

**PENGARUH PREVENTIF PEMBERIAN EKSTRAK DAUN
DEWANDARU (*Eugenia uniflora* L.) TERHADAP
EKSPRESI TNF ALPHA DAN HISTOPATOLOGI
JEJUNUM PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*)
MODEL GASTROENTERITIS**

SKRIPSI

Oleh:

VILLINDA MAYA MARVELINA

135130107111012



PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2018

**PENGARUH PREVENTIF PEMBERIAN EKSTRAK DAUN
DEWANDARU (*Eugenia uniflora* L.) TERHADAP
EKSPRESI TNF ALPHA DAN HISTOPATOLOGI
JEJUNUM PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*)
MODEL GASTROENTERITIS**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

VILLINDA MAYA MARVELINA

135130107111012



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

2018

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Pengaruh Preventif Pemberian Ekstrak Daun Dewandaru (*Eugenia Uniflora* L.) Terhadap Ekspresi TNF Alpha dan Histopatologi Jejunum pada Tikus (*Rattus Norvegicus*) Model Gastroenteritis

Oleh :
VILLINDA MAYA MARVELINA
135130107111012

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 19 Januari 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing 1

Pembimbing 2

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 : Villinda Maya Marvelina

NIM : 135130107111012

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulis Skripsi berjudul:

Pengaruh Preventif Pemberian Ekstrak Daun Dewandaru (*Eugenia Uniflora* L.) Terhadap Ekspresi TNF Alpha dan Histopatologi Jejunum pada Tikus (*Rattus Norvegicus*) Model Gastroenteritis. 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 termaksud 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,
Yang menyatakan,



(Villinda Maya Marvelina)
NIM. 135130107111012

Pengaruh Preventif Pemberian Ekstrak Daun Dewandaru (*Eugenia Uniflora* L.) Terhadap Ekspresi TNF Alpha dan Histopatologi Jejunum pada Tikus (*Rattus Norvegicus*) Model Gastroenteritis

ABSTRAK

Gastroenteritis (GE) yaitu peradangan pada saluran pencernaan ditandai dengan diare dan muntah. Penyebab GE berupa agen menular (bakteri, virus, parasit) dan agen tidak menular akibat keracunan. *Escherichia coli* adalah spesies bakteri gram negatif yang merupakan mikroflora normal pada usus, tetapi beberapa galur bersifat patogenik. Daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) mengandung flavonoid dan tanin sebagai antioksidan, antibakteri, dan antiinflamasi diharapkan menjadi alternatif pencegahan gastroenteritis. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun dewandaru terhadap kadar TNF- α dan histopatologi jejunum pada tikus (*Rattus norvegicus*) sebagai preventif gastroenteritis pada hewan. Hewan model berupa tikus putih strain wistar jantan berumur 8-12 minggu, BB 150-200 g dibagi dalam lima kelompok perlakuan. Kelompok kontrol negatif, kontrol positif yaitu tikus yang diberi induksi *E. coli*, kelompok perlakuan 1, 2, dan 3 yaitu tikus yang diberi ekstrak daun dewandaru dan induksi *E. coli*. Pembuatan hewan model gastroenteritis diinduksi *E. coli* 10^6 CFU/mL per ekor per hari selama 7 hari. Pemberian preventif ekstrak daun dewandaru dengan dosis masing-masing 300, 400, 500 mg/kg BB per ekor per hari menggunakan sonde lambung selama 7 hari. Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah kadar TNF- α diukur menggunakan metode immunohistokimia dan histopatologi jejunum dengan pewarnaan Hematoksilin Eosin. Analisis data dilakukan dengan uji *One-Way ANOVA* ($\alpha=0,05$) dan dilanjutkan uji BNP, serta pengamatan histopatologi jejunum dianalisa secara deskriptif. Hasil penelitian ini menunjukkan pemberian daun dewandaru mampu menurunkan ekspresi TNF- α dan mampu menghambat kerusakan jejunum. Kesimpulan penelitian ini ekstrak daun dewandaru dapat digunakan sebagai preventif gastroenteritis pada tikus.

Kata kunci: Gastroenteritis, *E. coli*, Ekstrak daun dewandaru, TNF- α , Histopatologi jejunum

**Preventive Effect of Dewandaru (*Eugenia Uniflora* L.) Leaves Extract
Towards TNF Alpha Expression and Jejunum Histopathology in Rat (*Rattus
Norvegicus*) Model of Gastroenteritis**

ABSTRACT

Gastroenteritis (GE) is an inflammation of the digestive tract characterized by diarrhea and vomiting. Causes of GE in the form of infectious agents (bacteria, viruses, parasites) and non contagious agents due to poisoning. *Escherichia coli* is a species of gram-negative bacteria that is a normal microflora of the intestine, but some strains are pathogenic. Dewandaru leaves (*Eugenia uniflora* L.) contains flavonoid and tannin as antioxidant, antibacterial, and anti-inflammatory are expected to be an alternative to prevention of gastroenteritis. This research aims to determine the effect of dewandaru leaves extract on levels of TNF- α and jejunal histopathology in rat (*Rattus norvegicus*) as preventive gastroenteritis in animals. The experimental animals in this study were white male rat strain wistar aged 8-12 weeks, 150-200 g divided into five groups. The control group were negatives, positives were induced by *E. coli*, treatment group 1, 2, and 3 were rat given dewandaru leaves extract and induced by *E. coli*. Animal model of gastroenteritis were induced *E. coli* 10^6 CFU/mL per animal per day for 7 days. Prevention of dewandaru leaves extract used doses of 300, 400, 500 mg/BW per day using gastric sonde for 7 days. Parameter of this study were levels of TNF- α which using immunoratio method and jejunal histopathology which using Hematoxylin Eosin stain. The data were analyzed statistically using One-Way ANOVA ($\alpha=0,05$) test and continued BNJ test, and jejunal histopathology observation was analyzed descriptively. The result of this study indicate dewandaru leaves extract able to decrease TNF- α expression and obstruct jejunal damage. The conclusion of this research is dewandaru leaves extract can be used as preventive gastroenteritis in rat.

Keywords: Gastroenteritis, *E. coli*, Extract of dewandaru leaves, TNF- α , Jejunum histopathology

KATA PENGANTAR

Ucapan Hamdallah penulis haturkan kehadiran Allah SWT karena atas limpahan rahmat, hidayah dan pertolongan-Nya sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pengaruh Preventif Pemberian Ekstrak Daun Dewandaru (*Eugenia Uniflora* L.) Terhadap Ekspresi TNF Alpha dan Histopatologi Jejunum pada Tikus (*Rattus Norvegicus*) Model Gastroenteritis” dengan lancar.

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

1. Dr. Sri Murwani, drh., MP selaku dosen pembimbing pertama yang telah membantu penulis dalam mengarahkan dan memberi bimbingan, fasilitas, dan waktu kepada penulis dalam penyusunan dan penyempurnaan skripsi ini.
2. drh. Nurina Titisari, M.Sc. selaku dosen pembimbing kedua yang telah membantu penulis dalam mengarahkan dan memberi bimbingan, fasilitas, dan waktu kepada penulis dalam penyusunan dan penyempurnaan skripsi ini.
3. drh. Arfan Lesmana, M. Sc selaku penguji pertama yang telah memberkan kritik, saran, dan masukan demi kesempurnaan skripsi ini.
4. Agri Kaltaria Anisa, S. Farm, Apt. selaku penguji kedua yang telah memberkan kritik, saran, dan masukan demi kesempurnaan skripsi ini.
5. Prof. Dr. Aulannia'am, drh., DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya yang selalu memberikan dukungan demi kemajuan FKH UB.
6. Ayahanda H. Hariyanto, Ibunda Hj. Ermawati serta saudara saya tercinta Pandu Sri Alam Wijayanto, S.T. dan Septania Nabila Khairunnisa untuk doa, kasih sayang, dukungan serta pengorbanan baik moril maupun materi selama ini.
7. Teman-teman seperjuangan di bangku kuliah Anggit Rospitasari, Fitri Hermawati, Pungky Dwi yang selalu bersama baik suka maupun duka.

8. Tim Penelitian Skripsi saya Luh Putu Setianti, Aidia Latifatul, Syaifuddin, dan Rizki Nurfathoni yang selalu bersama-sama untuk bekerja, memberikan semangat dan inspirasi selama pengerjaan tugas akhir.
9. Teman-teman seperjuangan angkatan 2013 FKH UB khususnya kelas B atas semangat dan inspirasi yang luar biasa.
10. Serta kepada semua pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan dan penyusunan skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kata sempurna, maka saran dan kritik yang membangun dari semua pihak sangat diharapkan. Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan kepada penulis dan semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat serta menambah pengetahuan tidak hanya bagi penulis tetapi juga bagi pembaca. Ameen ya Rabb Al Alameen.

Malang, Januari 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
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	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Gastroenteritis	6
2.1.1 Jenis-Jenis Gastroenteritis	6
2.1.2 Etiologi Gastroenteritis	6
2.1.3 Gejala Klinis Gastroenteritis	7
2.1.4 Patogenesis Gastroenteritis Akibat <i>E. coli</i>	8
2.1.5 Patologi Anatomi Gastroenteritis Akibat <i>E. coli</i>	9
2.1.6 Diagnosa Gastroenteritis	9
2.1.7 Pengobatan dan Pencegahan Gastroenteritis	10
2.2 <i>Escherichia coli</i>	11
2.2.1 Karakteristik Morfologi	11
2.2.2 Taksonomi dan Klasifikasi	13
2.2.3 Faktor Virulensi	15
2.3 Dewandaru (<i>Eugenia uniflora</i> L.)	17
2.3.1 Flavonoid	19
2.3.2 Tanin	19
2.4 Hewan Coba	20
2.5 Tumor Nekrosis Faktor Alpha (TNF- α)	22
2.6 Jejunum	24
BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	28
3.1 Kerangka Konsep Penelitian	28
3.2 Hipotesis Penelitian	31

BAB IV METODOLOGI PENELITIAN	32
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	32
4.2 Alat dan Bahan.....	32
4.2.1 Alat Penelitian	32
4.2.2 Bahan Penelitian.....	33
4.3 Rancangan Penelitian.....	33
4.4 Variabel Penelitian.....	36
4.5 Tahapan Penelitian.....	36
4.5.1 Persiapan Hewan Coba Tikus.....	36
4.5.2 Prosedur Pembuatan Ekstrak Daun Dewandaru (<i>Eugenia uniflora</i> L.).....	36
4.5.3 Perbanyak Bakteri <i>E. coli</i>	37
4.5.4 Pemberian Terapi Ekstrak Daun Dewandaru (<i>Eugenia uniflora</i> L.).....	38
4.5.5 Pembuatan Hewan Model Gastroenteritis	38
4.5.6 Preparasi Organ Jejunum.....	39
4.5.7 Pembuatan Preparat Histopatologi Jejunum dengan Pewarnaan HE	39
4.5.8 Pengukuran Ekspresi TNF- α dengan Metode Imunohistokimia (IHK).....	40
4.5.9 Analisa Data	42
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	43
5.1 Hasil Hewan Coba Model Gastroenteritis yang Diinduksi <i>Escherichia coli</i>	43
5.2 Pengaruh Preventif Ekstrak Daun Dewandaru (<i>Eugenia uniflora</i> L.) Sebagai Pencegahan Gastroenteritis pada Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) yang Diinduksi <i>Escherichia coli</i> Dilihat dari Ekspresi TNF- α Jejunum.....	44
5.3 Pengaruh Preventif Ekstrak Daun Dewandaru (<i>Eugenia uniflora</i> L.) Sebagai Pencegahan Gastroenteritis pada Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) yang Diinduksi <i>Escherichia coli</i> Dilihat dari Histopatologi Jejunum.....	52
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN.....	62
6.1. Kesimpulan	62
6.2. Saran	62
DAFTAR PUSTAKA	63
LAMPIRAN.....	69

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Rancangan Kelompok Penelitian	34
5.1 Hasil Uji BNJ Kadar TNF- α	49



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Morfologi <i>E. coli</i>	12
2.2 Struktur <i>E. coli</i>	13
2.3 Daun dan buah dewandaru	18
2.4 Tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>) strain wistar	21
2.5 Lipatan plika pada jejunum.....	25
2.6 Histopatologi jejunum tikus wistar keadaan sehat.....	26
2.7 Histopatologi jejunum tikus wistar diinduksi <i>E. coli</i> 10 ⁶ CFU/mL.....	27
3.1 Kerangka Konsep Penelitian	28
5.1 Feses pada hewan coba kontrol negatif, kontrol positif	44
5.2 Gambaran imunohistokimia ekspresi TNF- α pada jejunum tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>) kelompok kontrol negatif.....	45
5.3 Gambaran imunohistokimia ekspresi TNF- α pada jejunum tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>) kelompok kontrol positif	46
5.4 Gambaran imunohistokimia ekspresi TNF- α pada jejunum tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>) kelompok preventif 300 mg/kg BB	46
5.5 Gambaran imunohistokimia ekspresi TNF- α pada jejunum tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>) kelompok preventif 400 mg/kg BB	47
5.6 Gambaran imunohistokimia ekspresi TNF- α pada jejunum tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>) kelompok preventif 500 mg/kg BB	47
5.7 Histogram nilai <i>mean</i> dan standar deviasi kadar TNF- α	48
5.8 Gambaran histopatologi jejunum tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>) kelompok kontrol negatif	53
5.9 Gambaran histopatologi jejunum tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>) kelompok kontrol positif.....	54
5.10 Gambaran histopatologi jejunum tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>) kelompok preventif 300 mg/kg BB	54
5.11 Gambaran histopatologi jejunum tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>) kelompok preventif 400 mg/kg BB	55
5.12 Gambaran histopatologi jejunum tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>) kelompok preventif 500 mg/kg BB	55

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Bagan Kerangka Operasional Penelitian.....	69
2. Laik Etik.....	70
3. Determinasi Tanaman Dewandaru.....	71
4. Uji Fotokimia Daun Dewandaru	72
5. Perhitungan Dosis	73
6. Data Penimbangan Berat Badan	76
7. Pengambilan Organ Jejunum	77
8. Metode Pembuatan Preparat Histologi Jejunum.....	78
9. Skema Metode Imunohistokimia (IHK)	79
10. Analisis Statistika <i>One Way</i> ANOVA Kadar TNF- α	81



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

<u>Simbol/Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
%	Persen
±	Kurang lebih
>	Lebih dari
µm	mikrometer
BB	Berat Badan
C	Celcius
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CFU	<i>Colony Forming Units</i>
cm	centimeter
CO ₂	Karbon dioksida
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. uniflora</i>	<i>Eugenia uniflora</i>
EMBA	<i>Eosin Methylen Blue Agar</i>
g	gram
GF	<i>Growth Factor</i>
H ₂ O ₂	Hidrogen peroksida
HE	Haematoxylin Eosin
kg	kilogram
LBP	Lipopolisakarida <i>Binding Protein</i>
LPS	Lipopolisakarida
mg	milligram
mL	milliliter
MMP	<i>Matrix Metalloproteinase</i>
NaCl	Sodium klorida
NF-κβ	<i>Nuclear Factor Kappa B</i>
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
<i>spp</i>	<i>subspecies</i>
TLR	<i>Toll Like Receptor</i>
TNF-α	Tumor Nekrosis Faktor Alfa

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Gastroenteritis yaitu kondisi medis yang ditandai dengan peradangan pada saluran pencernaan, sehingga mengakibatkan kombinasi diare, muntah, serta kejang perut (Suraatmaja, 2005). Hasil penelitian veteriner menunjukkan bahwa agen penyebab penyakit ini banyak ragamnya, berupa agen penyakit yang bersifat menular (bakteri, virus, dan parasit) dan agen penyebab yang tidak menular akibat keracunan (Supar, 2001). Prevalensi penyakit gastroenteritis pada anak babi di Bali tahun 2005, menunjukkan bahwa dari 60,7% kejadian, 26,7% disebabkan infeksi akibat *E. coli* (Besung, 2012). Sedangkan kasus infeksi *E. coli* pada anak sapi di daerah sentra pengembangan sapi perah di Jawa Barat berkisar antara 19-40%, dengan kematian pedet di bawah umur 1 bulan berkisar antara 8-19% (Supar, 2001). Pada unggas dikenal dengan penyakit kolibasilosis yang disebabkan oleh *E. coli* dengan angka kematian sebesar 5,8% yang ditemukan di Bali (Tarmudji, 2003).

Escherichia coli adalah salah satu jenis spesies bakteri gram negatif (Levinson, 2008). Pada umumnya *E. coli* merupakan mikroflora normal pada usus manusia dan hewan, tetapi beberapa galur bersifat patogenik (Wibowo, 2008). Dalam kondisi normal *E. coli* terdapat di dalam saluran pencernaan ayam. Sekitar 10-15% dari seluruh *E. coli* yang ditemukan di dalam usus ayam yang sehat tergolong serotip patogen. Bagian usus yang paling banyak mengandung flora normal tersebut adalah jejunum, ileum, dan sekum (Tarmudji, 2003).

Saluran pencernaan memiliki fungsi utama yaitu mencerna dan memecah makanan menjadi molekul yang lebih kecil dan sederhana yang bisa diserap oleh

sirkulasi tubuh untuk menunjang kehidupan organisme. Jejunum merupakan bagian dari usus halus yang berperan dalam sistem pencernaan. Jejunum berfungsi sebagai tempat absorpsi zat-zat makanan (Ganong, 1995). Bakteri dapat menginfeksi saluran pencernaan yang kemudian menempel di mukosa usus halus, menembus sel-sel epitel dan menyebar melalui mukosa hingga ke aliran darah (Lavoie and Hinchcliff, 2008).

Infeksi *E. coli* yang menyerang saluran pencernaan pada bagian jejunum mengakibatkan timbulnya reaksi radang. Sitokin merupakan mediator yang dihasilkan oleh sel dalam reaksi radang atau imunologik yang berfungsi sebagai isyarat antara sel-sel untuk membentuk jaringan komunikasi dalam respon imun. Tumor Nekrosis Faktor (TNF) merupakan sitokin yang dihasilkan oleh makrofag sehingga memiliki peranan penting dalam terjadinya inflamasi (Green and Flavell, 2000). Infeksi yang berat dapat memicu produksi TNF dalam jumlah yang besar yang menimbulkan reaksi sistemik (Baratawidjaja, 2014).

Menurut Hutapea (1994) dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) merupakan salah satu tanaman asli Indonesia yang berkhasiat sebagai obat. Daun dan buah dewandaru secara empiris digunakan sebagai obat penurun panas dan diare (Suhendi dkk, 2011). Pada penelitian mengenai aktivitas dewandaru yang telah dilakukan diantaranya, pada ekstrak daun dan batangnya sebagai antibakteri (Khotimah, 2004; Oliveira *et al*, 2008). Selain itu, ekstrak daun dewandaru dapat berfungsi sebagai anti radikal bebas yang disebabkan karena adanya senyawa flavonoid (Utami dkk, 2005).

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui manfaat ekstrak daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) terhadap kadar TNF- α dan histopatologi jejunum pada tikus (*Rattus norvegicus*) model gastroenteritis sebagai tindakan preventif terjadinya gastroenteritis pada hewan.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan beberapa permasalahan yaitu:

1. Apakah ekstrak daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) dapat memberikan efek preventif terhadap gastroenteritis pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi *E. coli* dalam mencegah peningkatan ekspresi TNF- α pada organ jejunum?
2. Apakah ekstrak daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) dapat memberikan efek preventif terhadap gastroenteritis pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi *E. coli* berdasarkan pencegahan kerusakan jejunum?

