

**EFEK PREVENTIF EKSTRAK DAUN DEWANDARU
(*Eugenia uniflora.L*) PADA TIKUS (*Rattus novergicus*)
MODEL GASTROENTERITIS YANG DIINFEKSI
Escherichia coli BERDASARKAN KADAR ENZIM
SUPEROXIDE DISMUTASE (SOD) DAN
HISTOPATOLOGI KOLON**

SKRIPSI

Oleh:
RIZKI NURFATHONI ANWAR
135130100111009



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

**EFEK PREVENTIF EKSTRAK DAUN DEWANDARU
(*Eugenia uniflora.L*) PADA TIKUS (*Rattus novergicus*)
MODEL GASTROENTERITIS YANG DIINFEKSI
Escherichia coli BERDASARKAN KADAR ENZIM
SUPEROXIDE DISMUTASE (SOD) DAN
HISTOPATOLOGI KOLON**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

RIZKI NURFATHONI ANWAR
135130100111009



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

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Efek Preventif Ekstrak Daun Dewandaru (*Eugenia uniflora.L*) pada Tikus (*Rattus novergicus*) Model Gastroenteritis yang Diinfeksi *Escherichia coli* Berdasarkan Kadar Enzim *Superoxide Dismutase* (SOD) dan Histopatologi Kolon

Oleh:
RIZKI NURFATHONI ANWAR
135130100111009

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 23 Agustus 2017
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. Nurina Titisari, M.Sc.
NIP. 19860122 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 bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Rizki Nurfathoni Anwar

NIM : 135130100111009

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

Efek Preventif Ekstrak Daun Dewandaru (*Eugenia uniflora.L*) pada Tikus (*Rattus novergicus*) Model Gastroenteritis yang Diinfeksi *Escherichia coli* Berdasarkan Kadar Enzim *Superoxide Dismutase* (SOD) dan Histopatologi Kolon

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 bersedia menanggung segala risiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 21 Desember 2017

Yang menyatakan,

(Rizki Nurfathoni Anwar)
NIM. 135130100111009

Efek Preventif Ekstrak Daun Dewandaru (*Eugenia uniflora.L*) pada Tikus (*Rattus novergicus*) Model Gastroenteritis yang Diinfeksi *Escherichia coli* Berdasarkan Kadar Enzim *Superoxide Dismutase* (SOD) dan Histopatologi Kolon

ABSTRAK

Gastroenteritis adalah peradangan pada saluran pencernaan terutama pada gastrium dan intestinal yang ditandai dengan muntah dan diare. Gastroenteritis disebabkan oleh bakteri, virus dan parasit. *Escherichia coli* merupakan salah satu bakteri yang dapat menyebabkan gastroenteritis. Paparan *E. coli* patogen memicu terjadinya inflamasi karena kemampuan *E. coli* dalam menghasilkan endotoksin serta eksotoksin. Peningkatan toksin *E. coli* dalam saluran pencernaan akan menyebabkan peningkatan radikal bebas pada tubuh dan memicu respon imun. Daun tanaman dewandaru mengandung flavonoid dan tanin yang berfungsi sebagai antioksidan eksogen dan antibakteri. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek preventif ekstrak daun dewandaru untuk mencegah gastroenteritis yang disebabkan oleh *E. coli*. Penelitian ini merupakan studi eksperimental dengan pengambilan data menggunakan Rancangan Acak Lengkap dan menggunakan hewan coba berupa tikus (*Rattus novergicus*) jantan berusia 8-12 minggu dengan berat 150-200 gram, yang dibagi menjadi lima kelompok perlakuan. Kelompok 1 adalah kontrol negatif, kelompok 2 adalah tikus gastroenteritis infeksi *E. coli* 10^6 CFU/mL peroral tanpa diberi preventif, kelompok P1, P2 dan P3 yang diberikan ekstrak daun dewandaru dengan dosis 300 mg/kgBB, 400 mg/kgBB dan 500 mg/kgBB peroral selama 7 hari dan kemudian diberikan *E. coli* 10^6 CFU/mL peroral. Pengaruh preventif terhadap infeksi *E. coli* diketahui dengan menggunakan histopatologi kolon dan kadar *Superoxide Dismutase* (SOD) yang dianalisis secara statistik menggunakan *one way ANOVA* ($\alpha=0,05$). Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak daun dewandaru dapat mencegah penurunan kadar SOD dan mencegah kerusakan histopatologi kolon. Kesimpulan penelitian ini ekstrak daun dewandaru dapat mencegah gastroenteritis hasil infeksi *E. coli* berdasarkan kerusakan kolon dan penurunan kadar SOD

Kata kunci : *Escherichia coli*, Ekstrak daun dewandaru, Histopatologi kolon, kadar SOD

**The Effect Of Preventative Of Dewandaru Leaf Extract (*Eugenia uniflora. L*)
On Gastroenteritis Model Rats (*Rattus novergicus*) with *Escherichia Coli* -
Infected Based On Levels Of Enzyme Superoxide
Dismutase (SOD) And Colon Histopathology**

ABSTRACT

Gastroenteritis is an inflammation of the gastrointestinal tract especially in the gastrium and intestinal marked by vomiting and diarrhea. Gastroenteritis is caused by bacteria, viruses and parasites. *Escherichia coli* is one of the bacteria that can cause gastroenteritis. Exposure to pathogenic *E. coli* triggers the occurrence of inflammation due to the ability of *E. coli* to produce endotoxins and exotoxins. Increased *E. coli* toxin in the gastrointestinal tract will lead to increased free radicals in the body and trigger an immune response. The leaves of the dewandaru plant contain flavonoids and tannins that act as exogenous and antibacterial antioxidants. This study was conducted to determine the preventive effect of dewandaru leaf extract to prevent gastroenteritis caused by *E. coli*. This study was an experimental study with data collection using Completely Randomized Design and using experimental animals of males rat (*Rattus novergicus*) aged 8-12 weeks weighing 150-200 grams, divided into five groups. Group 1 was negative control, group 2 was gastroenteritis infectious *E. coli* 10⁶ CFU / mL without giving preventive therapy, P1, P2 and P3 group given dewandaru leaf extract at dose 300 mg / kgBB, 400 mg / kgBB and 500 mg / kgBB peroral for 7 days and then administered *E. coli* 10⁶ CFU / mL orally. The preventive effect on *E. coli* infection is known using colon histopathology and Superoxide Dismutase (SOD) levels analyzed statistically using one way ANOVA ($\alpha = 0.05$). The results of this study indicate that dewandaru leaf extract can prevent the decrease in SOD levels and prevent colon histopathological damage. The conclusion of this study dewandaru leaf extract can prevent gastroenteritis *E. coli* infection results based on colon damage and decreased levels of SOD

Keywords: *Escherichia coli*, Dewandaru leaf extract, Colon histopathology, SOD levels



KATA PENGANTAR

Ucapan alhamdulillah penulis haturkan kehadirat Allah SWT karena atas limpahan rahmat, hidayah dan pertolongan-Nya lah sehingga penulis mampu menyelesaikan Proposal Skripsi dengan baik yang berjudul ” **Efek Preventif Ekstrak Daun Dewandaru (*Eugenia uniflora.L*) pada Tikus (*Rattus novergicus*) Model Gastroenteritis yang Diinfeksi *Escherichia coli* Berdasarkan Kadar Enzim *Superoxide Dismutase* (SOD) dan Histopatologi Kolon ” dengan lancar.**

Selama penulisan Proposal Skripsi ini penulis banyak mendapat bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Sri Murwani, drh, MP sebagai dosen pembimbing I yang telah membimbing, memberi banyak masukan dan bimbingan serta mengajarkan hal-hal baru selama penelitian dan penulisan skripsi.
2. drh. Nurina Titisari, M.Sc selaku pembimbing II atas segala kesabaran dan keihlasannya dalam memberikan bimbingan, arahan, dan masukan bagi penulis dalam melakukan penelitian dan penulisan skripsi.
3. drh. Desi Wulansari, M. Vet, drh. Indah Amalia Amri, M.Sc selaku dosen penguji yang telah bersedia meluangkan waktu untuk menilai dan memberi masukan pada penulis.
4. Prof. Dr. Aulanni'am, drh. DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya
5. Drh. Dyah Ayu Oktavianie, M.Biotech selaku Wakil Dekan 1 bidang akademik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya
6. Seluruh Jajaran Dekanat, Dosen dan Staff Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya atas dorongan semangat dan fasilitas yang diberikan.

7. Ayahanda Suwito, Ibunda Wardatun serta saudara/i saya yang tercinta Ika Nur Meinawati dan Ma'rifat Nur Adi untuk doa, kasih sayang, dukungan serta pengorbanan baik moril maupun materi selama ini.
8. Rekan penelitian Syaifudin, Luh Putu, Aidia, dan Villinda atas semangat, kerjasama dan kebersamaan selama penelitian dan penulisan skripsi.
9. Teman-teman seperjuangan angkatan 2013 FKH UB khususnya kelas A atas cinta, persahabatan, dorongan semangat, inspirasi dan kebahagiaan
10. Serta kepada semua pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan dan penyusunan proposal ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa kesempurnaan hanya dimiliki oleh Allah SWT, maka dari itu penulis memohon maaf apabila terdapat kesalahan di dalam penulisan ini, oleh karena itu kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan. Semoga yang ada dalam tulisan ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Malang, 21 Desember 2017

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL DEPAN	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
ABSTRAK	v
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG	xiv
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan Penelitian	4
1.5 Manfaat Penelitian	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Gastroenteritis	6
2.1.1 Etiologi	6
2.1.2 Gejala Klinis Gastroenteritis	6
2.2 Gastroenteritis Disebabkan <i>E. coli</i>	7
2.2.1 Morfologi <i>E. coli</i>	7
2.2.2 Patogenesis <i>E. coli</i>	9
2.2.3 Diagnosis Gastroenteritis	9
2.2.4 Patologi Anatomi	10
2.2.5 Respon Imun Terhadap Infeksi <i>E. coli</i>	10
2.2.6 Pencegahan dan Pengobatan.....	11
2.3 Tanaman Dewandaru	12
2.3.1 Morfologi dan Taksonomi Dewandaru	12
2.4.1 Kandungan Daun Dewandaru	13
2.4 Radikal Bebas	14
2.5 Antioksidan	15
2.4.1 Antioksidan Endogen	16
2.4.1 Antioksidan Eksogen	17
2.6 Hewan Coba	18
2.7 Organ Kolon	20
BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN ..	22
3.1 Kerangka Konseptual.....	22
3.2 Hipotesis Penelitian	25
BAB 4. METODOLOGI PENELITIAN	27
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	27
4.2 Alat dan Bahan	27

4.3 Tahapan Penelitian.....	28
4.3.1 Penetapan Sampel Penelitian	28
4.3.2 Rancangan Penelitian	28
4.4 Variabel Penelitian.....	30
4.5 Tahapan Penelitian.....	30
4.5.1 Persiapan Hewan Coba	30
4.5.2 Prosedur Pembuatan Ekstrak Daun Dewandaru	31
4.5.3 Pembuatan Hewan Coba Model Gastroenteritis	32
4.5.4 Pemberian Ekstrak Daun Dewandaru	33
4.5.5 Isolasi Kolon	33
4.5.6 Pengukuran SOD	33
4.5.7 Pembuatan Preparat Histopatologi Kolon	34
4.6 Analisa Data	35
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN	37
5.1 Hasil Infeksi <i>E. coli</i> pada Tikus	37
5.2 Efek Preventif Pemberian Ekstrak Daun Dewandaru terhadap Kadar SOD Kolon Tikus Model Gastroenteritis.....	38
5.3 Efek Preventif Pemberian Ekstrak Daun Dewandaru terhadap Histopatologi Kolon Tikus Model Gastroenteritis.....	43
BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN	50
6.1 Kesimpulan	50
6.2 Saran	50
DAFTAR PUSTAKA	51
LAMPIRAN	56

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Rancangan Kelompok Penelitian.....	29
5.1 Rata-rata dan Standard Deviasi Kadar SOD Uji Tukey.....	39



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Morfologi <i>E. coli</i> dengan Pewarnaan SEM.....	8
2.2 Enteritis pada Usus Babi Karena Infeksi <i>E. coli</i>	10
2.3 Daun dan Buah Dewandaru.....	12
2.4 Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	19
2.5 Struktur Histologi Kolon Normal	21
2.6 Nekrosis Sel Mukosa Kolon	21
5.1 Konsistensi Feses pada Tikus Kontrol Positif dan Negatif	37
5.2 Histogram Nilai Rata-Rata dan Standard Deviasi kadar SOD	38
5.3 Gambaran Histopatologi Kolon Kontrol Negatif	44
5.4 Gambaran Histopatologi Kolon Kontrol Positif	44
5.5 Gambaran Histopatologi Kolon Kelompok Perlakuan 1.....	45
5.6 Gambaran Histopatologi Kolon Kelompok Perlakuan 2.....	45
5.7 Gambaran Histopatologi Kolon Kelompok Perlakuan 3.....	46



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Laik Etik	56
2. Determinasi Tanaman Dewandaru	57
3. Uji Fitokimia Daun Dewandaru	58
4. Perhitungan Dosis	59
5. Bagan Kerangka Operasional Penelitian.....	61
6. Data Penimbangan Berat Badan	61
7. Pengenceran <i>E. coli</i>	62
8. Isolasi Organ Kolon	63
9. Prosedur Pengukuran kadar SOD	63
10. Pembuatan Preparat Histopatologi.....	62
11. Hasil Pengukuran Kadar SOD Kolon	65
12. Perhitungan Statistik Kadar SOD	66
13. Dokumentasi Penelitian.....	70



DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

<u>Simbol/singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
ANOVA	<i>Analisis of Variance</i>
BNJ	Beda Nyata Jujur
HE	<i>Hematoxylin Eosin</i>
Kg	kilogram
mg	miligram
mL	mililiter
nm	nanometer
SEM	<i>Scanning Electron Microscope</i>
SOD	<i>Superoxide Dismutase</i>
PFA	<i>Paraformaldehyde</i>
pH	<i>Power of Hydrogen</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
µm	mikrometer
CFU	<i>Colony Forming Unit</i>
BB	Berat Badan
EMBA	<i>Eosin Methylen Blue Agar</i>
Cc	<i>Centimeter cubic</i>
Cm	Centimeter
rpm	rotasi per menit

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Gastroenteritis adalah peradangan pada saluran pencernaan terutama pada gastrium dan intestinal, sehingga dapat menyebabkan diare, kejang perut dan muntah. Secara umum gastroenteritis merupakan kelainan pada saluran pencernaan yang disebabkan inflamasi lambung serta usus, inflamasi yang terjadi biasanya pada bagian mukosa. (Suraatmaja, 2005).

