

**TESIS**

**EFEK MENIRAN (*Phyllanthus niruri* L) TERHADAP AKTIVITAS  
MAKROFAG DAN JUMLAH SKIZON PADA CAECUM  
AYAM YANG DIINFEKSI *Eimeria tenella***



Oleh :

**ANITA TRI PARYANTI**

**NIM. 060942003**

**PROGRAM STUDI MAGISTER  
ILMU PENYAKIT DAN KESEHATAN MASYARAKAT VETERINER  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2012**

**TESIS**

**EFEK MENIRAN (*Phyllanthus niruri* L) TERHADAP AKTIVITAS  
MAKROFAG DAN JUMLAH SKIZON PADA CAECUM  
AYAM YANG DIINFEKSI *Eimeria tenella***

**PENELITIAN TRUE EXPERIMENTAL**

**Anita Tri Paryanti**  
**NIM. 060942003**

**PROGRAM STUDI MAGISTER  
ILMU PENYAKIT DAN KESEHATAN MASYARAKAT VETERINER  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2012**

**LEMBAR PENGESAHAN**

**EFEK MENIRAN (*Phyllanthus niruri* L) TERHADAP AKTIVITAS  
MAKROFAG DAN JUMLAH SKIZON PADA CAECUM  
AYAM YANG DIINFEKSI *Eimeria tenella***

Tesis  
Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Veteriner  
Pada  
Program Studi Magister Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner  
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga  
Surabaya

Disetujui oleh :

Pembimbing I




Prof. Dr. Dewa Ketut Meles, drh., M.S.  
NIP. 195412131979011002

Pembimbing II



Muchammad Yunus, drh., M.Kes., PhD  
NIP. 196612291993031001

Mengetahui,  
Ketua Program Studi Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner  
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga



Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., M.P.  
NIP. 196208281989032001

## PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam tesis berjudul :

**EFEK MENIRAN (*Phyllanthus niruri* L) TERHADAP AKTIVITAS  
MAKROFAG DAN JUMLAH SKIZON PADA CAECUM  
AYAM YANG DIINFEKSI *Eimeria tenella***

Tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar Magister Veteriner di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, September 2012



ANITA TRI PARYANTI  
NIM. 060942003

Tesis dinilai pada Proposal Penelitian

Tanggal : 8 Maret 2012

**KOMISI PENGUJI TESIS**

Ketua : Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., M.P.

Sekretaris : Dr. Iwan Sahrial Hamid, drh., M.Si

Anggota : Dr. Mufasirin, drh., M.Si

Pembimbing Utama : Prof. Dr. Dewa Ketut Meles, drh., M.S.

Pembimbing Serta : Dr. Muchammad Yunus, drh., M.Kes., PhD.

Tesis ini telah diuji dan dinilai  
oleh komisi penguji pada  
Program Studi Magister Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner  
pada tanggal 7 September 2012

KOMISI PENGUJI TESIS

Ketua : Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., M.P.  
Anggota : Dr. Iwan Sahrial Hamid, drh., M.Si  
: Dr. Mufasirin, drh., M.Si  
: Prof. Dr. Dewa Ketut Meles, drh., M.S.  
: Dr. Muchammad Yunus, drh., M.Kes., PhD.

Surabaya, 28 September 2012

Program Studi Magister Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner  
Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan ,



Prof. Hj. Romziah Sidik, PhD., drh.  
NIP. 195312161978062001

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur Alhamdulillah penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala nikmat dan karunia-Nya yang dilimpahkan selama ini sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan tesis yang berjudul **Efek Meniran (*Phyllanthus niruri* L) terhadap Aktivitas Makrofag dan Jumlah Skizon pada Caecum Ayam yang Diinfeksi *Eimeria tenella*.**

Pada kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih kepada: Prof. Dr. H. Fasich, Apt. selaku Rektor Universitas Airlangga atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada penulis untuk mengikuti dan menyelesaikan Program Magister pada Fakultas kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Prof. Hj. Romziah Sidik, drh., Ph.D. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk menempuh pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Prof. Dr. Dewa Ketut Meles, drh., M.S. selaku dosen pembimbing pertama dan Muchammad Yunus, drh., M.Kes., PhD. selaku dosen pembimbing kedua atas segala bantuan dan bimbingannya sampai dengan terselesainya proposal ini.

Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., M.P., Dr. Iwan Sahrial Hamid, drh., M.Si dan Dr. Mufasirin, drh., M.Si sebagai dosen penguji. Terima kasih atas semua saran dan perbaikan dari awal hingga terselesainya tesis ini.

