

**PENGARUH PEMBERIAN TEPUNG DAUN MENKUDU
(*Morinda citrifolia L*) TERHADAP PROFIL PROTEIN DAN
GAMBARAN HISTOPATOLOGI BRONKUS
PADA AYAM BROILER YANG
DIINFEKSI *E.coli***

SKRIPSI



**MINCA
105130101111052**

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

**PENGARUH PEMBERIAN TEPUNG DAUN MENGGUDU
(*Morinda citrifolia L*) TERHADAP PROFIL PROTEIN DAN
GAMBARAN HISTOPATOLOGI BRONKUS
PADA AYAM BROILER YANG
DIINFEKSI *E.coli***

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh
gelar Sarjana Kedokteran Hewan



**MINCA
105130101111052**

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

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**PENGARUH PEMBERIAN TEPUNG DAUN MENKUDU (*Morinda citrifolia L*)
TERHADAP PROFIL PROTEIN DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI
BRONKUS PADA AYAM BROILER YANG DIINFEKSI *E.coli***

**Oleh:
Minca
105130101111052**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 05 Januari 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Dosen Pembimbing I

Dosen Pembimbing II

Dr. Ir. Edhy Sudjarwo, MS.
NIP. 19570629 198403 1 001

Drh. Dyah Ayu Oktavianie A.P, M.Biotech
NIP. 19841026 200812 2 004

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

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

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Minca
NIM : 105130101111052
Program Studi : Kedokteran Hewan.
Penulis Skripsi berjudul:

PENGARUH PEMBERIAN TEPUNG DAUN MENGGUDU (*Morinda citrifolia L*)
TERHADAP PROFIL PROTEIN DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI BRONKUS
PADA AYAM BROILER YANG DIINFEKSI *E.coli*

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila 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, 05 Januari 2018
Yang menyatakan,

Minca
NIM.105130101111052

**PENGARUH PEMBERIAN TEPUNG DAUN MENKUDU (*Morinda citrifolia L*)
TERHADAP PROFIL PROTEIN DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI
BRONKUS PADA AYAM BROILER YANG DIINFEKSI *E.coli***

ABSTRAK

Infeksi *Escherichia coli* atau koliseptikemia dapat terjadi pada ayam pedaging dan petelur dari semua kelompok umur. Bakteri *E.coli* berkembang sebagai agen penyakit sekunder yang sering mengikuti penyakit lain, misalnya pada berbagai penyakit pernafasan dan pencernaan yang menyerang ayam. Daun mengkudu (*Morinda citrifolia L.*) mengandung senyawa kimia diantaranya *antraquinone*, alkaloid, saponin, flavanoid, dan terpenoid yang berperan sebagai antibakteri. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pemberian tepung daun mengkudu (*Morinda citrifolia L*) terhadap profil protein dan gambaran histopatologi bronkus ayam broiler yang diinfeksi *E. coli*. Rancangan penelitian bersifat eksperimental menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap). Penelitian ini menggunakan ayam broiler dengan umur 21 hari yang dibagi menjadi 5 kelompok yaitu: kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan masing-masing diberikan infeksi *E.coli* dengan dosis 0,5 mL (10^8 CFU/mL) pada umur 21 hari. Dosis terapi tepung daun mengkudu diberikan selama 14 hari pada masing-masing perlakuan yaitu: 3,25 mg/kg, 6,5 mg/kg, dan 9,75 mg/kg yang diberikan pada umur 22 hari. Hasil pemberian tepung daun mengkudu (*Morinda citrifolia L.*) pada profil protein menunjukkan dosis 6,5 mg dan 9,75 mg yang tidak tersintesis protein 23 kDa pada bronkus. Protein berat molekul 23 kDa merupakan jenis protein *C-Reactive Protein* (CRP) yang merupakan marker inflamasi dan pada gambaran histopatologi bronkus ayam broiler tidak terjadi perubahan.

Kata kunci: *E. coli*, profil protein bronkus, histopatologi bronkus, tepung daun mengkudu

**THE EFFECT OF NONI LEAF FLOUR (*Morinda citrifolia* L) THERAPHY
on BRONCHUS PROTEIN PROFILE and BRONCHUS HISTOPATOLOGY
INFECTED by *E.coli* on BROILER CHICKEN**

ABSTRACT

Infections *Escherichia coli* or kolisepticemia can occur in broilers and layers of all age groups. *E. coli* develop as secondary disease agents that often follow other diseases, for example in various respiratory and digestive diseases that attack chickens. Leaves mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) contains chemical compounds such as antraquinone, alkaloids, saponins, flavonoids, and terpenoids that act as antibacterial. The purpose of this research is to know the effect of giving of noni leaf starch (*Morinda citrifolia* L.) to protein profile and histopathology picture of broiler broiler infected by *E. coli*. Experimental research design using Completely Randomized Design. This study used broiler chickens with age 21 days divided into 5 groups, namely: negative control group, positive control group and treatment group were each given *E.coli* infection with dose of 0.5 mL (10^8 CFU / mL) at 21 days . The dose of non-leaf non-starch therapy was given for 14 days in each treatment, namely: 3.25 mg / kg, 6.5 mg / kg, and 9.75 mg / kg given at 22 days. The results of noni-leaf flour (*Morinda citrifolia* L.) on protein profiles showed 6.5 mg and 9.75 mg doses of 23 kDa protein un synthesized in bronchi. 23 kDa molecular weight protein is a type of protein C-Reactive Protein (CRP) which is an inflammatory marker and the histopathologic features of broiler bronchus did not change.

Kata kunci: *E. coli*, bronchial protein profile, bronchial histopathology, noni leaf flour

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan Yesus yang melimpahkan segala berkat dan pertolonganNya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan proposal skripsi yang berjudul **“PENGARUH PEMBERIAN TEPUNG DAUN MENGKUDU (*Morinda citrifolia* L) TERHADAP PROFIL PROTEIN DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI BRONKUS PADA AYAM BROILER YANG DIINFEKSI *E.coli*.** Penelitian ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan pada Fakultas Kedokteran Hewan, Program Studi Pendidikan Dokter Hewan, Universitas Brawijaya.

Dengan penuh rasa hormat dan ketulusan hati, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Ir. Edhy Sudjarwo, MS dan drh. Dyah Ayu Oktavianie A.P., M.Biotech sebagai Pembimbing atas segala bantuan, bimbingan, kesabaran, nasihat, waktu, dan arahan yang diberikan tiada hentinya kepada penulis.
2. drh. M. Arfan Lesmana, M.Sc dan drh. Aldila Noviatry, M.Biomed sebagai Penguji atas segala kritik, bimbingan, kesabaran, nasihat, arahan dan waktu yang telah diberikan kepada penulis.
3. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES, selaku dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya atas kepemimpinan dan fasilitas yang telah diberikan.
4. Seluruh staf serta asisten *Teaching Farm* Universitas Islam Malang (UNISMA), Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan dan Laboratorium Sentra Ilmu Hayati Universitas Brawijaya.
5. Keluarga tercinta yang begitu sabar menyayangi dan mencintai serta doa yang tidak putus untuk penulis.
6. Tim Penelitian "*Morinda citrifolia linn.*" khususnya Dwijo Kuncoro Putra, Ella Ayuningtyas, Irmalia Ratnasari, Vincentius Prasetyo atas kerjasama selama penelitian.
7. Untuk Almira, Putri Dewi, Rizky, Dimas, Sakti, Tenty, Rossa, Ella dan Ninoek terima kasih buat suka, duka, tawa dan canda yang telah dihabiskan bersama-sama.
8. Mas jun yang mau diributkan dalam hal mencetak.
9. Ce Meyen dan Yuda buat doa dan dukungannya selalu.
10. Untuk Elsa, Ardhi, Tyan dan Tika terima kasih dalam perdagelan dalam rakyat Indonesia.
11. Untuk CG AOG 13 yang selalu memberikan tawa dan canda dalam hidup ini. Love u guys.
12. Seluruh sahabat kelas B dan angkatan 2010 FKH atas segala perhatian, dorongan, dukungan dan doa yang telah diberikan.

Akhir kata, penulis berharap semoga Tuhan Yesus membalas segala kebaikan serta ketulusan yang telah diberikan. Semoga Tugas Akhir ini dapat memberikan manfaat dan menambah ilmu pengetahuan bukan hanya untuk penulis namun untuk pembaca yang lain.

Malang, 05 Januari 2018

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
LEMBAR PERNYATAAN	iv
ABSTRAK.....	v
ABSTARCT.....	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR SINGKATAN	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Batasan Masalah.....	4
1.4 Tujuan	5
1.5 Manfaat	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 <i>Escherichia coli</i>	7
2.1.1 Taksonomi bakteri.....	7
2.1.2 Morfologi dan Sifat karakteristik <i>E.coli</i>	7
2.1.3 Patogenesis	8
2.2 Mengkudu (<i>Morinda citrifolia L</i>)	9
2.2.1 Manfaat Daun Mengkudu Terhadap Infeksi Bakteri <i>E.coli</i>	13
2.3. Hewan Coba Ayam <i>Broiler (Gallus sp.)</i>	13
2.3.1 Respirasi Unggas.....	15
2.4 Histologi Bronkus	16
2.5 SDS-PAGE (<i>Sodium Deodecyl Sulphate Poly-acrylamide Gel</i>)	17

2.6 Profil Pita Protein	19
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	20
3.1 Kerangka Konseptual	20
3.2 Hipotesis Penelitian	22
BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN.....	23
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	23
4.2 Rancangan Penelitian	23
4.3 Sampel Penelitian.....	24
4.4 Karakteristik Sampel Penelitian.....	24
4.4.1 Kriteria inklusi	24
4.4.2 Karakteristik Eksekusi.....	25
4.5 Variabel Penelitian.....	25
4.6 Alat dan Bahan.....	25
4.6.1 Alat.....	25
4.6.2 Bahan	26
4.7 Prosedur penelitian.....	26
4.7.1 Pembagian Kelompok Ayam.....	26
4.7.2 Kandang Coba.....	27
4.7.3 Adaptasi Hewan Coba.....	27
4.7.4 Infeksi <i>E.coli</i>	28
4.7.5 4.7.4.1 Penghitungan Bakteri dengan Spektrofotometri.....	28
4.7.6 Pembuatan Tepung daun mengkudu	29
4.7.7 Pengambilan Organ Bronkus	30
4.7.7 Pembuatan Preparat Histopatologi	30
4.7.8 Elektroforesis SDS-PAGE.....	30
4.7.8.1 Isolasi Protein.....	30
4.7.8.2 Persiapan Gel	31
4.7.8.3 Injeksi Sampel dan <i>Running</i>	32
4.7.8.4 Perlakuan Setelah <i>Running</i>	32
4.7.8.5 Penentuan Berat Molekul.....	32
4.7.9 Analisis Data	33

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN.....	34
5.1 Pengaruh Pemberian Tepung Daun Mengkudu (<i>Morinda citrifolia</i> L.) Terhadap Profil Protein	34
5.2 Pengaruh Pemberian Tepung Daun Mengkudu (<i>Morinda citrifolia</i> L.) Terhadap Gambaran Histopatologi Bronkus Ayam Broiler yang Diinfeksi <i>E.coli</i>	38
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN.....	44
6.1 Kesimpulan	44
6.2 Saran	44
DAFTAR PUSTAKA	45
LAMPIRAN.....	48



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1.1 Struktur Histologi Bronkus.....	17
Gambar 3.1 Kerangka Konseptual.....	20
Gambar 5.1 Profil Pita Protein Bronkus Ayam Broiler dengan Teknik SDS-Page	34
Gambar 5.2 Gambaran Histopatologi Bronkus dengan Pewarnaan HE.....	39
Gambar 12.1 Kurva Marker Protein	65



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Rancangan Penelitian	23
Tabel 5.1 Perbedaan Berat Molekul (BM) Protein Pada Bronkus	35
Tabel 12.1 Perhitungan Nilai Rf.....	64