1.3 Batasan Masalah

1. Hewan model yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain wistar umur 8-12 minggu dengan berat badan 150-200 gram (Astawan dkk, 2011) diperoleh dari peternakan tikus di daerah Dau, Malang
2. Pembuatan tikus (*Rattus norvegicus*) model gastroenteritis dengan diinduksi *E. coli* 10^6 CFU/mL selama 7 hari (Astawan dkk, 2011)
3. Bakteri *E. coli* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi dan Imunologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya

4. Daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) dan pembuatan ekstrak dilakukan di Laboratorium UPT Materia Medica, Kota Batu dengan metode maserasi dan digunakan sebagai preventif dengan dosis 300 mg/kg BB, 400 mg/kg BB, dan 500 mg/kg BB selama 7 hari dengan menggunakan sonde lambung berdasarkan penelitian sebelumnya yang telah dimodifikasi (Cynthia, 2006). Spesifikasi daun dewandaru yang digunakan yaitu daun yang berwarna hijau hingga hijau gelap berbentuk lojong, tepi daun rata dengan ukuran panjang \pm 5cm dan lebar \pm 4cm (Materia Medica, 2017)
5. Variabel yang diamati dalam penelitian ini antara lain TNF- α dan histopatologi organ jejunum tikus. Digunakan metode imunohistokimia untuk mengetahui ekspresi TNF- α organ jejunum
6. Gambaran histopatologi jejunum dilihat dengan menggunakan metode pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE) yang diamati dengan mikroskop cahaya Olympus BX51 perbesaran 400x (Wresdiyati dkk, 2013). Perubahan yang diamati berupa erosi vili ataupun sel radang.

1.4 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) dapat memberikan efek preventif terhadap gastroenteritis pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi *E. coli* dalam mencegah peningkatan ekspresi TNF- α pada organ jejunum
2. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) dapat memberikan efek preventif terhadap gastroenteritis pada

tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi *E. coli* berdasarkan kerusakan jejunum

1.5 Manfaat

Manfaat yang diharapkan oleh penulis dari penelitian ini yaitu sebagai landasan teori bagi penelitian selanjutnya mengenai ekstrak daun dewandaru sebagai alternatif terapi gastroenteritis, terutama dalam bidang medis veteriner.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Gastroenteritis

Gastroenteritis adalah inflamasi membran mukosa lambung dan usus halus yang ditandai dengan muntah-muntah dan diare yang berakibat kehilangan cairan elektrolit yang menimbulkan dehidrasi dan gejala keseimbangan elektrolit. Gastroenteritis adalah kehilangan cairan dan elektrolit secara berlebihan yang terjadi karena frekuensi buang air besar yang sering dengan bentuk tinja yang encer dan cair (Fadhilah, 2015).

Gastroenteritis adalah suatu penyakit karena adanya peradangan pada permukaan lambung dan usus yang biasanya terjadi akibat infeksi mikroorganisme, namun dapat juga akibat mengkonsumsi bahan kimia beracun atau obat tertentu. Gastroenteritis dibagi atas dua faktor, yaitu faktor infeksi dan faktor makanan. Faktor infeksi didapat dari virus, parasit, bakteri, dan protozoa (Chow *et al*, 2010).

2.1.1. Jenis-Jenis Gastroenteritis

Gastroenteritis menurut jenisnya dibagi menjadi dua, yaitu gastroenteritis akut dan gastroenteritis kronis. Gastroenteritis akut yaitu ditandai dengan diare yang terjadi kurang dari 14 hari yang sebagian besar disebabkan oleh infeksi. Sedangkan gastroenteritis kronis yaitu ditandai dengan diare yang terjadi selama 14 hari atau bahkan lebih (Yuliani, 2001).

2.1.2. Etiologi Gastroenteritis

Gastroenteritis dapat disebabkan oleh faktor internal maupun faktor eksternal.

1. Faktor internal diakibatkan infeksi antara lain:

- a. Golongan virus: *Astrovirus*, *Calicivirus*, *Enteric adenovirus*, *Coronavirus*, *Rotavirus*, *Norwalk virus*, *Herpes simplex virus*, *Cytomegalovirus*
 - b. Golongan bakteri: *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Plesiomonas shigelloides*, *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, dan *Yersinia enterocolitica*
 - c. Golongan parasit: *Balantidium coli*, *Capillaria philippinensis*, *Cryptosporidium*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Isoospora belli*, *Fassiolopsis buski*, *Sarcocystis suihominis*, *Strongyloides stercoralis*, dan *Trichuris trichiura*
2. Faktor eksternal terdiri dari:
- a. Faktor makanan, meliputi mengkonsumsi makanan basi, beracun, alergi terhadap makanan (Chow *et al*, 2010).

2.1.3. Gejala Klinis Gastroenteritis

Gejala klinis penyakit gastroenteritis yang sering ditemukan di Indonesia berupa mencret yang parah pada hewan muda dan menimbulkan kematian. Untuk mendiagnosis adanya infeksi gastroenteritis secara tepat, yang hanya berdasarkan pada pengamatan gejala klinis sangatlah sulit, terutama apabila gejala klinis yang ditimbulkannya sangat ringan atau akibat infeksi lain, sehingga diagnosis gastroenteritis sangat bergantung pada pengamatan gejala klinis dan pemeriksaan laboratorium (Sendow, 1998).

Infeksi dari bakteri *E. coli* yang menimbulkan gangguan fungsi usus dimana peristaltik dan sekresi usus meningkat, namun fungsi dan absorpsi usus berkurang sehingga menimbulkan gejala klinis berupa diare (Fadhilah, 2015).

2.1.4. Patogenesis Gastroenteritis Akibat *E. coli*

Salah satu faktor yang menyebabkan penyakit gastroenteritis yaitu akibat dari *E. coli*. Bakteri masuk ke dalam saluran pencernaan yang kemudian menetap pada usus dan lambung yang dapat merangsang produksi toksin di saluran pencernaan dan dapat mengakibatkan terjadinya peradangan pada usus dan lambung sehingga terjadi penurunan absorpsi karbohidrat. *E. coli* memproduksi dua protein endotoksin yaitu *Stable Toxin* (ST) dan *Labile Toxin* (LT). Akibat adanya toksin maka terjadi peradangan usus dan lambung yang dapat menimbulkan peningkatan asam lambung sehingga menimbulkan gejala mual dan muntah yang mengakibatkan kekurangan volume cairan dan memiliki resiko tinggi terhadap kekurangan nutrisi (Try, 2011).

Peradangan pada usus dan lambung dapat menimbulkan peningkatan motilitas usus sehingga sekresi cairan dan elektrolit meningkat yang dapat menimbulkan gangguan cairan dan elektrolit seperti kalium dan natrium mengakibatkan kejang dan kram abdomen sehingga menimbulkan rasa nyeri. Peradangan pada usus dan lambung juga dapat mengakibatkan meningkatnya permeabilitas usus yang dapat meningkatkan sekresi cairan dan elektrolit serta meningkatnya tekanan intra lumen, maka usus tidak mempunyai kemampuan untuk menyerap sehingga terjadi pengeluaran feses dengan tekstur encer dan frekuensi buang air besar yang berlebihan, konsistensi cair, dan bersifat asam sehingga dapat

menimbulkan gangguan integritas kulit. Selain itu peningkatan cairan dan elektrolit dapat mengakibatkan peningkatan tekanan pada intralumen yang akan menimbulkan terjadinya dehidrasi (Try, 2011).

2.1.5. Patologi Anatomi Gastroenteritis Akibat *E. coli*

E. coli patogen menghasilkan endotoksin akan berakibat menurunnya absorpsi natrium pada usus dan lumen usus meregang yang diikuti dengan peningkatan peristaltik usus sehingga terjadi diare. Patologi oleh infeksi *E. coli* dapat diamati pada semua bagian usus, terutama usus halus. Perubahan patologi anatomi yang terlihat pada usus halus adalah adanya distensi usus halus. Kongesti maupun hiperemi akan teramati pada saluran pencernaan hewan yang terinfeksi (Rahmawandani dkk, 2014).

Pemeriksaan patologi anatomi dilakukan dengan pengamatan langsung perubahan patologi anatomi dari setiap sampel (Rahmawandani dkk, 2014). Perubahan patologi anatomi yang menciri pada gastroenteritis adalah terlihat adanya fibrin yang melapisi hampir semua organ-organ abdomen, adanya akumulasi cairan pada organ abdomen. Perubahan secara makroskopis pada organ intestin berupa adanya distensi usus dan pembengkakan (Nielsen *et al*, 1975).

2.1.6. Diagnosa Gastroenteritis

Hewan yang mengalami gastroenteritis umumnya akan memperlihatkan tanda-tanda berupa lemas, rambut kusam, kurus, nafsu makan turun, murung, pertumbuhan terganggu, diare, rambut kotor dan lengket disekitar anus, suhu tubuh meningkat, warna feses berubah, dan terjadi dehidrasi (Tarmudji, 2003). Menurut Zein (2004), gastroenteritis yang disebabkan oleh bakteri dapat dilihat dari

manifestasi klinis, yaitu individu mengalami diare akut disertai muntah-muntah, demam, tenesmus, nyeri perut atau kejang perut. Sedangkan untuk pemeriksaan penunjang dapat dilakukan dengan inokulasi bakteri pada media selektif EMBA yang diinkubasi selama 24 jam untuk seleksi bakteri. Setelah itu pengembangbiakan bakteri dilakukan pada media PCA diinkubasi selama 24 jam dan dilakukan uji morfologi bakteri dengan pewarnaan gram (Tarmudji, 2003).

2.1.7. Pengobatan dan Pencegahan Gastroenteritis

Pemberian antibiotik diindikasikan pada pasien dengan gejala dan tanda diare seperti demam dan feses berdarah. Pemberian antibiotik secara empiris dapat dilakukan tetapi terapi antibiotik spesifik diberikan berdasarkan kultur dan resistensi kuman. Contoh antibiotik untuk gastroenteritis, yaitu *Ciprofloxacin*, *Tetrasiklin*, *Metronidazole* (Zein, 2004). Obat anti diare yang dapat diberikan, yakni *Loperamide HCl*. Efek kelompok obat tersebut meliputi peningkatan absorpsi cairan sehingga dapat memperbaiki konsistensi feses dan mengurangi frekuensi diare. Bila diberikan dengan cara yang benar obat ini cukup aman dan dapat mengurangi frekuensi defekasi sampai 80%. Bila diare akut dengan gejala demam dan sindrom disentri maka penggunaan obat ini tidak dianjurkan (Nurmasari, 2010). Pengobatan gastroenteritis dapat dilakukan upaya rehidrasi dengan pemberian terapi cairan elektrolit untuk menjaga hidrasi yang adekuat dan keseimbangan elektrolit dalam tubuh. Pemberian terapi cairan tergantung kebutuhan dan status hidrasi (Setiawan, 2006).

Pencegahan infeksi *E. coli* dapat dilakukan dengan program sanitasi yang baik dan benar. Selain itu, juga penting untuk mengusahakan agar pakan dan minum tidak tercemar oleh feses (Kusuma, 2010).

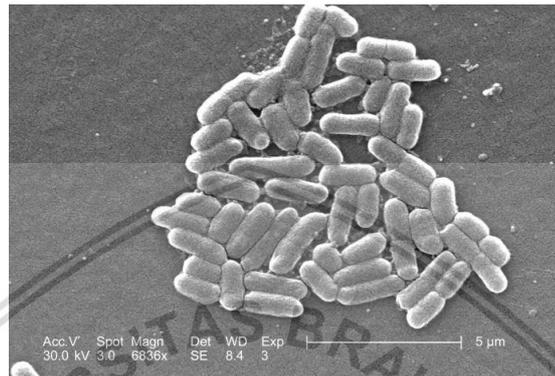
2.2. *Escherichia coli*

Bakteri *E. coli* dapat membentuk koloni pada saluran pencernaan manusia maupun hewan dalam beberapa jam setelah kelahiran. Faktor predisposisi pembentukan koloni ini antara lain jumlah mikroflora dalam tubuh masih sedikit, rendahnya kekebalan tubuh, faktor stress, pakan, dan agen patogen lain. Kebanyakan *E. coli* memiliki virulensi yang rendah dan bersifat oportunistis (Songer and Post, 2005). Ditjenak (1982) melaporkan bahwa *E. coli* keluar dari tubuh bersama tinja dalam jumlah besar serta mampu bertahan sampai beberapa minggu. Kelangsungan hidup dan replikasi *E. coli* di lingkungan membentuk koliform. *E. coli* tidak tahan terhadap keadaan kering atau desinfektan biasa. Bakteri ini akan mati pada suhu 60°C selama 30 menit. Menurut Elfridasari (2011) selain tersebar di banyak tempat dan kondisi, bakteri ini tahan terhadap suhu, bahkan pada suhu ekstrem sekalipun. Suhu yang baik untuk pertumbuhan bakteri ini adalah antara 8°C – 46°C, tetapi suhu optimalnya adalah 37°C. Oleh karena itu, bakteri tersebut dapat hidup dalam tubuh manusia dan vertebrata lainnya.

2.2.1. Karakteristik Morfologi

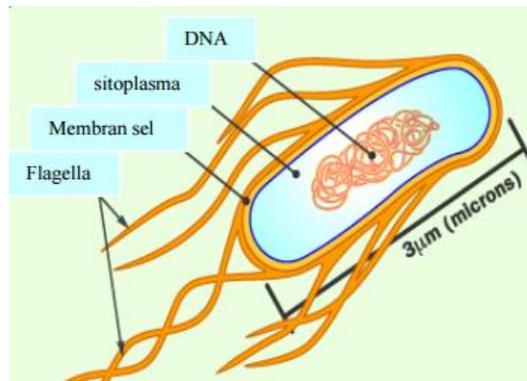
Bakteri *E. coli* merupakan spesies dengan habitat alami dalam saluran pencernaan manusia maupun hewan. *E. coli* pertama kali diisolasi oleh Theodor Escherich dari tinja seorang anak kecil pada tahun 1885. Bakteri ini berbentuk batang, berukuran 0,4-0,7 x 1,0-3,0 µm, termasuk gram negatif, dapat hidup soliter

maupun berkelompok, umumnya motil, tidak membentuk spora, serta fakultatif anaerob (Carter *and* Wise, 2004). *E. coli* merupakan penghuni normal usus dan sering kali menyebabkan infeksi (Elfridasari, 2011). Morfologi dari *E. coli* dapat dilihat pada **Gambar 2.1**.



Gambar 2.1 Morfologi *E. coli* (CDC, 2014)

Struktur sel *E. coli* (**Gambar 2.2**) dikelilingi oleh membran sel, terdiri dari sitoplasma yang mengandung nukleoprotein. Membran sel *E. coli* ditutupi oleh dinding sel berlapis kapsul. Flagela dan vili *E. coli* menjulur dari permukaan sel (Tizard, 2004). *E. coli* memiliki organel eksternal yakni vili yang merupakan filamen tipis untuk menangkap substrat spesifik dan flagela yang merupakan filamen tipis dan lebih panjang untuk berenang (Berg, 2004). Lapisan selubung sel yang terdapat di antara membran sitoplasma dan kapsul disebut dinding sel. Dinding sel pada bakteri gram negatif terdiri dari peptidoglikan dan membran luar. Dinding sel berperan penting sebagai proteksi terhadap tekanan osmotik internal dan juga berperan dalam pembelahan sel (Brooks *et al*, 2007). Membran luar bakteri gram negatif dapat menghambat perpindahan molekul-molekul yang berukuran besar. Membran luar ini merupakan suatu lipid bilayer dengan protein, lipoprotein, dan polisakarida (Fauzi *et al*, 2008).



Gambar 2.2 Struktur *E. coli* (Anggraeni, 2010)

Tiga struktur antigen utama permukaan yang digunakan untuk membedakan serotipe golongan *E. coli* adalah dinding sel, kapsul, dan flagela. Dinding sel *E. coli* berupa lipopolisakarida yang bersifat pirogen dan menghasilkan endotoksin serta diklasifikasikan sebagai antigen O. Kapsul *E. coli* berupa polisakarida yang dapat melindungi membran luar dari fagositik dan sistem komplemen, diklasifikasikan sebagai antigen K. Flagela *E. coli* terdiri dari protein yang bersifat antigenik dan dikenal sebagai antigen H (Quinn *et al*, 2002).

2.2.2. Taksonomi dan Klasifikasi

Taksonomi *E. coli* menurut Songer *and* Post (2005) adalah sebagai berikut:

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

Berdasarkan perbedaan serotipe dan virulensi, strain *E. coli* patogen yang menyebabkan penyakit pada saluran pencernaan dibedakan menjadi lima golongan, yaitu *Enterotoxigenic Escherichia coli* (ETEC), *Enteroinvasive Escherichia coli* (EIEC), *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC), *Enterohemorrhagic Escherichia coli* (EHEC), dan *Enteroadgregative Escherichia coli* (EAEC) (Sommer *et al*, 1994).

a. *Enterotoxigenic Escherichia coli* (ETEC)

Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) penyebab banyak kasus diare pada bayi di negara berkembang. Faktor kolonisasi ETEC yang spesifik untuk manusia menimbulkan pelekatan ETEC pada sel epitel usus kecil. Lumen usus terengang oleh cairan dan mengakibatkan hipermotilitas serta diare, dan berlangsung selama beberapa hari. Beberapa strain ETEC menghasilkan eksotoksin tidak tahan panas. Diare tanpa disertai demam ini terjadi pada manusia, babi, domba, kambing, kuda, anjing, dan sapi. Infeksi ETEC disebabkan oleh toksin LT (*Labile toxin*) dan ST (*Stable toxin*) yang menyebabkan sekresi cairan secara melimpah melalui aktivasi adenil siklase dan guanilat siklase pada jejunum dan ileum. Hal ini menyebabkan *watery diarrhea* disertai kram (Hendrayati, 2012).

b. *Enteroinvasive Escherichia coli* (EIEC)

Enteroinvasive Escherichia coli (EIEC) menimbulkan penyakit yang sangat mirip dengan shigelosis. Galur EIEC bersifat non-laktosa atau melakukan fermentasi laktosa dengan lambat serta bersifat tidak dapat bergerak. EIEC menimbulkan penyakit melalui invasinya ke sel epitel mukosa usus (Kusuma, 2010).

c. *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC)

Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) melekat pada sel mukosa usus kecil. Akibat dari infeksi EPEC adalah diare cair yang biasanya sembuh sendiri tetapi dapat juga kronik. Diare terjadi pada manusia, kelinci, anjing, kucing, dan kuda. EPEC menyebabkan diare melalui mekanisme molekular dari kolonisasi dan etiologi berbeda. Sel EPEC invasif (jika memasuki sel inang) dan menyebabkan radang (Kusuma, 2010).

d. *Enterohemorrhagic Escherichia coli* (EHEC)

Enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC) dianggap sebagai patogen zoonosis baru yang dapat menyebabkan gastroenteritis akut dan hemoragik kolitis dengan komplikasi ginjal (Jawetz *et al*, 2008). EHEC menghasilkan verotoksin. Banyak kasus EHEC dapat dicegah dengan memasak daging sampai matang. Diare ini ditemukan pada manusia, sapi, dan kambing (Kususma, 2010).

e. *Enteraggregative Escherichia coli* (EAEC)

Enteraggregative Escherichia coli (EAEC) menyebabkan diare akut dan kronik dengan durasi > 14 hari. Infeksi bakteri tersebut biasanya ditularkan melalui makanan (Hendrayati, 2012). Bakteri ini ditandai dengan pola khas pelekatnya pada sel manusia. EAEC memproduksi hemolisim dan ST (*Stable toxin*) enterotoksin yang sama dengan ETEC (Kususma, 2010).

