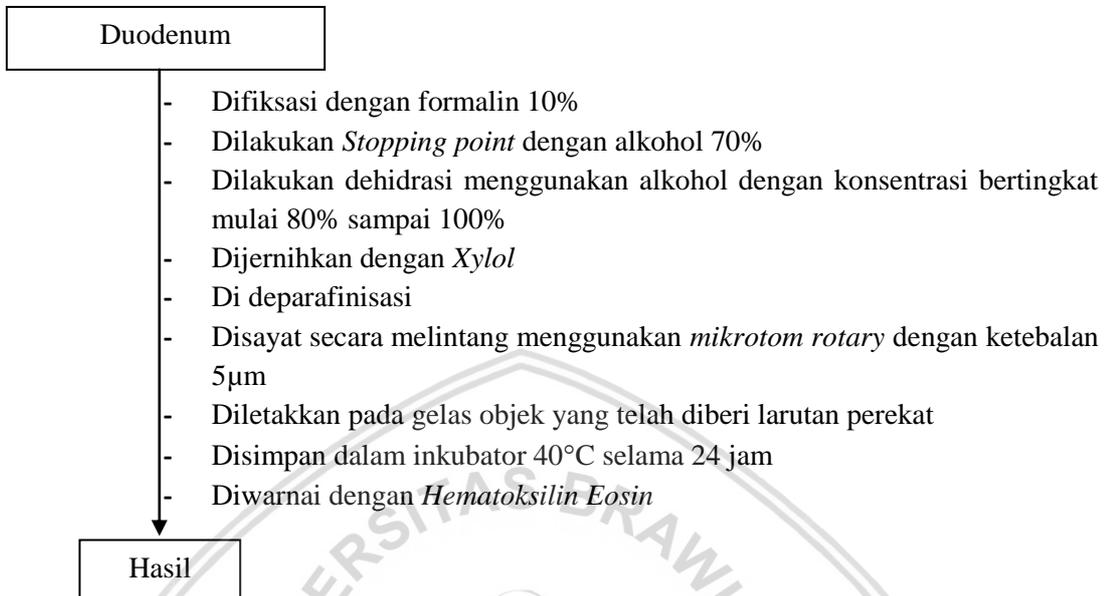
Tabel volume maksimum yang diberikan pada hewan

Hewan	volume maksimum (ml)				
	IV	IM	IP	SC	PO
Mencit (20-30g)	0,5	0,05	1	0,5-1	1
Tikus (100g)	1	0,1	2-5	0,5-5	5
Hamster (50g)	-	0,1	1-2	2,5	2,5
Marmut (250g)	-	0,25	2-5	5	10

Sumber : Harmita dan Radji, 2006

Lampiran 4. Pengambilan Organ Duodenum

Lampiran 5. Pewarnaan Histopatologi Duodenum



Lampiran 6. Immunohistokimia Duodenum

Duodenum dalam bentuk parafin

- Dilarutkan parafin dari jaringan menggunakan xylol
- Dilakukan rehidrasi dengan alkohol bertingkat
- Dicuci dengan PBS dengan pH 7,4
- Dihilangkan peroksidase endogen dengan 3% H₂O₂ dan dicuci dengan PBS pH 7,4
- Dilakukan blocking dengan 1% BSA selama 45 menit pada suhu 27⁰C dan dicuci PBS pH 7,4
- Direaksikan preparat dengan antibodi primer, anti-mouse TNF- α selama 24 jam dengan suhu 4⁰C dan PBS pH 7,4
- Direaksikan preparat ini dengan antibodi sekunder, *anti mouse labelled biotin* dalam *blocks buffer* selama 1 jam dengan suhu 27⁰C dan dicuci PBS pH 7,4
- Ditambahkan sa-HRP selama 40 menit pada suhu 27⁰C dan dicuci dengan PBS pH 7,4
- Divisualisasikan reaksi positif dengan penambahan substrat Kromagr DAB
- Dilakukan Counterstain dengan pewarna *mayer hematoxylen* hingga warna biru terlihat lalu dibilas, lalu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan setelah itu dibiarkan dalam semalam di suhu 27⁰C
- Dilakukan mounting dengan etilen dan ditutup dengan *cover glass*

Hasil

Lampiran 7. Data Ekspresi TNF- α dengan immunoratio (per bidang pandang)