Penyebab dari gastroenteritis adalah virus (Rotavirus), bakteri atau toksin (Salmonella, *E.coli*, Campylobacter, Yersinia dan lainnya), parasit (Cryptosporidium). Mikroorganisme patogen ini menyebabkan infeksi pada dinding usus dengan cara melekat pada dinding usus dan memproduksi enterotoksin atau sitotoksin (Suraatmaja, 2005).

Menurut Chotiah (2012) prevalensi gastroenteritis pada peternakan sapi perah di daerah Bogor mencapai 19-40%, pada anak sapi yang terserang juga mengakibatkan kekurangan cairan yang mengandung garam mineral atau elektrolit sehingga dapat menyebabkan dehidrasi dan asidosis, kerugian ekonomi yang dialami peternak adalah biaya pengobatan yang tinggi, gangguan pertumbuhan dan kematian. Prevalensi infeksi *E. coli* pada ternak di Kabupaten Sleman, Yogyakarta mencapai 35%, dengan 80% infeksi *E. coli* terjadi pada anak sapi. Secara keseluruhan prevalensi akibat infeksi *E. coli* pada tahun 2009 mencapai 35-80% (Suwito, 2009).

Kolon adalah bagian dari saluran pencernaan yang berfungsi sebagai absorpsi air dan elektrolit dari kimus untuk membentuk feses yang padat dan penimbunan bahan feses sampai dapat dikeluarkan, sebagian besar absorpsi dalam usus besar terjadi pada pertengahan proksimal kolon. Infeksi *E. coli* dapat menyebabkan meningkatnya permeabilitas kolon serta peningkatan sekresi cairan dan elektrolit sehingga kolon akan mengalami penurunan kemampuan, (Zein, *et al*, 2004).

Bakteri *E. coli* juga menghasilkan endotoksin yang kemudian direspon oleh sel-sel inflamator dan mengakibatkan inflamasi. Sel inflamasi yang teraktivasi akan menghasilkan *Reactive Oxygen Species* dan *Reactive Nitrogen Species* (ROS dan RNS) sebagai bentuk dari respon terhadap rangsangan fisik dan kimiawi yang merusak (Caramori, 2004). Menurut Utami (2011) produksi yang berlebihan dari ROS akan mengakibatkan penurunan kadar SOD jaringan. *Superoxide Dismutase* (SOD) merupakan antioksidan primer yang berfungsi mencegah terbentuknya radikal bebas baru. *Superoxide Dismutase* (SOD) secara alami sudah terdapat pada tubuh sehingga ketika terdapat radikal bebas kerjanya akan lebih cepat dibandingkan antioksidan yang lain (Sayuti, 2015).

Dewandaru (*Eugenia uniflora*) adalah jenis tanaman buah yang dapat dipanen sepanjang tahun karena tanaman ini dapat berbuah dalam berbagai musim (Hutapea, 1994). Dewandaru memiliki kandungan kimia seperti saponin, flavonoid, vitamin C tanin dan antosianin (Eindbond dkk, 2004). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Utami dkk (2005) membuktikan bahwa kandungan fenol dan

flavanoid dalam daun dewandaru memiliki aktivitas antioksidan. Daun dewandaru juga dapat dimanfaatkan sebagai antidiare dan juga antiinflamasi (Hutapea, 1994).

Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui manfaat dari ekstrak daun dewandaru (*Eugenia uniflora*) terhadap histopatologi kolon dan kadar SOD pada Tikus (*Rattus norvegicus*) dengan model gastroenteritis yang diinfeksi *E. coli* sebagai tindakan preventif terjadinya gastroenteritis pada hewan.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka rumusan masalah yang didapat adalah :

1. Bagaimana pengaruh preventif pemberian ekstrak daun dewandaru terhadap kadar *Superoxide dismutase* (SOD) pada organ kolon tikus model gastroenteritis yang diinfeksi *E. coli*?
2. Apakah terdapat perubahan histopatologi kolon pada tikus model gastroenteritis yang diinfeksi *E. coli* setelah pemberian preventif ekstrak daun dewandaru?

1.3 Batasan Masalah

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

1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain wistar dengan usia 8-12 minggu dan berat antara 200-250 gram (Astawan dkk, 2011). Penggunaan hewan coba dalam penelitian ini telah mendapatkan

sertifikat layak etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya (KEP-UB) dengan nomor 756-KEP-UB (**Lampiran 1**)

2. Induksi *E. coli* menggunakan sonde lambung dengan dosis 1 mL yang mengandung 10^6 CFU/mL selama 7 hari (Astawan dkk, 2011). Bakteri *E. coli* yang digunakan didapatkan dari laboratorium mikrobiologi FK UB.
3. Spesifikasi daun dewandaru yang digunakan adalah berwarna hijau muda sampai dengan hijau tua. Daun dewandaru didapatkan dari UPT. Meterina Medica Batu. Pembuatan ekstrak daun dewandaru dengan cara ekstraksi menggunakan pelarut etanol 70% (Indraswari, 2008). Ekstrak daun dewandaru diberikan satu kali dalam satu hari dengan dosis 300 mg/kgBB, 400 mg/kgBB, dan 500 mg/kgBB selama 7 hari dengan menggunakan sonde lambung (BPOM, 2014).
4. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah nilai absorbansi *Superoxide dismutase* (SOD) organ kolon menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 580 nm (Rarangsari, 2015).
5. Histopatologi organ kolon menggunakan pewarnaan *Hemaktosilin-Eosin* (HE) dan diamati dengan mikroskop menggunakan perbesaran 40-400x dianalisa secara deskriptif untuk mengamati kerusakan mukosa dan infiltrasi sel radang (Wresdiyati dkk, 2013).

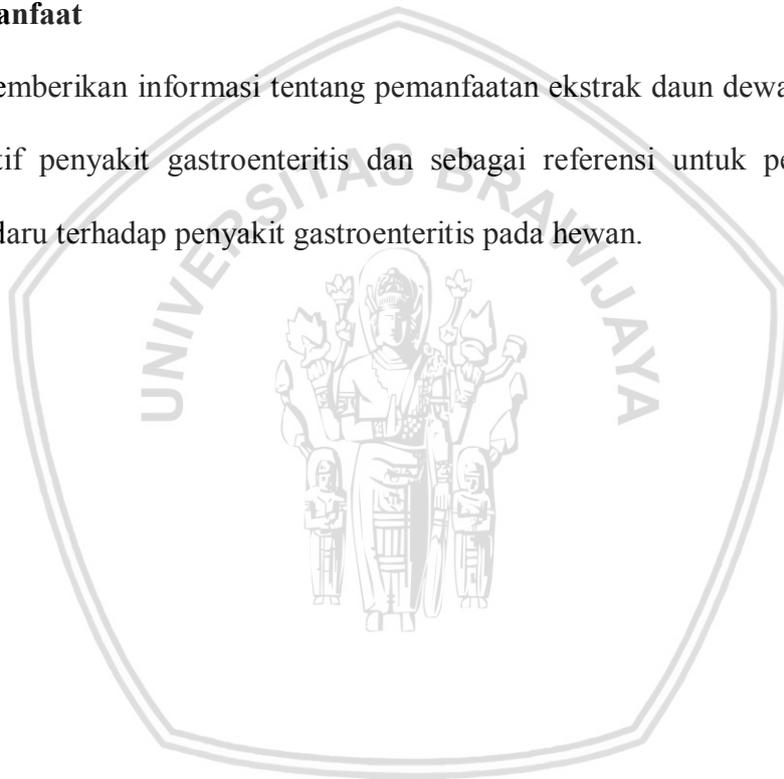
1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka tujuan penelitian ini adalah:

1. Mengetahui efek preventif pemberian ekstrak daun dewandaru terhadap kadar *Superoxide dismutase* (SOD) pada organ kolon tikus model gastroenteritis yang diinfeksi *E. coli*.
2. Mengetahui efek preventif pemberian ekstrak daun dewandaru terhadap perubahan histopatologi kolon pada tikus model gastroenteritis yang diinfeksi *E. coli*.

1.5 Manfaat

Memberikan informasi tentang pemanfaatan ekstrak daun dewandaru sebagai preventif penyakit gastroenteritis dan sebagai referensi untuk penelitian daun dewandaru terhadap penyakit gastroenteritis pada hewan.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Gastroenteritis

Gastroenteritis adalah inflamasi dari membran mukosa pada saluran pencernaan, yaitu meliputi lambung, usus halus dan usus besar. Gastroenteritis biasanya ditandai dengan diare dan muntah (Chow dkk, 2010). Gastroenteritis dapat menyebabkan kehilangan cairan elektrolit yang menimbulkan dehidrasi dan gejala ketidakseimbangan cairan elektrolit karena frekuensi defekasi yang berlebihan serta konsistensi feses yang cair. Penyebab utama gastroenteritis adalah bakteri, virus, parasit, dan mengkonsumsi pakan yang beracun (Simadibrata, 2006).

2.1.1 Etiologi

Penyebab dari gastroenteritis dapat dibagi menjadi beberapa faktor, yaitu :

- a. Golongan virus : virus yang biasanya menyebabkan gastroenteritis adalah golongan Rotavirus dan Coronavirus.
- b. Golongan bakteri : bakteri yang sering menyebabkan gastroenteritis adalah *E. coli*, *Salmonella*, *Clostridium perfringens*, dan *Staphylococcus aureus*.
- c. Golongan parasit : jenis parasit yang sering menyebabkan gastroenteritis adalah *Cryptosporidium*, *Coccidia*, dan *Giardia* (Chotiah, 2012).

2.1.2 Gejala Klinis Gastroenteritis

Hewan yang mengalami gastroenteritis akan memperlihatkan tanda-tanda seperti lemas, rambut kusam, kurus, nafsu makan menurun, pertumbuhan terganggu, diare, suhu tubuh meningkat, konsistensi feses cair dan dehidrasi. Gastroenteritis yang disebabkan bakteri dapat dilihat manifestasi klinis seperti muntah, demam, tenesmus dan nyeri perut. Dalam beberapa waktu tanpa

penanganan maka dapat menyebabkan kematian dikarenakan tubuh kekurangan cairan yang dapat mengakibatkan renjatan hipovolemik atau gangguan biokimiawi berupa asidosis metabolik (Zein dkk, 2004).

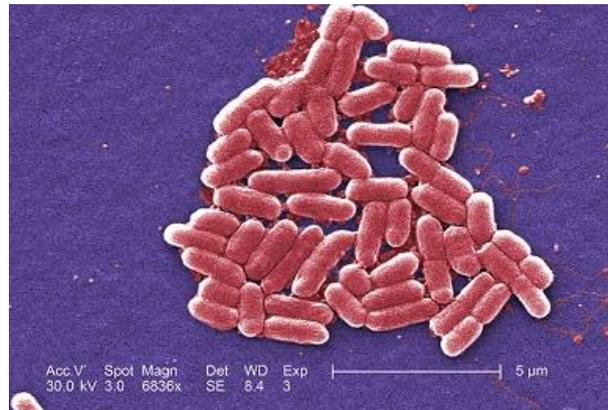
2.2 Gastroenteritis disebabkan *E. coli*

2.2.1 Morfologi *E. coli*

Klasifikasi *Escherichia coli* menurut Elfidasari (2011) adalah sebagai berikut:

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

Bakteri *E. coli* merupakan bakteri gram negatif dengan ciri berbentuk basil, tidak membentuk spora maupun kapsula, berdiameter 1,1-1,5 x 2,1-6,0 μm seperti pada **Gambar 2.1**, dapat bertahan hidup di medium sederhana dan memfermentasikan laktosa menghasilkan asam dan gas, pergerakannya motil atau tidak motil. Bakteri *E. coli* merupakan penghuni normal usus dan sering menyebabkan infeksi.



Gambar 2.1 Morfologi *E. coli* dengan pewarnaan *Scanning Electron Micrograph* (SEM) (Kunkel, 2009)

Bakteri *E. coli* dapat membentuk koloni pada saluran pencernaan manusia maupun hewan beberapa jam setelah kelahiran. Faktor predisposisi pembentukan koloni *E. coli* adalah mikroflora dalam tubuh masih sedikit, rendahnya kekebalan tubuh, faktor stress, pakan dan infeksi agen patogen lain. Kebanyakan *E. coli* memiliki virulensi yang rendah dan bersifat oportunistis (Songer *and* Post, 2005). Bakteri *E. coli* dapat menghasilkan beberapa jenis toksin, seperti endotoksin, enterotoksin dan verotoksin. Bakteri *E. coli* merupakan patogen utama dari infeksi gastroenteritis. Bakteri *E. coli* diklasifikasikan menurut ciri khas sifat virulensinya dan setiap kelompok menimbulkan penyakit melalui mekanisme yang berbeda (Biswas *et al*, 2006).

Berdasarkan perbedaan serotipe dan virulensinya, strain *E. coli* patogen yang menyebabkan penyakit pada saluran pencernaan dibagi menjadi enam golongan, yaitu enterotoksigenik (ETEC), enteroinvasif (EIEC), enteropatogenik (EPEC), enterohemorragik (EHEC), enteroagregatif (EAEC), dan nekrotoksigenik (NTEC) (Anggraeni, 2010).

2.2.2 Patogenesis *E. coli*

Patogenesis adalah kemampuan Bakteri *E. coli* masuk ke dalam saluran cerna dan melakukan penempelan pada epitel usus. Infeksi bakteri biasanya terdapat dua mekanisme yang bekerja, yaitu peningkatan sekresi usus dan penurunan absorpsi di usus. Infeksi bakteri yang invasif mengakibatkan perdarahan atau adanya leukosit dalam feses. Mekanisme terjadinya diare atau gastroenteritis akibat kuman enteropatogen meliputi penempelan bakteri pada sel epitel dengan atau tanpa kerusakan mukosa, invasi mukosa, dan produksi enterotoksin atau sitotoksin. Satu bakteri dapat menggunakan satu atau lebih mekanisme tersebut untuk dapat mengatasi pertahanan mukosa usus, sehingga dapat mengakibatkan peradangan usus (Zein dkk, 2004).

Peradangan usus juga dapat mengakibatkan meningkatnya permeabilitas dari usus dan meningkatkan sekresi cairan dan elektrolit sehingga usus mengalami penurunan kemampuan untuk menyerap terutama pada bagian kolon yang fungsi utamanya adalah penyerapan, sehingga feses yang keluar menjadi encer dan frekuensi defekasi yang berlebihan (Yulianti, 2011). Berdasarkan virulensinya grup *E. coli* patogen dibagi menjadi enteropatogenik *E. coli* (EPEC), enterotoksigenik *E. coli* (ETEC), enteroinvasif *E. coli* (EIEC), enteroagregatif *E. coli* (EAEC), enterohemoragik *E. coli* (EHEC) (Putri, 2015).

2.2.3 Diagnosis Gastroenteritis

Penegakan diagnosa dapat dilakukan dengan isolasi feses dan mengkultur pada media selektif EMBA agar yang diinkubasi selama 24 jam di laboratorium untuk mengetahui penyebab infeksi berasal dari bakteri (Zein dkk, 2004).