2.2.3. Faktor Virulensi

Ada lima grup *E. coli* patogen yang telah diidentifikasi yaitu *Enterotoxigenic Escherichia coli* (ETEC), *Enteroinvasive Escherichia coli* (EIEC), *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC), *Enterohemorrhagic Escherichia coli*

(EHEC), dan *Enteroaggregative Escherichia coli* (EAEC). Masing-masing grup memiliki virulensi dan mekanisme patogenik yang berbeda serta inang yang spesifik (Marzuki, 2013). *E. coli* menjadi patogen jika bakteri ini dalam saluran pencernaan meningkat. Bakteri ini menghasilkan enterotoksin yang menyebabkan beberapa kasus diare. Faktor virulensi bakteri *E. coli* meliputi:

a. Antigen Permukaan

E. coli memiliki sedikitnya dua tipe fimbria, yaitu tipe manosa sensitif (pili) dan tipe manosa resisten *Colonization Factor Antigen* (CFA I dan CFA II) (Maksum, 2009). Kedua tipe fimbria ini penting sebagai kolonisasi, yaitu untuk perlekatan sel bakteri pada sel hospes. Sebagai contoh CFA I dan II melekatkan *E. coli* enteropatogenik pada sel epitel usus. Enteropatogenik berarti dapat menimbulkan penyakit pada saluran intestin. Antigen kapsul K-1 sering ditemukan pada *E. coli* yang diisolasi dari penderita bakteremia dan penderita meningitis. Antigen K-1 berperan menghalangi proses fagositosis bakteri oleh leukosit (Maksum, 2009).

b. Enterotoksin

Enterotoksin yang berhasil diisolasi dari *E. coli* adalah toksin LT (*Labile toxin*) dan ST (*Stable toxin*). Produksi kedua jenis toksin ini diatur oleh plasmid. Plasmid dapat pindah dari satu sel bakteri ke sel bakteri yang lain. Bakteri *E. coli* memiliki dua jenis plasmid, yaitu plasmid yang menyandi pembentukan toksin LT dan ST dan plasmid yang menyandi pembentukan toksin ST saja (Maksum, 2009).

Toksin LT bekerja merangsang enzim adenilat siklase yang terdapat di dalam sel epitel mukosa usus, yang menyebabkan peningkatan permeabilitas sel epitel

usus sehingga terjadi akumulasi cairan di dalam usus dan berakhir dengan diare. Toksin ST bekerja dengan mengaktifkan enzim guanilat siklase menghasilkan guanosin monofosfat siklik, menyebabkan gangguan absorpsi klorida dan natrium, serta menurunkan motilitas usus halus (Maksum, 2009).

c. Hemolisin

Pembentukan hemolisin diatur oleh plasmid. Hemolisin merupakan protein yang bersifat toksik terhadap sel pada biakan jaringan. Peranan hemolisin pada proses infeksi *E. coli* belum diketahui dengan jelas (Maksum, 2009).

2.3. Dewandaru (*Eugenia uniflora* L.)

Taksonomi tanaman dewandaru adalah sebagai berikut:

Divisi	: Spermatophyta
Sub Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Sub kelas	: Dialypetalae
Bangsa	: Myrtales
Suku	: Myrtaceae
Marga	: Eugenia
Jenis	: <i>Eugenia uniflora</i> Linn. (Hutapea, 1994).

Eugenia uniflora L. (*E. uniflora* L.) dengan nama umum dewandaru merupakan perdu tahunan dengan tinggi \pm 5 m. Tanaman ini diketahui memiliki sifat sebagai antibakteri. Pernyataan ini didukung oleh Souza *et al* (2003) yang menyatakan bahwa *E. uniflora* banyak dimanfaatkan sebagai antibiotik pada diare

dan beragam ekstrak ini sebagai antimikroba menunjukkan hasil positif terhadap *Aspergillus flavus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*. Aktivitas antimikroba daun *Eugenia uniflora* L. yang dilaporkan oleh Adebayo *et al* (1989) memiliki kandungan tanin, glikosida, dan alkaloid. Kandungan ini diperoleh melalui ekstrak dengan etil asetat dan metanol.



Gambar 2.3 Daun dan buah dewandaru (Amalia, 2012)

Sedangkan Fiuza *et al* (2009) menyatakan bahwa pada analisis menggunakan KLT (Kromatografi Lapis Tipis) menunjukkan *E. uniflora* memiliki kandungan flavonoid dalam fraksi etil asetat dan klorofom, tanin dalam fraksi etil asetat, dan terpen dalam fraksi heksan dan klorofom.

Dewandaru banyak mengandung senyawa flavonoid, dimana 96,7% aktivitas antioksidan ekstrak daun dewandaru disumbangkan oleh senyawa flavonoid. Flavonoid dapat digunakan sebagai pelindung mukosa lambung, antioksidan, dan mengobati gangguan fungsi hati (Sutari, 2008). Berbagai penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa daun dewandaru memiliki aktivitas antibakteri, antioksidan, penangkal radikal bebas, penghambat hidrolisis dan oksidasi enzim,

dan antiinflamasi yang disebabkan karena adanya senyawa flavonoid (Reynertson and Kennelly, 2001; Utami dkk, 2005).

2.3.1. Flavonoid

Unsur zat flavonoid pada ekstrak daun dewandaru merupakan salah satu metabolit sekunder. Flavonoid dapat ditemukan di tumbuhan pada bagian daun dan juga akar. Fungsi flavonoid bagi tumbuhan yaitu berperan dalam menentukan warna, rasa, bau, serta kualitas nutrisi makanan. Flavonoid juga berperan dalam pertahanan diri dari serangan hama dan penyakit tumbuhan, dormansi biji, dan molekul sinyal pada berbagai jalur transduksi. Flavonoid merupakan senyawa pereduksi yang baik, menghambat banyak reaksi oksidasi, baik secara enzim maupun non enzim. Flavonoid bertindak sebagai penampung yang baik radikal hidroksi dan superoksida dengan demikian melindungi lipid membran terhadap reaksi yang merusak. Aktivitas antioksidannya dapat menjelaskan flavonoid merupakan komponen aktif tumbuhan yang digunakan secara tradisional untuk mengobati gangguan fungsi hati. Flavonoid merupakan golongan terbesar senyawa fenol alam. Flavonoid merupakan senyawa polar karena mempunyai sejumlah gugus hidroksil yang tidak tersulih, sehingga akan larut dalam pelarut polar seperti etanol, butanol, aseton, dimetilsulfoksida, dimetilformamida, dan air. Senyawa flavonoid adalah senyawa yang mengandung C_{15} terdiri atas dua inti fenolat yang dihubungkan dengan tiga satuan karbon (Rahmawan, 2008).

2.3.2. Tanin

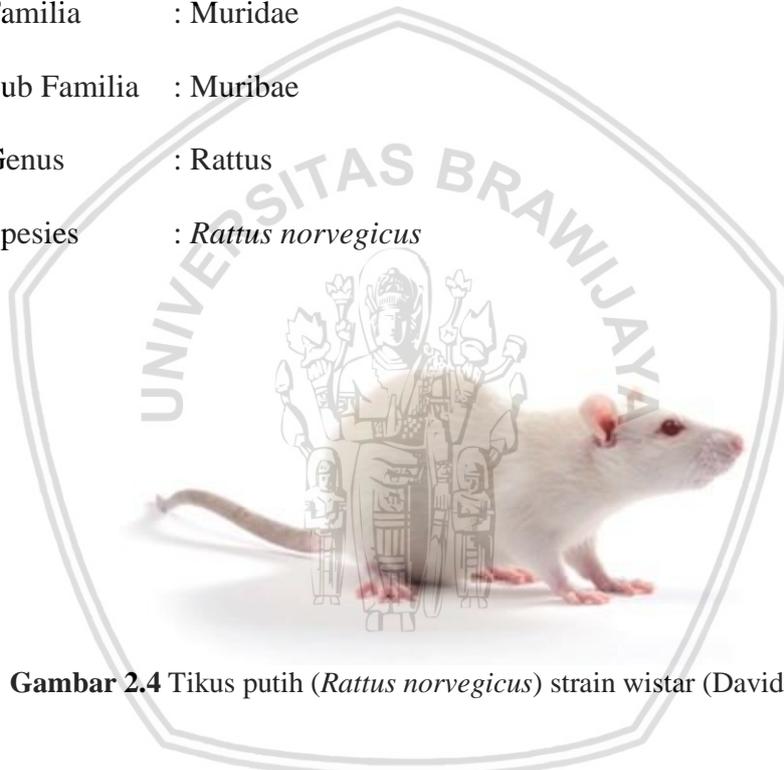
Tanin merupakan senyawa polifenol yang berasal dari tumbuhan, berasa pahit dan kelat. Mekanisme kerja tanin sebagai antibakteri berhubungan dengan

kemampuan dalam mengaktivasi sel mikroba (molekul yang menempel pada sel inang) yang terdapat pada permukaan sel. Tanin mempunyai target pada polipeptida dinding sel akan menyebabkan kerusakan pada dinding sel bakteri karena tanin merupakan senyawa fenol. Pada pengrusakan membran sel, ion H^+ dari senyawa fenol dan turunannya (flavonoid) akan menyerang gugus polar (gugus fosfat) sehingga molekul fosfolipid akan terurai menjadi gliserol, asam karboksilat, dan asam fosfat. Hal ini mengakibatkan fosfolipid tidak mampu mempertahankan bentuk membran sel akibatnya membran sel bocor dan bakteri akan mengalami hambatan pertumbuhan bahkan kematian (Kredy, 2010).

2.4. Hewan Coba

Hewan percobaan adalah hewan yang sengaja dipelihara untuk digunakan sebagai hewan model di dalam berbagai bidang ilmu dalam skala penelitian atau pengamatan laboratorik. Salah satu hewan percobaan yang memiliki sifat fisiologis mirip dengan manusia adalah tikus. Tikus memiliki dua spesies, yaitu tikus hitam (*Rattus rattus*) dan tikus putih (*Rattus norvegicus*). Spesies yang paling sering digunakan sebagai hewan model pada penelitian mengenai manusia maupun mamalia lain adalah *Rattus norvegicus*. *Rattus norvegicus* (**Gambar 2.4**) adalah hewan percobaan yang paling banyak digunakan dalam penelitian yang berkaitan dengan pencernaan (Larasathi, 2014). Tikus putih (*Rattus norvegicus*) dipilih sebagai hewan model karena tikus memiliki fisiologis dan respon endokrin yang mirip dengan manusia. Tikus putih tergolong sebagai hewan nokturnal yang termasuk cerdas dan tahan terhadap infeksi (Azhar, 2015). Klasifikasi tikus *Rattus norvegicus* sebagai berikut (Pangestika, 2014):

Kingdom : Animalia
Filum : Chordata
Sub Filum : Vertebrata
Class : Mamalia
Ordo : Rodentia
Sub Ordo : Sciurognathi
Familia : Muridae
Sub Familia : Muribae
Genus : Rattus
Spesies : *Rattus norvegicus*



Gambar 2.4 Tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar (David, 2000)

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar memiliki berat badan mencapai 35-40 g pada umur 4 minggu dan setelah dewasa rata-rata memiliki berat badan mencapai 200-250 g. Tikus jantan umur 12 minggu memiliki berat badan hingga 240 g. Panjang tubuh tikus putih ini mencapai 40 cm bila diukur dari hidung sampai ujung ekor. Panjang ekor dapat mencapai 20,5 cm. Tikus ini memiliki mata yang berwarna merah.

Pembuatan hewan coba dengan induksi *E. coli* dapat dilakukan dengan sonde lambung. Ada dua sifat yang membedakan antara hewan coba tikus dan hewan coba yang lainnya, yaitu tikus tidak muntah sehingga memudahkan kita untuk melakukan sonde lambung. Selain itu, tikus hanya mempunyai kelenjar keringat di telapak kaki. Ekor tikus menjadi bagian tubuh yang penting karena dapat berfungsi sebagai pengurang panas tubuh, dan mekanisme perlindungan lain adalah tikus akan mengeluarkan banyak ludah dan menutupi bulunya dengan ludah tersebut (Sirois, 2005).

Astawan dkk (2011) menyatakan bahwa pada penelitian sebelumnya sebanyak 12 ekor tikus diadaptasi dengan pakan standart selama tujuh hari, untuk perlakuan *E. coli*. Pada perlakuan infeksi *E. coli*, tikus diberi 1 mL suspensi sel yang mengandung 10^6 CFU/mL *E. coli* dengan cara *force feeding*.

2.5. Tumor Nekrosis Faktor Alpha (TNF- α)

Tumor Nekrosis Faktor Alpha (TNF- α) bersumber utama dari fagosit mononuklear dan sel T yang diaktifkan antigen, sel NK, dan sel mast. Tumor Nekrosis Faktor Alpha berfungsi membuat permukaan sel endotel menjadi adesif melalui ekspresi reseptor permukaan baru (molekul adesif) pada konsentrasi yang rendah. TNF- α juga menyebabkan peningkatan kemampuan adhesif neutrofil terhadap endotel. Jika produksi TNF- α berlebihan maka akan menyebabkan terganggunya keseimbangan aktivitas prokoagulan dan antikoagulan. TNF- α pada kadar rendah bekerja terhadap leukosit dan endotel, menginduksi inflamasi akut. TNF- α pada kadar sedang berperan dalam inflamasi sistemik, dan saat tinggi menimbulkan patologi syok septik (Karnen dan Iris, 2009).

Proses penyembuhan luka diperlukan peranan mediator pro-inflamasi seperti TNF- α dan IL-1. Bertambah baik dan maksimal kerja mediator pro-inflamasi untuk meningkatkan kerja sel inflamasi pada fase inflamasi, maka proses pembersihan luka semakin baik. Ini dapat mempercepat proses penyembuhan luka. TNF- α merupakan mediator pro-inflamasi yang dirangsang oleh neutrofil yang bermanfaat untuk merangsang sel inflamasi, fibroblas, dan sel epitel. Semakin tinggi kadar TNF- α pada luka, menandakan proses inflamasi sedang berlangsung, kalau kadar TNF- α menurun, menandakan luka mulai membaik. TNF- α juga berfungsi sebagai migrasi polimorfonuklear (PMN), apoptosis sel, sintesa sel matrix metalloproteinase (MMP), dan mempengaruhi apoptosis fibroblast (Navarro-Gonzalez *and* Fernandez, 2008).

TNF- α bersifat sitotoksik pada berbagai sel tumor dan juga terbukti merupakan modulator respon imun yang kuat dalam menginduksi molekul adhesi, sitokin lain, dan aktivasi neutrofil. Dalam proses inflamasi TNF- α mampu meningkatkan peran pro-trombotik dan merangsang molekul adhesi dari sel leukosit serta menginduksi sel endotel, berperan dalam mengatur aktivasi makrofag dan respon imun dalam jaringan. Beberapa efek TNF, sebagai berikut:

1. Efek TNF sebagai sitotoksik yaitu efek dari beberapa peristiwa jenis tumor yang mengalami nekrosis disertai perdarahan. Mekanisme kematian sel tumor *in vivo* oleh TNF belum jelas, tetapi kematian sel tumor akan dipercepat jika terdapat hambatan sintesis protein dalam sel tumor
2. Efek TNF pada radang yaitu TNF dianggap sebagai mediator utama dalam radang

3. Efek TNF pada hematopoetik yaitu aktivitas dalam bentuk penghambatan koloni biakan granulosit-monosit, eritrosit, dan koloni sel multi-potensial pada jaringan sumsum tulang
4. Efek TNF pada imunologik yaitu tumor nekrosis faktor mempunyai aktivitas perangsangan yang multiple terhadap limfosit T teraktifkan, misalnya respon proliferasi limfosit T terhadap antigen, peningkatan reseptor untuk IL-2 dan IFN- γ . TNF dapat meningkatkan ekspresi antigen MHC kelas 1 pada fibroblast dan sel endotel (Abbas *et al*, 2000).

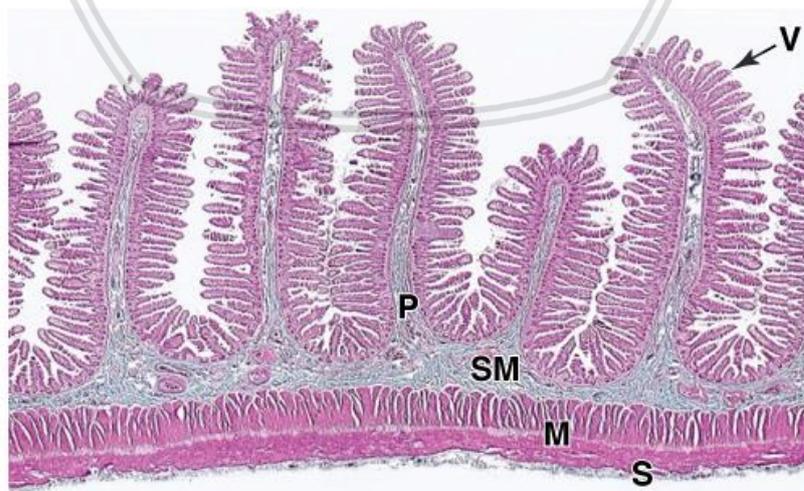
2.6. Jejunum

Usus kosong atau jejunum adalah bagian kedua dari usus halus, di antara usus dua belas jari (duodenum) dan usus penyerapan (ileum). Usus kosong atau jejunum dan usus penyerapan atau ileum digantungkan dalam tubuh dengan mesenterium. Permukaan dalam usus kosong berupa membran mukus dan terdapat jonjot usus (vili), yang memperluas permukaan dari usus. Secara histologis dapat dibedakan dengan usus dua belas jari, yakni berkurangnya kelenjar Brunner. Secara histologis pula dapat dibedakan dengan usus penyerapan, yakni sedikitnya sel goblet.

Fungsi utama dari usus halus adalah digesti enzimatik dan mengabsorpsi nutrisi. Usus halus memiliki epitel khusus yang mempunyai daerah permukaan yang luas. Struktur seperti vili pada mukosa dapat mengoptimalkan absorpsi. Vili ditutupi oleh sel absorptif (enterosit) yang tersusun erat, masing-masing memiliki mikrovili pada permukaan lumen sepanjang membran plasma. Keberadaan mikrovili akan meningkatkan luas permukaan (Samuelson, 2007).

Jejunum diturunkan dari kata sifat *jejune* yang berarti “lapar” dalam bahasa Inggris modern. Arti aslinya berasal dari bahasa Latin, *jejunus*, yang berarti “kosong”. Jejunum juga sering disebut dengan usus halus membentang dari flexura duodenojejunales sampai ke juncture ileocaecalis. Jejunum ini merupakan organ intraperitoneal. Jejunum memiliki penggantung disebut dengan radix mesenterii. Pada bagian akhir dari ileum akan terdapat sebuah katup yang disebut dengan valvula ileocaecal (valvula bauhini) yang merupakan suatu batas yang memisahkan antara intestinum tenue dengan intestinum crassum. Selain itu, juga berfungsi untuk mencegah terjadinya flora normal dalam intestinum crassum kembali ke intestinum tenue, dan juga untuk mengatur pengeluaran zat sisa penyerapan nutrisi.

Panjang rata-rata duodenum, jejunum, dan ileum pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) dewasa adalah 10 cm, 100 cm, dan 3 cm. Jumlah vili pada usus menurun seiring dengan pertambahan umur, terutama pada umur 21 - 35 hari. Ukuran vili juga mengalami penurunan dari duodenum ke ileum (Sharp and Villano, 2013).