DAFTAR SINGKATAN

Simbol/Singkatan	Keterangan
µm	mikrometer
µL	mikroliter
APEC	<i>Avian Pathogenic Eschericia coli</i>
CB2	<i>canabinoid</i> type 2
CFU	Colony Forming Unit
cm	centimeter
CO ₂	Karbondioksida
DOC	<i>Day Old Chicken</i>
<i>E.coli</i>	<i>Eschericia coli</i>
Hb	Hemoglobin
HE	Hematoxilin Eosin
IL-4	<i>interleukin-4</i>
IL-1β	<i>interleukin1</i> beta
IL-10	<i>interleukin-10</i>
IL-12	<i>interleukin-12</i>
IFN-γ	Interferon gamma
m	meter
mg	miligram
O ₂	oksigen
PO	peroral
RAL	Rancangan Acak Lengkap
SDS-Page	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide gel electrophoresis
TNF-α	Tumor Necrosis Factor alfa
TDM	Tepung Daun Mengkudu

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Sertifikat Laik Etik.....	48
Lampiran 2. Determinasi Tanaman Mengkudu	49
Lampiran 3. Perhitungan Dosis Terapi Tepung Daun Mengkudu	50
Lampiran 4. KerangkaOperasional.....	51
Lampiran 5. Pembuatan Media Agar Pertumbuhan <i>E.coli</i>	52
Lampiran 6. Langkah-Langkah PembuatanTepung Daun Mengkudu	55
Lampiran 7. Komposisi Larutan.....	56
Lampiran 8. Pembuatan Preparat Bronkus.....	58
Lampiran 9. Pewarnaan Hematoksilin Eosin	60
Lampiran 10. Profil Protein dengan Teknik SDS-Page	61
Lampiran 11. Penentuan Berat Molekul	63
Lampiran 12. Perhitungan Berat Molekul Bronkus	64

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Industri peternakan ayam pedaging menghadapi tantangan yang besar dalam upaya memenuhi besarnya permintaan pasar. Namun dalam perkembangan industri peternakan ayam pedaging, penyakit pada ayam pedaging menjadi tantangan dalam upaya produksi daging. Salah satu penyakit pada ayam pedaging adalah kolibasilosis yang disebabkan oleh *E.coli*. Bakteri *Escherichia coli* merupakan salah satu dari keluarga *Enterobacteriaceae* dan penghuni normal saluran pencernaan unggas. Adanya *Escherichia coli* dalam air minum merupakan indikasi adanya pencemaran oleh feses. Dalam saluran pencernaan ayam normal terdapat 10-15% bakteri *Escherichia coli* patogen dari keseluruhan *Escherichia coli* (Barness dan Gross, 1997). Dalam individu yang sama, *Escherichia coli* dalam usus tidak selalu sama dengan yang diisolasi dari jaringan lain (Tabbu, 2000). Jumlah *E.coli* dari setiap gram feses sebanyak 10^6 - 10^9 koloni (Schroeder *et al.* 2004) dan sering dikaitkan sebagai infeksi sekunder yang memperburuk kondisi inang setelah adanya infeksi primer oleh agen penyakit lain. Infeksi *Escherichia coli* atau koliseptikemia ini dapat terjadi pada ayam pedaging dan petelur dari semua kelompok umur, serta unggas lainnya seperti kalkun dan itik (Charlton *et al.*, 2000). Kolibasilosis pada unggas umumnya disebabkan oleh *avian pathogenic E.coli* (APEC), APEC didominasi tiga serogroup, yaitu O1, O2 dan O78 (Melatta *et al.*, 2003).

Tanda klinis kolibasilosis tidak spesifik dan dipengaruhi oleh umur ayam, lama infeksi, organ yang terserang dan adanya penyakit lain bersamanya. Pada

ayam pedaging umur 4-8 minggu dan ayam petelur umur ± 20 minggu dapat terjadi septicemia akut dan menimbulkan kematian yang didahului dengan hilangnya nafsu makan, malas bergerak/inaktif dan mengantuk (Lee dan Lawrence, 1998). *E.coli* mampu menyebar melalui peredaran darah sehingga dapat menyebabkan kerusakan pada berbagai organ, seperti perihepatitis, pericarditis, airsakulitis, mesenteritis, ooforitis, salpingitis, arthritis, panophthalmitis dan koligranuloma (Tabbu, 2000). Kolibasilosis memiliki peran penting pada perekonomian di industri perunggasan karena menimbulkan gangguan pertumbuhan, penurunan produksi, peningkatan jumlah ayam yang diafkir, penurunan kualitas karkas dan telur serta kualitas anak ayam (DOC). Di samping itu, adanya infeksi *Escherichia coli* menjadi faktor pendukung timbulnya penyakit kompleks pada saluran pernafasan, pencernaan atau reproduksi yang sulit ditanggulangi (Tabbu, 2000).

Penularan kolibasilosis biasanya terjadi secara oral melalui pakan, air minum atau debu dan kotoran yang tercemar *Escherichia coli*. Telah dilaporkan bahwa di Indonesia penyakit ini ditemukan pada ayam pedaging maupun petelur di berbagai daerah. Berbagai usaha untuk mengatasi kolibasilosis telah banyak dilakukan khususnya dengan menggunakan antibiotik seperti gentamisin, kolistin, kloramfenikol, streptomisin, doksisisiklin dan lain-lain. Pemberian antibiotik yang tidak tepat dapat menyebabkan resistensi bakteri terhadap antibiotik tersebut (Setiabudy, 2007).

Beberapa tahun terakhir semakin marak penggunaan tanaman obat sebagai salah satu alternatif tanpa residu yang berkhasiat menyembuhkan berbagai

macam penyakit dengan harga jauh lebih murah dan mudah diperoleh (Abbas, 2004). Salah satu tanaman obat yang memiliki khasiat pengobatan adalah daun mengkudu (*Morinda citrifolia L.*). Daun mengkudu memiliki kandungan *alizarin*, *glikosida*, *scopoletine*, *acubin*, *L. asperuloside*, *flavonoid*, *antraquinon*, asam amino, senyawa *fenolik*, dan asam ursulat. Kandungan *alkaloid*, *fenol*, *glikosida*, dan *antraquinone* ini merupakan suatu zat aktif yang bersifat antimikrobia, antibakteri dan antiinflamasi (Alfred, 2012). Antrakuinon terbukti dapat menekan pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus morganii*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* dan *E. coli* (Waha, 2000).

Dengan adanya infeksi *E.coli* dalam tubuh maka senyawa antibakteri yang terdapat dalam daun mengkudu akan mengeluarkan mekanisme penghambatan pertumbuhan bakteri *E.coli* dengan cara mengganggu pembentukan dinding sel dengan adanya akumulasi komponen lipofilat yang terdapat pada dinding atau membran sel akan menyebabkan perubahan komposisi penyusunan dinding sel, menghambat fungsi membran sel dengan cara merusak permeabilitas membran. Akibatnya terjadi kebocoran materi intraseluler, seperti senyawa phenol yang dapat mengakibatkan lisis sel dan denaturasi protein (Jawetz *et al*, 2005). Jika terjadi denaturasi protein dalam tubuh maka tubuh akan kehilangan fungsi dalam pertumbuhan dan pemeliharaan jaringan, menggantikan sel-sel yang telah mati atau terpakai dan sebagai mekanisme pertahanan tubuh melawan berbagai mikroba dan zat toksik lainnya yang datang dari luar kemudian masuk dalam tubuh.

Oleh karena itu, maka dilakukan penelitian tentang tepung daun mengkudu sebagai antibakteri terhadap pertumbuhan *E. coli* berdasarkan profil protein dan gambaran histopatologi bronkus dari ayam broiler pasca infeksi *E. coli*. Penelitian ini diharapkan bermanfaat untuk memberikan informasi kepada masyarakat, serta sebagai penelitian pendahuluan dan dapat memanfaatkan daun mengkudu (*Morinda. Citrifolia L*) sebagai pengobatan alternatif pada ayam yang terinfeksi *E.coli*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian diatas dapat dirumuskan suatu permasalahan sebagai berikut :

1. Bagaimana pengaruh pemberian tepung daun mengkudu (*Morinda citrifolia L*) sebagai antibakteri terhadap profil protein bronkus ayam broiler yang diinfeksi *E.coli*?
2. Bagaimana pengaruh pemberian tepung daun mengkudu (*Morinda citrifolia L*) sebagai antibakteri terhadap gambaran histopatologi bronkus ayam broiler yang diinfeksi *E.coli*?

1.3 Batasan Masalah

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

1. Hewan coba yang digunakan yaitu ayam *broiler* sejumlah 20 ekor, umur 21 hari dengan berat rata-rata 900-1000 gram, dan dinyatakan sehat dengan memperhatikan ciri fisik, nafsu makan normal, bulu mengkilat,

serta aktif yang didapatkan dari Wonokoyo Group, Batu-Malang Jawa Timur. Penggunaan hewan coba dalam penelitian ini telah disetujui laik etik no. 565-KEP-UB oleh Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya.

2. Tepung daun mengkudu (*Morinda Citrifolia L*) yang digunakan pada penelitian ini adalah daun mengkudu dalam sediaan simplisia, di dapatkan dari UPT Materia Medica Jalan Lahor no.87 Kota Batu, Jawa Timur yang sudah dideterminasi spesies dan kandungan bahan aktifnya.
3. Pemberian infeksi bakteri *Escherichia coli* diberikan per oral (PO) pada ayam *broiler* umur \pm 21 hari sebesar 0,5mL/ekor dengan konsentrasi 10^8 CFU/mL (Wientarsih dkk, 2013).
4. Terapi tepung daun mengkudu (*Morinda citrifolia L*) diberikan saat ayam berumur 22 hari setelah ayam diberikan infeksi *E. coli* patogen pada umur ke 21 hari. Terapi tepung daun mengkudu (*Morinda citrifolia L*) diberikan dengan dosis 3,25 mg, 6,5 mg dan 9,75 mg yang diberikan secara per oral (PO) berdasarkan kelompok perlakuan (Wardiny dkk, 2012)
5. Parameter yang diukur adalah profil protein bronkus ayam broiler yang diamati dengan SDS-Page dan gambaran histopatologi bronkus ayam broiler dengan pewarnaan HE yang diamati secara mikroskopis.

1.4 Tujuan

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan :

1. Untuk mengetahui pengaruh pemberian tepung daun mengkudu (*Morinda citrifolia L*) terhadap profil protein bronkus yang diinfeksi *E. coli*.

2. Untuk mengetahui pengaruh pemberian tepung daun mengkudu (*Morinda citrifolia L*) terhadap gambaran histopatologi bronkus yang diinfeksi *E.coli*.

1.5 Manfaat

Manfaat dari hasil penelitian ini adalah sebagai kajian ilmiah mengenai pemanfaatan tepung daun mengkudu (*Morinda citrifolia L*) sebagai antibakteri terhadap *E. coli*.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Escherichia coli*

2.1.1 Taksonomi bakteri

Escherichia coli (*E.coli*) merupakan bakteri Gram negatif berbentuk batang tidak berspora, dan bersifat anaerob. *E. coli* membentuk koloni yang bundar, cembung, dan halus dengan tepi yang nyata, serta memiliki motilitas yang tinggi.

Klasifikasi ilmiah :

Kingdom	: Prokaryotae
Divisi	: Gracilicutes
Klass	: Scotobacteria
Ordo	: Eubacteriales
Famili	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Escherichia</i>
Spesies	: <i>Escherichia coli</i> (Jawetz <i>et al.</i> , 2001).

2.1.2 Morfologi dan Sifat karakteristik *E.coli*

Bakteri *Escherichia coli* merupakan salah satu dari keluarga *Enterobacteriaceae* dan biasa ditemukan di saluran pencernaan manusia dan hewan berdarah panas. Jumlah *E. coli* dari setiap gram feses adalah sebanyak 10^6 - 10^9 koloni (Schroeder *et al.*, 2004). Keluarga dari *Enterobacteriaceae* ini ada yang bersifat pathogen seperti *Salmonella spp.*, *Yersinia spp.*, dan *Shigella spp.*, sedangkan yang bersifat komensal selain *Escherichia* adalah *Klebsiella*, *Proteus* dan *Citrobacter* (Whagela, 2004).

Escherichia coli adalah bakteri gram negatif, tidak membentuk spora, berbentuk batang dengan dimensi ukuran 1,1-1,5 μ m x 2,0-6,0 μ m, bersifat motil atau tidak motil dengan flagella serta tumbuh dengan atau tanpa oksigen (Bell dan Kyriakides, 2002). Menurut Mead (2007), bakteri ini biasanya dikaitkan sebagai bakteri indikator dari kualitas mikrobiologi pangan yang dihubungkan dengan adanya bakteri patogen lainnya. Selain itu, kemampuan *E.coli* dalam membuat dan menyebarkan sifat resistensinya ke bakteri pathogen (Martin et al., 2005).