2.2.4 Patologi Anatomi

Perubahan patologi anatomi yang menciri pada gastroenteritis adalah akumulasi cairan pada organ abdomen. Perubahan secara mikroskopis berupa distensi dan pembengkakan pada intestin (Nielsen *et al*, 2005). Menurut Sendow (1998) gastroenteritis pada babi akan menunjukkan perubahan patologi anatomi berupa kekurusan, dinding usus menjadi tipis dan pada lumen usus terdapat banyak cairan. Hewan yang berumur kurang dari 2 minggu, lesi dan perubahan patologik sering ditemukan radang pada saluran pencernaan seperti pada **Gambar 2.2**, lambung banyak berisi susu serta terjadi pendarahan pada daerah lambung. Di bagian usus halus sering ditemukan cairan berwarna kuning dan susu yang tidak tercerna, dinding usus menjadi tipis disebabkan oleh atrofi vili usus.



Gambar 2.2 Enteritis pada usus babi karena infeksi *E. coli* terlihat adanya perdarahan (panah hitam) (White, 2017).

2.2.5 Respon Imun terhadap Infeksi *E. coli*

Tubuh memiliki mekanisme daya tahan tubuh untuk merespon infeksi bakteri. Usus merupakan organ utama yang berfungsi untuk melindungi terhadap invasi dari berbagai bahan berbahaya yang masuk ke lumen usus, seperti mikroorganisme dan antigen toksik. Jika bahan tersebut dapat menembus barrier

mekanisme daya tahan tubuh dan masuk kedalam sirkulasi sistem sehingga dapat mengakibatkan bermacam reaksi seperti infeksi dan alergi (Suraatmaja, 2005).

Mekanisme pertahanan tubuh terdiri atas imunitas alami dan imunitas adaptif. Imunitas alami merupakan pertahanan yang paling pertama. Imunitas alami atau *innate immunity* terdiri atas barrier epitel, fagosit sel NK dan sistem komplemen. Sistem imunitas alami yang berperan melawan mikroba yang yang masuk menembus epitel adalah sistem fagosit. Sistem fagosit yang bersirkulasi dalam darah terdapat dua tipe, yaitu netrofil dan monosit.

Bakteri *E. coli* saat lisis akan mengeluarkan endotoksin yaitu lipopolisakarida (LPS). Lipopolisakarida melalui TLR 4 akan membangkitkan sinyal untuk mengaktifkan faktor transkripsi yang dinamakan *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) dan mengekspresikan gen-gen yang mengkode protein komponen respon imun nonspesifik seperti sitokin inflamatori (TNF α , IL-1, IL-12). Produksi sitokin akan meningkatkan sel fagosit menuju ke tempat infeksi untuk menghancurkan LPS dengan melakukan proses fagositosis (Sargowo, 2007).

2.2.6 Pencegahan dan Pengobatan

Pencegahan infeksi *E. coli* dilakukan dengan program sanitasi yang baik benar, serta diusahakan pakan dan minum tidak tercemar feses. Menurut Nurmasari (2010) pengobatan gastroenteritis dapat dikategorikan ke dalam beberapa jenis, yaitu pengobatan cairan, pengobatan kausal dengan menggunakan antibiotika sistemik (amoxicillin, kloramfenikol, dan tetrasiklin), dan pengobatan simptomatik menggunakan obat antidiare (papaverin dan loperamid).

2.3 Tanaman Dewandaru

2.3.1 Morfologi dan Taksonomi dewandaru

Tanaman dewandaru termasuk perdu tahunan dengan tinggi \pm 5m. Batang tegak berkayu, bulat dan coklat, daunnya tunggal, tersebar, lonjong, ujung runcing, pangkal meruncing, tepi rata, pertulangan menyirip, dengan panjang \pm 5 cm dan lebar \pm 4 cm serta berwarna hijau. Buah tanaman ini berbentuk bulat dengan diameter kurang lebih 1,5 cm dan berwarna merah seperti **Gambar 2.3**. Bijinya keras, berwarna coklat, dan kecil. Akar yang dimiliki berwarna coklat dan kecil. Akar yang dimiliki berwarna coklat dan merupakan akar tunggang (Hutapea, 1994).



Gambar 2.3 Daun dan buah dewandaru (Catur dkk, 2013).

Taksonomi dari tanaman dewandaru adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledone
Ordo	: Myrtales
Famili	: Myrtaceae
Genus	: <i>Eugenia</i>
Spesies	: <i>Eugenia uniflora</i> Linn (Hutapea, 1994).

Buah dewandaru berkhasiat sebagai obat batuk, kurap, disentri dan juga sebagai inflamasi. Berbagai ekstrak daun dewandaru diketahui dapat digunakan sebagai antidiabetes, antihipertensi, antibakteri, dan antioksidan. Penelitian lain membuktikan bahwa dewandaru dapat berfungsi sebagai penangkal radikal bebas, penghambat hidrolisis, oksidasi enzim dan antiinflamasi (Pourmorad *et al*, 2006). Menurut Utami (2005) senyawa flavonoid pada dewandaru dapat berfungsi sebagai antioksidan.

2.3.2 Kandungan Daun Dewandaru (*Eugenia uniflora L*)

a. Flavonoid

Flavonoid adalah salah satu golongan fenol alam terbesar dan tersusun dari 15 atom karbon pada inti dasarnya dengan konfigurasi yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh tiga atom karbon yang dapat atau tidak membentuk cincin ketiga. Flavonoid merupakan salah satu metabolit sekunder, kemungkinan keberadaanya pada daun dipengaruhi adanya proses fotosintesis sehingga pada daun tua kandungannya lebih banyak daripada daun tua (Sjahid, 2008).

Flavonoid adalah senyawa preduksi yang baik, menghambat banyak reaksi oksidasi baik secara enzim maupun non enzim. Flavonoid merupakan penampung yang baik radikal hidroksi dan superoksida sehingga melindungi membran lipid terhadap reaksi yang merusak. Sejumlah tanaman obat yang mengandung flavonoid telah dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan, antibakteri, antivirus, antialergi, antiradang dan antikanker. Efek antioksidan disebabkan oleh penangkapan radikal bebas melalui donor atom hidrogen dari gugus fungsi hidroksil flavonoid (Mardisadora, 2010).

b. Tanin

Tanin merupakan senyawa polifenol dan dapat membentuk kompleks dengan protein membentuk kopolimer yang tidak larut dalam air. Tanin terdapat pada daun dan buah yang belum matang, merupakan golongan senyawa aktif tumbuhan yang termasuk golongan senyawa flavonoid. Tanin mempunyai beberapa khasiat yaitu sebagai astringen, antidiare, antibakteri dan antioksidan. Tanin merupakan komponen zat organik yang sangat kompleks, terdiri dari senyawa fenolik yang sukar dipisahkan dan sukar mengkristal, mengendapkan protein dari larutannya dan bersenyawa dengan protein tersebut (Mabruroh, 2015).

Mekanisme kerja dari tanin sebagai antibakteri adalah dengan menghambat enzim *reverse* transkriptase dan DNA topoisomerase sehingga sel bakteri tidak terbentuk. Tanin memiliki aktivitas antibakteri yang berhubungan dengan kemampuannya untuk menginaktifkan adhesin sel mikroba juga menginaktifkan dan mengganggu transport protein pada lapisan dalam sel (Ngajow, 2013). Menurut Sari dan Sari (2011) tanin juga memiliki target pada polipeptida dinding sel, sehingga pembentukan dinding sel akan terganggu dan menyebabkan sel bakteri lisis karena tekanan osmotik atau fisik.

2.4 Radikal Bebas

Radikal bebas adalah atom atau molekul yang memiliki elektron tidak berpasangan pada orbit terluarnya dan dapat berdiri sendiri (Clarkson *and* Thompson, 2000). Dalam konsentrasi tinggi, radikal bebas dapat membentuk stress oksidatif, suatu proses penghancuran yang dapat merusak seluruh sel tubuh. Proses kerusakan sel tubuh dipengaruhi oleh kadar antioksidan yang tidak berimbang

dengan radikal bebas (Phamhuy *et al*, 2008). Radikal bebas terpenting dalam tubuh adalah radikal derivat dari oksigen yang disebut kelompok oksigen reaktif (ROS), triplet ($3O_2$), tunggal ($1O_2$), anion superoksida (O_2^-), radikal hidroksil (LO_2).

Sumber dari radikal bebas dibagi menjadi dua, yaitu endogen dan eksogen. Radikal bebas endogen dihasilkan dari mitokondria, mikrosom, enzim dan proses fagosit. Menurut Herlambang (2006) mitokondria adalah tempat utama pembentukan ROS selama proses metabolisme normal, dimana 90% pembentukan ROS dihasilkan di mitokondria. Mikrosom merupakan tempat kedua terbanyak dalam memproduksi radikal bebas, dimana autooksidasi dari sitokrom P-450 dan oksidasi dari NADPH oleh NADPH dehidrogenase akan memicu terbentuknya O_2^- . Proses fagosit juga berpengaruh dalam menghasilkan radikal bebas, aktivitas fagosit dapat memicu suatu *respiratory burst* yang ditandai dengan peningkatan uptake O_2 , metabolisme glukosa dan penggunaan NADPH. Sedangkan, radikal bebas eksogen berasal dari lingkungan seperti obat-obatan, radiasi, asap rokok (Vallyathan dan Shi, 1997).

2.5 Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat spesies oksigen reaktif, spesies nitrogen, dan radikal bebas lainnya sehingga dapat mencegah penyakit-penyakit degeneratif seperti kardiovaskular, kanker dan penuaan. Antioksidan memiliki fungsi untuk menghentikan atau memutuskan reaksi berantai dari radikal bebas yang terbentuk di dalam tubuh, sehingga dapat mencegah kerusakan sel-sel tubuh akibat radikal bebas. Senyawa ini memiliki struktur

molekul yang dapat memberikan elektronnya kepada molekul radikal bebas sehingga membuat radikal bebas lebih stabil (Hernani dan Rahardjo, 2005).

2.5.1 Antioksidan Endogen

Tubuh dapat menghasilkan antioksidan berupa enzim yang aktif apabila mendapatkan nutrisi pendukung yang disebut kofaktor, seperti tembaga, seng, selenium, mangan, dan besi. Antioksidan ini disebut dengan antioksidan endogen atau antioksidan primer. Antioksidan endogen mampu memutus rantai reaksi pembentukan radikal bebas sehingga menjadi produk yang lebih stabil. Enzim-enzim seperti katalase, glutathion peroksidase, dan superoksida dismutase (SOD) merupakan antioksidan endogen yang dapat ditemui pada jaringan tubuh (Kartikawati, 1999).

a. Katalase

Katalase adalah antioksidan endogen yang dibentuk di dalam retikulum endoplasma. Katalase banyak terdapat di hati dan eritrosit, namun rendah dalam otot skelet, jantung dan otak. Kerja enzim ini mengkatalis pengubahan hidrogen peroksida menjadi molekul air dan oksigen.

b. Glutathion peroksidase

Glutathion peroksidase merupakan antioksidan endogen yang terdapat pada sitoplasma dan mitokondria sel mamalia, serta diproduksi di hati. Glutathion peroksidase merupakan tripeptida yang terdiri atas asam glutamat, asam amino glisin, sistein dan empat selenium. Enzim ini mencegah peroksidase lipid dengan menggunakan hidrogen peroksida untuk mengubah glutathion menjadi glutathion teroksidasi (Nurfritria, 2007).

c. *Superoxide dismutase* (SOD)

Superoxide dismutase (SOD) adalah antioksidan yang berperan dalam memerangi radikal superoksida. Superoksida dismutase ditemukan pada organisme yang menggunakan oksigen untuk metabolismenya, tetapi tidak ditemukan pada organisme anaerob obligat. *Superoxide Dismutase* (SOD) merupakan metaloenzim yang mengkatalisis dismutasi anion superoksida menjadi O_2 dan senyawa yang tidak terlalu reaktif seperti hidrogen peroksida (H_2O_2). Terdapat empat macam logam yang umumnya menjadi atom pusat pada enzim ini, yaitu tembaga (Cu), seng (Zn), mangan (Mn), dan besi (Fe) (Ariadini, 2007).

Superoxide Dismutase (SOD) merupakan antioksidan endogen pada tubuh. Berdasarkan mekanisme kerjanya, enzim ini digolongkan sebagai antioksidan primer yang berfungsi mengurangi pembentukan radikal bebas baru dengan memutus reaksi berantai dan mengubahnya menjadi produk yang lebih stabil agar tidak merusak sel tubuh. Aktivitas SOD pada organ tikus bervariasi, kadar SOD tertinggi terletak pada organ hati, setelah itu kelenjar adrenal, ginjal, darah, limpa, pankreas, otak, paru-paru, lambung, usus, timus dan lemak (Nurwati, 2002).

2.5.2 Antioksidan Eksogen

Tubuh tidak memiliki cadangan antioksidan dalam jumlah yang cukup, sehingga ketika radikal bebas dalam tubuh jumlahnya melebihi normal maka tubuh membutuhkan antioksidan eksogen. Antioksidan eksogen adalah jenis antioksidan yang bisa didapatkan dari luar tubuh, yaitu dengan mengonsumsi buah-buahan dan

sayur-sayuran. Antioksidan eksogen diperlukan oleh tubuh sebagai sistem pertahanan preventif (Winarsi, 2010). Cara kerja dari antioksidan eksogen adalah dengan memotong reaksi oksidasi berantai atau menangkap radikal bebas sehingga tidak lagi reaktif (Kartikawati, 1999).

2.5 Hewan Coba

Hewan laboratorium atau hewan percobaan adalah hewan yang sengaja dipelihara dan dibudidayakan untuk keperluan penelitian atau pengamatan laboratorium. Tikus termasuk hewan mamalia, sehingga dampaknya terhadap suatu perlakuan tidak jauh berbeda dengan mamalia lainnya. Penggunaan tikus sebagai hewan coba juga dikarenakan pertimbangan ekonomis dan kemampuan hidup tikus hanya 2-3 tahun dengan lama reproduksi 1 tahun (Maula, 2014)

Menurut Akbar (2010), klasifikasi tikus putih (*Rattus norvegicus*) adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordata
Subphylum	: Vertebrata
Class	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Family	: Muridae
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>norvegicus</i>

Kelompok tikus laboratorium pertama kali dikembangkan di Amerika Serikat antara tahun 1877 dan 1893. Tikus putih memiliki keunggulan diantara tikus

liar, yaitu lebih cepat dewasa, perkawinan tidak musiman, dan lebih cepat berkembang biak. Kelebihan lainnya adalah mudah ditangani dan berukuran cukup besar sehingga mudah untuk diamati. Tikus putih memiliki ciri morfologis seperti albino, kepala kecil, dan ekor yang lebih panjang dari badannya, pertumbuhannya cepat, temperamen baik, dan kemampuan laktasi yang tinggi seperti pada **Gambar 2.4**. Terdapat beberapa galur tikus yang sering digunakan dalam penelitian. Galur-galur tersebut adalah *Wistar*, *Sprague-Dawley*, *Long Evans*, dan *Holdzman* (Maula, 2014).