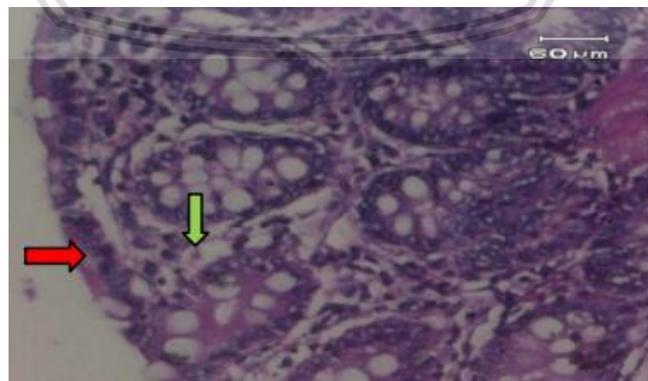


Source: Mescher AL: *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas*.

Gambar 2.5 Lipatan plika pada jejunum (Junqueira, 2010)

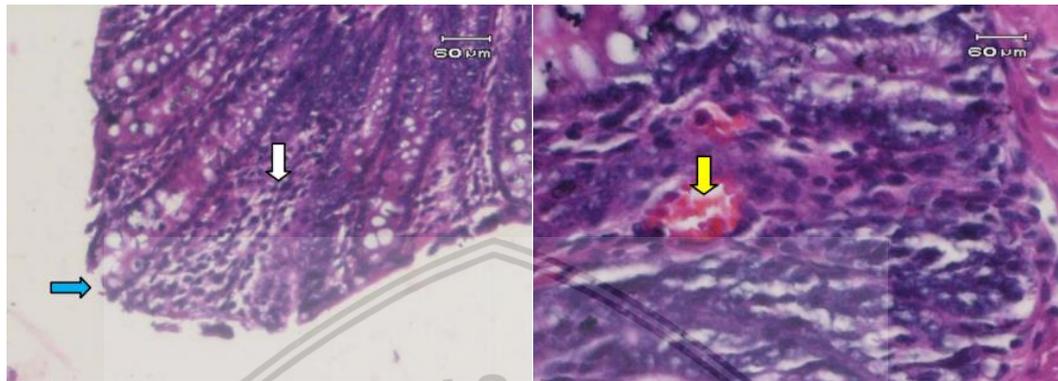
Gambaran histologi jejunum normal dapat terlihat dari tunika mukosa dengan vili yang berbentuk panjang dan tipis (Peckham, 2014). Jejunum memiliki 4 lapisan, yaitu tunika mukosa, tunika submukosa, tunika muskularis, dan tunika serosa (Rospitasari, 2017). Mukosa dan submukosa (SM) pada usus halus memproyeksikan bentuk lipatan yang berbeda disebut Plika (P), yang mengelilingi atau spiral di sekitar lingkaran bagian dalam dan terbentuk baik di jejunum. Di setiap lipatan mukosa terdapat bentukan yang menutupi dengan struktur rapat disebut vili. Pada bagian longitudinal terdapat dua lapisan muskularis (M) yang jelas dapat dibedakan. Lapisan dalam otot polos mengelilingi submukosa, lapisan luar memanjang hanya di dalam serosa (S) pada bagian luar usus. Susunan dari otot polos mempersiapkan untuk gerakan peristaltik usus yang kuat (Junqueira, 2010).

Vili tersusun atas kumpulan sel epitel silindris sebaris yang berjajar dan jaringan ikat longgar lamina propria. Mikrovili sel epitel berfungsi untuk menyerap nutrisi. Sel epitel vili mengandung filamen aktin dan miosin yang berfungsi untuk pergerakan mikrovili, serta mengandung jaringan terminal sebagai reseptor perlekatan mikroba (Inamoto *et al*, 2008).



Gambar 2.6 Histopatologi organ jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) keadaan sehat. Terlihat epitel silindris utuh (panah merah) dan sedikit sel limfosit (panah hijau) (Perbesarannya 200x) (Towoliu dkk, 2013)

Arsitektur mukosa usus halus normal ditunjukkan dengan permukaan epitel yang utuh, jumlah limfosit yang sedikit dan tidak ada pelebaran pembuluh darah (Towoliu dkk, 2013).

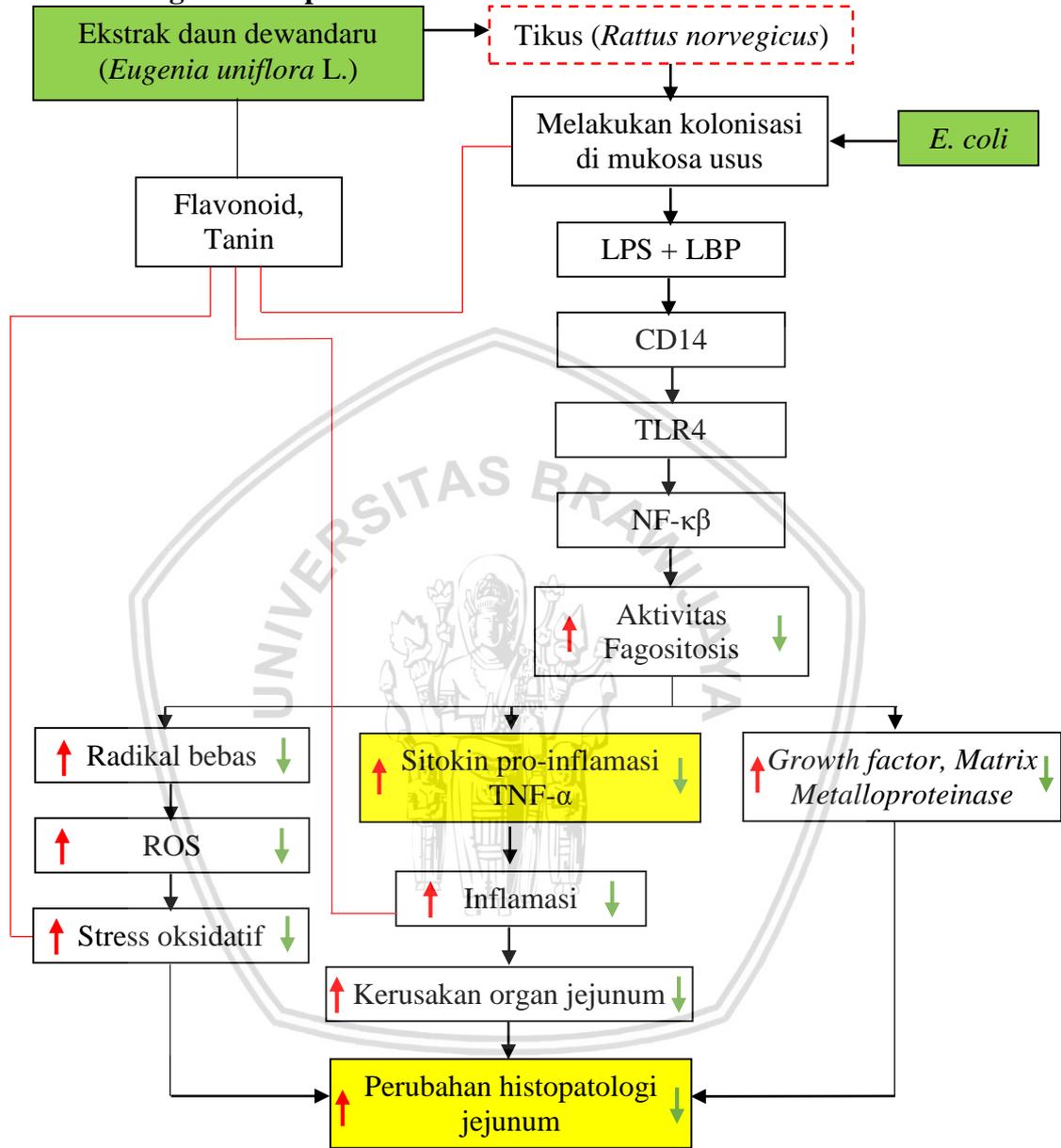


Gambar 2.7 Histopatologi organ jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi *E. coli* 10^6 CFU/mL selama 7 hari. Terlihat epitel silindris mengalami erosi (panah biru), limfosit yang banyak (panah putih) menandakan adanya peradangan, dan pelebaran pembuluh darah kapiler (panah kuning) (perbesaran 200x dan 400x) (Towoliu dkk, 2013)

Escherichia coli yang bersifat patogen yang menempel pada lapisan mukosa dapat menyebabkan erosi sel-sel epitel permukaan dan peradangan usus halus (Towoliu dkk, 2013). Inflamasi pada jejunum ditandai dengan adanya edema, infiltrasi sel-sel inflamasi seperti neutrofil, basofil, dan eosinofil, serta kerusakan vili dan epitel (Mitchel and Cotran, 2003).

BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan Gambar:

- : variabel bebas
- : variabel tergantung
- : hewan model gastroenteritis
- ↑ : efek infeksi *E. coli*
- ↓ : efek pemberian ekstrak daun dewandaru
- : menghambat

Tikus jantan strain wistar diberi perlakuan induksi ekstrak daun dewandaru dengan menggunakan metode sonde lambung. Ekstrak daun dewandaru mengandung senyawa flavonoid dan tanin. Flavonoid akan berikatan dengan DNA bakteri sehingga menyebabkan kerusakan permeabilitas dinding sel, mikrosom, dan lisosom bakteri. Selain itu flavonoid dapat berfungsi sebagai antioksidan yang memiliki gugus hidroksil yang terikat pada CO₂ sehingga dapat menangkap radikal bebas dengan menyumbang satu atom hidrogen. Flavonoid dapat juga sebagai antiinflamasi berperan melalui penghambatan enzim COX-2 (siklooksigenase-2), dimana COX-2 merupakan enzim yang terinduksi pada sel yang mengalami inflamasi oleh sitokin (TNF- α) dan endotoksin. Sedangkan senyawa tanin sebagai anti bakteri dapat menginaktivasi adhesi sel mikroba sehingga bakteri tidak dapat melakukan perlekatan pada epitel usus halus dan menstimulasi sel-sel fagosit yang berperan dalam respon imun seluler.

Hewan coba berupa tikus model gastroenteritis dibuat dengan cara menginduksi tikus dengan *E. coli* menggunakan sonde lambung. *E. coli* yang telah diinduksikan kemudian melakukan adhesi pada mukosa usus. Kemudian bakteri *E. coli* akan melakukan kolonisasi sehingga terjadi peningkatan jumlah *E. coli* di dalam usus dan mengeluarkan endotoksin pada saat bakteri mengalami lisis. Salah satu ciri khas dari bakteri gram negatif yang terletak pada dinding sel yaitu adanya Lipopolisakarida (LPS). LPS dilepaskan saat bakteri mengalami lisis sehingga merangsang sistem pertahanan tubuh (*immunity*) dan terjadi proses fagositosis oleh makrofag. Lipopolisakarida yang telah lisis dapat merusak epitel saluran pencernaan dan dapat memasuki aliran darah. *Lipopolisakarida Binding Protein*

(LBP) merupakan suatu protein fase akut yang disintesis oleh hepatosit yang dianggap sebagai tanda adanya endotoksin dalam darah. Kompleks LPS-LBP kemudian akan mentransfer LPS pada reseptor CD14 yang terdapat di permukaan makrofag. Setelah berikatan dengan LPS, CD14 berinteraksi dengan TLR4 sehingga menyebabkan aktivasi dari NF- κ B (*Nuclear Factor kappa B*). Aktivasi NF- κ B akan memicu aktivasi fagositosis makrofag. NF- κ B merupakan faktor transkrip pada makrofag yang akan meningkatkan produksi dari sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α dan akan menghasilkan efek yang merusak jaringan saat terjadi gastroenteritis.

Radikal bebas yang terjadi akibat aktivitas fagositosis akan membentuk ROS (*Reactive Oxygen Species*) untuk membunuh bakteri yang masuk. Peningkatan produksi ROS di organ atau sel-sel yang menyusun organ seperti jejunum akan mengakibatkan peningkatan stress oksidatif. Senyawa oksigen reaktif yang berinteraksi dengan lipid bilayer pada membran sel akan menghasilkan peroksidasi lipid pada jejunum yang akan mengakibatkan hilangnya fungsi seluler. Sehingga dengan adanya peranan flavonoid dapat menstabilkan ROS dimana akan menghambat kadar TNF- α serta menghambat kerusakan organ jejunum.

Aktivitas fagositosis juga mengakibatkan terbentuknya *Growth Factor* atau GF dan *Matrix Metalloproteinase* atau MMP. MMP berperan dalam degradasi molekul matriks ekstraseluler dalam jaringan. MMP mempunyai kemampuan untuk memodifikasi integritas jaringan pada kondisi fisiologi normal termasuk dalam perkembangan embrionik, migrasi sel, penyembuhan luka, resorpsi jaringan serta remodeling jaringan. GF adalah suatu polipeptida yang mengawali pertumbuhan,

diferensiasi, metabolisme sel, dan mengatur proses perbaikan jaringan. Jika GF dan MMP yang dihasilkan sedikit, maka kerusakan jaringan organ jejunum akan semakin parah.

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan kerangka konsep yang telah didapatkan hipotesa penelitian sebagai berikut:

1. Pemberian ekstrak daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) dapat menghambat kerusakan mukosa jejunum pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) model gastroenteritis yang diinfeksi *E. coli*
2. Pemberian ekstrak daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) dapat menghambat kadar TNF- α pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) model gastroenteritis yang diinfeksi *E. coli*.

BAB IV METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei sampai Juli 2017 dan penelitian ini dilakukan di beberapa laboratorium, antara lain:

1. Tahapan pembuatan ekstrak daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) dilaksanakan di Laboratorium UPT Materia Medica Batu
2. Tahapan pemeliharaan dan perlakuan terhadap tikus putih (*Rattus norvegicus*) dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
3. Tahapan pembuatan preparat HE jejunum dilaksanakan di Laboratorium Patologi Anatomi Kessima Medika Malang
4. Tahapan pewarnaan imunohistokimia jejunum untuk TNF- α dilaksanakan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
5. Tahapan pengamatan preparat HE dan pengukuran ekspresi TNF- α dilaksanakan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.2 Alat dan Bahan

4.2.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain kandang pemeliharaan hewan coba, botol minum tikus, tempat pakan tikus, alat sonde, toples bertutup, timbangan analitik, gelas ukur, botol, *waterbath*, *erlenmeyer*, *rotary evaporator*, *beaker glass*, *alcoholmeter*, *shaker digital*, kertas saring, *dissecting set*, papan bedah, pot organ, cawan petri, mikrotom, *appendorf*, *blender*, mikropipet 10-

100 μm , *yellow tip*, *blue tip*, *cover glass*, *object glass*, lemari pendingin, inkubator, *microtube*, *vortex*, *sentrifuse*, *timer*, kertas label, spidol marker, masker, *tissue*, *glove*, kamera.

4.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar jenis kelamin jantan berumur 8-12 minggu dengan berat badan 150-200 gram, makanan dan minuman hewan coba, daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.), bakteri *E. coli*, NaCl 0,9%, Alkohol 96%, Buffer Formalin 10%, larutan *Paraformaldehyd* (PFA) 4%, alkohol absolut, alkohol bertingkat (100%, 95%, 90%, 80%, 70%), *Hematoxylen-Eosin*, aquadest, etanol bertingkat (70%, 80%, 90%, 95%, 100%), etanol absolut 96%, xylol, entellan, paraffin, H_2O_2 3%, *Bovine Serum Albumin* (BSA) 1%, larutan *Phospate Buffer Saline-Azida* (PBS) pH 7,4, antibodi primer rat anti TNF- α , antibodi sekunder *Rabbit anti-rat IgG* berlabel *biotin*, *Strep Avidin Conjugated Horseradish Peroxidase* (SHARP), *Diaminobenzidine* (DAB), *object glass*, *cover glass*, minyak emersi.

4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rangkaian Acak Lengkap (RAL) dengan desain *post test only control group*. Hewan coba dibagi menjadi lima kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif yang diinduksi *E. coli*, kelompok perlakuan terapi dibagi menjadi kelompok P1, P2, dan P3 yang diberi ekstrak daun dewandaru dengan dosis bertingkat dan diinduksi *E. coli*, keterangan terdapat pada **Tabel 4.1**.

Tabel 4.1 Rancangan Kelompok Penelitian

Kelompok Perlakuan	Keterangan
Kontrol negatif	Kelompok tikus yang diberi pakan dan minum selama 21 hari tanpa diberikan perlakuan infeksi <i>E. coli</i> dan ekstrak daun dewandaru
Kontrol positif (<i>E. coli</i>)	Kelompok tikus yang diberi pakan dan minum serta diinduksi <i>E. coli</i> 10 ⁶ CFU/mL per ekor per hari menggunakan sonde lambung selama 7 hari mulai hari ke-15 sampai hari ke-21 tanpa diberikan ekstrak daun dewandaru
P1 (Ekstrak daun dewandaru + <i>E. coli</i>)	Kelompok tikus yang diberi pakan dan minum serta diberi ekstrak daun dewandaru 300 mg/kg BB selama 7 hari mulai hari ke-8 sampai hari ke-14 dan diinduksi <i>E. coli</i> 10 ⁶ CFU/mL per ekor per hari menggunakan sonde lambung selama 7 hari mulai hari ke-15 sampai hari ke-21
P2 (Ekstrak daun dewandaru + <i>E. coli</i>)	Kelompok tikus yang diberi pakan dan minum serta diberi ekstrak daun dewandaru 400 mg/kg BB selama 7 hari mulai hari ke-8 sampai hari ke-14 dan diinduksi <i>E. coli</i> 10 ⁶ CFU/mL per ekor per hari menggunakan sonde lambung selama 7 hari mulai hari ke-15 sampai hari ke-21
P3 (Ekstrak daun dewandaru + <i>E. coli</i>)	Kelompok tikus yang diberi pakan dan minum serta diberi ekstrak daun dewandaru 500 mg/kg BB selama 7 hari mulai hari ke-8 sampai hari ke-14 dan diinduksi <i>E. coli</i> 10 ⁶ CFU/mL per ekor per hari menggunakan sonde lambung selama 7 hari mulai hari ke-15 sampai hari ke-21.

Hewan coba yang digunakan yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*) jenis kelamin jantan strain wistar berumur 8 – 12 minggu dengan berat badan antara 150 – 200 gram. Hewan coba dibagi menjadi lima kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif yang diinduksi *E. coli*, kelompok P1, P2, dan P3 yang diberi preventif ekstrak daun dewandaru dengan dosis bertingkat dan diinduksi *E. coli* dengan dosis harian. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Larasathi, 2014):

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

Keterangan:

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

t = jumlah kelompok (perlakuan)

$$5n - 5 \geq 15$$

n = jumlah ulangan yang diperlukan

$$5n \geq 15 + 5$$

$$n \geq 20/5$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan di atas maka untuk lima kelompok perlakuan diperlukan jumlah tikus putih (*Rattus norvegicus*) sebanyak 4 ekor dalam setiap kelompok sehingga dibutuhkan total 20 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) sebagai hewan coba.

Sebelum perlakuan, dilakukan proses aklimatisasi pada tikus selama satu minggu dengan tujuan tikus dapat beradaptasi dengan lingkungannya. Tikus dikandangkan pada kandang yang memudahkan akses pemberian pakan dan minum (Alexandra, 2011).

4.4 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dari penelitian ini adalah:

Variabel bebas : Ekstrak daun dewandaru (300, 400, 500 mg/kg BB) dan dosis pemberian *E. coli* 10⁶ CFU/mL

Variabel tergantung : Ekspresi TNF- α dan histopatologi jejunum

Variabel terkendali : Homogenitas tikus (galur, jenis kelamin, dan berat badan), umur, dan pakan.