Perlakuan	Ulangan	1	2	3	4	5	Rata-rata	Rata-rata kelompok
KN (negatif)	U1	36,4	39,5	42,8	37,4	35,3	38,28	47,6150
	U2	51,3	49,8	51,8	47,8	58	51,74	
	U3	48	56,7	41,5	53,7	37,9	47,56	
	U4	56,5	54,5	43,4	59,2	50,8	52,88	
KP (Positif)	U1	100	93,9	80,2	59,5	62,4	79,2	85,7300
	U2	81,4	87,3	97	99,2	87,5	90,48	
	U3	97,7	98,6	98,3	98,9	100	98,7	
	U4	72,6	74,6	85,1	72,3	68,1	74,54	
P1	U1	69,6	85,3	87,4	70	63	75,06	68,2150
	U2	84,7	93,2	70,4	100	96	88,86	
	U3	52,4	63,5	57,9	51,2	75,4	60,08	
	U4	58,6	47,8	36,6	56,1	45,2	48,86	
P2	U1	63,4	73,5	36,1	34,1	70,7	55,56	57,4900
	U2	49,6	49,7	52,6	49,8	60,8	52,5	
	U3	73,4	73,5	72,6	72,5	59,2	70,34	
	U4	75,3	34	50	59,2	39,3	51,56	
P3	U1	73,4	98	90,3	92,2	98,8	90,54	71,2500
	U2	53,5	56,1	58,7	64,6	57,9	58,16	
	U3	80	89,4	87,5	81,2	60,7	79,76	
	U4	48,4	50,3	67,2	47,1	69,7	56,54	

Lampiran 8. Data Statistik IHK TNF- α

Tabel 7.1 Uji Normalitas

Tests of Normality				
	Kelompok	Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
TNFalpha	kontrol negatif	,873	4	,309
	Kontrol Positif	,952	4	,730
	Perlakuan 1	,984	4	,923
	Perlakuan 2	,786	4	,080
	Perlakuan 3	,873	4	,311

a. Lilliefors Significance Correction

Hasil uji normalitas data menunjukkan nilai signifikannya $p > 0,05$, maka H_0 diterima dan dapat disimpulkan bahwa data yang digunakan mempunyai distribusi yang tersebar dengan normal.

Tabel 7.2 Uji Homogenitas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,853	4	15	,061

$P > 0,05$ Data Homogen

Hasil pengujian menunjukkan nilai signifikansi (p) sebesar 0,061, sehingga nilai $p > 0,05$ maka H_0 diterima dan dapat disimpulkan bahwa data yang digunakan mempunyai ragam yang homogen.

Tabel 7.3 Uji Statistik ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3328,608	4	832,152	5,063	,009
Within Groups	2465,555	15	164,370		
Total	5794,162	19			

F hitung sebesar 5,063 sedangkan F tabel sebesar 3,05, jadi F hitung $>$ F tabel. Hasil ini dapat disimpulkan bahwa H_0 ditolak yang berarti bahwa ada perbedaan antar perlakuan.

Tabel 7.4 Uji Lanjutan BNJ**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: TNFalpha

Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol negatif	Kontrol Positif	-38,11500*	9,06560	,006	-66,1089	-10,1211
	Perlakuan 1	-20,60000	9,06560	,207	-48,5939	7,3939
	Perlakuan 2	-9,87500	9,06560	,809	-37,8689	18,1189
	Perlakuan 3	-23,63500	9,06560	,119	-51,6289	4,3589
Kontrol Positif	kontrol negatif	38,11500*	9,06560	,006	10,1211	66,1089
	Perlakuan 1	17,51500	9,06560	,343	-10,4789	45,5089
	Perlakuan 2	28,24000*	9,06560	,048	,2461	56,2339
	Perlakuan 3	14,48000	9,06560	,521	-13,5139	42,4739
Perlakuan 1	kontrol negatif	20,60000	9,06560	,207	-7,3939	48,5939
	Kontrol Positif	-17,51500	9,06560	,343	-45,5089	10,4789
	Perlakuan 2	10,72500	9,06560	,761	-17,2689	38,7189
	Perlakuan 3	-3,03500	9,06560	,997	-31,0289	24,9589
Perlakuan 2	kontrol negatif	9,87500	9,06560	,809	-18,1189	37,8689
	Kontrol Positif	-28,24000*	9,06560	,048	-56,2339	-,2461
	Perlakuan 1	-10,72500	9,06560	,761	-38,7189	17,2689
	Perlakuan 3	-13,76000	9,06560	,567	-41,7539	14,2339
Perlakuan 3	kontrol negatif	23,63500	9,06560	,119	-4,3589	51,6289
	Kontrol Positif	-14,48000	9,06560	,521	-42,4739	13,5139
	Perlakuan 1	3,03500	9,06560	,997	-24,9589	31,0289
	Perlakuan 2	13,76000	9,06560	,567	-14,2339	41,7539