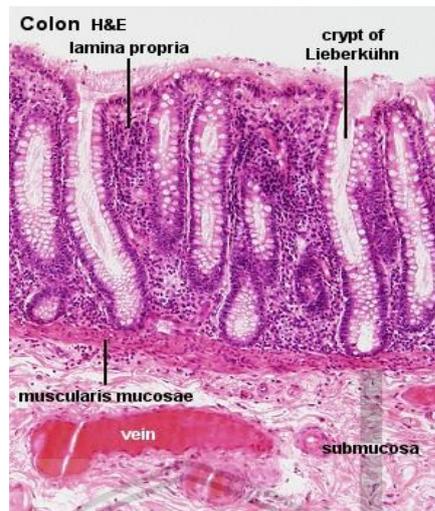
Gambar 2.4 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) (Akbar, 2010)

Penggunaan tikus putih *strain Wistar* telah digunakan dalam penelitian serupa sebelumnya. Penelitian yang dilakukan oleh Towoliu dkk (2013) untuk mengetahui efek pemberian *Lactobacillus* terhadap tikus infeksi *E. coli* juga menggunakan tikus putih strain Wistar yang berumur sekitar 5 bulan dengan berat 130-170 gram. Penelitian serupa juga dilakukan oleh Nuratmi dkk (2002) untuk melihat efek antidiare jus temu ireng dan temu mangga pada tikus. Penelitian ini menggunakan tikus putih jantan *strain Wistar* yang berumur 3-4 bulan dengan berat 200 gram.

2.7 Organ Kolon

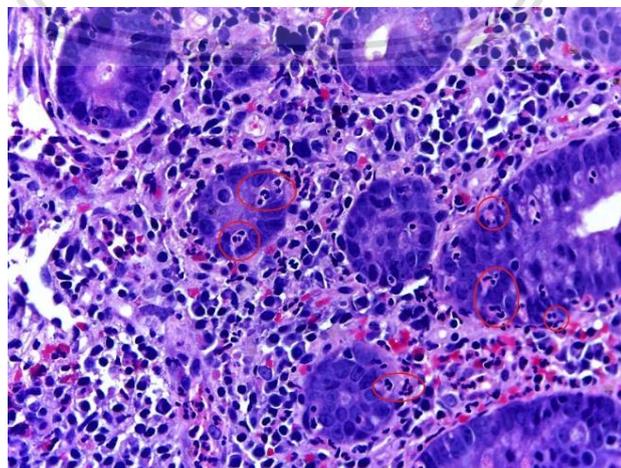
Usus besar dibagi menjadi sekum, kolon dan rektum. Kolon dibagi lagi menjadi kolon ascenden, transversum, descendens dan sigmoid. Fungsi utama kolon adalah absorpsi air dan elektrolit dari kimus untuk membentuk feses yang padat dan penimbunan bahan feses sampai dapat dikeluarkan, sebagian besar absorpsi dalam usus besar terjadi pada pertengahan proksimal kolon sehingga dinamakan kolon pengabsorpsi. Kolon bagian distal berfungsi untuk tempat penyimpanan feses sampai waktu yang tepat untuk ekskresi feses, sehingga disebut kolon penyimpanan (Guyton *and* Hall, 2008).

Dinding usus besar terdiri atas empat lapisan, yaitu mukosa, sub mukosa, muskularis eksterna dan serosa seperti **Gambar 2.5**. Mukosa terdiri atas epitel kolumnar selapis, kelenjar intestinal, lamina propia dan muskularis mukosa (Eroschenko, 2003). Lapisan mukosa berfungsi untuk mencerna dan mengabsorpsi makanan, lapisan muskularis berfungsi untuk mendorong makanan ke bawah dan bagian serosa berfungsi mencegah dinding usus tidak berlengketan karena sangat licin. Usus besar tidak memiliki plika dan vili, sehingga mukosa tampak lebih rata daripada usus kecil (Sudoyo, 2006).



Gambar 2.5 Struktur Histologi Kolon normal (HE; Perbesaran 100x) (Hill, 2017)

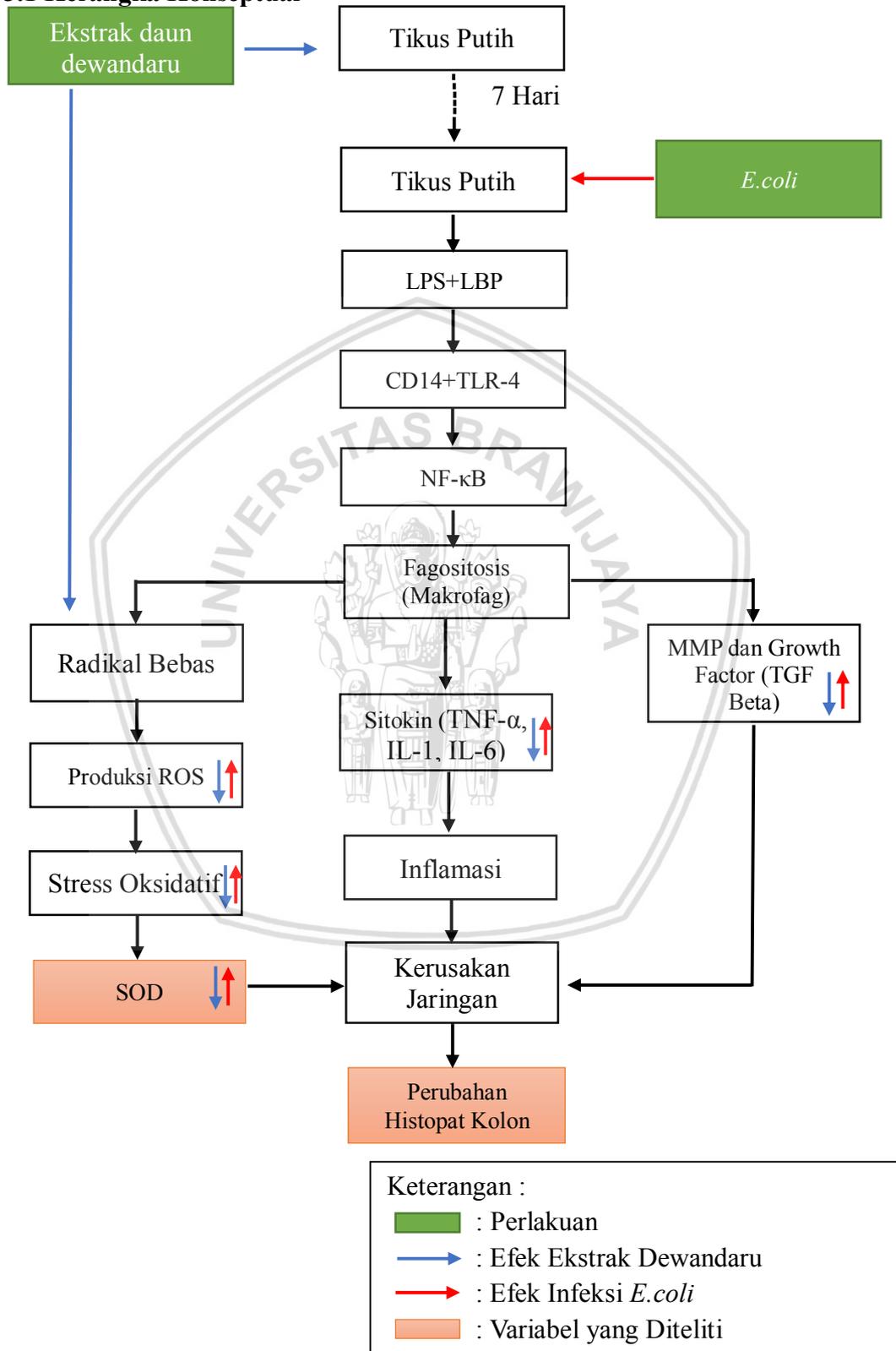
Histopatologi kolon yang diinfeksi *E. coli* patogen akan ditemukan adanya nekrosis sel mukosa usus, dimana didominasi neutrofil pada jaringan usus. Derajat keparahan infiltrasi sel radang juga dipengaruhi oleh lama waktu terjadinya peradangan. Derajat keparahan infiltrasi sel radang juga dipengaruhi oleh jumlah agen asing yang menginfeksi suatu jaringan. Hal ini juga dapat teramati dari adanya perbedaan derajat peradangan dari jumlah infiltrasi sel-sel radang pada sampel jaringan usus yang terinfeksi gastroenteritis seperti **Gambar 2.6** (Irawan dkk, 2014).



Gambar 2.6 Terdapat infiltrasi sel radang (di dalam lingkaran) pada mukosa kolon (HE, perbesaran 400x) (Arevaldo, 2014)

BAB III KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Berdasarkan kerangka konsep diatas, hewan coba berupa tikus jantan strain wistar diberikan terapi preventif dengan menggunakan ekstrak daun dewandaru yang mengandung flavonoid dan tanin melalui sonde lambung selama 7 hari. Flavonoid merupakan antioksidan eksogen yang memiliki gugus hidroksil yang terikat pada karbondioksida sehingga dapat menangkap radikal bebas dengan menyumbangkan satu atom hidrogen, selain itu flavonoid juga dapat melibatkan kemampuan Nrf2 (*Nuclear factor like 2*) dalam meningkatkan aktifasi antioksidan enzimatis endogen. Tanin pada ekstrak daun dewandaru berfungsi sebagai anti bakteri dengan mencegah *E. coli* melakukan perlekatan pada epitel usus sehingga *E. coli* tidak dapat melakukan koloni di epitel usus, akan tetapi *E. coli* yang berhasil lolos dari tanin akan melakukan koloni pada permukaan sel mukosa usus dan berproliferasi pada seluruh bagian usus, bakteri yang telah berhasil berkoloni dan melakukan perlekatan pada usus tahan terhadap barrier pada saluran pencernaan seperti enzim, pH dan peristaltik usus sehingga koloni bakteri ini akan menyebar sampai ke kolon.

E. coli memiliki enterotoksin yang disekresikan ke dalam lumen usus, sehingga dapat merangsang epitel usus dalam mensekresi cairan tubuh dan elektrolit secara berlebihan. *E.coli* merupakan bakteri gram negatif yang memiliki ciri khas yaitu selain memiliki enterotoksin juga memiliki endotoksin berupa Lipopolisakarida (LPS) yang terletak pada dinding selnya, LPS akan disekresikan oleh *E. coli* ketika bakteri tersebut lisis. Endotoksin yang dihasilkan akan merusak epitel pada saluran pencernaan yang kemudian dapat masuk ke dalam aliran darah dan akan terbawa ke organ lain.

LPS akan berikatan dengan LBP yang merupakan protein dalam plasma membentuk ikatan LPS-LBP, fungsi dari LBP adalah mengefektifkan ikatan antara LPS dengan reseptor spesifik. Kompleks LPS-LBP akan mentransfer LPS menuju CD14 yang merupakan reseptor spesifik dari LPS dan terdapat pada permukaan sel makrofag yang kemudian akan berinteraksi dengan TLR-4 untuk mengirim sinyal ke nukleus dan menyebabkan aktivasi dari NF- κ B yang merupakan faktor transkripsi yang memicu produksi sitokin dan kemokin. Aktivasi dari NF- κ B akan mengaktifkan sel-sel fagositosis. Aktivasi dari sel fagositosis kemudian akan mengeluarkan mediator inflamasi seperti TNF- α , IL-1, IL-6, sehingga akan mengakibatkan inflamasi jaringan. Makrofag juga mensekresikan enzim ekstraseluler yang berfungsi membersihkan jaringan nekrotik pada daerah luka, enzim ini dikenal sebagai substansi *Matrix metalloproteases* (MMP). Makrofag juga mengaktifasi *Growth Factor* dimana ligan berikatan dengan reseptor pada permukaan sel, sehingga dapat menimbulkan respon seluler seperti angiogenesis. Kedua enzim ini berperan penting dalam kesembuhan luka dan akan mengurangi kerusakan jaringan. Proses fagosit juga berpengaruh dalam menghasilkan radikal bebas, aktivitas fagosit dapat melalui proses oksigen dependen atau oksigen independen. Proses oksigen independen adalah proses yang melibatkan lisozim, laktoferin dan enzim proteolitik, sedangkan proses oksigen dependen membutuhkan ROI (*Reactive Oxygen Intermediate*). Ketika fagolisosom, reseptor pengikat mikroba mengaktifkan beberapa enzim salah satunya enzim oksidase fagosit. Enzim ini mengubah oksigen menjadi ROI yaitu anion superoksid, radikal bebas dan H₂O₂.

Radikal bebas yang diproduksi dalam jumlah yang normal penting untuk fungsi biologis. Adanya radikal bebas yang masuk akan dinetralkan oleh antioksidan endogen di dalam tubuh yaitu enzim *Superoxide Dismutase* (SOD). Namun dalam keadaan tertentu produksi radikal bebas melebihi sistem pertahanan tubuh, sehingga akan mengganggu oksidasi fosforilasi yang kemudian akan meningkatkan produksi ROS, kondisi ini disebut stress oksidatif. Pada kondisi stress oksidatif imbalan normal antara produksi radikal bebas dan antioksidan alami tubuh yang mengeliminasi mengalami gangguan sehingga menyebabkan kerusakan oksidatif jaringan atau sel-sel yang menyusun organ seperti kolon.

Pemberian ekstrak daun dewandaru yang mengandung flavonoid diharapkan dapat berperan sebagai antioksidan eksogen untuk meningkatkan aktifitas antioksidan yang ada dalam tubuh dengan menangkap radikal bebas dan menyumbangkan 1 atom hidrogen, sehingga dapat menstabilkan ROS dan dapat meningkatkan aktivitas enzim *Superoxide dismutase* (SOD), serta mencegah terjadinya kerusakan jaringan kolon.

3.2 Hipotesis Penelitian

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

1. Pemberian ekstrak daun dewandaru (*Eugenia uniflora L*) sebagai preventif gastroenteritis pada tikus (*Rattus norvegicus*) hasil induksi *E. coli* dapat meningkatkan aktivitas enzim *Superoxide dismutase* (SOD) kolon tikus (*Rattus norvegicus*) model gastroenteritis hasil induksi *E. coli*.
2. Pemberian ekstrak daun dewandaru (*Eugenia uniflora L*) sebagai preventif gastroenteritis pada tikus (*Rattus norvegicus*) hasil induksi *E. coli* dapat

mencegah kerusakan organ kolon, berdasarkan gambaran histopatologi kolon tikus (*Rattus novergicus*) model gastroenteritis hasil induksi *E. coli*.