4.5 Tahapan Penelitian

4.5.1. Persiapan Hewan Coba Tikus

Hewan percobaan yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan umur 8-12 minggu dengan berat badan sekitar 150-200 gram. Tikus dipelihara di Laboratorium Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya Malang. Tikus diadaptasi selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium. Kemudian dibagi dalam 5 kelompok perlakuan dimana setiap kelompok terdiri atas 4 ekor.

Tikus ditempatkan dalam bak plastik tertutup kawat, dengan ukuran 30 cm x 50 cm x 10 cm dengan alas berupa sekam padi agar kandang tidak lembab. Kandang tikus berlokasi pada tempat yang bebas dari suara ribut dan terhindar dari asap industri maupun polutan lainnya. Semua tikus diberi pakan secara teratur dan minum *ad libitum* (Lamanepa, 2005).

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

Pembuatan ekstrak daun dewandaru dilakukan di Laboratorium UPT Materia Medica Batu. Berikut merupakan proses yang dilakukan di laboratorium sehingga

dihasilkan ekstrak yang digunakan sebagai induksi terapi. Daun dewandaru ditimbang sebanyak 100 g dan dimasukkan dalam pelarut etanol 70% sebanyak 100 mL. Serbuk yang telah dimasukkan ke dalam pelarut di toples, diratakan dan ditambahkan pelarut etanol 70% sampai terendam (pelarut yang digunakan minimal 2 kali berat massa serbuk atau lebih). Pelarut yang ditambahkan sebanyak 500 mL. Tutup toples dengan rapat selama 24 jam, kemudian ditaruh di atas *shaker digital* rpm 50 (Materia Medica, 2017).

Ekstrak cair disaring dengan penyaring kain. Tampung ekstrak dalam erlenmeyer. Didapatkan endapan yang dimasukkan kembali dalam toples dan ditambahkan pelarut sampai terendam (minimal pelarut 5 cm di atas permukaan), dalam hal ini digunakan 500 mL pelarut. Biarkan semalam atau 24 jam diatas *shaker digital* rpm 50. Hasil ekstrak cair pertama dan kedua dijadikan satu dan diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator*. Diperlukan waktu 2 jam untuk evaporasi. Ekstrak yang dihasilkan dievaporasi/diuapkan di atas *water bath* selama 2 jam. Dari 100 g serbuk daun dewandaru yang diekstraksi dengan menggunakan pelarut etanol 70% sebanyak 1 L dihasilkan ekstrak sebanyak 50 mL (Materia Medica, 2017).

4.5.3. Perbanyak Bakteri *E. coli*

Suspensi bakteri *E. coli* yang digunakan pada penelitian ini, yaitu *E. coli* patogen dengan konsentrasi bakteri 10^6 CFU/mL. *E. coli* yang sudah dikultur selanjutnya diambil dengan ose steril lalu disuspensikan dalam tabung reaksi yang berisi 10 mL larutan NaCl 0,9% sampai didapat konsentrasi bakteri sama dengan larutan standart MC. Farland no 1, menunjukkan konsentrasi bakteri adalah 3×10^8

CFU/mL. Setelah itu dilakukan pengenceran dengan mengambil 1 mL suspensi bakteri (10^8 CFU/mL) menggunakan pipet, kemudian dimasukkan ke dalam tabung steril dan ditambahkan larutan NaCl 0,9% sebanyak 9 mL dan dikocok hingga homogen maka diperoleh suspensi bakteri dengan konsentrasi 10^7 CFU/mL, diulang langkah yang sama untuk memperoleh konsentrasi bakteri 10^6 CFU/mL (Putra, 2017).

4.5.4. Pemberian Terapi Ekstrak Daun Dewandaru (*Eugenia uniflora* L.)

Hewan coba dibagi menjadi lima kelompok perlakuan, masing-masing kelompok perlakuan terdiri dari empat ekor tikus putih. Kelompok perlakuan meliputi kelompok tikus putih kontrol negatif (-), kelompok tikus putih kontrol positif (+), kelompok tikus putih perlakuan 1, kelompok tikus putih perlakuan 2, dan kelompok tikus putih perlakuan 3. Ekstrak daun dewandaru diberikan pada kelompok tikus putih perlakuan 1 dengan dosis 300 mg/kg BB, kelompok tikus putih perlakuan 2 dengan dosis 400 mg/kg BB, dan kelompok tikus putih perlakuan dengan dosis 500 mg/kg BB. Ekstrak daun dewandaru diberikan satu kali sehari dengan cara sonde lambung. Pemberian ekstrak daun dewandaru pada hewan coba dilakukan selama 7 hari pada hari ke-8 hingga hari ke-14 (Cynthia, 2006).

4.5.5. Pembuatan Hewan Model Gastroenteritis

Model hewan gastroenteritis didapatkan dengan cara induksi suspensi *E. coli* 10^6 CFU/mL. Bakteri *E. coli* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi dan Imunologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Menurut Astawan (2011), bakteri diberikan pada semua tikus putih kecuali kelompok tikus putih kontrol

negatif dengan dosis 1 mL per hari dengan cara sonde lambung selama 7 hari pada hari ke-15 hingga hari ke-21.

4.5.6. Preparasi Organ Jejunum

Pengambilan organ jejunum pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) perlakuan 1, 2, 3, 4, dan 5 dilakukan pada hari ke 22. Menurut Jusuf (2009), tikus putih (*Rattus norvegicus*) didislokasi pada bagian *vertebrae cervicalis* dan dilakukan pembedahan. Pembedahan dilakukan pada rongga abdomen, tikus posisi rebah dorsal pada papan pembedahan. Diincisi mulai dari ventral *midline* abdomen, diincisi kulit, subkutan lalu diincisi muskular daerah abdomen ke arah caudal, dicari organ jejunum. Organ jejunum kemudian dibilas dengan NaCl fisiologis 0,9% direndam dalam larutan formalin 10% dalam pot, diberi label kemudian dilanjutkan pembuatan preparat histopatologi dengan pewarnaan HE dan pengukuran ekspresi TNF- α .

4.5.7. Pembuatan Preparat Histopatologi Jejunum dengan Pewarnaan HE

Organ jejunum yang akan dibuat preparat dimasukkan kedalam larutan fiksatif PFA 4%, kemudian dideparafinasi pada xylol sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit, kemudian dimasukkan ke dalam alkohol absolut sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. Proses dehidrasi dengan memasukkan ke dalam tabung yang berisi alkohol 70%, 80%, 90%, dan 100% masing-masing selama 5 menit secara bertahap untuk menghilangkan semua air dari dalam jaringan, kemudian direndam dalam aquadest. Jaringan diletakkan di dalam cawan kecil berisi paraffin cair agar mengeras. Jaringan yang telah terblok paraffin tersebut dipotong untuk *sectioning (slicing)*. Pemotongan blok yang telah mengeras

berisi jaringan tersebut diletakkan pada mikrotom dan dipotong menggunakan *steel* mikrotom atau *glass blade* menjadi bagian-bagian dengan ketebalan 1-10 μm . Potongan-potongan tersebut diapungkan di atas air kemudian ditransfer ke *object glass* untuk pewarnaan. Pewarna yang digunakan untuk membuat preparat jejunum adalah kombinasi Hematoxylin dan Eosin (HE) (Junqueira, 2010). Proses yang telah dijelaskan di atas dapat dilihat secara rinci pada **Lampiran 8**.

Preparat yang telah diwarnai selanjutnya diamati dibawah mikroskop Olympus BX51. Pengamatan ini dilakukan mulai dari perbesaran 400x atau 1000x untuk mengetahui adanya erosi vili dan sel radang pada tunika mukosa jejunum.

4.5.8. Pengukuran Ekspresi TNF- α dengan Metode Imunohistokimia (IHK)

Menurut Jusuf (2009), metode pewarnaan preparat IHK pada jaringan jejunum dilakukan dengan prosedur yang terdiri dari proses deparafinasi dan rehidrasi. Proses deparafinasi dengan menggunakan xylol bertingkat 1-2 masing-masing 5 menit. Lalu dilanjutkan dengan proses rehidrasi dengan menggunakan alkohol 70%, 80%, 90%, 95%, dan 100% secara berurutan selama 3 menit. Jaringan dicuci dengan aquadest dan PBS sebanyak tiga kali masing-masing selama 5 menit, direndam dalam H_2O_2 selama 20 menit, kemudian preparat dicuci dengan PBS sebanyak tiga kali masing-masing selama 5 menit. Blocking dilakukan dengan menggunakan BSA 1% (*Bovine Serum Albumin*) selama 30 menit pada suhu ruang. Kemudian preparat dicuci dengan PBS sebanyak tiga kali masing-masing selama 5 menit.

Proses selanjutnya yaitu diinkubasi dengan antibodi primer *anti-rat* TNF- α selama 24 jam pada suhu 4°C, dicuci dengan PBS sebanyak tiga kali masing-masing

selama 5 menit, ditambah dengan antibodi sekunder *Rabbit anti-rat IgG* berlabel *biotin* dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang. Slide preparat kemudian dicuci dengan PBS sebanyak tiga kali masing-masing selama 5 menit. Ditambah SA-HRP (*Strep Avidin-Horse Radish Peroxidase*) selama 30-60 menit pada suhu ruang. Dicuci dengan PBS sebanyak tiga kali masing-masing selama 5 menit. Lalu ditambahkan substrat berupa kromagen DAB (*Diamano Benzidine*) selama 10-20 menit pada suhu ruang untuk menghasilkan warna coklat. Preparat dibilas dengan aquadest sebanyak tiga kali masing-masing selama 5 menit. Kemudian dicuci dengan PBS sebanyak tiga kali masing-masing selama 5 menit. Dilakukan *counterstaining* dengan Mayer's Hematoxylin selama 5 menit pada suhu ruang dan dicuci dengan aquadest sebanyak tiga kali masing-masing selama 5 menit. Preparat dikeringkan dan dilakukan *mounting* menggunakan entellan kemudian ditutup dengan *cover glass* (Jusuf, 2009).

Langkah setelah diperoleh preparat imunohistokimia, preparat diamati dengan mikroskop Olympus BX51 untuk menentukan hasil secara kualitatif berupa positif atau negatif ekspresi TNF- α . Preparat diamati dimulai dari perbesaran 400x dan 1000x untuk melihat area jaringan yang menunjukkan ekspresi TNF- α . Dari seluruh luas jaringan, ditentukan lima lapang pandang area ekspresi TNF- α (Junqueira and Carneiro, 2010). Masing-masing lapang pandang diamati dengan perbesaran 400x untuk diperoleh *digital image*. *Digital image* diproses menggunakan aplikasi Immunoratio untuk menghitung luas area yang mengekspresikan TNF- α dalam presentase. Prinsip dari Immunoratio memisahkan area nuklei yang terwarnai DAB dan hematoxylin dari gambar mikroskop,

kemudian menghitung persentase area yang terwarnai DAB dari area nuklear total dan menghasilkan gambar *pseudo-colored* yang sesuai dengan hasil segmentasi (pemisahan). Area yang terwarnai DAB tersebut merupakan area yang mengekspresikan TNF- α (Touminen, *et al.*, 2010). Proses yang telah dijelaskan di atas dapat dilihat secara rinci pada **Lampiran 9**.

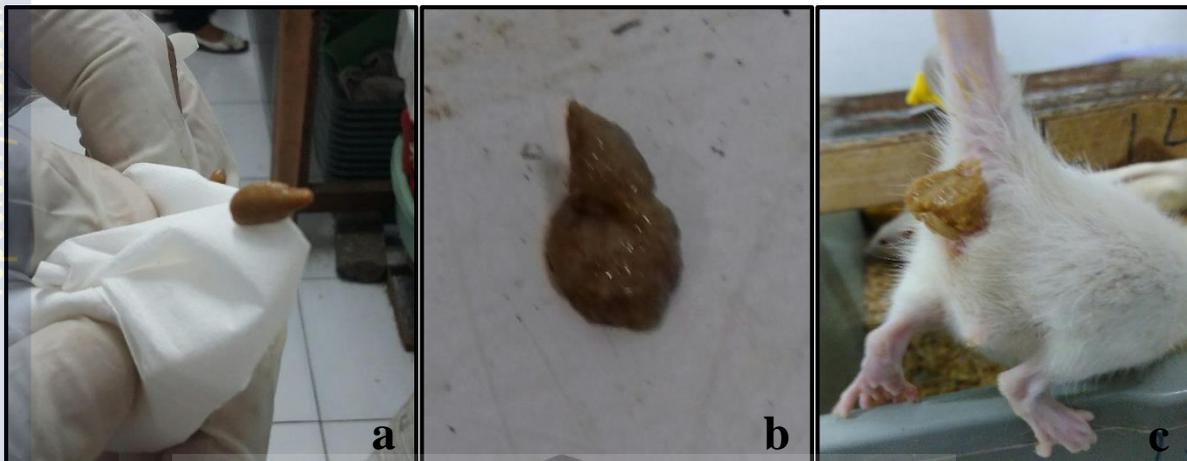
4.5.9. Analisa Data

Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekspresi TNF- α dan gambaran histopatologi jejunum. Data yang diperoleh dari hasil perlakuan berupa ekspresi TNF- α diolah dengan menggunakan uji *One Way Analysis of Variance* (ANOVA) dengan taraf kepercayaan sebesar 95% ($\alpha = 0,05$) dengan menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) 16,0 for Windows untuk mengetahui perbedaan rata-rata antar kelompok perlakuan atau perbedaan keseluruhan dari kelompok perlakuan. Apabila terdapat perbedaan yang nyata diantara kelompok perlakuan, maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) / uji *Tukey*. Gambaran histopatologi jejunum dengan pewarnaan HE menggunakan data kualitatif, yang akan dianalisis dan disajikan secara deskriptif.

BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Hasil Hewan Coba Model Gastroenteritis yang Diinduksi *Escherichia coli*

Gastroenteritis yaitu kondisi medis yang ditandai dengan peradangan pada saluran pencernaan, sehingga mengakibatkan kombinasi diare, muntah, serta kejang perut (Suraatmaja, 2005). Salah satu penyebab dari penyakit ini adalah adanya infeksi bakteri yaitu *E. coli*. Induksi *E. coli* 10^6 CFU/mL yang diberikan pada hewan coba menunjukkan gejala klinis yang ditemukan pada penderita penyakit gastroenteritis hingga 7 hari pasca induksi *E. coli*. Gejala klinis yang dialami oleh hewan coba model gastroenteritis yaitu perubahan konsistensi feses hingga mengalami diare serta penurunan berat badan yang cukup signifikan (**Lampiran 6**). Berat badan mengalami penurunan pada hewan coba model gastroenteritis kelompok kontrol positif (K+) dan kelompok perlakuan (P1, P2, P3) dibandingkan dengan berat badan hewan coba kelompok kontrol negatif (K-) yang cukup stabil. Pada hewan coba kelompok kontrol negatif (K-) terlihat memiliki konsistensi feses yang padat sedangkan pada hewan coba model gastroenteritis kelompok kontrol positif (K+) terlihat memiliki konsistensi feses yang lembek (**Gambar 5.1**).

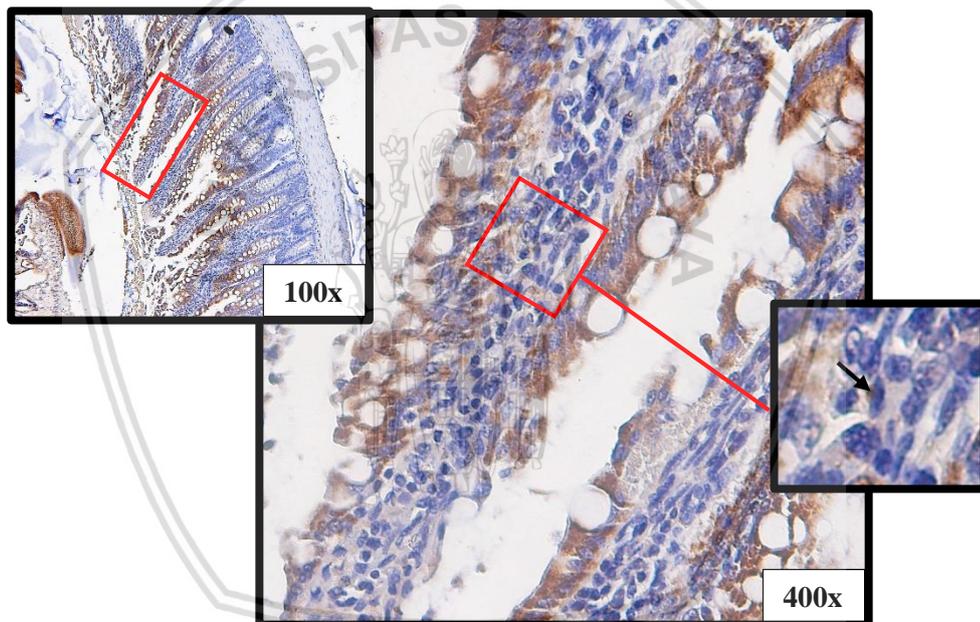


Gambar 5.1 a) Feses pada hewan coba kontrol negatif (K-) tampak padat, b) Feses pada hewan coba kontrol positif (K+) tampak lembek, c) Sisa feses yang masih menempel pada rektum tikus yang menderita gastroenteritis.