Janben *et al.* (2001), mengelompokkan *Escherichia coli* patogenik sesuai dengan gejala klinis yang ditimbulkan antara lain: *Escherichia coli* penyebab diare, *Escherichia coli* penyebab septisemia dan *Avian Pathogenic Escherichia coli* (APEC). Beberapa faktor virulensi yang terdapat pada *Escherichia coli* galur APEC diantaranya: *FimC (fimbriae tipe1)*, *iucD*, *protein tsh*, *hlyE* dan *stx2f*. Galur APEC merupakan galur yang berhubungan dengan lesi-lesi karakteristik penyakit kolibasilosis pada ayam. Stehling *et al.* (2003), menambahkan bahwa sebagian besar galur APEC termasuk dalam serotipe O₇₈ dan mempunyai kemampuan untuk mengekspresi beberapa faktor virulensi diantaranya adalah *adhesin* yang berperan dalam perlekatan pada saluran pernafasan ayam.

2.1.3 Patogenesis

Kolibasilosis adalah penyakit infeksius pada unggas yang disebabkan oleh bakteri *E.coli* patogen sebagai agen primer ataupun sekunder. Infeksi *E.coli* dapat terjadi pada ayam dari semua kelompok umur (Charlton *et al.*, 2000). Faktor virulensi *E.coli* dipengaruhi oleh ketahanannya terhadap fagositosis, kemampuan perlekatan terhadap epitel sel pernapasan dan ketahanannya terhadap serum *E.coli*

patogen yang mempunyai struktur dinding yang disebut “pili”. (Tabbu, 2000). Pili dalam *E.coli* patogen ini mempunyai peran dalam kolonisasi.

Beberapa faktor pendukung timbulnya penyakit pernafasan antara lain: iklim, letak geografis peternakan, aspek manajemen, kualitas DOC, kualitas pakan/air dan sistem pencegahan penyakit. Kejadian penyakit pernafasan cenderung meningkat selama curah hujan tinggi, kemarau panjang maupun pada saat peralihan musim dari kemarau ke musim hujan atau sebaliknya. Faktor penting dalam patogenesis dari infeksi yang bersifat kompleks adalah waktu kontak dengan agen infeksius (menular). Pada umumnya, infeksi virus dan mikoplasma terjadi dalam waktu yang berdekatan untuk mendapatkan efek yang sinergistik.

Tiga serotipe *E.coli* yaitu O1:K1,O2:K1 dan O78:K80 merupakan serotipe yang sering ditemukan pada isolasi wabah kolibasilosis pada ayam dan merupakan serotipe yang banyak menimbulkan koliseptikemia. Artinya *E.coli* masuk dalam sirkulasi darah ayam, menginfeksi berbagai jaringan melalui luka usus atau saluran pernapasannya. (Charlton *et al.*, 2000)

2.2 Mengkudu (*Morinda citrifolia L*)

Mengkudu (*Morinda citrifolia L.*) atau yang disebut pace maupun noni merupakan tumbuhan asli Indonesia yang sudah dikenal lama oleh penduduk di Indonesia. Pemanfaatannya lebih banyak diperkenalkan oleh masyarakat jawa yang selalu memanfaatkan tanaman atau tumbuhan herbal untuk mengobati

beberapa penyakit (Djauhariya, 2003). Klasifikasi mengkudu adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae (tumbuhan)
Subkingdom	: Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
Sub Divisi	: Spermatophyta (Menghasilkan biji)
Divisi	: Magnaliophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas	: Magnoliopsida (berkeping dua/dikotil)
Sub Kelas	: Asteridae
Ordo	: Rubiales
Famili	: Rubiaceae (suku kopi-kopian)
Genus	: <i>Morinda</i>
Spesies	: <i>Morinda citrifolia</i> L.

Mengkudu memiliki banyak zat aktif yang sangat berkhasiat dalam mencegah dan mengatasi berbagai penyakit. Berikut adalah kandungan senyawa yang terdapat dalam mengkudu:

a. Senyawa Terpenoid

Senyawa terpenoid adalah senyawa hidrokarbon isometrik yang terdapat pada lemak atau minyak esensial (*essential oil*). Zat-zat terpenoid membantu tubuh dalam proses sintesa organik dan pemulihan sel-sel tubuh. Zat terpenoid juga diketahui memiliki fungsi dalam terapi pada infeksi jamur dan bakteri (Alfred, 2012).

b. Zat Anti-bakteri

Acubin, *Asperuloside*, *Alizarin* dan beberapa zat *Antraquinone* telah terbukti sebagai zat anti bakteri. Zat-zat yang terdapat di dalam daun mengkudu ini dapat melawan golongan bakteri infeksi: *Pseudomonasaeruginosa*,

Proteusmorganii, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli* (Waha, 2000; Winarti, 2005).

Zat anti-bakteri dalam daun mengkudu dapat mengontrol dua golongan bakteri yang patogen, diantaranya *Salmonella* dan *Shigella*. Pada kandungan dari sari buah mengkudu terhadap zat anti bakteri memiliki peran dalam merawat penyakit infeksi kulit, pilek, demam dan berbagai masalah kesehatan yang disebabkan oleh bakteri (Winarti, 2005).

Zat *antraquinone* merupakan salah satu produk metabolisme sekunder dari tanaman mengkudu, merupakan golongan kuinon fenolik yang dalam biosintesisnya berasal dari turunan fenol dan dapat bersifat sebagai antibakteri. Metabolit ini tidak hanya terakumulasi pada buah saja, tetapi juga pada daun. Senyawa *antraquinone* pada mengkudu diketahui mampu melawan beberapa jenis bakteri seperti *Staphylococcus*, *Bacillus subtilis*, dan *E.coli* (Ariningsih, dkk., 2003). *Antraquinone* diketahui berperan sebagai antibiotik yang bersifat bakteristatik. Peran bakteristatik *antraquinone* dengan cara mempengaruhi sintesis protein sel bakteri, sehingga memiliki mekanisme kerja sebagai antibakteri mirip dengan sifat-sifat fenol, yaitu menghambat bakteri dengan cara mendenaturasi protein yang terdapat pada dinding sel bakteri (Rahayu, 2006).

c. Beberapa Jenis Asam

Asam askorbat pada buah mengkudu adalah sumber vitamin C yang merupakan salah satu antioksidan dalam menetralkan radikal bebas. Asam kaproat, asam kaprilat dan asam kaprik termasuk golongan asam lemak. Asam

kaproat dan asam kaprik inilah yang menyebabkan bau busuk yang tajam pada buah mengkudu (Winarti, 2005).

d. *Scopoletinee*

scopoletinee ini mempunyai khasiat pengobatan dan zat-zat yang terdapat dalam buah mengkudu dapat mengikat serotonin, salah satu zat kimiawi penting di dalam tubuh manusia (Waha 2000).

Scopoletinee berfungsi memperlebar saluran pembuluh darah yang mengalami penyempitan dan melancarkan peredaran darah. Selain itu *scopoletinee* juga dapat membunuh beberapa tipe bakteri, bersifat fungisida (pembunuh jamur) terhadap *Pythium sp.* serta bersifat anti-peradangan dan anti-alergi (Nuryati, 2003).

e. *Xeronine dan Proxeronine*

Salah satu alkaloid penting yang terdapat dalam buah mengkudu adalah *xeronine*. *Xeronine* dihasilkan juga oleh tubuh manusia dalam jumlah terbatas yang berfungsi untuk mengaktifkan enzim-enzim dan mengatur fungsi protein di dalam sel. Walaupun buah mengkudu hanya mengandung sedikit *xeronine*, tetapi mengandung bahan-bahan pembentuk (prekursor), yaitu *proxeronine* dalam jumlah besar (Alfred, 2012).

Proxeronine adalah sejenis asam koloid yang tidak mengandung gula, asam amino atau asam nukleat seperti koloid-koloid lainnya dengan bobot molekul relatif besar lebih dari 16.000. Fungsi utama *xeronine* adalah mengatur bentuk protein-protein spesifik yang terdapat di dalam sel (Nuryati, 2003).

2.2.1 Manfaat Daun Mengkudu Terhadap Infeksi Bakteri *E.coli*

Kemampuan daun mengkudu dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E.coli* melalui zat *antraquinone* sebagai antibakteri. Zat *antraquinone* yang terdapat dalam daun mengkudu sebagai antibakteri mirip dengan sifat-sifat fenol, yaitu menghambat bakteri dengan cara mendenaturasi protein. Sedangkan alkaloid memiliki kemampuan sebagai antibakteri. Pertumbuhan *E. coli* akan terhambat akibat lapisan dinding sel yang tidak terbentuk secara utuh sehingga menyebabkan kematian sel (Kameswari, dkk., 2013).

Daun mengkudu diketahui meningkatkan sistem imun dengan mengaktifasi *canabinoid* (CB2) reseptor, menekan produksi sitokin IL-4 dan meningkatkan produksi IFN- γ yang diikuti oleh aktivasi makrofag. Polisakarida dalam daun mengkudu memiliki kemampuan menghambat TNF- α dan juga bersifat antioksidan. yang menstimulasi pelepasan beberapa mediator respon imun, seperti TNF α , IL-1 β , IL-10, IL-12, *interferon-gamma* (IFN-gamma) dan mensupresi pengeluaran IL-4. IL-4 merupakan regulator negatif dalam trombositopoiesis sehingga supresi dapat meningkatkan jumlah trombosit dalam hepar (Rachim, 2012).

2.3. Hewan Coba Ayam *Broiler* (*Gallus sp.*)

Ayam *broiler* merupakan jenis ayam dari hasil rekayasa genetik yang banyak digunakan karena memiliki keunggulan dibandingkan dengan jenis ayam petelur. Ayam *broiler* memiliki masa pertumbuhan yang lebih cepat serta peningkatan berat badan lebih cepat dibandingkan ayam petelur. Ayam *broiler*

juga diketahui memiliki sensitivitas yang lebih tinggi terhadap rasa sakit dibandingkan dengan jenis ayam lainnya (Eriksson, *et al.*, 2008).

Ayam *broiler* (*Gallus sp.*) secara genetik memiliki kemampuan tumbuh lebih cepat daripada spesies ayam yang lain. *Broiler* lebih mengkonversikan pakan menjadi daging, sehingga dapat dipanen sebagai penghasil daging dalam waktu yang pendek yaitu umur 6-10 minggu sehingga belum banyak mengalami penimbunan (AAK,2003). Ayam *broiler* dipilih sebagai hewan percobaan untuk obat-obatan atau makanan yang nantinya akan digunakan atau dikonsumsi oleh manusia.

Penelitian menggunakan hewan coba ayam telah mengacu pada penelitian sebelumnya (Galuh Puspitasari, 2008) mengenai ayam broiler sebagai hewan coba. Alasan penggunaan ayam broiler sebagai hewan coba adalah ayam broiler memiliki kemampuan berkembang biak sangat tinggi sehingga mampu digunakan dalam eksperimen yang membutuhkan jumlah banyak, pertumbuhannya sangat cepat, harganya terjangkau dan mudah dipelihara .

. Ayam indukan pedaging *strain Hubbard* merupakan hasil persilangan antara ayam ras strain *New Hampshire* dan *Cornish*. Ayam indukan pedaging *strain Hubbard* memiliki ciri-ciri: bulu berwarna putih, bentuk badan padat, jengger dan pial berwarna merah, telur berwarna coklat seperti. Keunggulan ayam ini yaitu mampu menghasilkan telur yang dapat ditetaskan sebagai ayam bibit untuk pedaging (Siregar, 2003).

2.3.1 Respirasi Unggas

Alat pernafasan ayam terdiri dari tiga komponen penting yaitu saluran pernafasan (hidung, sinus hidung, trakea dan bronkus), paru-paru dan kantong udara (air sac). Pada mamalia otot diafragma berfungsi mengontrol ekspansi dan kontraksi paru-paru. Unggas tidak memiliki diafragma sehingga paru-paru tidak mengembang dan kontraksi selama ekspirasi dan inspirasi. Paru-paru hanyalah sebagai tempat berlangsungnya pertukaran gas di dalam darah (Sembiring, 2009).