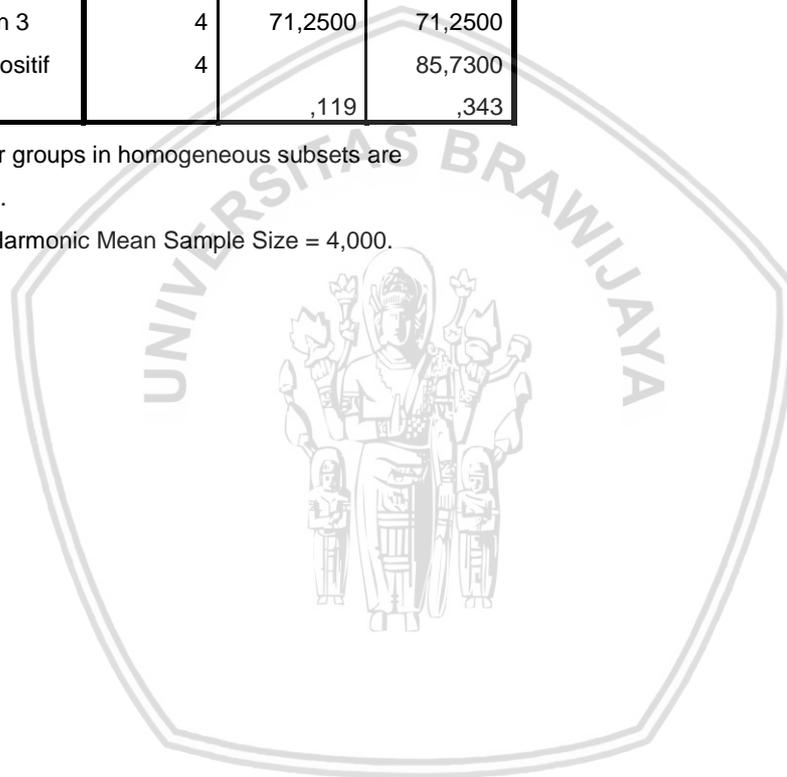
*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Tabel 7.5 Pemberian Notasi pada Uji BNJ**TNFalpha**Tukey HSD^a

Kelompok	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
kontrol negatif	4	47,6150	
Perlakuan 2	4	57,4900	
Perlakuan 1	4	68,2150	68,2150
Perlakuan 3	4	71,2500	71,2500
Kontrol Positif	4		85,7300
Sig.		,119	,343

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,000.



Lampiran 8. Keterangan Kelaikan Etik



**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARENCE"**

No: 735-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 : ANTIPELET : PEMANFAATAN ANTIMICROBIAL
PEPTIDES LEDIR LELE (*Clarias sp*) PADA MENCIT
YANG DIINFEKSI *Eschericia coli*

PENELITI : ANIS ANIQOH

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 12 April 2017
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya



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



Lampiran 9. Dokumentasi Penelitian

No	Foto	Keterangan
1.		<p>Pemeliharaan hewan coba.</p>
2.		<p>Menanam bakteri pada media EMBA (untuk mengkonfirmasi bakteri yang digunakan adalah <i>Escherichia coli</i>).</p> <p>Bakteri <i>E. coli</i> pada media EMBA ditandai dengan warna hijau metalik.</p>
3.		<p>Pembelian ikan lele di tempat budidaya.</p>

4.		Isolasi lendir lele dilakukan pada bagian dorsal menggunakan ose.
5.		Sentrifugasi lendir lele dengan kecepatan 5000rpm selama 15 menit.
6.		Nekropsi hewan coba dengan mengincisi bagian abdomen.