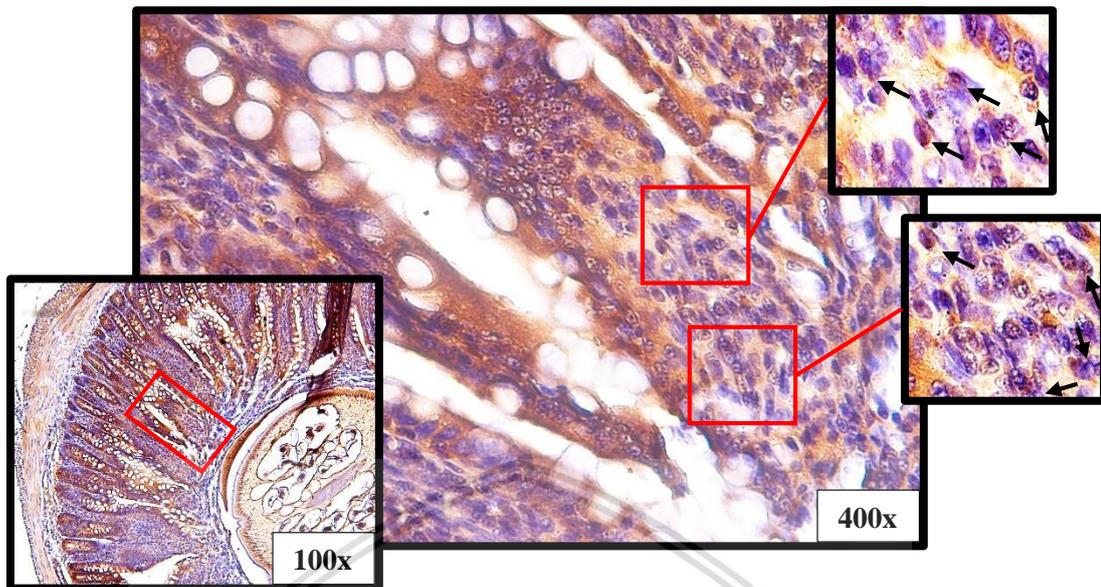
5.2. Pengaruh Preventif Ekstrak Daun Dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) Sebagai Pencegahan Gastroenteritis pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi *Escherichia coli* Dilihat dari Ekspresi TNF- α Jejunum

Hasil penelitian pengaruh preventif ekstrak daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) pada tikus putih model gastroenteritis hasil induksi *E. coli* terhadap ekspresi TNF- α diamati secara langsung pada gambar histopatologi organ jejunum yang telah diwarnai dengan metode pewarnaan imunohistokimia di bawah mikroskop cahaya Olympus BX51 dengan perbesaran 400x. Hasil berupa data kuantitatif yang diperoleh dari perhitungan rata-rata persentase 5 lapang pandang yang diamati dari mikroskop cahaya yang dianalisa menggunakan *immunoratio software*. Ekspresi TNF- α muncul secara normal dalam jumlah sedikit sebagai respon imun yang diproduksi oleh makrofag dalam proses fagositosis sel yang mati dan antigen yang masuk ke dalam tubuh (Garlanda *et al.*, 2014). Pada preparat imunohistokimia ekspresi TNF- α ditunjukkan dengan adanya perubahan warna sitoplasma makrofag yang coklat. Warna coklat terbentuk akibat adanya reaksi

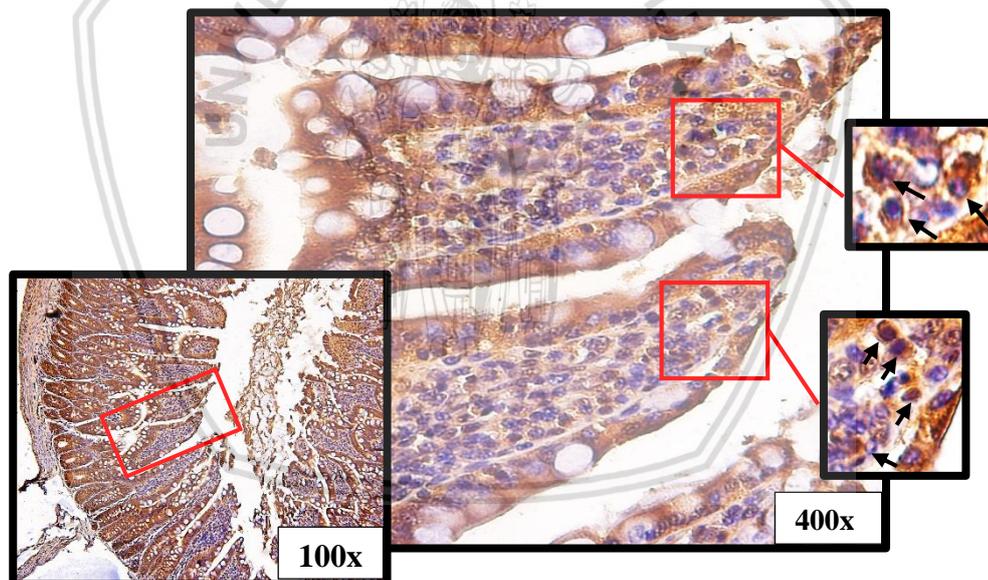
antara antigen TNF- α pada jaringan dengan antibodi primer (*anti-rat* TNF- α) yang kemudian direaksikan dengan antibodi sekunder. Warna coklat muncul akibat kompleks antigen antibodi yang dikenali SA-HRP (*Strep Avidin-Horse Peroxidase*), hasil produksinya ditambah dengan substrat kromagen DAB (*Diamino Benzidine*) yang menimbulkan endapan berwarna dan tervisualisasi berwarna coklat (Sayuti, 2015). Ekspresi TNF- α organ jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) pada tiap kelompok perlakuan disajikan dalam gambar histopatologi jejunum di bawah ini.



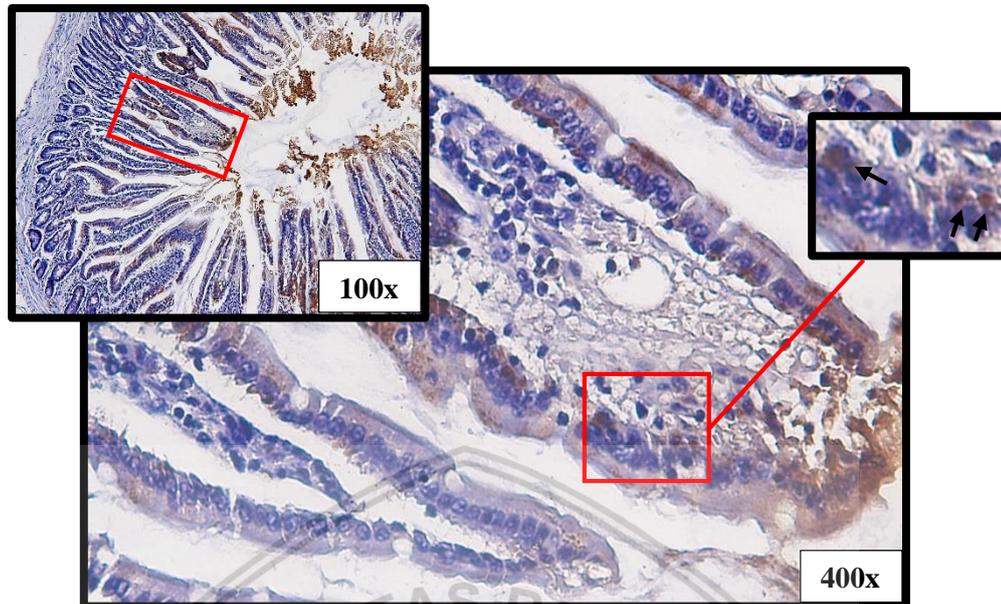
Gambar 5.2 Gambaran imunohistokimia ekspresi TNF- α pada jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) kelompok kontrol negatif.
Keterangan: ekspresi TNF- α (→).



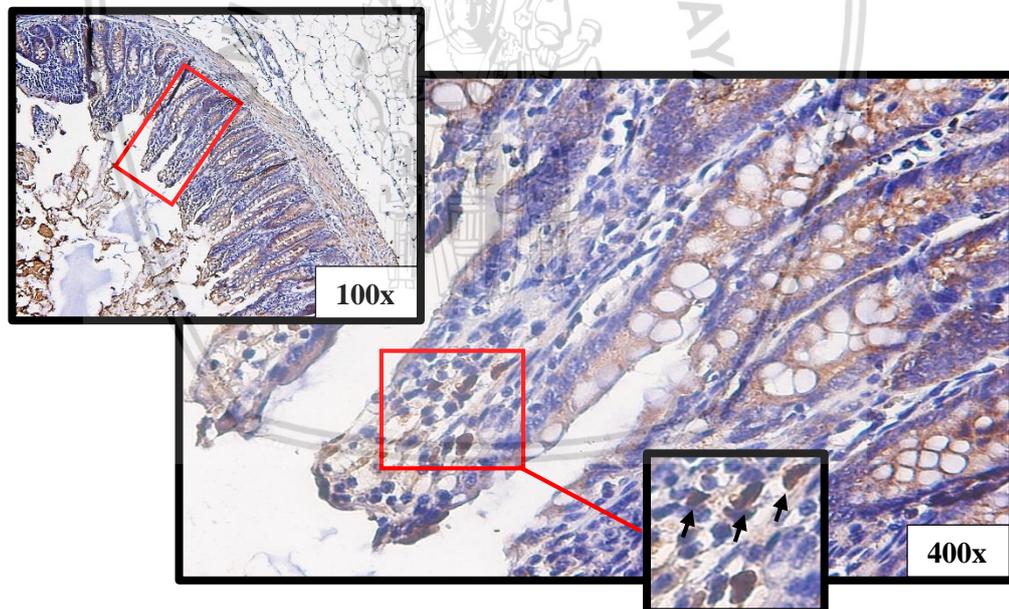
Gambar 5.3 Gambaran imunohistokimia ekspresi TNF- α pada jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) kelompok kontrol positif.
Keterangan: ekspresi TNF- α (\rightarrow).



Gambar 5.4 Gambaran imunohistokimia ekspresi TNF- α pada jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) kelompok preventif 300 mg/kg BB.
Keterangan: ekspresi TNF- α (\rightarrow).



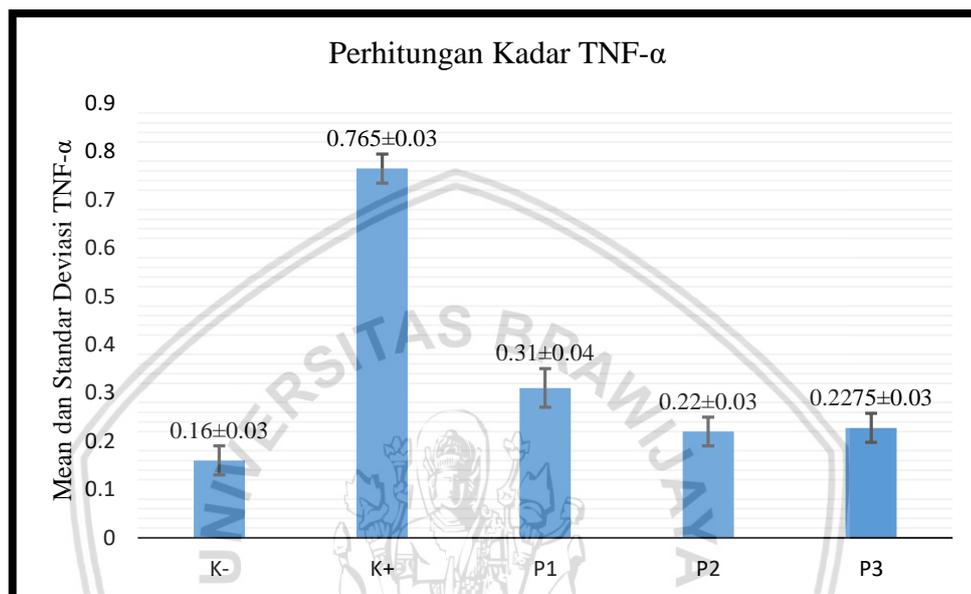
Gambar 5.5 Gambaran imunohistokimia ekspresi TNF- α pada jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) kelompok preventif 400 mg/kg BB.
Keterangan: ekspresi TNF- α (→).



Gambar 5.6 Gambaran imunohistokimia ekspresi TNF- α pada jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) kelompok preventif 500 mg/kg BB.
Keterangan: ekspresi TNF- α (→).

Data rata-rata kadar TNF- α yang diperoleh kemudian dianalisis secara statistika sehingga diperoleh hasil bahwa rata-rata kadar TNF- α tertinggi terdapat

pada kelompok kontrol positif (K+), terendah terdapat pada kelompok kontrol negatif (K-) dan standar deviasi yang diperoleh pada masing-masing kelompok pada rentang 0,03-0,04. Standar deviasi menunjukkan sebaran data dalam sampel. Histogram hasil perhitungan kadar TNF- α ditunjukkan pada **Gambar 5.7**.



Gambar 5.7 Histogram nilai *mean* dan standar deviasi kadar TNF- α .

Keterangan: K- = Kontrol negatif, K+ = Kontrol positif, P1 = Preventif dosis ekstrak daun dewandaru 300 mg/kg BB, P2 = Preventif dosis ekstrak daun dewandaru 400 mg/kg BB, P3 = Preventif dosis ekstrak daun dewandaru 500 mg/kg BB.

Berdasarkan statistika dilakukan uji normalitas dan homogenitas (**Lampiran 10**) data hasil pengukuran kadar ekspresi TNF- α dengan menggunakan *imunoratio* menunjukkan bahwa data terdistribusi normal dan homogen, setelah itu dilanjutkan dengan uji *one way* ANOVA. Pada uji *one way* ANOVA (**Lampiran 10**) diperoleh hasil nilai Sig. < 0,05. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) dengan dosis yang berbeda mempunyai pengaruh terhadap kadar TNF- α pada tikus putih model gastroenteritis hasil induksi *E. coli*. Uji lanjutan yang dilakukan yaitu uji Beda Nyata Jujur (BNJ) atau Tukey dan

didapatkan hasil bahwa antar kelompok memiliki perbedaan rata-rata yang signifikan. Hasil dari uji BNJ (**Lampiran 10**) dapat dilihat dalam **Tabel 5.1** berikut ini.

Tabel 5.1 Hasil Uji BNJ Kadar TNF- α

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Kadar TNF- α \pm SD
Kontrol Negatif (Normal)	0,1600 \pm 0,03 ^a
Kontrol Positif (Gastroenteritis)	0,7650 \pm 0,03 ^c
P1 (Dosis Preventif 300 mg/kg BB)	0,3100 \pm 0,04 ^b
P2 (Dosis Preventif 400 mg/kg BB)	0,2200 \pm 0,03 ^a
P3 (Dosis Preventif 500 mg/kg BB)	0,2275 \pm 0,03 ^a

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

Pada tabel di atas dapat dilihat bahwa pada kelompok tikus kontrol negatif (K-) memiliki rata-rata kadar TNF- α yang berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan kelompok kontrol positif (K+) dan kelompok perlakuan 1 (P1), tetapi tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan 2 (P2) dan perlakuan 3 (P3). Kelompok tikus kontrol negatif (K-) merupakan kelompok kontrol negatif yang tidak diinduksi *E. coli* dan terapi ekstrak daun dewandaru. Munculnya ekspresi TNF- α pada kelompok kontrol negatif (K-) (**Gambar 5.2**) yang tidak diinduksi *E. coli* karena secara normal TNF- α diekspresikan oleh makrofag di lamina propria yang merupakan respon imun (Bueno and Anna, 2013). Kelompok kontrol negatif (K-) digunakan sebagai acuan untuk menentukan adanya peningkatan atau penurunan pada kelompok kontrol positif (K+) dan kelompok perlakuan (P1, P2, P3).

Kelompok kontrol positif (K+) memiliki rata-rata kadar TNF- α yang berbeda nyata dengan kelompok kontrol negatif (K-), kelompok perlakuan 1, 2 dan 3 (P1,

P2, dan P3). Meningkatnya kadar ekspresi TNF- α menunjukkan terjadinya inflamasi pada jejunum tikus hasil induksi *E. coli*. Bakteri *E. coli* melakukan perlekatan yang sangat kuat hingga mikrovili seperti terkelupas pada permukaan jejunum dan sel goblet ikut terlepas bersama sel-sel epitel permukaan yang mengalami erosi, sehingga tidak ada *barrier protector* pada mukosa jejunum. *E. coli* merupakan bakteri gram negatif yang mempunyai endotoksin berupa LPS pada membran sel. Lipopolisakarida (LPS) kemudian akan berikatan dengan LBP membentuk kompleks LPS-LBP. Kompleks LPS-LBP kemudian akan mentransfer LPS pada reseptor CD14 yang terdapat di permukaan makrofag. Setelah berikatan dengan LPS, CD14 berinteraksi dengan TLR4 sehingga menyebabkan aktivasi dari NF- κ B (*Nuclear Factor kappa B*) pada sel epitel usus (Savcovic *et al.*, 1997). Adanya NF- κ B akan menyebabkan terjadinya infiltrasi sel makrofag pada lokasi inflamasi untuk memfagositosis bakteri, sehingga diproduksi sitokin proinflamasi (TNF- α) yang berlebih (Bueno *and* Anna, 2013).

Pada kelompok perlakuan 1 (P1) menunjukkan rata-rata kadar TNF- α yang berbeda nyata dengan kelompok kontrol negatif (K-), kelompok kontrol positif (K+), dan kelompok perlakuan 2 (P2) dan perlakuan 3 (P3). Rata-rata kadar TNF- α tersebut menunjukkan bahwa ekstrak daun dewandaru pada dosis 300 mg/kg BB mulai menunjukkan efek pencegahan terhadap gastroenteritis, namun masih belum maksimal dalam melakukan pencegahan. Hal ini disebabkan jumlah dari senyawa flavonoid dan tanin yang masih belum optimal dalam mencegah adhesi bakteri pada mukosa jejunum dan peranan dalam merusak permeabilitas membran sel bakteri, sehingga bakteri masih menimbulkan infeksi pada jejunum dan terjadi infiltrasi

makrofag yang memproduksi sitokin proinflamasi TNF- α meningkat. Sedangkan pada kelompok perlakuan 2 (P2) dan perlakuan 3 (P3) menunjukkan rata-rata kadar TNF- α yang berbeda nyata dengan kelompok kontrol positif (K+) dan kelompok perlakuan 1 (P1), tetapi tidak berbeda nyata dengan kelompok kontrol negatif (K-). Hal ini menunjukkan bahwa dengan dosis terapi ekstrak daun dewandaru dengan dosis 400 mg/kg BB dan 500 mg/kg BB telah mampu menurunkan ekspresi TNF- α organ jejunum.

Penurunan persentase ekspresi TNF- α dikarenakan adanya aktivitas senyawa yang terkandung dalam daun dewandaru yaitu flavonoid dan tanin. Flavonoid sebagai antibakteri yaitu dengan cara menghambat metabolisme energi, menghambat sintesis protein, dan menghambat fungsi membran sel (Chusnie *and* Lamb, 2005). Flavonoid juga memiliki efek antioksidan dengan menyumbangkan atom hidrogen untuk menetralkan radikal bebas, sehingga radikal bebas tidak membutuhkan elektron dari membran sel yang menyebabkan kerusakan sel. Berkurangnya radikal bebas akan menekan pembentukan NF- κ B yang memicu produksi sitokin, sehingga aktivasi sel radang berkurang (Janeway *et al.*, 2001). Selain sebagai antibakteri dan juga antioksidan, flavonoid juga berperan sebagai antiinflamasi yaitu dengan cara menghambat aktivitas enzim siklooksigenase-2 (COX-2), dimana COX-2 berperan dalam mediator inflamasi dengan terlibat dalam pelepasan asam arakidonat yang berperan dalam tahap awal respon inflamasi. Asam arakidonat ini berperan dalam pembentukan senyawa kemotaksis oleh neutrofil (Nijveld *et al.*, 2001). Senyawa tanin yang terkandung dalam daun dewandaru memiliki peran sebagai antibakteri yaitu dengan cara mengganggu sintesa

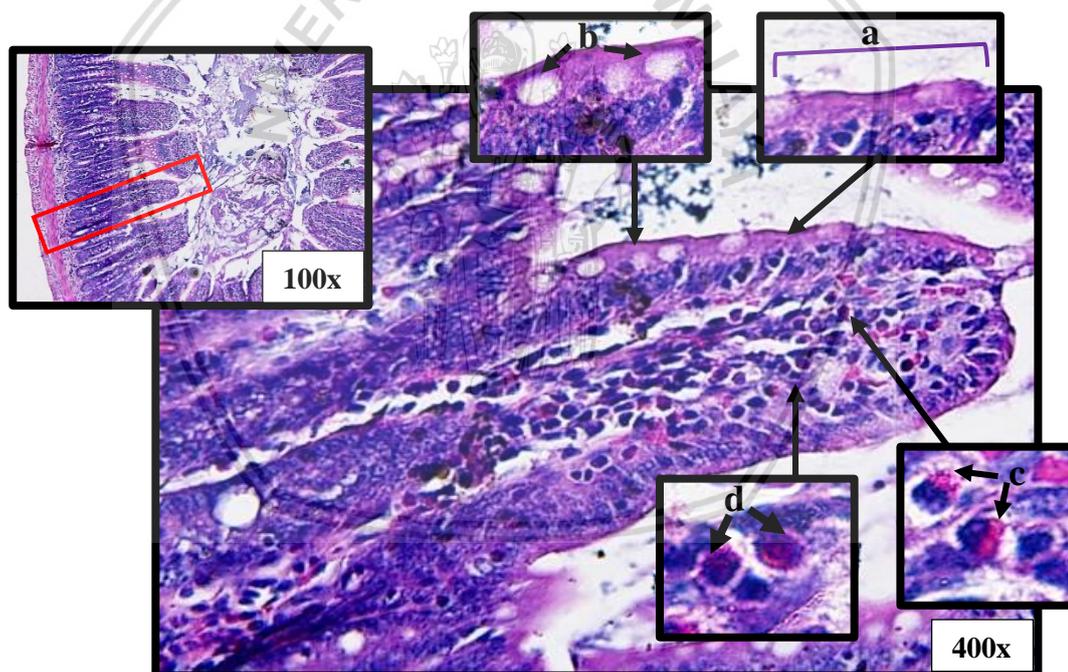
peptodoglikan sehingga pembentukan dinding sel menjadi tidak sempurna. Sel bakteri akan menjadi lisis karena adanya tekanan osmotik maupun tekanan fisik sehingga sel bakteri akan mati (Safera, 2005). Mekanisme kerja tanin sebagai antibakteri berhubungan dengan kemampuan tanin dalam mengaktivasi adhesi sel bakteri (molekul yang menempel pada sel inang) yang terdapat pada permukaan sel (Naim, 2004).