Umumnya unggas memiliki sembilan kantong udara yaitu kantong udara servikalis, thorakalis kranialis, thorakalis kaudalis, abdominalis (masing-masing berpasangan) dan kantong udara klavikularis (tunggal). Kantong udara merupakan suatu rongga dengan dinding tipis dan halus, sehingga sulit dikenali dalam posisi mengempis. Tetapi jika terjadi infeksi kantong udara, biasanya mengalami penebalan dan peradangan (air sacculitis), sehingga mudah dideteksi pada waktu nekropsis (Tarmudji, 2005). Paru-paru maupun kantong udara berfungsi sebagai *cooling mechanism* (mekanisme pendinginan) bagi tubuh apabila panas tubuh dikeluarkan lewat pernapasan dalam bentuk uap air. Laju respirasi diatur oleh kandungan karbon dioksida dalam darah. Apabila kandungan karbon dioksida meningkat, maka laju pernapasan juga akan meningkat.

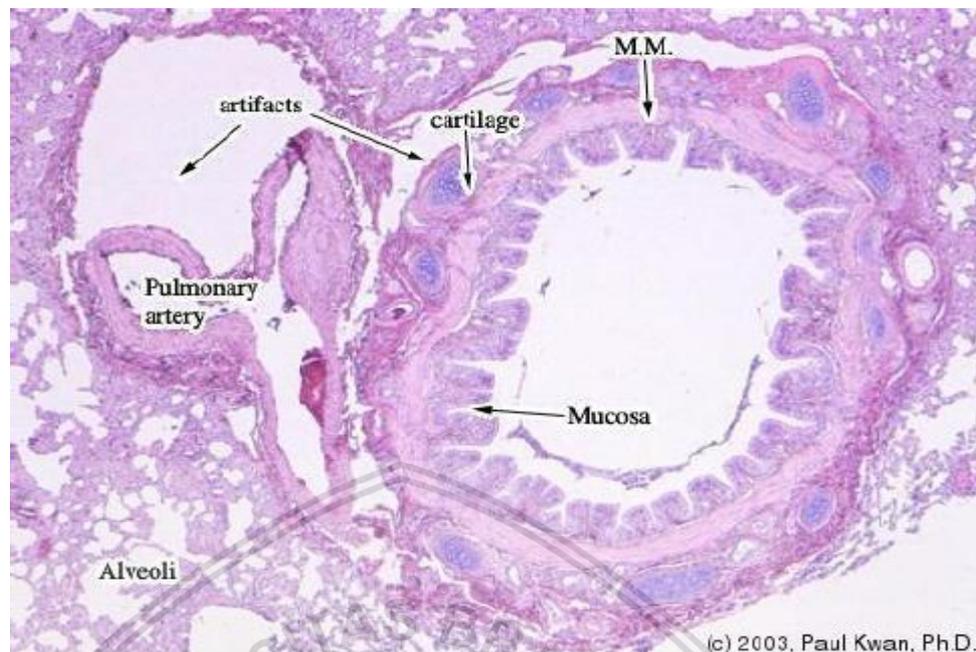
Menurut Diana, 2008 terdapat 4 fungsi utama dari sistem respirasi, yaitu:

1. Sebagai pertukaran gas antara udara dan sistem aliran darah.
2. Sebagai jalur keluar masuknya udara dari luar ke paru-paru.

3. Melindungi permukaan respirasi dari dehidrasi, perubahan temperatur, dan berbagai keadaan lingkungan yang buruk atau melindungi sistem respirasi oleh patogen.
4. Sebagai deteksi stimulus olfactory dengan adanya reseptor olfactory di superior portion pada rongga hidung.

2.4 Histologi Bronkus

Bronkus memiliki susunan struktural mukosa yang mirip dengan trakea, kecuali pada susunan tulang rawan dan otot polos. Lapisan mukosa terdiri dari lapisan sel-sel epitel silindris berlapis semu bersilia dengan lamina propria yang tipis (banyak serabut elastin). Sedangkan tulang rawan bronkus berbentuk lebih tidak teratur daripada tulang rawan trakea. Pada bagian bronkus cincin tulang rawan mengelilingi seluruh lumen. Dibagian bawah epitel, dalam lamina propria bronkus tampak lapisan otot polos yang tersusun secara menyilang.



Gambar 1.1 Struktur Histologi Bronkus (Piraksa dkk, 2017)
Keterangan : MM (otot polos)

Berkas otot polos menjadi lebih jelas terlihat di dekat bagian respirasi. Pengerutan otot yang terjadi menyebabkan mukosa bronkus terlihat berlipat-lipak pada sediaan histologi. Lamina propria banyak mengandung serat elastin dan memiliki banyak kelenjar serosa dan mukosa, dengan saluran yang bermuara ke dalam lumen bronkus. Banyak limfosit yang berada di dalam lamina propria dan di antara sel-sel epitel. Selain itu terdapat kelenjar getah bening dan banyak dijumpai di tempat percabangan bronkus (Eroschenko dan Victor, 2003).

2.5 SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Poly-acrylamide Gel*)

Salah satu metode PAGE yang umumnya digunakan untuk analisa campuran protein secara kualitatif adalah SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electroforesis*), prinsip penggunaan metode ini adalah migrasi

komponen akril amida dengan N,N' bisakrilamida. Metode ini sering digunakan untuk menentukan berat molekul suatu protein disamping untuk memonitor pemurnian protein. SDS-PAGE dilakukan terhadap protein tak larut dengan kekuatan ion rendah dan dapat menentukan apakah suatu protein termasuk monomerik atau oligomerik, menetapkan berat molekul dan jumlah rantai polipeptida sebagai subunit atau monomer (Wilson and Walker, 2000).

Komponen penting yang membentuk gel poliakrilamida adalah akrilamida, bis-akrilamida, ammonium persulfate dan TEMED (N,N,N',N' tetrametilendiamin). Akrilamida sebagai senyawa utama yang menyusun gel merupakan senyawa karsinogenik. *Ammonium persulfate* berfungsi sebagai inisiator yang mengaktifkan akrilamida agar bereaksi dengan molekul akrilamida yang lainnya membentuk rantai polimer yang panjang. TEMED berfungsi sebagai katalisator reaksi polimerisasi akrilamid menjadi gel poliakrilamid sehingga dapat digunakan dalam pemisahan protein. Bis-akrilamida berfungsi sebagai cross-linking agent dan perbandingan antara akrilamida dengan bis-akrilamida dapat diatur sesuai dengan berat molekul protein yang dipisahkan. Semakin rendah berat molekul protein yang dipisahkan, maka semakin tinggi konsentrasi akrilamida yang digunakan agar kisi-kisi yang terbentuk semakin rapat (Janson *et al.*, 2000).

Penggunaan SDS bertujuan untuk memberikan muatan negatif pada protein yang akan dianalisa. Protein yang terdenaturasi sempurna akan mengikat SDS dalam jumlah yang setara dengan berat molekul protein tersebut. Denaturasi protein dilakukan dengan merebus sampel dalam buffer yang mengandung

β -merkaptotanol (berfungsi untuk mereduksi ikatan disulfide), gliserol dan SDS (Wilson and Walker,2000).

2.6 Profil Pita Protein

Protein berasal dari Bahasa Yunani yaitu proteos, yang berarti utama atau yang di dahulukan. Kata ini diperkenalkan oleh ahli kimia Belanda, Geraldus Mulder (802-1880) yang berpendapat bahwa protein adalah zat yang paling penting dalam setiap organisme (Ellya, 2010). Protein terdapat di dalam semua sistem kehidupan dan merupakan komponen seluler utama. Protein berperan dalam menentukan bentuk dan struktur sebuah sel serta bertindak sebagai alat untuk pengenalan antar molekul dan proses katalis (Sumardjo, 2009).

Molekul protein merupakan rantai panjang tersusun oleh rantai asam-asam amino yang bergabung melalui reaksi gugusan karboksil dan membentuk ikatan peptida (Juswono *et al.*, 2013). Protein mengandung unsur-unsur yang tidak dimiliki oleh karbohidrat atau lemak, unsur tersebut diantaranya adalah karbon, hidrogen, oksigen dan nitrogen. Kandungan lain yang juga terdapat pada protein adalah fosfor, belerang, serta unsur logam seperti besi dan tembaga (Budianto, 2009). Fungsi protein dalam tubuh adalah sebagai penyusun enzim, transport dan penyimpanan, koordinasi gerak, pertahanan tubuh, pembentuk hormon, cadangan energi, dan proteksi imun (Almatsier, 2004).

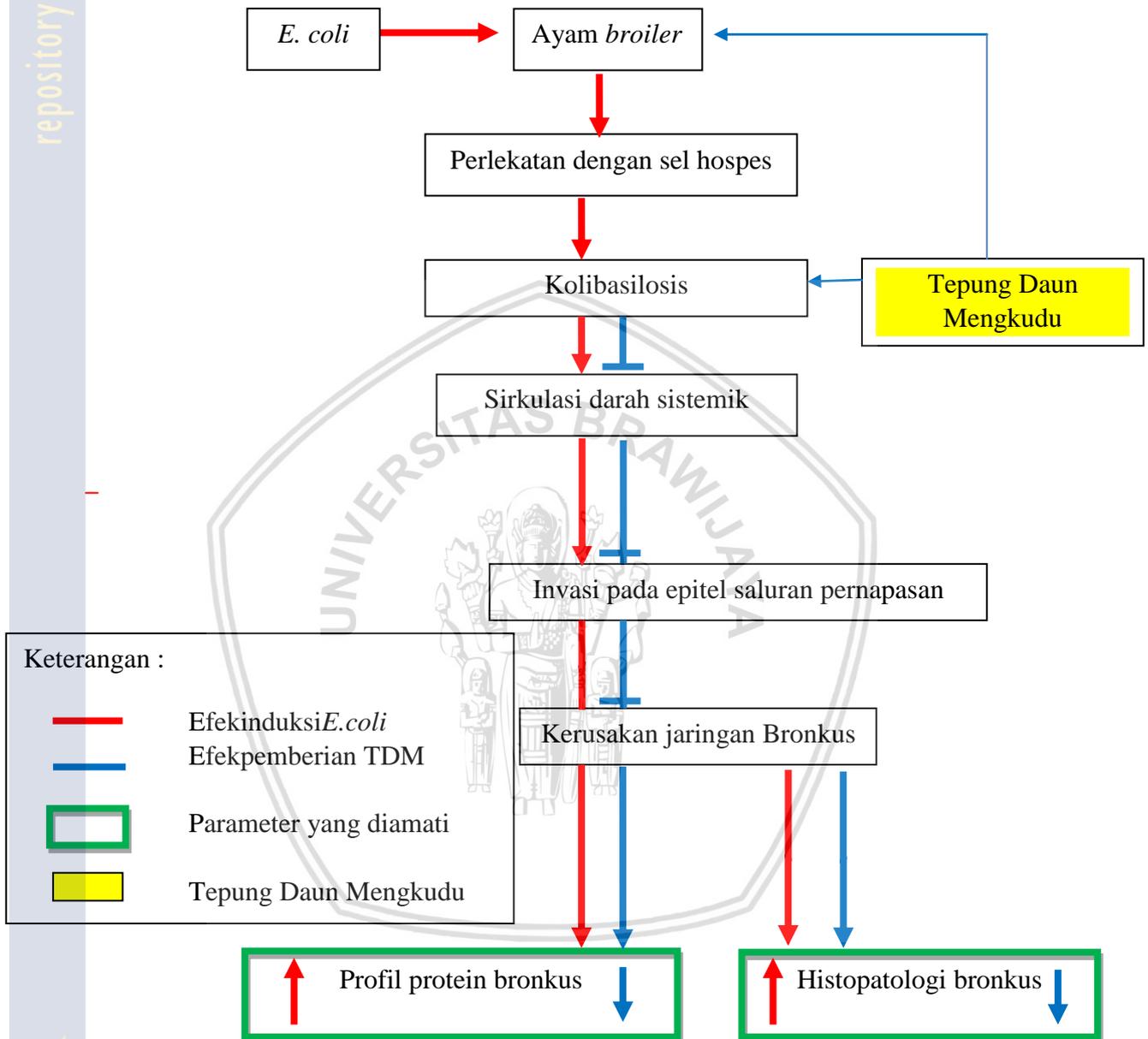
Protein merupakan molekul yang sangat besar, sehingga mudah sekali mengalami kerusakan, baik perubahan bentuk fisik maupun aktifitas biologis. Penyebab kerusakan dapat berasal dari oksidan dan spesies reaktif yang

diproduksi selama metabolisme atau respon imun tubuh dan faktor eksternal dari luar tubuh (Pickering dan Davies, 2012). *Reactive Oxygen Species* (ROS) merupakan radikal bebas yang berperan penting dalam menimbulkan stress oksidatif serta kerusakan oksidatif dengan mengubah lipid, protein, serta DNA (Finaud *et al.*, 2006). Kerusakan oksidatif pada protein menghasilkan kegagalan fungsi biologis tubuh, seperti terganggunya aktifitas enzim, transport protein, dan reseptor (Salvi *et al.*, 2001).