BAB IV METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei s/d Juni 2017. Pembuatan ekstrak daun dewandaru dilakukan di Laboratorium UPT Meteria Medica, Kota Batu. Pemeliharaan hewan coba dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pemeriksaan kadar SOD dilakukan di Laboratorium Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan histopatologi jaringan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.2 Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang tikus, botol minum tikus, sekam, spuit 1 cc, timbangan digital, blender, *erlenmeyer*, alat sonde, alat bedah, mikropipet 10-100 μm , *yellow tip*, *blue tip*, *cover glass*, *object glass*, inkubator, lemari pendingin, mikrotom, plastik klip, cawan petri, evaporator, kamera, pot organ, spektrofotometer, papan bedah, sarung tangan, masker, *disposable syringe* 1 cc dan 3 cc, *microtube*, *vortex*, *sentrifus*, kertas saring, kapas, *tissue*, *timer*, mikroskop cahaya, *autoclave*, kertas label, spidol marker, botol larutan.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi tikus putih (*Rattus novergicus*) berumur 8-12 minggu dengan berat 150-200 gram, daun dewandaru (*Eugenia uniflora*), makanan dan minuman hewan coba, bakteri *E. coli*, *bufer natrium karbonat*, aquades, ethanol, *xantin*, *xantin oksidase*, NBT, PBS, alkohol 96%.

4.3 Tahapan Penelitian

4.3.1 Penetapan Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan coba berupa tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan strain wistar berumur 8-12 minggu dengan berat 150-200 gram. Hewan coba diaklimatisasikan selama tujuh hari di laboratorium untuk adaptasi tempat dan suhu. Hewan coba harus dalam keadaan sehat (berambut cerah, aktivitas baik, nafsu makan dan minum baik, defekasi dan urinasi baik dan tidak ada abnormalitas anatomis), lulus sertifikasi etik penelitian, dan belum pernah digunakan untuk penelitian. Sedangkan, untuk daun dewandaru yang dipakai sebaiknya berasal dari daerah malang. Estimasi besar sampel dilakukan penghitungan dengan menggunakan rumus Fereder (Kusriningrum, 2008).

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

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan:

t : jumlah kelompok perlakuan

n : jumlah ulangan yang diperlukan

Dari perhitungan diatas maka didapatkan hasil untuk 5 macam perlakuan dibutuhkan jumlah tikus putih (*Rattus novergicus*) minimal sebanyak 4 ekor dalam setiap kelompok perlakuan.

4.3.2 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan studi eksperimental sengan pengambilan data menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), yaitu kegiatan percobaan yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh yang timbul sebagai akibat dari adanya

perlakuan tertentu. Hewan coba dibagi menjadi lima kelompok perlakuan yaitu kelompok A sebagai kontrol negatif, kelompok B sebagai kontrol positif, kelompok perlakuan terapi dibagi menjadi kelompok C dengan dosis 300mg/kg BB, kelompok D dengan dosis 400mg/kg BB dan kelompok E dengan dosis 500 mg/kg BB (Utami, 2007). Kelompok penelitian ditunjukkan dalam **Tabel 4.1** sebagai berikut :

Tabel 4.1 Rancangan Kelompok Penelitian

Kelompok Perlakuan	Keterangan
A (Negatif)	Tikus sehat tanpa diberikan perlakuan infeksi <i>E. coli</i> dan ekstrak daun dewandaru
B (Positif)	Tikus yang diinfeksi <i>E. coli</i> 10 ⁶ CFU/mL per ekor per hari selama 7 hari menggunakan sonde lambung dan tanpa diberikan ekstrak daun dewandaru
C	Tikus yang diberikan ekstrak daun dewandaru 300 mg/kg BB selama 7 hari dan diinfeksi <i>E. coli</i> 10 ⁶ CFU/mL per ekor per hari pada hari ke-8 menggunakan sonde lambung selama 7 hari
D	Tikus yang diberikan ekstrak daun dewandaru 400 mg/kg BB selama 7 hari dan diinfeksi <i>E. coli</i> 10 ⁶ CFU/mL per ekor per hari pada hari ke-8 menggunakan sonde lambung selama 7 hari
E	Tikus yang diberikan ekstrak daun dewandaru 500 mg/kg BB selama 7 hari dan diinfeksi <i>E. coli</i> 10 ⁶ CFU/mL per ekor per hari pada hari ke-8 menggunakan sonde lambung selama 7 hari

4.4 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

- Variabel bebas : Dosis ekstrak daun dewandaru (*Eugenia uniflora*) dan *E. coli*
- Variabel terikat : Kadar *Superoxide dismutase* (SOD) dan histopatologi kolon
- Variabel kontrol : Homogenitas tikus (berat badan, umur dan jenis kelamin), kondisi kandang, pakan, suhu

4.5 Tahapan Penelitian

4.5.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus (*Rattus novergicus*) putih jantan berumur 8-12 minggu dengan berat 150-200 gram (Astawan dkk, 2011). Sebelum dilakukan untuk penelitian semua tikus diaklimatisasi terlebih dahulu. Tujuan dari aklimatisasi adalah untuk membiasakan tikus dengan lingkungan baru agar tidak terjadi stress (Permawati, 2008). Tikus dibagi dalam lima kelompok perlakuan. Setiap kelompok perlakuan minimal terdapat 4 ekor tikus. Tikus ditempatkan dalam kandang berupa bak plastik dengan penutup kawat dengan ukuran 30 cm x 50 cm x 10 cm dengan alas berupa sekam padi agar kandang tidak lembab.

Kandang tikus ditempatkan pada daerah bebas dari suara bising dan terhindar dari asap industri maupun polutan lainnya. Semua tikus diberi pakan secara teratus dan air minum ad libitum. Pakan yang diberikan pada tikus berupa ransum dengan komposisi sesuai standard yang terdiri atas karbohidrat, lemak, protein, mineral dan vitamin. Kebutuhan pakan seekor tikus setiap hari adalah 10% dari bobot tubuhnya.

4.5.2 Prosedur Pembuatan Ekstrak Daun Dewandaru (*Eugenia uniflora*)

Prosedur pembuatan ekstrak daun dewandaru (*Eugenia uniflora*) adalah dengan melakukan proses preparasi meliputi tahap penyimpanan bahan baku dan ekstraksi. Daun dewandaru yang akan digunakan dibersihkan dari kotoran dan debu menggunakan air kemudian dibilas dengan akuades. Setelah itu dilakukan penirisan dan pengeringan untuk mengurangi kadar air pada daun dewandaru agar reaksi enzimatik dapat dihentikan dan daun tidak mudah rusak. Daun yang telah kering kemudian dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk, kemudian diayak menggunakan ayakan 20 mesh. Pada tahap ekstraksi menggunakan metode maserasi, dimulai dengan menimbang serbuk daun dewandaru sebanyak 100 gram. Kemudian dilakukan perendaman dengan pelarut etanol 70% secukupnya. Etanol 70% efektif dalam menghasilkan jumlah bahan aktif yang optimal, dimana bahan pengganggu dalam cairan pengestraksi jumlahnya relatif kecil. Keuntungan lain penggunaan etanol sebagai pelarut adalah etanol mampu menghambat kerja dari enzim (Indraswari, 2008). Serbuk dewandaru yang telah ditambahkan pelarut kemudian dimasukkan ke dalam toples, diratakan, dan ditambahkan pelarut etanol 70% hingga serbuk terendam (pelarut yang digunakan minimal 2 kali berat serbuk). Toples ditutup selama 24 jam dan di shaker digital 50 rpm dengan tujuan untuk homogenisasi.

Ekstrak cair yang didapatkan disaring dengan penyaring kain dan ditampung ke dalam erlenmeyer. Dilakukan remaserasi sebanyak dua kali pada ampas dengan cara memasukkan kembali ke dalam toples dan ditambah pelarut sampai terendam (minimal 5 cm di atas permukaan serbuk). Dibiarkan semalam

atau 24 jam diatas shker 50 rpm. Hasil shaker pertama dan terakhir dijadikan satu kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* selama dua jam. Serbuk daun dewandaru sebanyak 100 g yang diekstraksi dengan pelarut etanol 70% sebanyak 1 L didapatkan hasil ekstrak sebanyak 20 mL, kemudian ekstrak daun dewandaru disuspensikan ke dalam akuades hingga 100 mL (Materia medica, 2017).

4.5.3 Pembuatan Model Hewan Coba Gastroenteritis

Seluruh tikus yang sudah diadaptasikan pada hari pertama hingga ke tujuh, dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan. Masing-masing kelompok perlakuan terdiri atas minimal 4 ekor tikus. Kemudian seluruh tikus diberi tanda atau label pada ekornya dengan menggunakan spidol tahan air sesuai kelompoknya.

A. Pembuatan Suspensi Bakteri

E. coli yang digunakan pada penelitian ini adalah jenis *E. coli* patogen dengan konsentrasi bakteri 10^6 CFU/mL. *E. coli* yang sudah dibiakkan diambil dengan ose steril, lalu disuspensikan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 mL larutan NaCl 0,9% sampai didapat konsentrasi bakteri yang sama dengan larutan Mc. Farland no 1 yaitu setara dengan 3×10^8 CFU/mL. Kemudian dilakukan pengenceran dengan mengambil 1 mL suspensi bakteri (10^8 CFU/mL), dimasukkan ke dalam tabung steril dan ditambahkan larutan NaCl 0,9% sebanyak 9 mL dan dikocok hingga homogen agar didapat suspensi bakteri 10^7 CFU/mL, kemudian diulang langkah tersebut untuk mendapatkan konsentrasi bakteri 10^6 CFU/mL (Oonmett *et al*, 2005)

B. Pembuatan Hewan Model Gastroenteritis

Suspensi *E. coli* 10⁶ CFU/mL diberikan kepada tiap tikus kelompok B, C, D, E setiap hari selama 7 hari dengan cara sonde lambung (Astawan dkk, 2011).

4.5.4 Pemberian Ekstrak Daun Dewandaru

Metode pemberian ekstrak daun dewandaru dilakukan secara peroral dengan menggunakan sonde lambung. Pemberian ekstrak daun dewandaru diberikan kepada hewan coba selama 7 hari sebelum diinduksi *E. coli* patogen selama 7 hari. Ekstrak daun dewandaru diberikan pada kelompok C, D, E dengan masing-masing berturut-turut 300 mg/kg BB, 400 mg/kg BB, 500 mg/kg BB (BPOM, 2014). Ekstrak daun dewandaru diberikan satu hari sekali. Perhitungan dosis pada **Lampiran 1**.

4.5.5 Isolasi Kolon

Pengambilan organ kolon pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) dilakukan pada hari ke-23 setelah dilakukan proses adaptasi, pemberian ekstrak buah dewandaru, dan induksi *E. coli* selesai diberikan. Pada pengambilan organ proses pertama yang dilakukan adalah dislokasi hewan coba pada bagian leher, kemudian hewan coba ditelentangkan pada papan pembedahan. Pembedahan dilakukan pada bagian abdomen. Bagian organ kolon diambil dan dibilas dengan NaCl fisiologis 0,9%, kemudian organ kolon dimasukkan ke dalam larutan PFA 4% (Permata, 2015).

4.5.6 Pengukuran Kadar SOD

Pengukuran SOD dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-1601. Organ kolon dipotong dan

dilarutkan pada cairan fisiologis untuk analisa kadar SOD. Prinsip dari spektrofotometer adalah penyerapan cahaya oleh molekul-molekul. Panjang gelombang bergantung dari kekuatan absorbansi molekul tersebut. Nilai absorbansi dibaca menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum (580nm) (Pradana dkk, 2014).

4.5.7 Pembuatan Preparat Histopatologi Kolon

Pembuatan preparat meliputi proses dehidrasi, penjernihan (*Clearing*), infiltrasi parafin, penanaman jaringan (*Embedding*), dan *sectioning*. Organ kolon didehidrasi menggunakan alkohol bertingkat dari konsentrasi 70%, 80%, 90% dan 95%. Dehidrasi berfungsi untuk mengeluarkan air dari jaringan. Selanjutnya dilakukan proses penjernihan dalam *xylol* I (20 menit) dan *xylol* II (30 menit). Penjernihan dilakukan untuk mengeluarkan alkohol dari jaringan agar dapat berikatan dengan parafin. Tahap selanjutnya adalah infiltrasi yang dilakukan dalam parafin cair. Infiltrasi parafin berfungsi menggantikan kedudukan dehidran dalam jaringan dan bahan penjernih dengan parafin cair. Tahap selanjutnya adalah *embedding*, yaitu kolon dimasukkan ke dalam cetakan yang didalamnya diisi cairan parafin. Jaringan dimasukkan dalam parafin cair (1 jam didalam oven), dan selanjutnya didinginkan di dalam suhu 4°C. Blok parafin yang sudah membeku kemudian dipasang pada mikrotom dan diatur agar posisinya sejajar dengan pisau. Blok parafin dipotong dengan ketebalan 5 µm dan diletakkan pada gelas obyek atau disebut *sectioning*, kemudian dilakukan inkubasi dengan suhu 38-40°C selama 24 jam. Setelah inkubasi preparat diwarnai menggunakan *Hematoxilin Eosin* (HE) (Bancroft and Gamble, 2008).

Pewarnaan Hemaktosilin Eosin (HE) dilakukan untuk melihat morfologi jaringan kolon, pewarnaan dimulai dengan deparafinasi dengan menggunakan *xylol* dan rehidrasi dengan alkohol 96%, 90%, 80%, 70% secara berurutan masing-masing selama 5 menit. Kemudian sediaan dicuci dengan air mengalir selama 5 menit dan dilanjutkan dengan air aquades selama 5 menit. Setelah itu dilakukan pewarnaan yang dimasukkan ke dalam pewarna hemaktosilin selama 10 menit untuk memberi warna pada inti sel atau nukleus. Selanjutnya dicuci dengan air mengalir selama 5 menit dan dibilas dengan aquades, lalu dimasukkan kedalam pewarna eosin selama 5 menit untuk memberi warna merah pada sitoplasma sel. Selanjutnya preparat direndam dalam aquades untuk menghilangkan pewarna eosin yang masih menempel. Selanjutnya dilakukan dehidrasi dengan memasukkan ke dalam alkohol bertingkat dari 70%, 80%, 90% dan 95% untuk menghilangkan air dari jaringan. Selanjutnya dilakukan *clearing* dengan memasukkan preparat pada *xylol* I – II selama 5 menit dan dikeringkan, lalu dilakukan mounting menggunakan entelan dan ditutup cover glass (Jusuf, 2009).

Pengamatan histopatologi kolon dilakukan menggunakan mikroskop cahaya Olympus BX51 dengan 5 lapang pandang dan menggunakan perbesaran 100x – 400x. Pengamatan dilihat pada lapisan mukosa serta tanda-tanda adanya infiltrasi sel radang dan kerusakan mukosa epitel (Wresdiyati dkk, 2013).