Mekanisme yang diperankan oleh flavonoid dan tanin dapat mengurangi jumlah bakteri dan dapat mencegah bakteri menempel pada sel epitel usus. Hal ini dapat menekan produksi dari sitokin proinflamasi TNF- α akibat pemberian preventif ekstrak daun dewandaru. Kelompok preventif (P1, P2, P3) pada penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak daun dewandaru dapat menurunkan ekspresi TNF- α dilihat berdasarkan rata-rata kadar TNF- α dan juga didukung dengan gambaran imunohistokimia. Hasil yang didapatkan yaitu pada kelompok perlakuan 1 (P1) memiliki rata-rata kadar TNF- α lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok perlakuan 2 (P2) dan perlakuan 3 (P3).

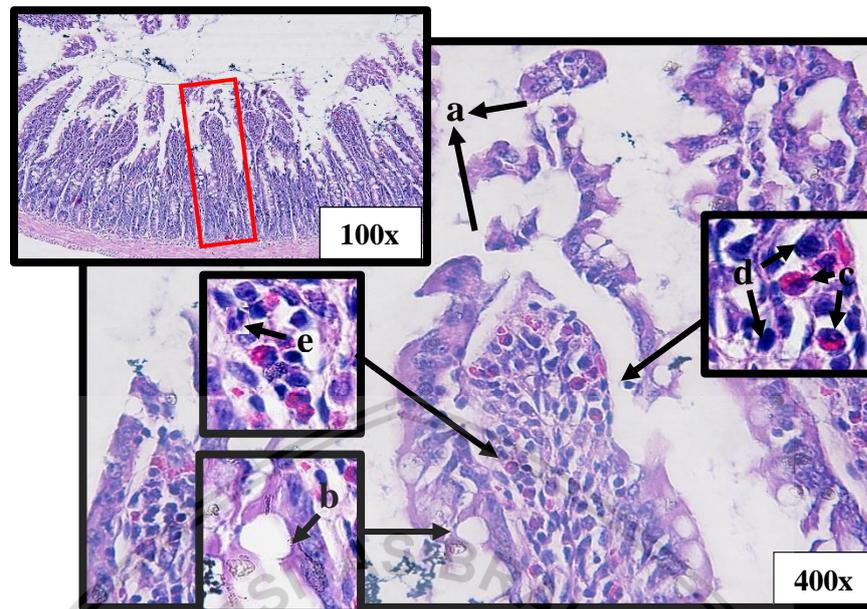
5.3. Pengaruh Preventif Ekstrak Daun Dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) Sebagai Pencegahan Gastroenteritis pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi *Escherichia coli* Dilihat dari Histopatologi Jejunum

Pengamatan histopatologi jejunum dilakukan di bawah mikroskop pada perbesaran 400x. Pengamatan dilakukan pada semua preparat jaringan jejunum kelompok perlakuan untuk melihat adanya perubahan histopatologi jejunum tikus. Pada penelitian ini tikus dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif (tanpa diberi perlakuan apapun), kontrol positif (tikus yang diinduksi *E. coli*

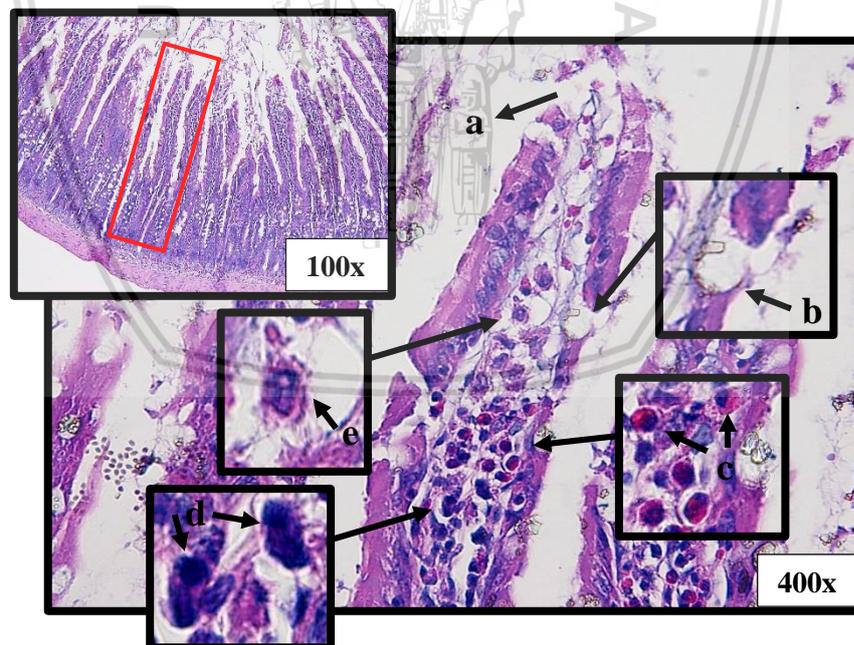
10^6 CFU/mL diberikan sebanyak 1 mL per ekor sehari sekali selama 7 hari dengan cara sonde lambung), dan 3 kelompok perlakuan yang diberi preventif ekstrak daun dewandaru dengan dosis pemberian (300 mg/kg BB, 400 mg/kg BB, 500 mg/kg BB) selama 7 hari dan kemudian diinduksi *E. coli* 10^6 CFU/mL diberikan sebanyak 1 mL per ekor sehari sekali selama 7 hari dengan cara sonde lambung. Setelah tikus dieuthanasi, organ jejunum dipreparasi menggunakan pewarnaan *Hematoxyline Eosine* yang kemudian diamati untuk melihat adanya infiltrasi sel radang, sel goblet, serta struktur epitel. Hasil gambaran histopatologi organ jejunum dapat dilihat pada **Gambar 5.8** sampai dengan **Gambar 5.11** berikut ini.



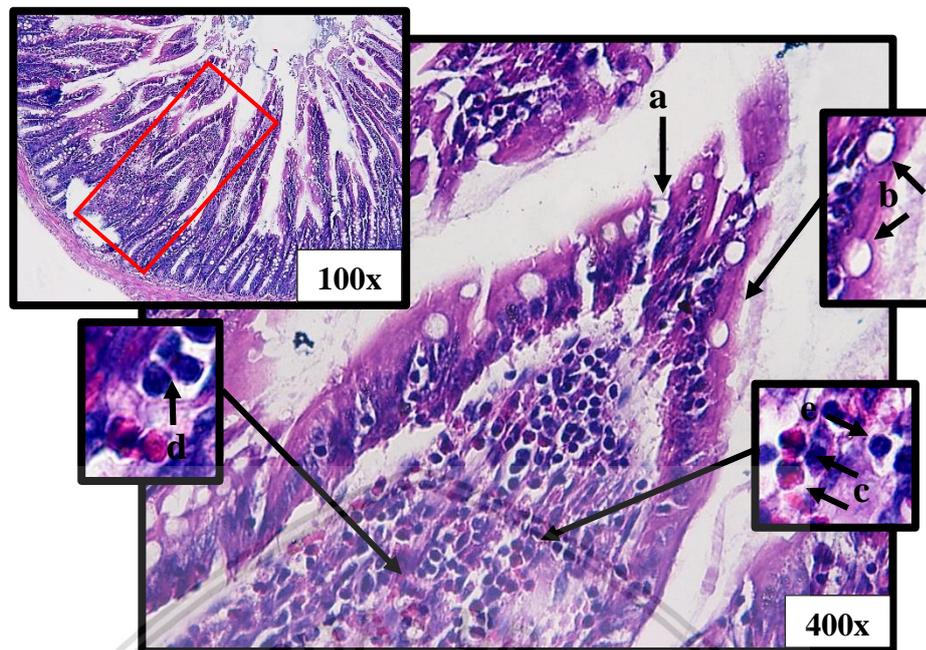
Gambar 5.8 Gambaran histopatologi jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) kelompok kontrol negatif menggunakan pewarnaan HE perbesaran 100x dan 400x. a) Struktur vili tampak utuh (panah ungu), b) Sel goblet, ditemukan infiltrasi sel radang berupa c) Makrofag, d) Limfosit.



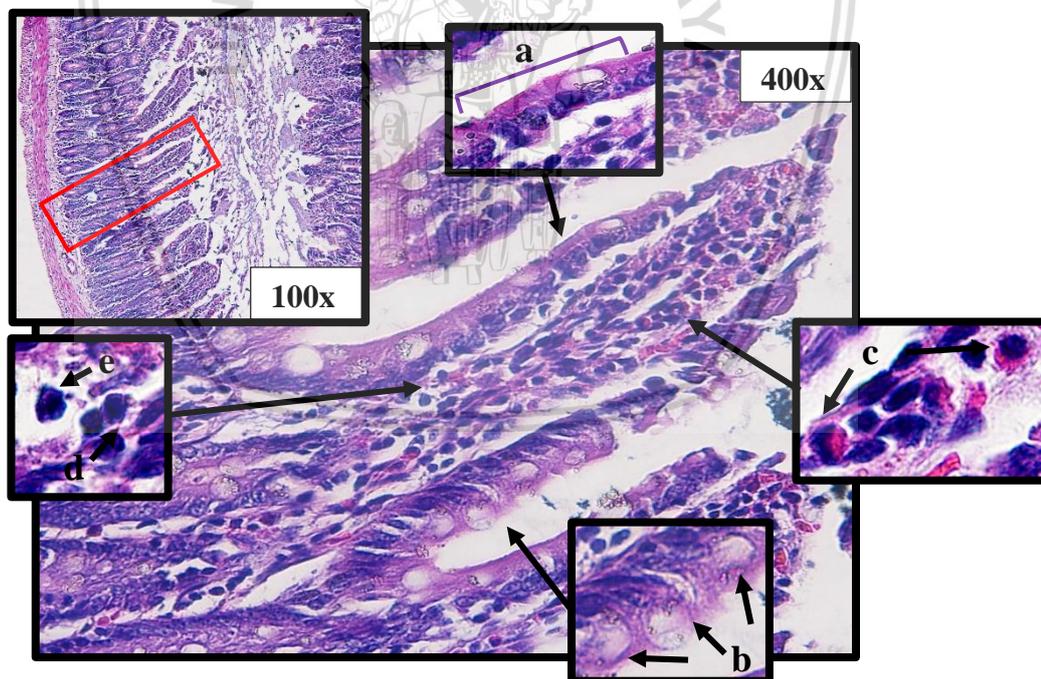
Gambar 5.9 Gambaran histopatologi jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) kelompok kontrol positif menggunakan pewarnaan HE perbesaran 100x dan 400x. a) Struktur vili mengalami erosi, b) Sel goblet, ditemukan infiltrasi sel radang berupa c) Makrofag, d) Limfosit, e) Neutrofil.



Gambar 5.10 Gambaran histopatologi jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) kelompok preventif 300 mg/kg BB menggunakan pewarnaan HE perbesaran 100x dan 400x. a) Struktur vili tampak masih mengalami erosi, b) Sel goblet, ditemukan infiltrasi sel radang berupa c) Makrofag, d) Limfosit, e) Neutrofil.



Gambar 5.11 Gambaran histopatologi jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) kelompok preventif 400 mg/kg BB menggunakan pewarnaan HE perbesaran 100x dan 400x. a) Struktur vili sudah mengalami perbaikan, b) Sel goblet, ditemukan infiltrasi sel radang berupa c) Makrofag, d) Limfosit, e) Neutrofil.



Gambar 5.12 Gambaran histopatologi jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) kelompok preventif 500 mg/kg BB menggunakan pewarnaan HE perbesaran 100x dan 400x. a) Struktur vili tampak utuh (panah ungu), b) Sel goblet, ditemukan infiltrasi sel radang berupa c) Makrofag, d) Limfosit, e) Neutrofil.

Gambaran histopatologi organ jejunum normal dapat terlihat dari tunika mukosa dengan vili yang berbentuk panjang dan tipis (Peckham, 2014). Jejunum memiliki 4 lapisan, yaitu tunika mukosa, tunika submukosa, tunika muskularis, dan tunika serosa. Gambaran histopatologi organ jejunum kelompok kontrol negatif (K-) (**Gambar 5.8**) pada tunika mukosa ditunjukkan dengan keadaan epitel permukaan berbentuk silindris selapis yang rapi dan utuh, terdapat sel goblet yang terletak di antara sel epitel dan tidak ada pelebaran lamina propria. Gambaran histopatologi kelompok kontrol negatif (K-) dapat dijadikan acuan gambaran normal organ jejunum. Pada kelompok kontrol negatif, feses tampak normal dengan konsistensi padat.

Hasil penelitian Towoliu dkk. (2013) menunjukkan bahwa arsitektur mukosa usus halus normal ditunjukkan dengan permukaan epitel yang utuh, jumlah limfosit sedikit dan tidak ada pelebaran pembuluh darah. Menurut Brown *and* Hardisty (1990), dalam keadaan normal pada lamina propria tikus ditemukan sejumlah sel makrofag, limfosit, neutrofil. Hal ini dikarenakan migrasi sel radang merupakan reaksi tanggap umum terhadap zat toksik yang masuk dalam tubuh dan merupakan reaksi patofisiologis untuk melawan agen yang merugikan. Histopatologi vili organ jejunum kontrol negatif dapat dijadikan patokan terhadap perubahan dan kerusakan pada vili jejunum kelompok lain.

Gambaran histopatologi organ jejunum tikus kelompok kontrol positif (K+) (**Gambar 5.9**) gastroenteritis pada tunika mukosa, yaitu sel epitel silindris sebaris mengalami erosi yang cukup parah ditunjukkan dengan keterangan (a) dan

peningkatan infiltrasi sel radang, yaitu makrofag, limfosit, neutrofil yang mengindikasikan bahwa terjadi peradangan.

Sel goblet berperan dalam menghasilkan lendir (mucinogen) yang dilepas ke permukaan epitel dan bekerja sebagai pelicin (Hartono, 1988). Mukus melindungi sel-sel epitel dari infeksi mikroorganisme dan partikel lain yang berbahaya. Bila terjadi infeksi, sel-sel goblet akan mengeluarkan lebih banyak mukus yang akan mempercepat pengeluaran mikroorganisme tersebut (Azrimaidaliza, 2007). Induksi *E. coli* meningkatkan jumlah *E. coli* dalam usus tikus dan memicu sel goblet untuk menghasilkan mukus lebih banyak.

Beberapa limfosit dan makrofag bisa ditemukan dalam lamina propria usus pada kondisi normal. Hal ini dikarenakan tubuh selalu terpapar oleh toksin namun dalam dosis yang sedikit, sehingga adanya sel radang di dalam lamina propria usus normal digambarkan sebagai reaksi patofisiologis untuk melawan toksin tersebut. Pada kelompok tikus kontrol positif (K+) terlihat sel makrofag, yang diduga akibat *barrier protector* (sel goblet mengeluarkan mukus) tidak dapat mencegah penempelan *E. coli* karena terjadinya erosi epitel dimana sel goblet juga ikut terlepas ke lumen sehingga menyebabkan infiltrasi sel makrofag.

Endotoksin (LPS) dikenali oleh TLR4 pada permukaan sel makrofag yang mengakibatkan sekresi sitokin proinflamasi TNF- α . Menurut Yan and Polk (2008), penempelan *E. coli* pada permukaan sel epitel akan mengaktifkan mekanisme inflamasi yang kemudian menyebabkan peningkatan sekresi sitokin. Mekanisme ini menyebabkan infiltrasi leukosit, terutama neutrofil dan makrofag di mukosa.

Pada tikus kelompok kontrol positif (K+) terlihat adanya gejala klinis gastroenteritis berupa penurunan berat badan (**Lampiran 6**) dan diare dengan konsistensi feses lembek akibat penyerapan air tidak optimal dalam usus akibat adanya erosi epitel. Bakteri masuk kemudian berkembangbiak dan akan merangsang epitel usus sehingga terjadi peningkatan aktivitas enzim adenilat siklase (Supar, 1997). Bakteri *E. coli* memiliki antigen ekstraseluler dikenal dengan enterotoksin yang memproduksi 2 macam toksin yang berbeda, yaitu toksin LT (*Labile toxin*) dan ST (*Stable toxin*). Toksin LT bekerja merangsang enzim adenilat siklase yang terdapat di dalam sel epitel mukosa usus, yang menyebabkan peningkatan permeabilitas sel epitel usus sehingga terjadi akumulasi cairan di dalam usus dan berakhir dengan diare. Toksin ST bekerja dengan mengaktifkan enzim guanilat siklase menghasilkan guanosin monofosfat siklik, menyebabkan gangguan absorpsi klorida dan natrium, serta menurunkan motilitas usus halus (Maksum, 2009).

Bakteri *E. coli* terutama menyerang jejunum karena ukuran jejunum yang lebih panjang dibandingkan dengan duodenum dan ileum sehingga paparan *E. coli* cenderung lebih lama di jejunum. Selain itu, jejunum memiliki regenerasi sel epitel yang lebih lambat dibandingkan dengan duodenum dan ileum sehingga eliminasi *E. coli* yang menempel pada sel epitel vili juga menjadi lambat (Louaka *et al.*, 2009).

Erosi epitel permukaan terjadi karena strain *E. coli* yang bersifat patogen menempel secara kuat pada permukaan epitel vili dan merusak epitel permukaan usus. Ciri patogenitas dari penempelan ini terletak pada tumpuannya di permukaan

sel inang dan menyebabkan kerusakan pada mikrovili usus halus (Fitrial, 2009). Kerusakan mikrovili mengakibatkan penyerapan nutrisi dan keseimbangan osmotik sel epitel usus terganggu sehingga menyebabkan diare.

Gambaran mikroskopis vili organ jejunum tikus kelompok perlakuan 1 (P1) tidak berbeda dengan tikus kelompok kontrol positif (K+) dimana vili mengalami kerusakan (**Gambar 5.10**), terlihat adanya erosi sel epitel silindris sebaris di beberapa area dan pada lamina propria terdapat infiltrasi sel radang, yaitu makrofag, limfosit, dan neutrofil. Kerusakan pada organ jejunum pada tikus kelompok perlakuan 1 (P1) dikarenakan efek dari senyawa daun dewandaru (flavonoid dan tanin) yang terkandung di dalamnya masih kurang efektif dalam mencegah kerusakan jaringan sehingga dibutuhkan dosis yang lebih banyak.

Tikus kelompok perlakuan 2 (P2) menunjukkan gambaran mikroskopis vili organ jejunum (**Gambar 5.11**) yang berbeda dari kelompok perlakuan 1 (P1), terlihat struktur epitel silindris sebaris mengalami perbaikan dibandingkan dengan struktur epitel pada tikus kelompok kontrol positif (K+) maupun kelompok perlakuan 1 (P1) meskipun masih terlihat adanya erosi di beberapa area, dan ditemukan infiltrasi sel radang (makrofag, limfosit, neutrofil) dalam jumlah yang lebih sedikit.