Molekul protein memiliki berat yang berbeda-beda berdasarkan jumlah asam amino yang menyusunnya. Berdasarkan perbedaan berat molekul ini, maka protein dapat dipisahkan satu dengan yang lainnya. Berat molekul protein dapat mengalami perubahan jika molekulnya ditarik oleh radikal bebas sehingga dapat menyebabkan perubahan pada sifat kimianya (Suryohusodo, 2000). Struktur protein juga dapat mengalami perubahan sebagai akibat dari reaksi protein dengan radikal bebas. Protein merupakan polimer yang panjang dari asam-asam amino yang bergabung melalui ikatan peptida. Ikatan peptida yang putus dapat menyebabkan perubahan struktur protein (Juswono *et al.*, 2013).

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Kerangka Konseptual

Bakteri *E.coli* yang dipaparkan ke ayam broiler akan masuk kedalam sistem pernafasan ayam melalui aliran darah dari tubuh dan debu. Bakteri *E.coli* berkembang sebagai agen penyakit sekunder yang sering mengikuti penyakit lain, misalnya pada berbagai penyakit pernafasan dan pencernaan yang menyerang ayam. Setelah udara masuk kedalam paru, udara akan masuk ke *bifurcatio* bronkus. Didalam *bifurcatio* bronkus terjadi pertukaran udara, yaitu O₂ dan CO₂, dimana udara yang masuk ke saluran pernafasan sebagian akan masuk kedalam paru dan sebagian udara lainnya masuk kedalam kantong udara. Di dalam tubuh hewan, *E.coli* ditangkap oleh radikal bebas. Radikal bebas terakumulasi di *bifurcatio* bronkus kemudian berdifusi ke dalam pembuluh darah. Radikal bebas kemudian berikatan dengan hemoglobin (Hb) darah dan diedarkan ke seluruh tubuh. Hewan yang terinfeksi *E.coli* diketahui akan mengalami penurunan jumlah eritrosit dan hemoglobin dalam darah, serta peningkatan kadar leukosit (Regar, dkk., 2014). Penurunan jumlah eritrosit dan haemoglobin dalam darah ini disebabkan karena zat toksin dari *E.coli* diketahui memiliki kemampuan untuk merusak sel-sel eritrosit dan menyebabkan terjadinya lisis pada eritrosit. Peningkatan leukosit akibat *E.coli* disebabkan oleh adanya aktivitas imun tubuh untuk melawan bakteri, yang memicu produksi leukosit untuk melawan bakteri (Wientarsih, dkk., 2013).

Menurut Kusmardi *et al.* (2006) kandungan flavonoid dan antrakuinon yang tinggi pada daun mengkudu (*Morinda citrifolia* L) dapat berperan sebagai imunostimulator dengan cara meningkatkan aktivitas dan kapasitas fagositosis sel makrofag. Flavonoid berpotensi bekerja terhadap limfokin yang dihasilkan oleh

sel T sehingga akan merangsang sel-sel fagosit untuk melakukan respon fagositosis. Radikal bebas yang berikatan dengan protein dapat menyebabkan perubahan profil pita protein jika molekulnya ditarik oleh radikal bebas sehingga dapat menyebabkan perubahan pada sifat kimianya. Struktur protein juga dapat mengalami perubahan sebagai akibat dari reaksi protein dengan radikal bebas dan dapat memicu aktivasi sitokin pro-inflamasi seperti IL-1, IL-6, dan TNF α .

Peran *antraquinone* sebagai antibakteri dengan cara mempengaruhi sintesis protein sel bakteri, yaitu menghambat bakteri dengan cara mendenaturasi protein yang terdapat pada dinding sel bakteri, dengan adanya akumulasi komponen lipolifat yang terdapat pada dinding atau membrane sel yang menyebabkan perubahan komposisi penyusunan dinding sel dan menghambat fungsi membran plasma (Rahayu, 2006).

Kerusakan jaringan bronkus akibat induksi *E.coli* menyebabkan akumulasi sel radang dan terjadinya perubahan pada pita protein bronkus dengan tersintesisnya protein marker penanda inflamasi. Terapi dengan tepung daun mengkudu dapat memperbaiki kerusakan jaringan bronkus dan marker penanda inflamasi juga tidak tersintesis.

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah ada, maka hipotesis yang dapat diajukan adalah sebagai berikut ini : terapi tepung daun mengkudu (TDM) mampu memperbaiki histopatologi bronkus dan memperbaiki profil protein pada ayam broiler yang diinfeksi *E.coli*.

BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium *Teaching Farm* Fakultas Peternakan Universitas Islam Malang (UNISMA), Laboratorium Mikrobiologi Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya, Laboratorium Sentra Ilmu Hayati Universitas Brawijaya, Malang. Penelitian dilakukan dari bulan Juli 2014 sampai September 2014.

4.2 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental dengan desain *post test only control group* menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). Rancangan penelitian ditunjukkan **Tabel 4.1**.

Tabel 4.1 Rancangan Penelitian

Kelompok	Keterangan
Kontrol negatif	Tanpa pemberian <i>E.coli</i> dan tanpa terapi TDM
Kontrol positif	Pemberian bakteri <i>E.coli</i> , tanpa terapi TDM
Terapi 1 (T1)	Pemberian bakteri <i>E.coli</i> 0,5 mL/ekor (10^8 CFU), terapi daun mengkudu (<i>Morinda citrifolia</i> L.) dengan dosis 3,25mg/ekor/hari.
Terapi 2 (T2)	Pemberian bakteri <i>E.coli</i> 0,5 mL/ekor (10^8 CFU), terapi daun mengkudu (<i>Morinda citrifolia</i> L.) dengan dosis 6,5 mg/ekor/hari.
Terapi 3 (T3)	Pemberian bakteri <i>E.coli</i> 0,5 mL/ekor (10^8 CFU), terapi daun mengkudu (<i>Morinda citrifolia</i> L.) dengan dosis 9,75 mg/ekor/hari.

4.3 Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan coba ayam *broiler* jantan strain *Hubbard* berumur 21 hari dengan berat badan 900-1000 gram yang diperoleh Wonokoyo Group, Batu-Malang Jawa Timur. Penggunaan hewan coba dalam penelitian ini telah disetujui laik etik no. 565-KEP-UB oleh Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Besar sampel dihitung dengan rumus sebagai berikut (Kusriningrum, 2008):

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

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

P : jumlah perlakuan

n : jumlah pengulangan

Berdasarkan perhitungan diatas, maka untuk 5 perlakuan diperlukan jumlah sampel atau ulangan paling sedikit 4 kali dalam setiap kelompok, sehingga total hewan coba yang digunakan sebagai sampel adalah 20 ekor ayam *broiler*.

4.4 Karakteristik Sampel Penelitian

4.4.1 Kriteria inklusi

- a. Ayam *broiler* strain *Hubbard* umur 21 hari
- b. Berat badan rata-rata ± 900 gram
- c. Jenis kelamin jantan
- d. Sehat, ditandai dengan geraknya yang aktif, warna bulu cerah dan mengkilat, nafsu makan normal.

4.4.2 Karakteristik Eksekusi

- a. Ayam *broiler* yang mati dalam perjalanan penelitian atau mengalami sakit.

4.5 Variabel Penelitian

- a) **Variabel Bebas** : Pemberian tepung daun mengkudu, injeksi *E.coli* 0,5 mL/ekor (10^8 CFU/mL)
- b) **Variabel tergantung** : Profil protein bronkus dan histopatologi bronkus
- c) **Variabel kendali** : 1. Ayam *broiler* jantan yang diperoleh dari Wonokoyo Group, Batu, yang dinyatakan sehat Dengan memperhatikan pergerakan individu yang aktif, nafsu makan baik, serta warna bulu yang cerah dan mengkilat.
2. *E.coli* yang diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi dan Imunologi Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
3. Pakan ayam *broiler* br-1 yang diperoleh dari UD. Gangsar PS Batu.

4.6 Alat dan Bahan

4.6.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain ; *Mc. Farland*, timbangan, kandang ayam, tempat pakan, tempat minum, vaksin ND-Clone 45, vaksin ND lasota, vaksin IB, mikroskop, pipet *Pasteur*, tempat fiksasi, penjepit

objek glass, objek glass, kapas, tabung reaksi, mikropipet, aluminium foil, spuit, tabung erlenmeyer, *vacum tube*, apron, beker glass, gelas ukur, pengaduk, cawan petri, *autoclave*, inkubator, bunsen, ose, korek api, *vortex* dan lemari pendingin.

4.6.2 Bahan

Bahan yang digunakan adalah ayam *broiler strain Hubbard* umur 21 hari dengan berat badan rata-rata \pm 900 gram, tepung daun mengkudu (*Morinda citrifolia L.*), desinfektan, aquades, pakan ayam, vitamin, Alkohol 70%, NaCl fisiologis, PFA 10%, PBS azida pH 7,4, plastik clip, EMBA (*Eosin Methylene Blue Agar*), NB (*Nutrient Broth*), spirtus, *lugol*, *crystal violet*, *safranin* dan sampel biakan bakteri *E.coli*.

4.7 Prosedur penelitian

4.7.1 Pembagian Kelompok Ayam

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah ayam *broiler strain Hubbard* yang normal, dan dalam kondisi yang sehat ditandai dengan gerakan yang aktif. Ayam *broiler* ini diperoleh dari Wonokoyo Group, Batu-Malang Jawa Timur. Sampel merupakan ayam *broiler* jantan berumur 21 hari dengan berat badan rata-rata \pm 900 gram.

Ayam *broiler* yang digunakan sebanyak 20 ekor, terbagi menjadi 5 kelompok dan tiap kelompok terdiri dari 4 ekor ayam. Pembagian kelompok sebagai berikut:

1. Kelompok pertama sebagai kontrol positif, ayam *broiler* tanpa perlakuan.
2. Kelompok kedua sebagai kontrol negatif. Ayam *broiler* yang diinfeksi *E.coli* sebanyak 0,5 mL/ekor (10^8 CFU/ml).

3. Kelompok ketiga sebagai kelompok terapi 1. Ayam *broiler* yang diinfeksi *E.coli* sebanyak 0,5 mL/ekor (10^8 CFU/mL) dan pemberian tepung daun mengkudu 3,25mg/ekor/hari melalui spuit peroral selama 14 hari.
4. Kelompok keempat sebagai kelompok terapi 2. Ayam *broiler* yang diinfeksi *E.coli* sebanyak 0,5 mL/ekor (10^8 CFU/mL) dan pemberian pemberian tepung daun mengkudu 6,5 mg/ekor/hari melalui spuit peroral selama 14 hari.
5. Kelompok kelima sebagai kelompok terapi 3. Ayam *broiler* yang diinfeksi *E.coli* sebanyak 0,5 mL/ekor (10^8 CFU/mL) dan pemberian pemberian tepung daun mengkudu 9,75 mg/ekor/hari melalui spuit peroral selama 14 hari.

4.7.2 Kandang Coba

Tempat pengamatan sekaligus penginfeksi bakteri *E.coli* berupa kandang sistem litter yang disekat menjadi 10 bagian kotak-kotak ukuran (60 x 40 x 20 cm) dengan 1 kandang tambahan untuk subjek cadangan tiap kelompok perlakuan. 1 kelompok ayam dimasukkan ke dalam 1 kotak kandang, 1 kotak kandang berisi 2 ekor ayam *broiler*.

4.7.3 Adaptasi Hewan Coba

Adaptasi hewan coba dalam kandang selama 7 hari dengan tujuan agar ayam menyesuaikan diri terhadap lingkungan yang baru (Frandsen, 1992). Aklimitasi yang dilakukan pada penelitian ini, anak ayam yang berumur 1 hari di letakkan pada 1 kandang besar yang sama dengan diberikan lampu pemanas untuk menjaga suhu kandang, alas kandang diberi sekam, tempat makan dan minum, ayam dirawat hingga dapat menyesuaikan diri dengan lingkungannya.