4.6 Analisa Data

Analisa data preparat histopatologi kolon diamati secara deskriptif, sedangkan untuk kadar SOD menggunakan uji One Way ANOVA (Analysis of

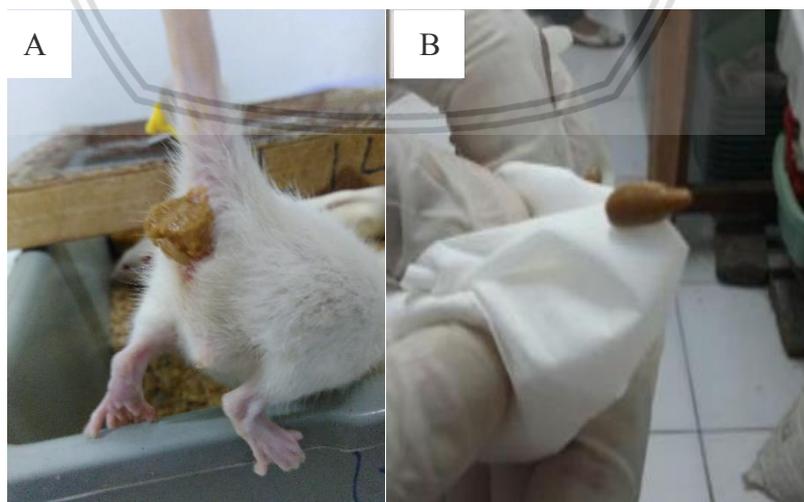
Varian) dan dilanjutkan Uji Beda Nyata Jujur (BNJ) dengan taraf kepercayaan sebesar 95% ($\alpha = 0,05$) apabila hasil analisis ragam berpengaruh nyata.



BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil Infeksi *E. coli* pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Hasil infeksi *E. coli* 10^6 CFU/mL pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) mengakibatkan timbulnya beberapa gejala klinis yang menciri pada kondisi gastroenteritis. Gejala klinis yang terlihat adalah berupa diare dan penurunan berat badan. Pada tikus kontrol positif didapatkan kondisi feses menjadi lembek serta memiliki warna coklat muda jika dibandingkan dengan kontrol negatif yang memiliki konsistensi feses lebih keras dan warnanya coklat tua **Gambar 5.1**. Diare dapat terjadi karena bakteri *E. coli* melakukan penempelan pada lapisan mukosa usus, lalu melakukan invasi pada mukosa. Keadaan ini dapat mengakibatkan peningkatan sekresi usus dan penurunan absorpsi dari usus. Mekanisme terjadinya diare akibat bakteri meliputi penempelan bakteri pada sel epitel dengan atau tanpa kerusakan mukosa, invasi mukosa dan produksi enterotoksin, sehingga akan mengakibatkan peradangan pada usus dengan masa inkubasi bakteri *E. coli* 3-9 hari. (Zein dkk, 2004).



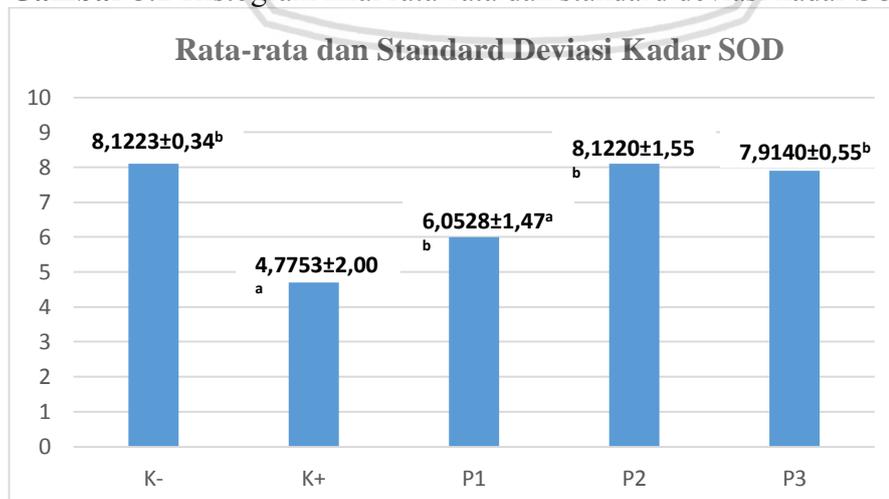
Gambar 5.1 (A) konsistensi feses pada tikus kontrol positif yang mengalami diare terlihat lebih lembek, (B) feses pada tikus kontrol negatif terlihat lebih padat

Selain itu, pada tikus kontrol positif juga mengalami penurunan berat badan setelah diinduksi *E. coli*, dibandingkan dengan kelompok tikus kontrol negatif seperti pada **Lampiran 5.1**. Hal ini disebabkan karena *E. coli* mengganggu sistem pencernaan sehingga nutrisi tidak diserap sempurna oleh tubuh.

5.2. Efek Preventif Pemberian Ekstrak Daun Dewandaru (*Eugenia uniflora*) Terhadap Kadar *Superoxide Dismutase* (SOD) Kolon Tikus Model Gastroenteritis

Superoksida dismutase (SOD) merupakan enzim yang mengkatalis anion superoksida yang sangat reaktif menjadi oksigen dan senyawa yang tidak terlalu reaktif seperti hidrogen peroksida. Enzim SOD memegang peranan penting sebagai antioksidan endogen. Berdasarkan dari mekanismenya enzim ini digolongkan sebagai antioksidan primer yang berperan mengurangi pembentukan radikal bebas baru dengan memutus reaksi berantai dan mengubah menjadi produk lebih stabil (Nurwati, 2002). Hal ini dapat dilihat pada hasil histogram rata-rata dan standard deviasi kadar SOD pada **Gambar 5.2**.

Gambar 5.2 Histogram nilai rata-rata dan standard deviasi kadar SOD.



Keterangan: K-: Kontrol Negatif, K+: Kontrol Positif, P1: Preventif dosis 300mg/kg BB, P2: Preventif dosis 400mg/kg BB, P3: Preventif dosis 500mg/kg BB.

Hasil penelitian pada histogram tersebut menunjukkan rata-rata kadar SOD pada tiap kelompok perlakuan, dimana pada P1 yang merupakan kelompok perlakuan dosis 300mg/kg BB memiliki kadar SOD terendah dan mendekati kelompok kontrol positif. Kelompok P2 (preventif dosis 400mg/kg BB) dan P3 (preventif dosis 500mg/kg BB) memiliki kadar SOD yang mendekati kelompok kontrol negatif dan lebih tinggi jika dibandingkan dengan perlakuan 1 dan kontrol positif. Hal ini menunjukkan pemberian ekstrak daun dewandaru efektif dalam meningkatkan kadar SOD, dimana pada grafik menunjukkan perlakuan 1 dan perlakuan 2 sama tingginya dengan kontrol negatif.

Berdasarkan hasil uji normalitas dan homogenitas didapatkan data terdistribusi normal dan homogen, sehingga dapat dilanjutkan uji statistik OneWay ANOVA dengan SPSS 22.0 dan uji BNJ dengan tingkat signifikansi $p < 0,05$, didapat data seperti pada **Tabel 5.1**. Data pengujian statistik pada **Lampiran 6**

Tabel 5.1 Rata-rata dan standard deviasi kadar SOD uji tukey

Perlakuan	Rata-rata kadar SOD ($\mu\text{g/mL}$) \pm SD	Kadar SOD (%)	
		Peningkatan terhadap kontrol positif	Penurunan terhadap kontrol negatif
Kontrol negatif (-)	8,1223 \pm 0,34 ^b	-	-
Kontrol positif (+)	4,7753 \pm 2,00 ^a	-	41, 25%
Perlakuan 1	6,0528 \pm 1,47 ^{ab}	26, 83%	-
Perlakuan 2	8,1220 \pm 1,55 ^b	70, 27%	-

Perlakuan 3	7,9140±0,55 ^b	68, 29%	-
----------------	--------------------------	---------	---

Keterangan: notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata antar perlakuan ($p < 0,05$)

Berdasarkan hasil uji aktivitas SOD diatas dapat dilihat adanya perbedaan yang nyata antara kelompok kontrol negatif ($8,1223 \pm 0,34$) dan kontrol positif ($4,7753 \pm 2,00$). Hal ini ditunjukkan dengan nilai aktivitas SOD yang memuat notasi berbeda nyata. Kelompok perlakuan dosis 300 mg/kg BB ($6,0528 \pm 1,47$) tidak berbeda nyata terhadap kontrol positif, sedangkan kadar SOD kelompok perlakuan 400 mg/kg BB ($8,1220 \pm 1,55$) dan kelompok perlakuan 500 mg/kg BB ($7,9140 \pm 0,55$) berbeda nyata dengan kontrol positif.

Menurut Ariadini (2007). Enzim SOD merupakan enzim yang berperan mengkatalis dismutase radikal superoksida (O_2^-) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) dan oksigen (O_2). Dalam melawan radikal bebas kerja dari enzim SOD dibantu oleh dua enzim yang lain, yaitu katalase dan glutathion (GSH) peroksidase, kerja dari dua enzim ini adalah dengan mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen. Aktivitas enzim SOD memegang peran penting dalam sistem pertahanan tubuh, terutama terhadap senyawa oksigen reaktif yang dapat menyebabkan stress oksidatif, sehingga kondisi stress oksidatif akibat radikal bebas dapat dihindari.

Pada kelompok kontrol positif terdapat penurunan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif sebesar 41, 25 % setelah diberikan induksi *E. coli*. Hal tersebut menunjukkan bahwa induksi *E. coli* yang diberikan pada perlakuan tersebut dapat menyebabkan penurunan aktivitas dari SOD pada kondisi gastroenteritis berdasarkan pemeriksaan kadar SOD. Menurunnya kadar SOD pada

kontrol positif disebabkan karena adanya kerusakan kolon yang disebabkan infeksi dari *E. coli*. Bakteri *E. coli* merupakan bakteri gram negatif yang memiliki endotoksin berupa LPS. Menurut Widjaja (2011), LPS bersama dengan protein LBP akan berikatan dengan CD14 yang merupakan dari makrofag. Adanya ikatan antara LPS dan CD14 kemudian akan berinteraksi dengan TLR-4 untuk mengaktivasi NF- κ B dan sitokin inflamatori. Produksi dari sitokin yang meningkat dapat mengaktifkan sel fagosit. Sel-sel fagosit akan menuju ke tempat infeksi untuk menghancurkan LPS dengan melakukan proses fagositosis. Proses fagositosis akan merangsang pemakaian oksigen yang diikuti oleh peningkatan radikal bebas yang dapat merusak membran.

Menurut Astuti (2008), peningkatan radikal bebas dalam tubuh akan meningkatkan pemakaian enzim antioksidan intrasel sehingga terjadi penurunan aktivitas enzim SOD yang merupakan salah satu antioksidan endogen dalam tubuh. Ketidakseimbangan antara radikal bebas dan sistem pertahanan antioksidan mengakibatkan proses detoksifikasi oleh antioksidan akan menurun atau terganggu. Oleh karena itu diperlukan adanya antioksidan eksogen pada tubuh seperti flavonoid yang dapat membantu kerja dari enzim SOD sehingga dapat mencegah penurunan kadar SOD.

Hasil rata-rata kadar SOD kolon pada kelompok preventif dosis 300 mg/kg BB tidak berbeda nyata dengan kelompok kontrol positif. Hal ini menunjukkan bahwa preventif ekstrak daun dewandaru (*Eugenia uniflora*) perlakuan dosis 300 mg/kg BB belum dapat meningkatkan kadar SOD tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang mengalami gastroenteritis. Hasil rata-rata kadar SOD kolon pada kelompok

preventif dosis 400 mg/kg BB dan 500 mg/kg BB berbeda nyata dengan kelompok kontrol positif, hal ini menunjukkan bahwa preventif ekstrak daun dewandaru dosis 400 mg/kg BB dan 500 mg/kg BB dapat meningkatkan kadar SOD tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang mengalami gastroenteritis.

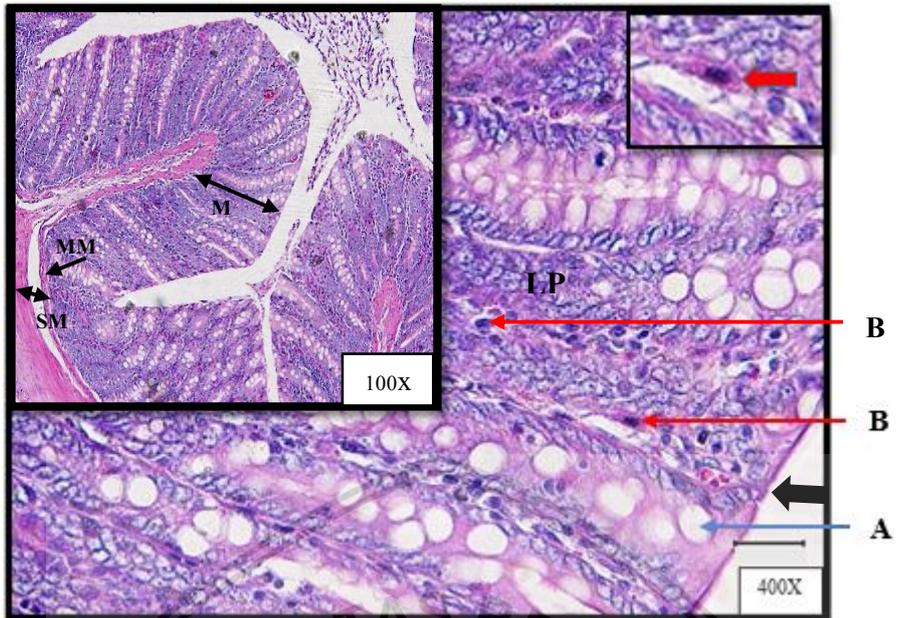
Hasil penelitian dosis 400 mg/kg BB dan 500 mg/kg BB adalah dosis yang sesuai untuk mencegah penurunan kadar SOD tikus putih pada kondisi gastroenteritis. Hal ini dapat terjadi dikarenakan senyawa atau bahan aktif yang terkandung dalam ekstrak daun dewandaru yang berperan sebagai antioksidan. Kandungan bahan aktif berupa flavonoid yang dapat membantu aktivitas SOD karena flavonoid memiliki aktivitas antioksidan dengan cara mendonorkan elektron kepada radikal bebas. Menurut Indraswari (2008), efek flavonoid terhadap bermacam-macam organisme sangat banyak macamnya, diantaranya flavonoid merupakan senyawa pereduksi yang baik, menghambat banyak reaksi oksidasi baik secara enzim maupun non enzim. Flavonoid merupakan penampung yang baik bagi radikal hidroksi dan superoksida melindungi membran lipid terhadap reaksi yang merusak. Menurut Aripasha, dkk (2015), mekanisme flavonoid dalam fungsinya dibagi menjadi dua yaitu flavonoid berperan sebagai pengikat ROS, mengaktivasi antioksidan enzimatik dan menghambat oksidase, serta flavonoid dapat melibatkan kemampuan Nrf2 (*Nuclear factor like 2*) dalam meningkatkan aktivasi antioksidan enzimatik endogen.