Pada gambaran histopatologi organ jejunum tikus kelompok perlakuan 3 (P3) (**Gambaran 5.12**) memiliki bentuk vili yang lebih baik dibandingkan dengan tikus kelompok kontrol positif (K+) maupun kelompok perlakuan 1 (P1) dan memiliki struktur yang sama bagusnya dengan kelompok perlakuan 2 (P2). Terlihat struktur sel epitel silindris sebaris tampak rapi dan utuh, terdapat sel goblet, dan jumlah sel

radang (makrofag, limfosit, neutrofil) dalam jumlah yang sedikit. Kondisi ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun dewandaru dengan dosis 400 mg/kg BB dan 500 mg/kgBB sudah dapat memperbaiki kerusakan vili pada organ jejunum.

Perbaikan gambaran histopatologi vili jejunum dimungkinkan karena ada aktivitas senyawa polifenol (flavonoid dan tanin) yang dimiliki daun dewandaru (Islam *et al.*, 2012). Flavonoid sebagai antibakteri dengan 3 mekanisme: (1) menghambat sintesis asam nukleat yang dapat mengganggu permeabilitas dinding sel bakteri, (2) menghambat fungsi membran sel bakteri hingga menyebabkan kerusakan pada dinding sel bakteri, dan (3) menghambat metabolisme energi, yang kemudian dapat menyebabkan pertumbuhan terhambat hingga terjadi kematian pada sel bakteri. Selain memiliki aktivitas antibakteri, flavonoid juga mempunyai aktivitas antioksidan dengan cara mendonasikan atom hidrogen yang kemudian akan menetralkan radikal bebas sehingga ROS pada organ jejunum akan berkurang (Islam *et al.*, 2012). Radikal bebas adalah molekul yang kehilangan elektron, sehingga molekul tersebut menjadi tidak stabil dan selalu berusaha mengambil elektron dari molekul atau sel lain. Radikal bebas dalam tubuh bersifat sangat reaktif dan akan berinteraksi dengan bagian tubuh maupun sel yang dapat menyebabkan kerusakan fungsi jaringan (Rosahdi dkk, 2013). Ketidakseimbangan antara radikal bebas dengan antioksidan menyebabkan terjadinya suatu keadaan yang disebut stress oksidatif. Stress oksidatif adalah suatu keadaan dimana tingkat kelompok oksigen reaktif (ROS) yang toksik melebihi pertahanan antioksidan endogen. Keadaan ini mengakibatkan kelebihan radikal bebas yang akan bereaksi

dengan lemak, protein, dan asam nukleat seluler sehingga terjadi kerusakan lokal dan disfungsi organ tertentu (Syahrizal, 2008). Berkurangnya radikal bebas akan menekan pembentukan NF- κ B yang memicu produksi sitokin, sehingga aktivasi sel radang berkurang (Janeway *et al.*, 2001). Tanin sebagai antibakteri dapat menyebabkan denaturasi protein dan menginaktifkan faktor adhesi sehingga dapat mencegah bakteri menempel pada epitel permukaan vili. Selain itu, tanin dapat menyebabkan sel bakteri menjadi lisis karena tekanan osmotik maupun fisik sehingga bakteri menjadi mati.

Berdasarkan hasil histopatologi organ jejunum yang telah dilakukan pada penelitian ini, pemberian ekstrak daun dewandaru dengan dosis 300 mg/kg BB (P1) belum mampu menghambat sintesis dinding sel bakteri pada sel epitel, sehingga sel epitel tidak dapat berproliferasi lebih baik. Sedangkan pemberian ekstrak daun dewandaru dengan dosis 400 mg/kg BB (P2) dan 500 mg/kg BB (P3) mampu mencegah kerusakan vili organ jejunum akibat induksi *E. coli* dilihat dari struktur gambaran histopatologi yang mendekati keadaan normal dan juga berkurangnya sel radang. Hasil ini juga didukung dengan rata-rata kadar TNF- α pada kelompok perlakuan 2 dan 3 mendekati rata-rata kadar TNF- α pada kelompok kontrol negatif.

BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

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

1. Preventif ekstrak daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) dengan dosis 300 mg/kg BB, 400 mg/kg BB, dan 500 mg/kg BB mampu mencegah peningkatan ekspresi TNF- α di organ jejunum pada hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) model gastroenteritis yang diinduksi *E. coli* dengan dosis preventif yang terbaik yaitu 400 mg/kg BB pada kelompok perlakuan 2 (P2).
2. Preventif ekstrak daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) dengan dosis 300 mg/kg BB, 400 mg/kg BB, dan 500 mg/kg BB dapat mencegah kerusakan organ jejunum dengan dosis preventif yang terbaik yaitu 400 mg/kg BB pada kelompok perlakuan 2 (P2).

6.2. Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui dosis toksisitas ekstrak daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) untuk mencegah penyakit gastroenteritis hasil induksi *E. coli* pada hewan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A. K., Lichman, A. H., and Pober, J. S. 2000. *Cytokin in Cellular and Moleculer Immunology 4th ed.* WB Saunders. Philadelphia. 233-267.
- Alexandra, I. 2011. Experimental Use of Animals in Research. *Balneo Research Journal*, 2(1): 65-69.
- Astawan, M., T. Wresdiyati, I.I. Arief, dan E. Suhesti. 2011. Gambaran Histopatologi Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinfeksi *Escherichia coli* Enteropatogenik dan Diberikan Probiotik. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor. Bogor. *EISSN 2087-4634*. Media Peternakan. 7-13.
- Azhar, L.A. 2015. Yoghurt Susu Kambing Sebagai Tindakan Preventif Hiperkolesterolemia Melalui Pengukuran Kadar Malondialdehyde (MDA) dan Ekspresi Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) Ginjal Tikus (*Rattus norvegicus*) [Skripsi]. Program Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Azrimaidaliza. 2007. Vitamin A, Imunitas, dan Kaitannya dengan Penyakit Infeksi. *Jurnal Kesehatan Masyarakat*, 1(2): 90-96.
- Baratawidjaja, K.G. dan I. Rengganis. 2014. *Imunologi Dasar Edisi ke-11*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Besung, I.N.K. 2005. Kejadian Kolibasilosis pada Anak Babi. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Udayana.
- Brown, R.H., and J.F. Hardisty. 1990. *Refence and Atlas: Pathology of The Fischer Rat*. Academic Press Inc. San Diego. 9-14.
- Bueno, V. and O.A.S. Anna. 2013. Color Atlas of Veterinary Histology Third Edition. Wiley-Blackwell Publishing.
- Carter, G.R., and D.J. Wise. 2004. *Veterinary Bacteriology and Micology*. Iowa State Press. Iowa. USA.
- Chow, C.M., A.K.C. Leung, and K.L. Hon. 2010. Acute Gastroenteritis: From Guideline to Real Life. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, 3: 97-112.
- Cynthia, A.P., D.A. Pradana., dan Q. Susanto. 2006. Efek Ekstrak Etanolik Daun Bayam Merah (*Amaranthus tricolor L.*) Terstandar terhadap Indeks Massa tubuh dan Kadar Glukosa Darah Pada Tikus Sprague Dawley yang Diberikan Diet Tinggi Lemak sebagai Upaya Preventif Obesitas. *Pharmacy Journal*, 13(2): 5-10.

- Direktorat Jenderal Peternakan. 1982. *Pedoman Pengendalian Penyakit Hewan Menular Jilid 4*. Jakarta.
- Fadhilah, D. 2015. Ilmu Veteriner: Enteritis pada Hewan. <http://www.ilmu.veteriner.com/enteritis-pada-hewan/>. [12 Maret 2017].
- Fitrial, Y. 2009. Analisis Potensi Biji dan Umbi Teratai (*Nymphaea pubescens wild*) untuk Pangan Fungsional Prebiotik dan Antibakteri Escherichia coli Enteropatogenik K.1.1 [Disertasi]. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Ganong, W.F. 1995. *Review of Medical Physiology 4th Ed*. Prentice Hall International Inc. San Francisco.
- Garlanda, C., C.A. Dinarello, and A. Mantovani. 2014. The Interleukin-1 Family: Back To the Future. PMC.
- Green, E.A. and R. A. Flavell. 2000. The Temporal Importance of TNF- α Expression In The Development of Arthritis Reumatoid. *Journal Immunity*, 12: 459 – 469.
- Hartono, R. 1988. *Buku Teks Histologi Veteriner*. UI Press. Jakarta. 43.
- Hutapea, J.R. 1994. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia Jilid III*. Departemen Kesehatan RI dan Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. 29-30.
- Inamoto, T., M. Namba, W.M. Qi, K. Yamamoto, Y. Yokoo, H. Miyata, J. Kawano, T. Yokoyama, N. Hoshi, and H. Kitagawa. 2008. An Immunohistochemical Detection of Actin and Myosin in The Indigenous Bacteria-Adhering Sites of Microvillous Columnar Epithelial Cells in Peyer's patches and Intestinal Villi in The Rat Jejunioileum. *Journal Vet Med Sci*, 70(11): 1153-1158.
- Islam, M.R., M.S. Parvin, M.S. Islam, S.M.R. Hasan, and M.E. Islam. 2012. Antioxidant Activity of The Ethanol Extract of Manilkara zapota Leaf. *J. Science Research*, 4(1): 193-201.
- Janeway, C.A., T. Paul, W. Mark, and J.S. Mark. 2001. *Immuno Biology 5th Edition*. Garland Publishing. New York.
- Jawetz, E., J.L. Melnick, E.A. Adelberg, G.F. Brooks, J.S. Butel, dan L.N. Ornston. 2008. *Mikrobiologi Kedokteran Edisi Ke-20*. ECG. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta. 223-235, 351-357.
- Junqueira, L.C. and Carneiro. 2010. *Basic Histology*. The Mcgraw-Hill Companies Inc. USA.
- Junqueira. 2010. *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas 12th Edition*. McGraw-Hill Companies Inc. USA.

- Jusuf, A.A. 2009. *Histoteknik Dasar*. Fakultas Kedokteran. Universitas Indonesia. Jakarta.
- Khotimah, K.D.S. 2004. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kloroform dan Metanol Daun Dewandaru (*Eugenia Uniflora. L.*) Terhadap *Staphylococcus aureus*, *Shigella dysenteriae* dan *Escherichia coli* [Skripsi]. Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta.
- Kredy. 2010. *Chemistry of Natural Products*. Departement of Pharmaceutical Chemistry Faculty of Science Jamia Hamdard. New Dehli.
- Kusuma, S.A.F. 2010. *Escherichia coli*. Fakultas Farmasi. Universitas Padjajaran. Bandung.
- Lamanepa. M.E.L. 2005. Perbandingan Profil Lipid dan Perkembangan Lesi Aterosklerosis pada Tikus Wistar yang Diberi Diet Perasan Pare Dengan Diet Perasan Pare dan Statin [Tesis]. Magister Ilmu Biomedik. Program Pascasarjana. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Larasathi, A.S. 2014. Pengaruh Terapi Yoghurt Susu Kambing Terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) dan Ekspresi Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) Organ Hati Hewan Model Tikus (*Rattus norvegicus*) Hiperkolesterolemia [Skripsi]. Program Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Lavoie, J.P. and W. Hinchcliff. 2008. *Blackwell's Five Minute Veterinary Consult Equine 2nd Ed*. Blackwell Publishing. USA.
- Levinson, W. 2008. *Review of Medical Microbiology*. The McGraw-Hill Companies Inc. USA.
- Louaka A.S., P.N. Jean, W. Claude, O. Eric, and T. Frederic. 2009. The Enteropathogenic E. coli Effector Cif Induces Delayed Apoptosis in Epithelial Cells. *Infect Immun*, 77(12): 5471-5477.
- Maksum, R. 2009. *Mikrobiologi*. Penerbit Buku Kedokteran. EGC. Jakarta. 153-154.
- Mestecky, J., M.E. Lamm, J.R. McGhee, J. Bienenstock, L. Mayer, and W. Strober. 2004. *Mucosal Immunology Third Edition*. Elsevier Academic Press. USA. 430.
- Mitchell, R.N., and R. S Cotran. 2003. *Acute and Chronic Inflammation: Robbins Basic Pathology 7th Ed*. Elsevier Saunders. Philadelphia. 33-59.
- Navarro-Gonzalez, J.F., and C. Mora-Fernandez. 2008. The Role Of Inflammatory Cytokines in Diabetic Nephropathy. *Journal of The American Society of Nephrology*, 19: 433-442.

- Neilsen, F., B.B. Mikkelsen, J.B. Nielsen, H.R. Andersen, and P. Grandjean. 1975. Plasma Malondialdehyde as Biomarker for Oxidative Stress: Reference Interval and Effect of Life-style Factors. *Journal Clinical Chemistry*, 43(7): 1209-1214.
- 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. Solo.
- Pangestika, A. 2014. Efek Terapi Yoghurt Susu Kambing Terhadap Ekspresi Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) dan Gambaran Histopatologi Aorta Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Hiperkolesterolemia [Skripsi]. Program Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Peckham, M. 2014. *At A Glance Histology*. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Quinn, P.J., B.K. Markey, M.E. Carter, W.J. Donnelly, and F.C. Leonard. 2002. Paramyxoviridae. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Blackwell Publishing. 381-387.
- Rahmawandani, F.I., I.M. Kardena dan I.K. Berata. 2014. Gambaran Patologi Kasus Kolibasilosis pada Babi Landrace. *Indonesia Medicus Veterinus*, 3(4): 300-309.
- Reynertson, K.A. and E.J. Kennelly. 2001. *Antioxidant Polyphenols from Fruits of the Myrtaceae: A Chemotaxonomic and Ethnomedical Approach to Discovery, Building Bridges with Traditional Knowledge II*. The Society for Economic Botany. Honolulu.
- Rosahdi, T.D., M. Kusmiyati, F.R. Wijayanti. 2013. Uji Aktivitas Daya Antioksidan Buah Rambutan Rapih dengan Metode DPPH. *Politeknik Kesehatan Bandung. ISSN 1979-8911*, 7(1): 2.
- Rospitasari, A. 2017. Efek Pencegahan Arang Aktif Terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) dan Gambaran Histopatologi Jejunum pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Model Hiperkolesterolemia [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Samuelson, D.A. 2007. *Textbook of Veterinary Histology*. Saunders Elsevier. China.
- Sayuti, S.N. 2015. Deteksi Imunohistokimia Antigen *Coxiella burnetti* Sebagai Penyebab *Q Fever* Pada Sapi. *Jurnal Kedokteran Hewan*, 9(2).
- Sendow, I., S. Tatty, B. Sjamsul, dan S. Antonius. 1998. Uji Serologis Terhadap Virus *Transmissible Gastroenteritis* (TGE) di Beberapa Daerah Di Indonesia. Balai Penelitian Veteriner. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*, 3(3).

- Setiawan, B. 2006. *Diare Akut Karena Infeksi. Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam. Jilid 3 Edisi IV*. Fakultas Kedokteran. Universitas Indonesia. Jakarta.
- Sharp, P., and J. Villano. 2013. *The Laboratory Rat Edisi 2*. CRC Press. California. 9-11.
- Sirois, M. 2005. *Laboratory Animal Medicine: Principle and Prosedures*. Elsevier Saunders. USA.
- Songer, J.G. and K.W. Post. 2005. *Veterinary Microbiology. Bacterial and Fungal Agent of Animal Disease*. Elsevier Saunders. USA.
- Sugathan, S., Pradeep, N.S., and Abdulhameed, S. 2017. *Bioresources and Bioprocess in Biotechnology: Volume 2 Exploring Potential Biomolecules*. Springer Nature. Singapore. 275.
- Suhendi, A., R.S. Landyyun, dan D. Hanwar. 2011. Isolasi dan Identifikasi Flavonoid dari Daun Dewandaru (*Eugenia uniflora* L.). *Pharmacon*, 12(2): 73-81.
- Supar. 1997. Faktor-faktor Virulensi Enterotoksin dan Perlekatan *Escherichia coli* terhadap Kesehatan Ternak dan Manusia. *Wartazoa*, 6(1): 7-17.
- Supar. 2001. Pemberdayaan Plasma Nutfah Mikroba Veteriner dalam Pengembangan Peternakan: Harapan Vaksin E. coli Enterotoksinogenik, Enteropatogenik, dan Verotoksigenik Isolat Lokal untuk Pengendalian Kolibasilosis Neonatal pada Anak Babi dan Sapi. Balai Penelitian Veteriner. Bogor.
- Suraatmaja. 2005. *Kapita Selekta Gastroenterologi Anak*. Sagung Seto. Denpasar.
- Sutari, I. 2008. Efek Hepatoprotektif Ekstrak Etanol 70% Daun Dewandaru (*Eugenia Uniflora* L.) Terhadap Mencit Jantan Galur Swiss Terinduksi Parasetamol [Skripsi]. Universitas Muhammadiyah. Surakarta.
- Syahrizal, D. 2008. Pengaruh Proteksi Vitamin C terhadap Enzim Transaminase dan Gambaran Histopatologis Hati Mencit yang dipapar Plumbum [Tesis]. Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Tarmudji. 2003. Kolibasilosis Pada Ayam: Etiologi, Patologi dan Pengendaliannya. *Wartazoa*, 13(2): 65-73.
- Tizard, I.R. 2004. *Veterinary Immunology an Introduction 7th Ed*. Elsevier Saunders. USA.
- Towoliu, S., P. Lintong, dan C. Kairupan. 2013. Pengaruh Pemberian Lactobacillus terhadap Gambaran Mikroskopis Mukosa Usus Halus Tikus Putih Wistar (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi dengan *Escherichia coli*. Fakultas Kedokteran, Universitas Sam Ratulangi. Manado. *Jurnal e-Biomedik (eBM)*, 1(2): 930-934.

- Try, Y.L. 2011. Hubungan Faktor Kesehatan Lingkungan Terhadap Angka Kejadian Diare Pada Anak Usia Balita di RW.04 Kelurahan Cilandak Barat, Kecamatan Cilandak, Jakarta Selatan Tahun 2011 [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Pembangunan Nasional Veteran. Jakarta.
- Utami, W., M. Da'i, dan Y.S. Sofiana. 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* L.). *Pharmacon*, 6(1): 5-9.
- Wresdiyati, T., R.L. Sri, S. Yeni, I.A. Irma, dan A. Made. 2013. Probiotik Indigenus Meningkatkan Profil Kesehatan Usus Halus Tikus yang Diinfeksi Enteropathogenic *Escherichia coli*. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor. *MKB*, 45(2): 78-85.
- Yan, F., and D.B. Polk. 2008. *Mechanism of Probiotic Regulation of Host Homeostasis*. In: Michail S. and P. M. Sherman, Editor. *Probiotic in Pediatric Medicine*. Springer. USA. 52-68.
- Yuliani. 2001. *Ilmu Penyakit Dalam* Jilid 2 Edisi IV. Pusat Penerbitan Departemen Penyakit Dalam. Fakultas Kedokteran. Universitas Indonesia. Jakarta.
- Yusuf, S. 2015. Pengaruh Pemberian Zink terhadap Diare pada Tikus yang Diinduksi Lipopolisakarida (LPS) dari *Escherichia coli*: Kajian terhadap Kadar Sitokin Proinflamasi (TNF- α , IL-1, IL-6), Zink, SOD, Hb, dan Jumlah Sel Goblet Mukosa Usus [Disertasi]. Program Studi Ilmu Kedokteran. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Zein, U., H.S. Khalid, G. Josia. 2004. Diare Akut Disebabkan Bakteri. Divisi Penyakit Tropik dan Infeksi Bagian Ilmu Penyakit Dalam. Universitas Sumatera Utara. Medan.