4.7.4 Infeksi *E.coli*

Pemberian infeksi *E.coli* pada ayam *broiler* menggunakan spuit 1 ml. Kelompok III, IV dan V diinfeksi dengan *E.coli* sebanyak 0,5 mL/ekor (10^8 CFU/mL). Inokulasi bakteri *E.coli* pada ayam *broiler* diberikan pada umur ke- 21 hari (Wientarsih, dkk., 2013).

Cara pemaparan :

1. Dikeluarkan ayam *broiler* satu persatu dari kandangnya.
2. Dilakukan inokulasi bakteri *E.coli* pada ayam *broiler* sebanyak 0,5 mL/ekor (10^8 CFU/mL) pada umur ke 21 hari (1 hari).
3. Dimasukkan kembali ayam *broiler* pada kandang setelah dilakukan inokulasi bakteri *E.coli*, dibiarkan selama 24 jam sebelum dilakukan terapi pada umur ke 22 hari.

4.7.4.1 Penghitungan Bakteri dengan Spektrofotometri

Mc Farland adalah peyetaraan konsentrasi mikroba dengan menggunakan larutan BaCl_2 1% dan H_2SO_4 1%. Standar kekeruhan Mc Farland ini dimaksudkan untuk menggantikan perhitungan bakteri satu per satu dan untuk memperkirakan kepadatan sel yang akan digunakan pada prosedur pengujian antimikroba. Keuntungan dari penggunaan standar Mc Farland adalah tidak dibutuhkannya waktu inkubasi yang cukup untuk memperoleh jumlah kepadatan bakteri yang diinginkan. Sedangkan kerugiannya, akan terjadi perbedaan pandangan untuk menilai tingkat kekeruhan dari sel bakteri. Untuk menilai kekeruhannya dapat digunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm (setara dengan panjang gelombang *E.coli*) (Sutton 2011).

Standar Kekeruhan Mc Farland

Skala Mc Farland	CFU (10^8 /mL)	1% BaCl ₂ / 1% H ₂ SO ₄ (mL)	Absorbansi
0,5	150	0,05/9,95	0,132
1	300	0,1/9,9	0,257
2	600	0,2/9,8	0,451
3	900	0,3/9,7	0,582

Sumber : Sutton 2011

Prosedur :

1. Koloni yang tumbuh pada medium NA (Nutrient Agar) diambil 1 koloni bakteri dan dilarutkan dalam medium NB (Nutrient broth) yang telah steril dan disetarakan dengan konsentrasi 0,5 McFarland.
2. NB yang telah berisi medium biakan diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 30°C.
3. Setelah inkubasi selama 1x24 jam, biakan Kultur Cair diambil dari Inkubator Shaking.
4. Spektrofotometer disiapkan dengan setting panjang gelombang 600 nm.
5. Blanko (medium) dan Sampel kultur (biakan cair) disiapkan masing -masing sebanyak 2 mL ke dalam kuvet steril.
6. *Run* spektrofotometer.
7. Hasil disetarakan dengan nilai absorbansi pada konsentrasi Mc Farland.

4.7.5 Pembuatan Tepung Daun Mengkudu

Daun mengkudu yang digunakan dalam penelitian ini adalah jenis daun mengkudu yang diambil dari kota Batu. Proses yang pertama kali dilakukan adalah mencuci daun mengkudu sampai bersih, kemudian dibuang daun mengkudu yang rusak. Selanjutnya, daun mengkudu ditiriskan, kemudian dikeringkan dengan menggunakan oven selama 1 jam dengan suhu 40°C agar

kandungan di dalam daun mengkudu tidak hilang. Terakhir, daun mengkudu yang sudah dikeringkan, digiling dengan mesin penggiling atau penyerbuk mesh dengan kecepatan 80/100 dan dikemas dalam plastik agar tahan lama.

4.7.6 Pengambilan Organ Bronkus

Pada penelitian ini ayam satu per satu di *Euthanasi* dengan cara injeksi pada medula oblongata (Franson, 2004). Setelah ayam mati, ayam di nekropsi (bedah bangkai) untuk diambil organ bronkus, kemudian organ direndam di dalam larutan PFA (*Paraformaldehid*) 10% dan disimpan di dalam suhu ruang. Kemudian organ yang lainnya direndam pada larutan PBS azida pH 7,4 dan disimpan di dalam freezer.

4.7.7 Pembuatan Preparat Histopatologi

Organ yang sudah difiksasi menggunakan PFA 10% kemudian didehidrasi menggunakan alkohol bertingkat dari konsentrasi 70% selama 24 jam, etanol 80% selama 2 jam, etanol 90%, 95% dan etanol absolut selama 20 menit. Kemudian dilakukan penjernihan dengan cara merendam jaringan dalam larutan xylol I selama 20 menit dan xylol II selama 30 menit. Infiltrasi dan *embedding* dengan menggunakan parafin cair pada inkubator bersuhu 58 – 60°C. Lalu dilakukan *trimming* dengan cara cetakan dijepit dalam mikrotom dan jaringan dipotong dengan ketebalan 5µm. Sediaan disimpan dalam inkubator suhu 38 – 40°C 24 jam dan kemudian dilakukan pewarnaan HE (Muntiha, 2001).

4.7.8 Elektroforesis SDS-PAGE

4.7.8.1 Isolasi Protein

Diawali dengan menimbang organ bronkus 0,5 g, ditambah sedikit pasir kuarsa dan digerus dengan mortar dingin yang diletakkan diatas blok es. Setelah

itu homogenat ditambah dengan larutan PBS-Tween : PSMF (9 :1) sebanyak 1 ml dan dipindahkan ke dalam tabung *effendorf* steril. Disonikasi selama 10 menit dengan sonikator, kemudian disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 6000 rpm. Selanjutnya supernatnya diambil dan ditambah etanol absolut dingin dengan perbandingan 1:1 dan dibiarkan selama semalam dan disimpan pada *freezer*. Setelah itu disentrifugasi selama 15 menit (10.000 rpm), dibuang supernatnya dan dikering anginkan sampai bau etanol hilang. Kemudian endapan ditambah dengan larutan buffer Tris-HCl pH 6,8 (Kusnoto dkk., 2005).

4.7.8.2 Persiapan Gel

Pada persiapan gel, langkah pertama plat gel dibuat dengan merangkai dua plat kaca dengan jarak antar plate kurang lebih 1 mm. Gel dibuat dua lapis yaitu gel sebagai tempat sampel (*Stacking gel*) dan gel sebagai media untuk pemisahan protein (*Separating gel*). *Separating gel* dibuat dari *Lower Gel Buffer* (LGB), T-Acryl, akuades, *ammonium persulphate* (APS), N, N, N', N', - *tetramethylethylene diamine* (TEMED) yang dilarutkan menjadi satu dalam akuades steril. Kemudian dituangkan ke dalam plate tempat lapisan gel menggunakan mikropipet dan dibiarkan 15 menit hingga terbentuk gel. Berikutnya *stacking gel* dituang di atas *separating gel* yang telah memadat sambil dipasang sisir hingga terbentuk gel berikut sumurannya. *Stacking gel* dibuat dari *Upper Buffer* (UGB), T-Acryl, APS, TEMED dan dilarutkan menjadi satu dalam akuades steril. Setelah terbentuk gel, sisir diangkat dengan hati-hati dan plate dipasang pada alat elektroforesis dan dituangkan larutan *running buffer* dituangkan pada bejana elektroforesis (Hames and Hooper, 2005).

4.7.8.3 Injeksi Sampel dan *Running*

Ekstrak kasar hasil isolasi dari organ bronkus diambil 150 μl , ditambahkan 150 μl *Reducing Sampel Buffer* (RSB) dan dipanaskan pada penangas air dengan temperatur 100°C selama 5 menit. Setelah didinginkan sampel dimasukkan dalam sumur-sumur gel dengan volume 30 μl untuk tiap sumur, dimana salah satu sumuran gel diisi dengan protein standar marker. Selanjutnya anoda dihubungkan pada *reservoir* bawah dan katoda dihubungkan pada *reservoir* atas dan dihubungkan *power supply* dengan arus listrik konstan volt dan 200 volt selama 45 menit. Dihentikan proses ini jika warna penanda biru berada kurang lebih 0,5 cm dari batas bawah plat gel (Aulani'am, 2004).

4.7.8.4 Perlakuan Setelah *Running*

Pewarnaan dilakukan dengan merendam gel dalam larutan *staining* selama 30-60 menit dengan *dishake* menggunakan *shaker*. Menghilangkan warna dilakukan dengan merendam gel dalam larutan *destaining* sambil *destaining* menggunakan *shaker* sampai gel menjadi jernih (Hames and Hooper, 2005).

4.7.8.5 Penentuan Berat Molekul

Membandingkan hasil elektroforesis sampel dengan marker protein maka dapat diketahui jenis-jenis protein dalam ekstrak kasar enzim tersebut. Penentuan berat molekul dilakukan dengan menghitung nilai R_f (*Retardation factor*) dari masing-masing pita dimana :

$$R_f = \frac{\text{jarak pergerakan protein dari tempat awal (cm)}}{\text{jarak pergerakan warna dari tempat awal (cm)}}$$

Kemudian dibuat kurva standar dengan harga R_f sebagai sumbu X dan harga logaritma berat molekul sebagai sumbu Y, kemudian diplotkan mobilitas

dan berat molekul dari protein yang akan dicari sehingga diketahui berat molekulnya.

4.7.9 Analisis Data

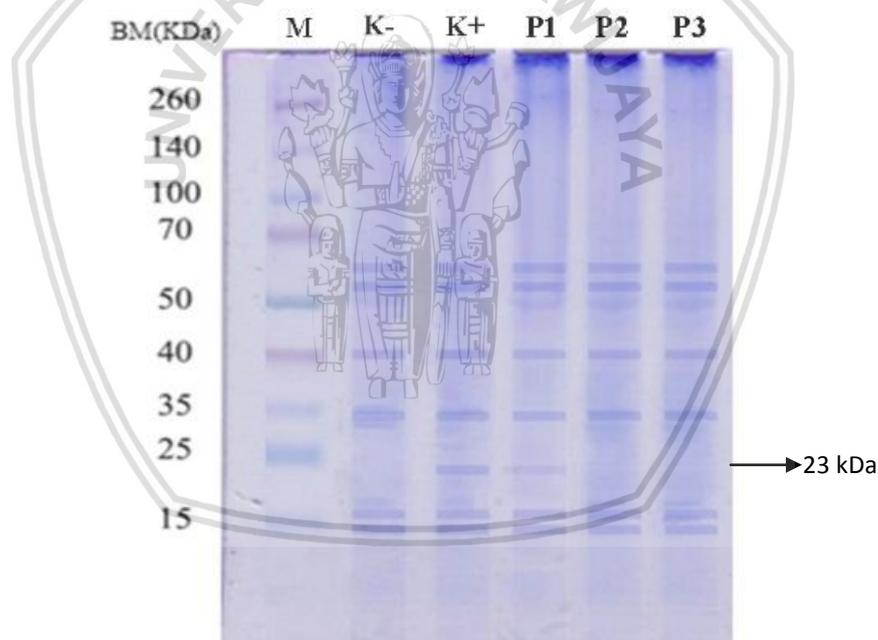
Data diperoleh dengan melihat dan menganalisa profil protein secara kuantitatif pada organ bronkus dengan metode SDS-PAGE, sedangkan pada histopatologi organ bronkus ayam broiler dianalisis secara deskriptif.



BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Pemberian Tepung Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia L.*) terhadap Profil Protein

Profil protein diperoleh dari hasil Elektroforesis SDS-Page pada ayam broiler kontrol negatif, ayam broiler yang diinfeksi E.coli sebanyak 0,5 ml/ekor (10^8 CFU/ml), ayam broiler yang diterapi menggunakan tepung daun mengkudu (*Morinda citrifolia L.*) dengan dosis 3,25mg/ekor/hari, dosis 6,5 mg/ekor/hari , dan dosis 9,75 mg/ekor/hari ini menunjukkan adanya perbedaan pita protein yang tersintesis (**Gambar 5.1**).



Gambar 5.1 Profil pita protein bronkus ayam broiler dengan teknik SDS-Page

keterangan:

- M = Marker Protein
 K (-) = Sehat
 K (+) = Ayam broiler yang diinfeksi *E.coli* sebanyak 0,5 ml/ekor/hari (10^8 CFU/ml)
 P1 = Pemberian tepung daun mengkudu dosis 3,25 mg/ekor/hari
 P2 = Pemberian tepung daun mengkudu dosis 6,5 mg/ekor/hari
 P3 = Pemberian tepung daun mengkudu dosis 9,75 mg/ekor/hari

Profil pita protein bronkus dengan berat molekul dari **Gambar 5.1** ditunjukkan pada **Tabel 5.1**.