Menurut Hidayati, dkk (2008), efek flavonoid sebagai antioksidan secara tidak langsung juga mendukung efek antiinflamasi flavonoid. Keberadaan radikal bebas dapat menarik berbagai mediator inflamasi. Flavonoid dapat menstabilkan

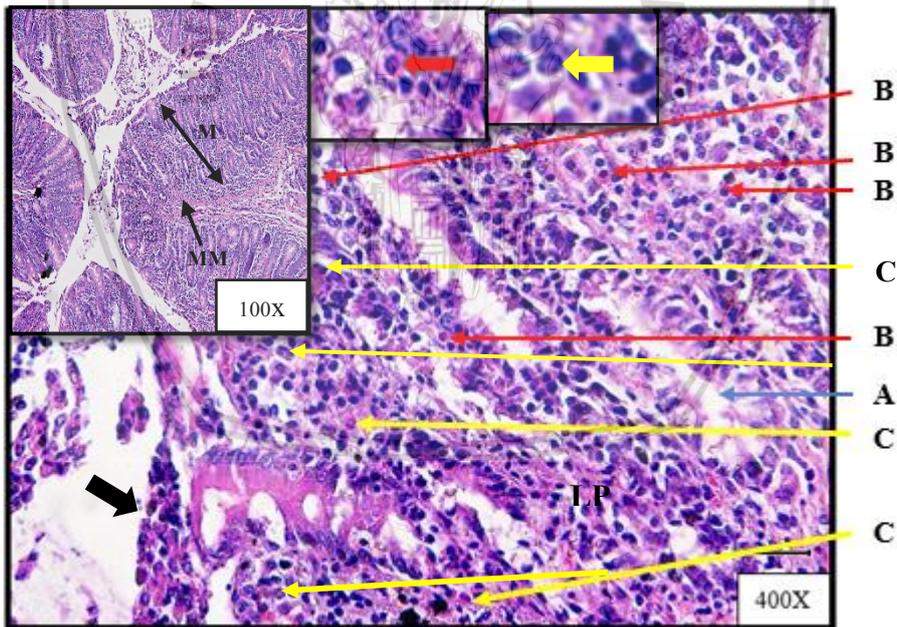
ROS melalui reaksi dengan senyawa reaktif dari radikal sehingga radikal menjadi inaktif. menurut Sukmawati (2015) mekanisme flavonoid sebagai antiinflamasi adalah dengan menghambat enzim lipooksigenase yang berperan dalam biosintesis leukotrien. Flavonoid juga berperan dalam menghambat sekresi enzim lisosom yang merupakan mediator inflamasi, sehingga dapat menghambat proliferasi proses radang.

5.3 Efek Preventif Ekstrak Daun Dewandaru Terhadap Histopatologi Kolon Tikus Model Gastroenteritis

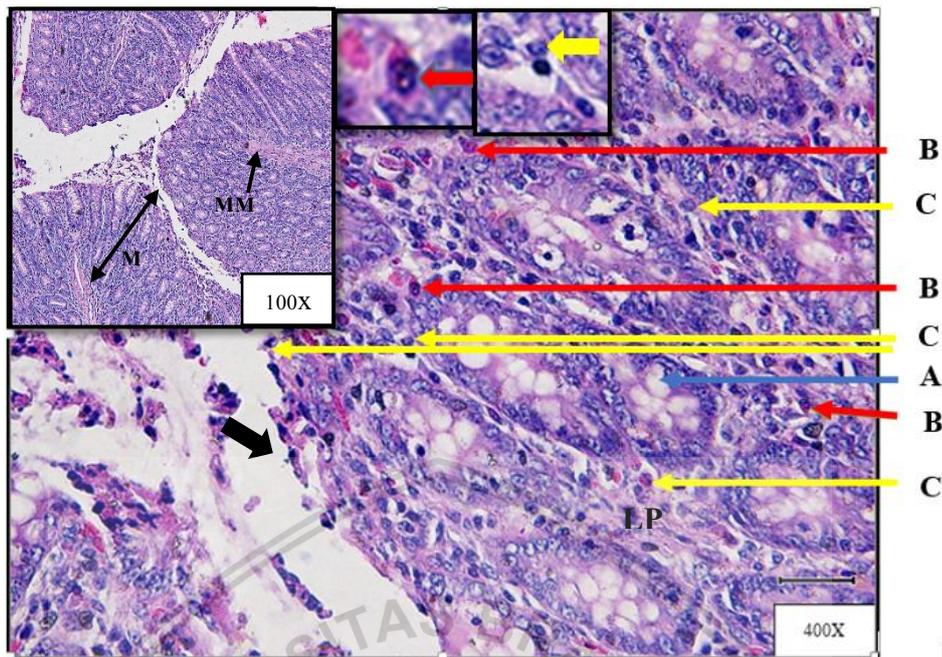
Hasil histopatologi kolon dianalisa secara deskriptif menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 40x dan 400x, untuk melihat efektifitas dari ekstrak daun dewandaru sebagai preventif gastroenteritis pada tikus yang diinfeksi *E. coli*. Kelompok tikus pada penelitian ini dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan yaitu kelompok tikus kontrol negatif (-) yang tanpa diberi perlakuan apapun, kelompok tikus kontrol positif (+) yang diinduksi *E. coli* 10^6 CFU/mL selama 7 hari, dan kelompok perlakuan (P1, P2 dan P3) yang diberi preventif dengan dosis (300, 400 dan 500mg/kg BB) selama 7 hari dan kemudian diinduksi dengan *E. coli* 10^6 CFU/mL selama 7 hari, setelah itu dilakukan euthanasi dan organ kolon dipreparasi menggunakan pewarnaan *Hematoxyline Eosin*, lalu dilihat adanya infiltrasi sel radang dan erosi sel epitel. Gambaran histologi kolon normal terdiri atas empat lapisan, yaitu mukosa, sub mukosa, muskularis eksterna dan serosa. Mukosa terdiri atas epitel kolumnar selapis, kelenjar intestinal, lamina propia dan muskularis mukosa (Eroschenko, 2003)



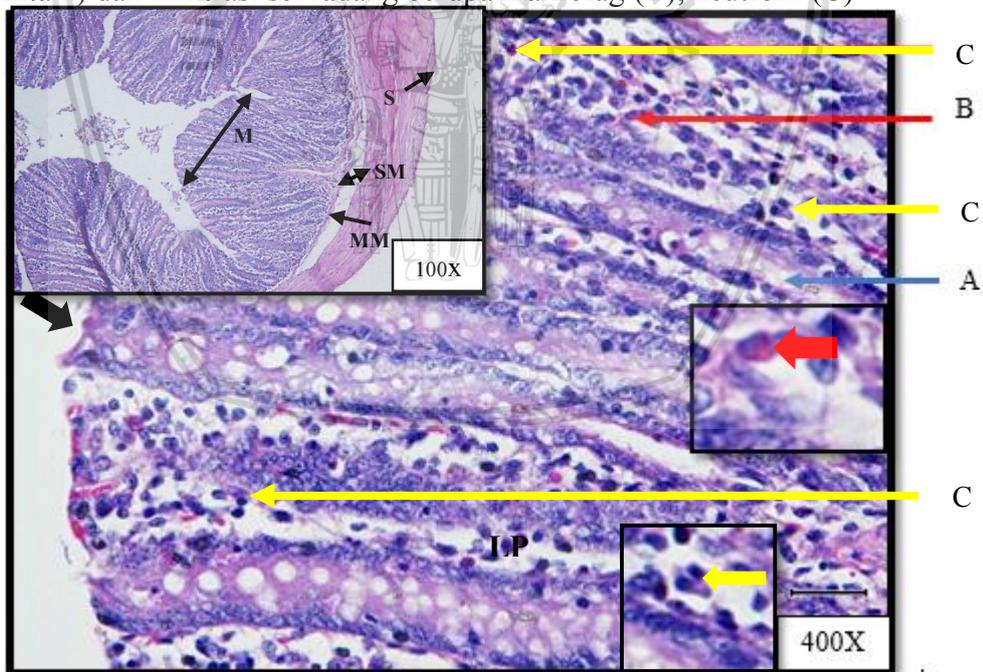
Gambar 5.3 Gambaran histopatologi kolon kontrol negatif perbesaran 100x dan 400x menggunakan pewarnaan HE, tidak terdapat erosi epitel (panah hitam), sel goblet (A) dan terlihat adanya sel radang berupa makrofag (B)



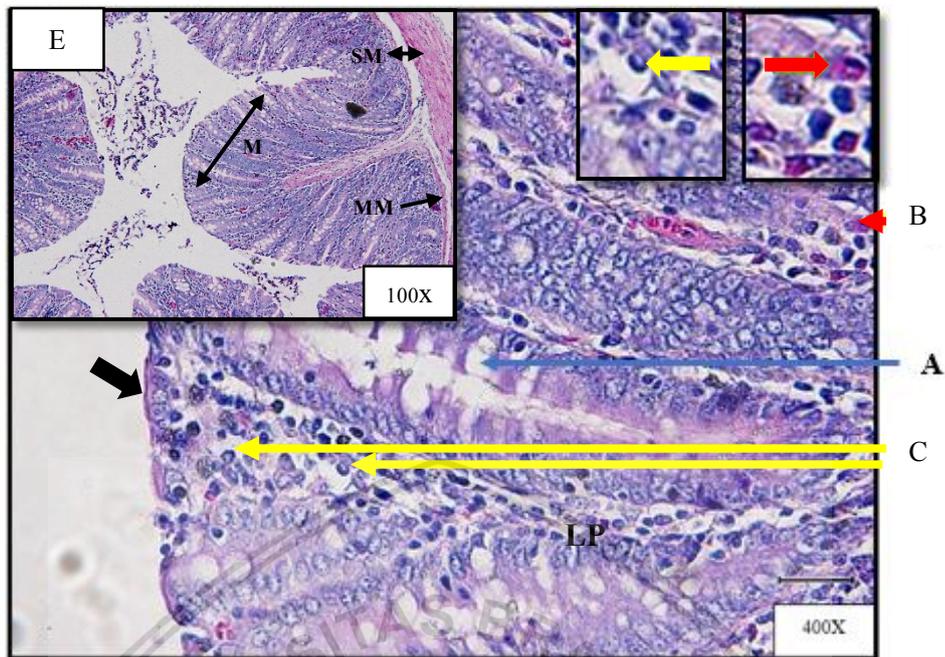
Gambar 5.4 Gambaran histopatologi kolon kelompok kontrol positif perbesaran 100x dan 400x menggunakan pewarnaan HE, sel goblet tidak tersusun rapi dan sel goblet hipertrofi (A), terdapat erosi epitel sehingga sel epitel tidak dapat terlihat (panah hitam) dan infiltrasi sel radang berupa makrofag (B), neutrofil (C)



Gambar 5.5 Gambaran histopatologi kolon kelompok preventif 300mg/kg BB dengan perbesaran 100x dan 400x menggunakan pewarnaan HE, sel goblet tersusun rapi (A), terdapat erosi epitel seperti pada kontrol positif (panah hitam) dan infiltrasi sel radang berupa makrofag (B), neutrofil (C)



Gambar 5.6 Gambaran histopatologi kolon kelompok preventif 400mg/kg BB dengan perbesaran 100x dan 400x menggunakan pewarnaan HE, terdapat sedikit erosi sel epitel (panah hitam), infiltrasi sel radang berupa neutrofil (C), makrofag (B) dan terlihat sel goblet yang tersusun rapi (A)



Gambar 5.7 Gambaran histopatologi kolon kelompok preventif 500mg/kg BB dengan perbesaran 100x dan 400x menggunakan pewarnaan HE, terlihat adanya sel goblet yang tersusun rapi (A), infiltrasi sel radang berupa makrofag (B), neutrofil (C) dan tidak terlihat adanya erosi epitel (panah hitam)

Keterangan: (M): Mukosa; (MM): Muskularis Mukosa;
(SM): Submucosa; (S): Serosa, dan (LP): Lamina Propria

Kelompok tikus kontrol negatif (-) menunjukkan gambaran histologi kolon normal, dimana terlihat tidak ada kerusakan pada sel epitel serta terdapat sel goblet pada mukosa seperti **Gambar 5.3**. Hal ini dikarenakan kelompok kontrol negatif atau tikus sehat tidak diberikan perlakuan apapun sehingga terlihat normal. Mukosa kolon memiliki sel epitel kolumnar selapis yang terdiri dari sel enterosit dan berfungsi untuk absorpsi dan juga ditemui adanya sel goblet yang berfungsi sebagai lubrikasi dan membuat barrier pada mukosa usus bersama dengan flora normal usus. Keberadaan sel radang pada mukosa kolon merupakan kondisi normal sebagai respon imun dalam memfagosit toksin yang tidak sengaja tertelan tubuh, namun jumlahnya relatif sedikit (Bacha *and* Linda, 2013)

Kelompok kontrol positif yang merupakan tikus yang diinduksi *E. coli* 10^6 CFU/mL selama 7 hari **Gambar 5.4** menunjukkan adanya erosi epitel dan terdapat infiltrasi sel radang meliputi makrofag dan neutrofil dengan jumlah yang banyak. Histopatologi kolon pada kontrol positif menunjukkan bahwa induksi *E. coli* menyebabkan infeksi organ kolon yang ditandai dengan konsistensi feses yang menjadi lembek. Kerusakan pada kolon akan mengakibatkan fungsi penyerapan pada usus besar terganggu.

Bakteri *E. coli* yang masuk tubuh mengakibatkan peningkatan jumlah *E. coli* di dalam kolon. Bakteri ini menghasilkan endotoksin berupa lipopolisakarida (LPS) dan akan dilepaskan ketika bakteri mengalami lisis. Infeksi ini dapat merusak epitel kolon dan menstimulus aktivitas makrofag untuk melakukan fagositosis sehingga akan terjadi peningkatan infiltrasi sel radang dan radikal bebas. Radikal bebas dalam tubuh secara normal akan diseimbangkan oleh antioksidan endogen yaitu *Superoxide Dismutase* (SOD), namun jika jumlahnya melebihi normal maka dapat menyebabkan kerusakan jaringan kolon (Droge, 2002). Radikal bebas yang tidak dan diseimbangkan oleh SOD akan mengikat elektron pada membran sel untuk menjadi netral, namun hal ini akan membuat sel-sel pada jaringan kolon menjadi lisis dan mengalami erosi sehingga terjadi kerusakan kolon (Bueno and Anna, 2013).