Tabel 5.1 Perbedaan Berat Molekul (BM) Protein pada bronkus

Sumuran	Berat Molekul (BM) Protein (kDa)						
	62	56	38	32	23	16	14
Sehat	√	√	√	√	-	√	√
Infeksi <i>E.coli</i> 0,5ml (10^8 CFU/ml)	√	√	√	√	√	√	√
TDM 3,25 mg	√	√	√	√	√	√	√
TDM 6,5 mg	√	√	√	√	-	√	√
TDM 9,75 mg	√	√	√	√	-	√	√

Menurut data dari hasil penelitian diatas menunjukkan bahwa ayam broiler pada kontrol negatif terlihat protein tidak tersintesis dengan berat molekul 23 kDa, sedangkan pada ayam broiler yang diinfeksi *E.coli* menyebabkan tersintesisnya protein dengan berat molekul 23 kDa. Hal ini dipengaruhi oleh infeksi bakteri *E.coli* pada bronkus menyebabkan terjadinya perlekatan terhadap sel epitel pernafasan sehingga sistem pertahanan tubuh terserang dan pili berperan sebagai kolonisasi yang menentukan sifat adhesi dari bakteri *E.coli*. Menurut pendapat Silalahi (2013) Protein dengan berat molekul 23 kDa diduga mengalami *C-Reactive Protein* (CRP). *C-Reactive Protein* (CRP) merupakan golongan protein pentraksin dengan sifat pertahanan imunologis. Selain itu, juga sebagai marker inflamasi yang diproduksi dan dilepas dibawah rangsangan sitokin-sitokin

seperti *Interleukin 6 (IL-6)*, *Interleukin 1 (IL-1)* dan *Tumor Necrotizing Factor α* (TNF- α). Konsentrasi CRP dalam keadaan normal adalah 0,0008-0,004 g/L atau 0,08-4 mg/dL, sedangkan dalam keadaan peradangan akut konsentrasinya 0,4 g/L atau 40 mg/dL. CRP beredar dalam darah selama 6-10 jam setelah proses inflamasi akut dan destruksi jaringan, kadarnya memuncak dalam 48-72 jam. Kadar tersebut akan menurun apabila proses peradangan atau kerusakan jaringan mereda dalam waktu sekitar 24-48 jam (Susanto dan Adam, 2009).

CRP merupakan salah satu dari beberapa protein yang sering disebut sebagai protein fase akut dan digunakan untuk memantau perubahan-perubahan dalam fase inflamasi akut yang dihubungkan dengan banyak penyakit infeksi. Adanya CRP yang tetap tinggi menunjukkan infeksi yang tetap persisten. *C-Reactive Protein (CRP)* yaitu sebagai reaksi fase akut dalam respon terhadap infeksi, inflamasi dan kerusakan jaringan (Nakou *et al.*, 2010).

Inflamasi merupakan mekanisme proteksi yang terbatas terhadap trauma atau invasi mikroba dengan reaksi yang menghancurkan atau membatasi bahan yang berbahaya dan merusak jaringan. Inflamasi diperlukan tubuh untuk mempertahankan diri dari berbagai bahaya yang mengganggu keseimbangan tetapi juga dapat memperbaiki kerusakan struktur serta gangguan fungsi jaringan. Reaksi inflamasi termasuk dalam respon imun nonspesifik. Bila terjadi inflamasi, sel-sel sistem imun yang tersebar di seluruh tubuh akan bergerak ke lokasi infeksi beserta produk-produk yang dihasilkan. Selama respon imun berlangsung terjadi 3 proses penting yaitu peningkatan aliran darah ke daerah infeksi, peningkatan permeabilitas kapiler akibat retraksi sel-sel endotel yang mengakibatkan molekul-molekul besar dapat menembus dinding vaskuler dan migrasi leukosit ke vaskuler.

Eisenhardt dkk pada tahun 2009 menemukan bahwa *C-Reactive Protein* (CRP) terdapat dalam 2 bentuk, yaitu bentuk pentamer (pCRP) dan monomer (mCRP). Bentuk pentamer dihasilkan oleh sel hepatosit sebagai fase akut dalam respon terhadap infeksi, inflamasi dan kerusakan jaringan. Bentuk monomer berasal dari pentamer CRP yang mengalami disosiasi dan mungkin dihasilkan juga oleh sel-sel ekstrahepatik seperti otot polos dinding arteri, jaringan adiposa dan makrofag.

Fungsi dan peranan CRP di dalam tubuh belum diketahui seluruhnya. CRP bukan suatu antibodi tetapi CRP mempunyai berbagai fungsi biologi yang menunjukkan peranannya pada proses peradangan dan mekanisme daya tahan tubuh terhadap infeksi. Fungsi biologis CRP adalah:

1. Mengikat C-polisakarida (CPS) dari berbagai bakteri melalui reaksi presipitasi/aglutinasi.
2. CRP dapat meningkatkan aktivitas dan motilitas sel fagosit seperti granulosit dan monosit/makrofag.
3. CRP mempunyai daya ikat selektif terhadap limfosit T. Dalam hal ini diduga CRP memegang peranan dalam pengaturan beberapa fungsi tertentu selama proses peradangan.
4. CRP dapat mengikat dan mendetoksikasi bahan toksin endogen yang terbentuk sebagai hasil kerusakan jaringan.

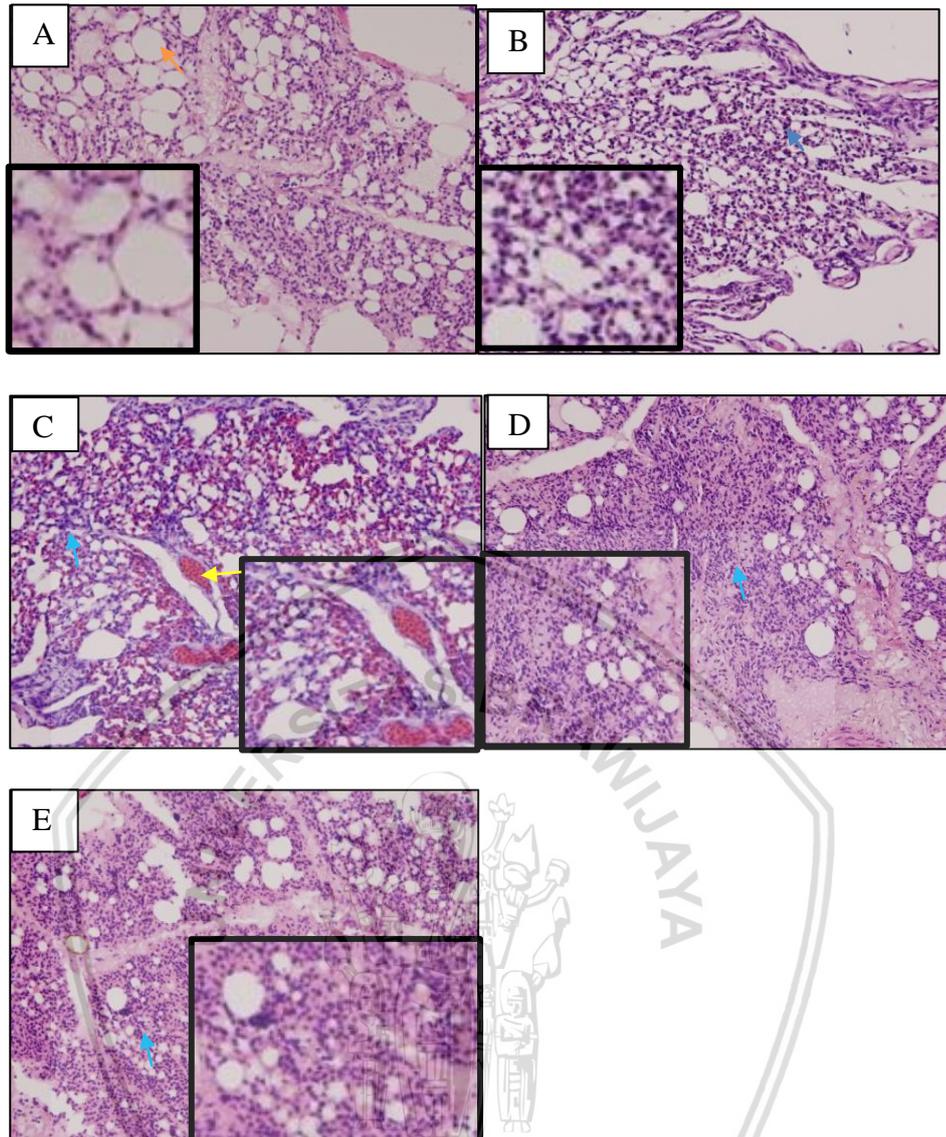
Infeksi *E.coli* yang diberikan sebanyak 0,5 mL/ekor menunjukkan tersitesisnya protein dengan berat molekul 23 kDa sebagai *C-Reactive Protein* (CRP) dimana protein ini merupakan marker penanda adanya inflamasi. Munculnya protein ini disebabkan peningkatan produksi *Reactive Oxygen Species*

(ROS) yang akan berpengaruh terhadap aktivasi dari neutrofil, dengan adanya aktivasi dari neutrofil merupakan salah satu respon pertama sel-sel inflamasi untuk bermigrasi ke jaringan yang mengalami peradangan (Basivirreddy *et al.*, 2002).

Pada pemberian TDM dosis 3,25 mg menunjukkan tersintesisnya protein dengan berat molekul 23 kDa, hal ini dipengaruhi kadar zat antrakuinon yang terdapat dalam TDM rendah sehingga aktivitas anti bakteri juga rendah, sedangkan pada pemberian TDM dosis 6,5 mg dan dosis 9,75 mg protein marker penanda inflamasi tidak muncul. Hal ini dipengaruhi oleh kadar zat antrakuinon yang tinggi sehingga semakin besar aktivitas antibakteri yang dihasilkan. Zat antrakuinon yang terdapat dalam TDM merupakan suatu persenyawaan fenolik, sehingga mekanisme kerja sebagai antibakteri yaitu dengan menghambat bakteri dengan cara mendenaturasi protein, mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel (Robinson, 1991).

5.2 Pengaruh Pemberian Tepung Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) Terhadap Gambaran Histopatologi Bronkus Ayam Broiler yang Diinfeksi *E.coli*

Penelitian ini menggunakan parameter histopatologi bronkus dengan menggunakan pewarnaan *Hematoksilin eosin* (HE) perbesaran mikroskop 400x. Berikut hasil pengamatan preparat bronkus ayam broiler pada masing-masing kelompok perlakuan dapat dilihat pada **Gambar 5.2** berikut ini:



Gambar 5.2 Gambaran Histopatologi Bronkus dengan Pewarnaan HE
Perbesaran 400x

Keterangan : (A) Kontrol Negatif, (B) Kontrol Positif, (C) Pemberian TDM 3,25 mg, (D) Pemberian TDM 6,5 mg, (E) Pemberian TDM 9,75 mg.

(↗) sel radang (↘) Alveolar (↑) pembuluh darah

Secara histologi, struktur bronkus mirip dengan trakea. Bronkus dilapisi epitel silindris banyak baris, terutama terdiri dari sel-sel yang mampu bersekresi, sel bersilia dan sel basal. Bronkus merupakan cabang dari trakea yang bercabang dua ke paru-paru kanan dan paru-paru kiri. Bronkus kanan lebih pendek dan lebih besar diameternya. Bronkus kiri lebih horizontal, lebih panjang, dan lebih sempit.

Bronkus primer kanan bercabang menjadi 3 bronkus sekunder (bronkus lobaris) dan bronkus kiri bercabang menjadi 2 bronkus sekunder. Selanjutnya bronkus sekunder bercabang-cabang menjadi bronkus tersier, bronkiolus, bronkiolus terminal, bronkiolus respiratori sampai pada alveolus (Tarwoto et al., 2009).

Pada kondisi kontrol negatif, histopat bronkus yang terlihat yaitu adanya bulatan kantung udara atau disebut dengan alveolar. Sedangkan pada **gambar 5.2.B** tampak sel radang dan pengecilan alveolar pada histopat. Pada **gambar 5.2.C** terdapat sel radang dan adanya pembuluh darah, sedangkan pada **gambar 5.2.D** dan **gambar 5.2.E** juga terlihat adanya sel radang.

Radang adalah reaksi alamiah yang berupa respon vaskuler dan seluler dari jaringan tubuh sebagai reaksi terhadap adanya stimuli. Adanya rangsang/iritasi akan menyebabkan munculnya respon neurogenik dan humoral (Celloti dan Laufer, 2001). Kemampuan tubuh dalam membuat reaksi radang bertujuan untuk mendukung jaringan pada proses kerusakan, pertahanan terhadap serangan mikroorganisme dan memperbaiki jaringan yang rusak serta proses kesembuhan luka (NN, 2003). Terdapat 2 tipe radang yaitu:

1. Radang akut (eksudatif) merupakan respon awal terhadap gangguan, merupakan reaksi non spesifik dan mungkin menimbulkan pengaruh yang fatal. Durasi biasanya pendek, umumnya terjadi sebelum respon imun menjadi jelas dan ditujukan terutama untuk menghilangkan agen penyebab gangguan dan membatasi jumlah jaringan yang rusak
2. Radang kronis (proliferatif) merupakan radang yang berlangsung dalam hitungan minggu sampai menahun. Radang kronis bisa merupakan hasil perkembangan radang akut. Ciri radang kronis adalah adanya infiltrasi sel

mononuklear (makrofag), limfosit dan proliferasi fibroblas. Agen penyebab biasanya merupakan iritan yang mengganggu secara persisten namun tidak mampu melakukan penetrasi lebih dalam atau menyebar secara cepat.

Tanda-tanda peradangan menurut Celloti dan Laufer (2001), peradangan akut ditandai dengan adanya warna merah (rubor) sebagai hasil peningkatan aliran darah pada daerah radang/hiperemi; panas (kalor) sebagai hiperemi vaskuler; bengkak (tumor) sebagai hasil eksudat seluler dan cairan; sakit (dolor) disebabkan oleh adanya iritasi akibat tekanan dan adanya produk metabolisme serta kehilangan fungsi (*functio laesa*) karena fungsi jaringan berjalan secara tidak normal. Gejala tersebut merupakan gejala umum sebagai manifestasi yang berkaitan dengan proses konstiksi arteriola diikuti dilatasi kapiler dan venula; kongesti venula; peningkatan permeabilitas pembuluh darah kapiler, eksudasi cairan radang kaya protein (eksudat); hemokonsentrasi, marginasi dan adesi sel darah, transmigrasi menembus venula, kemotaksis, agregasi dan fagositosis.

Terdapat 3 komponen histologis dasar daerah peradangan yaitu:

1. Vaskularisasi yang disertai peningkatan namun statis dari aliran darah yang menyebabkan panas dan kemerahan
2. Eksudasi seluler terutama sel fagosit (neutrofil dan monosit) yang menyebabkan pembengkakan
3. Eksudasi cairan yang mengandung protein tinggi (fibrinogen) menyebabkan pembengkakan disertai iritasi nervus yang menyebabkan sakit dan gangguan fungsi.

Sel radang merupakan respon tubuh karena adanya inflamasi dan macam-macam sel radang antara lain neutrofil, basofil, eosinofil dan limfosit. Akan tetapi sel radang yang lebih dahulu muncul yaitu neutrofil, oleh sebab itu pada kasus inflamasi akut, banyak ditemukan infiltrasi neutrofil. Neutrofil adalah anggota dari sel-sel PMN (PMNs). Jenis yang paling banyak di sel darah putih, komposisinya 70% dari seluruh leukosit (sel darah putih). Sel-sel ini memainkan peran penting dalam sistem kekebalan tubuh. Morfologi dari neutrofil yaitu sel ini berdiameter 12–15 μm memiliki inti yang khas padat terdiri atas sitoplasma pucat di antara 2 hingga 5 lobus dengan rangka tidak teratur dan mengandung banyak granula merah jambu (azurophilik) atau merah lembayung selain itu sel-sel ini dipenuhi dengan butiran netral-pewarnaan. Neutrofil diproduksi di sumsum tulang, neutrofil dewasa biasanya ditemukan dalam aliran darah, namun selama peradangan, neutrofil bergerak menuju daerah yang terkena dalam waktu satu jam dengan proses yang dikenal sebagai *chemotaxis* (Butterfield *et al.*, 2006).

Pemberian tepung daun mengkudu pada dosis 3,25 mg, 6,5 mg, dan 9,75 mg kurang efektif dalam menekan pertumbuhan bakteri *E.coli* pada bronkus ayam broiler. Salah satu faktor kurangnya efektifitas dari kerja tepung daun mengkudu adalah tidak mencapai pada saluran bronkus, hal ini dikarenakan tepung daun mengkudu termetabolisme di dalam hepar.

Berdasarkan pembahasan pada hasil profil pita protein dan hasil analisa gambaran histopatologi pemberian tepung daun mengkudu (TDM) dosis 3,25 mg/ekor/hari tersintesis *C-Reactive Protein* (CRP) dan gambaran histopatologi yang ditandai dengan akumulasi sel radang sedangkan pada dosis 6,5 mg/ekor/hari dan 9,75 mg/ekor/hari tidak tersintesis *C-Reactive Protein* (CRP) dan pada gambaran histopatologisnya terlihat akumulasi sel radang.

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

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

1. Pemberian tepung daun mengkudu (*Morinda citrifolia L*) terhadap profil protein bronkus ayam broiler menunjukkan dosis tepung daun mengkudu (*Morinda citrifolia L*) sebanyak 6,5 mg/ekor/hari dan 9,75 mg/ekor/hari tidak tersintesis *C-Reactive Protein* (CRP) yang merupakan marker inflamasi
2. Pemberian tepung daun mengkudu (*Morinda citrifolia L*) terhadap histopatologi bronkus ayam broiler menunjukkan tidak adanya perubahan pada jaringan bronkus ayam broiler.

6.2 Saran

Sebaiknya dilakukan penelitian lanjutan dengan meningkatkan dosis, lama pemberian tepung daun mengkudu (*Morinda citrifolia L*) dan proses pemaparan yang tepat untuk infeksi *E.coli* pada saluran pernapasan ayam broiler.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, F. 2004. Berpaling ke Tanaman Obat.//<http://www.suarapembaruan.com/News/2004/05/11.htm>. [05 Juli 2014]
- Alfred, M. 2012. *Why Noni Works: A Reference Book for The Biological Activity of The Constituents of Morinda citrifolia (Noni)*. Australia: M, & R. Naturopathic Clinic, Rochedale Qld.
- Ariningsih I., Solichatun, dan E. Anggarwulan. 2003. Pertumbuhan Kalus dan Produksi Antrakuinon Mengkudu (*Morinda citrifolia L.*) pada Media Murashige-Skoog (MS) Dengan Penambahan Ion Ca²⁺ dan Cu²⁺. *Biofarmasi 1 (2)* : 39-43. ISSN : 1693 – 2242.
- Aulanni'am, 2004. Prinsip dan Teknik Analisis Biomolekul. Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Press.
- Bangun A.P dan Sarwono B, 2002. Khasiat dan Manfaat Mengkudu. Agromedia. Jakarta.
- Charlton, B.R., A.J. Bermudez, D.A. Halvorson, J.S. Jeffrey, L.J. Newton, J.E. Sander and P.S. Wakernell. 2000. Avian Diseases Manual. Fifth Edition. American Association of Avian Pathologist. Poultry Pathology Laboratory University of Pennsylvania. New Bolton Center. USA.
- Djauhariya, E. 2003. Pengaruh Umur Batang Bawah dan Lama Penyimpanan Entres Terhadap Keberhasilan Okulasi Tanaman Mengkudu. Pros.Seminar Nasional XXV Tumbuhan Obat Indonesia. Tawangmangu. Hal: 96-103.
- Djauhariya, 2003. Mengkudu (*Morinda citrifolia L.*) *Tanaman Obat Potensial, Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat*. J. Perkembangan Teknologi TROL, Vol. XV, No. 1, p. 21.
- Eriksson, J, G. Larson, U. Gunnarsson, B. Bed'hom, M. Tixier-Boichard. 2008. Identification of the Yellow Skin Gene Reveals a Hybrid Origin of the Domestic Chicken. *Genetic Journal PLoS*. Vol 1. No.23.
- Jawetz, Melnick dan Adelberg, 2001. Mikrobiologi Kedokteran, Buku1, Salemba Medika, Surabaya.
- Kameswari M.S., I.N.K. Besung, dan H. Mahatmi. 2013. Perasan Daun Mengkudu Menghambat Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli* Secara *In Vitro*. *Indonesia Medicus Veterinus*. Vol 2(3) : 322-330. ISSN: 2301-7848.
- Kusnoto, S., M. Sosilawati dan S. Subekti. 2005. Isolasi dan karakterisasi protein cathepsin-L dari excretory/secretory material *Fasciola* spp untuk pengembangan diagnosis distomatosis dengan teknik ELISA. Seminar Nasional Biomolekuler dalam Bidang Peternakan, FKH UNAIR.

- Lee, M.D. and H.A. Lawrence. 1998. Colibacillosis. In A Laboratory Manual For the isolation and identification of avian pathogens. American Association of Avian Pathologists. Fourth Ed. Pennsylvania: pp: 14–16.
- Martin BS, Campos L, Bravo V, Adasne M, Borie C. 2005. Evaluation of antimicrobial resistance using indicator bacteria isolated from pigs and poultry in Chile. *Int J Appl Res Vet Med*. 2(3):171-178.
- Mead GC. 2007. *Microbiological Analysis of Red Meat, Poultry and Eggs*. Cambridge (UK): Woodhead Pub.
- Mellata M, Dho-Moulin M, Dozois CM, Curtise M, Brown Dk, Arne P, Bree A, Dasautels C, Fairbrother Jm. 2003. Role of Virulence Factors in Resistance of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Serum and in Pathogenicity, *J Infect Immun*, 71:536-540.
- Muntiha, M. 2001. *Teknis Pembuatan Preparat Histopatologi dari Jaringan Hewan Dengan Pewarnaan Hematoksin Eosin (H&E)*. Temu Teknis Fungsional Non Peneliti : Bogor.
- Nuryati, 2003. Manfaat tanaman mengkudu (*Morinda citrifolia*) sebagai obat tradisional dan kosmetika. Puslitbang Teknologi Isotop dan Radiasi, Batan. 5 hlm.
- Rachim M. 2012. Pengaruh Pemberian Jus Mengkudu dengan pemberian Dosis Bertingkat Terhadap Jumlah Trombosit pada Tikus Galur Wistar yang Terpapar Asap Rokok. *Laporan Hasil Karya Tulis Ilmiah*. Fakultas Kedokteran UNDIP.
- Rahayu I.D. 2006. Kolibasilosis, Kholera, dan Aspergilosis Pada Unggas. Modul Ajar Perkuliahan. Fakultas Pertanian-Peternakan UMM.
- Schroeder CM, White DG, Meng J. 2004. Retail meat and poultry as a reservoir of antimicrobial-resistant *Escherichia coli*. *Food Microbiol*. 21:249-255.
- Setiabudy, R. 2007. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi ke-V. Departemen Farmakologi dan Terapeutik, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- Tabbu CR. 2000. *Penyakit ayam dan Penanggulangannya penyakit bakterial, Mikal dan Viral* Yogyakarta : penerbit Kanisius.
- Tarmudji. 2003. Kolibasilosis Pada Ayam : Etiologi, Patologi, dan Pengendaliannya. *Wartazoa* Vol. 13 No.2, p.65-73.
- Wardiny, M.T., Retnani Y., Taryati. 2012. Pengaruh Ekstrak Daun Mengkudu Terhadap Profil Darah Puyuh Starter. *JITP*. Vol 2, No. 2.

Waha. 2000. *Sehat dengan mengkudu (Morinda citrifolia)*. MSF Group. Jakarta. Hal.1-44.

Wientarsih I., S.D Widhyari. T. Aryanti. 2013. Kombinasi Imbuhan Herbal Kunyit dan Zink dalam Pakan sebagai Alternatif Pengobatan Kolibasilosis pada Ayam Pedaging. *Jurnal Veteriner*. Vol. 14, No.3: 327-334. ISSN: 1411 – 8327.

Winarti, 2005. *Sehat Dengan Mengkudu*. MSF Group, Jakarta. Hal.1-44.