Bakteri *E. coli* juga dapat menghasilkan enterotoksin. Menurut Supar (1997) enterotoksin yang dihasilkan oleh *E. coli* dibagi menjadi dua yaitu toksin tidak tahan panas dan tahan panas. Toksin ini dapat memblokir absorpsi air pada usus dan merangsang sekresi cairan tubuh dan garam elektrolit sehingga menyebabkan

hewan menjadi diare dan dehidrasi. Menurut Kumar *et al* (2013) enterotoksin dapat mengaktivasi berbagai mediator inflamasi seperti komplemen dan sitokin. Mediator inflamasi akan menyebabkan vasodilatasi pembuluh darah serta meningkatkan permeabilitas pembuluh darah, sehingga sel inflamasi akan menuju jaringan usus yang terinfeksi.

Kelompok preventif dosis 300mg/kg BB **Gambar 5.5** menunjukkan masih terjadi erosi sel epitel, namun infiltrasi sel radang terlihat menurun jika dibandingkan dengan kontrol positif. Hal ini menunjukkan efek ekstrak daun dewandaru masih kurang efektif dalam mencegah kerusakan jaringan kolon. Kelompok preventif dosis 400mg/kg BB **Gambar 5.6** menunjukkan hasil yang lebih baik, meskipun masih terlihat adanya sedikit erosi epitel, namun jumlah infiltrasi sel radang yang terlihat seperti kontrol negatif dan preventif 300mg/kg BB. Kondisi ini terlihat mendekati kontrol negatif. Gambaran histopatologi kelompok preventif dosis 400mg/kg BB dan 500mg/kg BB **Gambar 5.7** menunjukkan gambaran histopatologi kolon yang paling mendekati kondisi normal atau kontrol negatif. Dimana sel epitel dan sel goblet tersusun rapi serta tidak adanya erosi epitel dan jumlah infiltrasi sel radang seperti kontrol negatif.

Kondisi pada perlakuan preventif 400mg/kg BB dan 500mg/kg BB adalah yang paling mendekati kondisi dari kontrol negatif. Hal ini dikarenakan efek dari senyawa flavonoid dan tanin yang terdapat pada ekstrak daun dewandaru. Flavonoid adalah senyawa yang terdapat pada daun dewandaru dan dapat sebagai antioksidan, antibakteri dan antiinflamasi. Mekanisme flavonoid sebagai antibakteri adalah membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan

terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri dan akan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler. Flavonoid juga dapat menyebabkan rusaknya susunan dan perubahan mekanisme permeabilitas dari dinding sel bakteri. Menurut Fauziah (2015) mekanisme kerja tanin sebagai antibakteri adalah dengan cara mengganggu permeabilitas sel bakteri, akibat terganggunya permeabilitas, sel tidak dapat melakukan aktivitas hidup sehingga akan mati, selain itu tanin juga dapat menghambat sintesis asam nukleat sehingga pertumbuhan bakteri terhambat. Senyawa tanin juga bersifat astringent, mekanismenya adalah dengan dengan menciutkan permukaan usus atau zat yang bersifat proteksi terhadap mukosa usus dan dapat menggumpalkan protein, oleh karena itu senyawa tanin dapat menghentikan diare.

BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Pemberian ekstrak daun dewandaru (*Eugenia uniflora*) dengan dosis 400mg/kg BB dan 500mg/kg BB merupakan dosis terbaik untuk mencegah penurunan kadar *Superoxide dismutase* (SOD) kolon dibandingkan dengan kontrol positif.
2. Pemberian ekstrak daun dewandaru (*Eugenia uniflora*) dengan dosis 400mg/kg BB dan 500mg/kg BB merupakan dosis terbaik untuk mencegah kerusakan histopatologi jaringan kolon dibandingkan dengan kontrol positif.

6.2 Saran

Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui dosis toksisitas ekstrak daun dewandaru (*Eugenia uniflora*) sebelum digunakan pada hewan model gastroenteritis

DAFTAR PUSTAKA

- Andriani. 2005. *Escherichia Coli* 0157 H:7 Sebagai Penyebab Penyakit Zoonosis. Balai Penelitian Veteriner. Bogor
- Anggraeni, F. W. 2010. Deteksi Keberadaan Antibodi Anti *Escherichia coli* di Dalam Serum Sapi Neonatus yang Diberi Kolostrum dengan Metode ELISA [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Arevaldo, F. 2014. Gastrointestinal and Liver Histopathology Atlas. <http://fer13013.blogspot.co.id/2014/08/colon-infectious-colitis-self-limited.html>. [17 Agustus 2017]
- Ariadini, S. W. 2007. Aktivitas Superoksida Dismutase dan Patologi Anatomi pada Hati Tikus dengan Perlakuan Parasetamol dan Suplemen Kelapa Kopyor [Skripsi]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Bogor
- Aripasha, A. 2015. Efek Dekokta Pulutan terhadap SOD dan MDA Serum pada Tikus Model DMT-2[Skripsi]. Fakultas Kedokteran Unisma
- Astawan, M., Wresdiyati, T. I. I, Arief dan E, Suhesti. 2011. Gambaran hematologi Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang diinfeksi *Escherichia coli* *Enteropatogenik* dan diberikan Probiotik. Media Peternakan: 7-13
- Astuti, Sussi. 2008. Isoflavon Kedelai dan Potensinya Sebagai Penangkap Radikal Bebas. Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian 14(2): 126-136
- Bacha, W. J., and Linda M. B. 2012. Color atlas of Veterinary Histology Third Edition. Wiley-Blackwell Publishing
- Bancroft, J. D., and Gamble, M. 2008. Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone. New York
- Biswas., Guignot, J. Servin, A. L. 2006. *Escherichia coli* Strains Colonising the Gastrointestinal Tract Infection Gut 49(1): 47-55
- Caramori, G. J., and A. Papi. 2004. Oxidants and Asthma. *Research Center on Asthma and COPD*. University of Ferrara. Italy. 59: 170-173
- Carvajal, A. 2011. Infection in Pigs due to Rotavirus. University of Leon. Spain
- Chotiah, S. 2012. Strategi Pengendalian Diare Bakterial pada Anak Sapi Potong. Balai Besar Penelitian Veteriner. Bogor

- Chow, C. M., Leung, A. K. C. Hon, K. L. 2010. Acute gastroenteritis : From Guideline to Real Life. *Clinical and Experimental Gastroenterology* 3: 97-112
- Clarkson, P. M., Thompson, H. S. 2000. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health. *J Clin Nutr Biochem*, 72: 637S-46S
- Droge, W. 2002. Free Radicals In The Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev*. 82: 47-95
- Elfridasari, D., Anita, M. S. Grariani, N. Rugayah, S. Viki, S. 2011. Perbandingan Kualitas Es di Lingkungan Universitas Al Azhar Indonesia dengan Restoran Fast Food di Daerah dengan Indikator Jumlah *Escherichia coli* Terlarut. Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Al Azhar Jakarta
- Eroschenko, V. P. 2003. Atlas Histologi di Fiore dengan Kolerasi Fungsional. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta
- Guyton, A. C., dan J. E. Hall. 2008. Buku Ajar Fisiologi Kedokteran. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta
- Herlambang, N. 2006. Pengaruh Penambahan Vitamin E pada Terapi Standard Stroke Iskemik Akut Terhadap Perbaikan Status Neurologis. Universitas Diponegoro. Semarang
- Hidayati, N. A., Listyawati, S dan Setyawan, A. D. 2008. Kandungan Kimia dan Uji Antiinflamasi Ekstrak Etanol *Lantana camara* pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Jantan. *Bioteknologi*5(1): 10-17
- Hill, M. 2017. Embryology Gastrointestinal Tract. https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Gastrointestinal_Tract_-_Colon_Histology. [17 Agustus 2017]
- Hutapea, J.R. 1994. Inventaris Tanaman Obat Indonesia. Departemen Kesehatan RI Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. Jakarta
- Indraswari, A. 2008. Optimasi Pembuatan Ekstrak Daun Dewandaru (*Eugenia uniflora*) Menggunakan Metode Maserasi dengan Parameter Kadar Total Senyawa Fenolik dan Flavanoid[Skripsi]. Fakultas Farmasi. Universitas Muhamadiyah Surakarta
- Kumar, V., Abbas, and A. K. Aster. 2013. Robbins Basic pathology. Elsevier saunders. Philadelphia. USA

- Kusriningrum. 2008. Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga Surabaya
- Mabruroh, A, I. 2015. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Tanin dari Daun Rumput Bambu (*Laphatherum gracile* Brongn)[Skripsi]. Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
- Mardisadora, O. 2010. Identifikasi dan Potensi Antioksidan Flavonoid Kulit Kayu Mahoni (*Swietenia macrophylla* King) [Skripsi]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor
- Maula, I, F. 2014. Uji Antifertilitas Ekstrak N-Heksana Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) pada Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*) Galur *sprague dawley* Secara In Vitro. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan. Jakarta
- Neilsen, F, Mikkelsen B.B, Nielsen J.B, Andersen H.R, dan Grandjean P, 2005. *Plasma Malondialdehyde as Biomarker for Oxidative Stress: Reference Interval and Effect of Life-style Factors. Journal Clinical Chemistry*, 43(7): 1209-1214.
- Ngajow, M, Jemmy, A, Vanda, S, K. 2013. Pengaruh Antibakteri Ekstrak Kulit Batang Matoa (*Pometia pinnata*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* secara In vitro. *Jurnal Mipa Unsrat Online* 2(2): 128-132
- Nurfitriya, R, S. 2007. Efek Antioksidan In Vitro Ekstrak bawang Putih, Kunyit, Jahe Merah, Mengkudu, Serta Beberapa Kombinasinya dan Ex Vivo Ekstrak Bawang Putih, Kunyit, dan Kombinasinya [Skripsi]. Program Studi Sains dan Teknologi Farmasi. Institut Teknologi Bandung
- Nurmasari, M. 2010. Pola Pemilihan Obat dan Outcome Terapi Gastroenteritis Akut (GEA) pada Pasien Pediatri di Instalasi Rawat Inap Rumah Sakit PKU Muhammadiyah Surakarta Januari-Juni Tahun 2008 [Skripsi]. Universitas Muhammadiyah Surakarta
- Oonmett, A., Rudijanto, D. Hendrawan dan H, Kalim. 2005. Flavonoid on *Manilkara zapotta*. *Drug Developmental and Research* 3 (1) : 170-185
- Permata, K. I. 2015. Efek Pemberian Ekstrak Etanol Kunyit (*Curcuma longa*) Terhadap Kadar Glukosa Darah Serta Ekspresi Interleukin-1Beta Pada Pulau Langerhans *Rattus norvegicus* Model Diabetes Mellitus Tipe 1 Yang Diinduksi Dengan Streptozotosin [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya Malang
- Phamhuy, L. A., Hua He. dan Chuong, P. 2008. Free Radical Antioxidants In Disease and Health. *International Journal Of Biomedical Science*. 4(2): 89-96

- Rarangsari, N. E. 2015. Pengaruh Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata L.*) Terhadap SOD dan Histopatologi Hepar Tikus (*Rattus novergicus*) yang Diinduksi Aloksan. Fakultas Sains dan Teknologi [Skripsi]. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Malang
- Sayuti, K dan Rina, Y. 2015. Antioksidan Alami dan Sintetik. Andalas University Press. Padang
- Sendow, I. 1998. Infeksi Virus Transmissible Gastroenteritis Pada Babi. Balai Penelitian Veteriner. Bogor
- Simadibrata, M. K. 2006. Pendekatan Diagnostik Diare Kronik. Dalam: Buku Ajar Ilmu Penyakit. Dalam Jilid I Edisi IV. Pusat Penerbitan Departemen Ilmu Penyakit Dalam FK UI. Jakarta
- Sjahid, L. R. 2008. Isolasi dan Identifikasi Flavonoid dari Daun Dewandaru (*Eugenia uniflora L.*) [Skripsi]. Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta
- Songer, J. G., dan Post, K. W. 2005. Veterinary Microbiology: Bacterial and Fungal Agents Of Animal Disease. Elsvier Saunders
- Sudoyo. 2006. Ilmu Penyakit Dalam Ed. IV. Fakultas Kedokteran. Universitas Indonesia Jakarta
- Supar. 1997. Faktor-Faktor Virulensi Enterotoksin dan Perlekatan *Escherichia coli* Terhadap Kesehatan ternak dan Manusia. Wartazoa. 6(1) : 7-17
- Suraatmaja. 2005. *Kapita Selekta Gastroenterologi anak*. Denpasar: Sagung Seto
- Tarmudji. 2003. Kolibasilosis pada Ayam: Etiologi, Patologi dan Pengendaliannya. Balai Penelitian Veteriner 13(2): 65-73
- Utami, F.F. 2011. Efek Probiotik Indigenus pada Profil *Imunohistokimia* Antioksidan *Superoksida Dismutase* (SOD) di Hati Tikus yang Dipapar *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC) [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor
- Utami, W., Da'i, M. dan Sofiana, Y.S. 2005. Uji Aktivitas Penangkap Radikal dengan Metode DPPH serta Penetapan Kandungan Fenol dan Flavonoid dalam Ekstrak Kloroform Ekstrak Etil Asetat, Ekstrak Etanol Daun Dewandaru (*Eugenia Uniflora*). Pharmacon, 6 (1) : 5-9
- Vallyathan, V., Shi, S. 1997. The Role of Oxygen Free Radicals in Occupational and Enviromental Lung Disease. Enviromental Health Perspectives 105 (1): 165-178

- Widjaja, H. 2011. Pengaruh Pemberian Vitamin C Terhadap Aktifitas Fagositosis Makrofag dan Kadar Vitamin C dalam Cairan Intraperitoneal Mencit Bal B/C dengan Sepsis[Tesis]. Universitas Diponegoro. Semarang
- White, M. 2017. Pig Health Post Weaning Diarrhoea and Oedema Disease. <http://www.nadis.org.uk/bulletins/post-weaning-diarrhoea-and-oedema-disease.aspx>. [17 Agustus 2017].
- Wresdiyati, T., Sri, R.L., Yeni, S., Irma, I.A., dan Made, A. 2013. Probiotik Indigenus Meningkatkan Profil Kesehatan Usus Halus Tikus yang Diinfeksi *Enteropathogenic E. coli*. MKB 45(2): 78-85
- Yulianti, T. 2011. Deteksi Keberadaan Antibodi Antidiare (Escherichia coli dan Salmonella Enteridis) dan Anti Flu Burung (H5N1) pada Kuning Telur Ayam Isa Brown yang Diberi Perlakuan Pemanasan Bertingkat [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor
- Zein, U. Khalid, H. S. Josia, G. 2004. Diare Akut Disebabkan Bakteri. E-USU Repository. Universitas Sumatera Utara