Kepala Laboratorium Entomologi dan Protozoologi Fakultas Kedokteran Hewan beserta seluruh stafnya atas segala fasilitas yang diberikan kepada penulis. Dr. Lucia Tri Suwanti, M.P, drh. selaku Ketua Prodi Magister IPKMV dan

seluruh staf pengajar Program Magister Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner (IPKMV) Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yaitu Prof. Dr. Rochiman Sasmita, drh., M.S., Prof. Dr. Setiawan Koesdarto, drh., M.Sc., Prof. Dr. Rahayu Ernawati, drh., M.Sc., Prof. Dr. Sarmanu, drh., M.S., Prof. Dr. Nunuk Dyah Retno Lastuti, drh., M.S., Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh., Dr. Suwarno, drh., M.S., Dr. Agnes Theresia Soelih Estoepangestie, drh., Dr. Mustofa Helmi Effendi, drh., DTAPH., Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., M.P. atas wawasan keilmuan selama mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Kepada orang tua saya yaitu ayahanda Pardi, S.Pd. dan ibunda Siti Mutmainah, S.Pd. yang telah mengasuh, mendidik dan selalu memberi dorongan baik moral maupun spiritual sehingga penulis terpacu untuk segera menyelesaikan tesis ini. Kakakku Aris Eko Parwanto, S.T., Ary Dwi Parwanti, S.E., Yuneterza Wuriagung H., S.T. dan seluruh keluarga di Gresik yang selalu selalu memberikan dukungan dan semangat.

Teman-teman seangkatan di Program Magister IPKMV yaitu Dwi Aprilia, drh., Yuliana, drh., Fitria Ardiani, drh., Ristin, S.Pt., Rofik Fadila, drh., Nunung, drh. atas kerjasamanya yang baik dan saling memberi dukungan semangat di saat suka maupun duka dalam menjalani program pendidikan ini.

Terima kasih untuk teman satu penelitian mas Ari, Valent, Okta, Eka, Faris, Icha serta sahabatku Yulia Endah, drh., Rizky Meikasari, drh. dan semua orang terdekat yang tidak bisa saya sebutkan satu per satu namanya yang senantiasa membantu dan memberikan semangat.



Penulis menyadari bahwa dalam tulisan ini masih banyak kekurangan dan masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis sangat mengharapkan kritik dan saran untuk dijadikan sebagai koreksi demi perbaikan tulisan ini. Dengan segala kerendahan hati, penulis berharap semoga tesis ini dapat memberikan sumbangan pemikiran di bidang Kedokteran Hewan serta semua pihak yang membutuhkan.

Surabaya, September 2012

Penulis

**EFFECT MENIRAN (*Phyllanthus niruri* Linn) TO THE MACROPHAGES  
ACTIVITIES AND NUMBER OF SCHIZONT OF *Eimeria tenella*  
INFECTED CHICKEN CAECUM**

**Anita Tri Paryanti**

**ABSTRACT**

This study was effect of meniran extract (*Phyllanthus niruri* Linn) on the macrophages activities and number of schizont of *E. tenella* infected chicken caecum. The purpose of this study was to determine the activity of macrophages and the number of schizont in the caecum of broiler (*Gallus gallus domesticus*) strain CP 707 at 24 days old infected by *E. tenella* with giving extract of meniran. This type of research was an experimental design using Complete Randomized Design (CRD) with 25 units of five experimental treatments, namely treatments P0 (a group of chicken that wasn't infected by *E. tenella*), P1 treatment (group of chickens infected by *E. tenella*), P2 treatment (group of chickens infected by *E. tenella* + 12.25 mg/ml dose extract of meniran), P3 treatment (group of chickens infected by *E. tenella* +14.7 mg/ml dose extract of meniran), and P4 treatment (group of chickens infected by *E. tenella* +24.5 mg/ml dose extract of meniran). Datas were analyzed by ANOVA test. If there were significant differences ( $p < 0.05$ ), the statistical test followed by Duncan's multiple range test (*Duncan's multiple range test*) with a significant level of 5%. The results showed that a significant differences between meniran dose treatment at 12.25 mg / ml, 14.7 mg / ml, 24.25 mg / ml and without meniran on features the activity of macrophages and the number of schizont. At 24.5 mg/ml dose of meniran extract showed the highest activity of macrophages and showed the lowest number of schizont.

**Keywords :** Meniran (*Phyllanthus niruri* Linn), schizont of *Eimeria tenella*, macrophages.

## DAFTAR ISI

	Halaman
SAMPUL DALAM.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN IDENTITAS.....	v
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vii
ABSTRACT.....	x
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
DAFTAR SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG.....	xvi
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.3.1 Tujuan umum.....	5
1.3.2 Tujuan khusus.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	6
1.4.1 Manfaat teoritik.....	6
1.4.2 Manfaat aplikatif.....	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Tinjauan Tentang <i>Eimeria tenella</i> .....	7
2.1.1 Morfologi <i>E. tenella</i> .....	7
2.1.2 Siklus hidup <i>E. tenella</i> .....	8
2.1.3 Patogenesis dan gejala klinis koksidiosis.....	11
2.1.4 Gambaran histopatologi koksidiosis.....	13
2.1.5 Peradangan.....	14
2.2 Tinjauan Tanaman Meniran ( <i>Phyllanthus niruri</i> L).....	15
2.2.1 Klasifikasi.....	15
2.2.2 Sinonim.....	15
2.2.3 Morfologi.....	16
2.2.4 Manfaat <i>Phyllanthus niruri</i> L sebagai immunomodulator.....	17
2.3 Respons Imun.....	19
2.3.1 Makrofag.....	21
2.3.2 Limfosit.....	24
2.3.3 Fagositosis.....	25
2.4 Respons Imun terhadap Koksidiosis.....	26
2.5 Obat Herbal.....	29

<b>BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL.....</b>	<b>32</b>
3.1 Kerangka Konseptual Penelitian.....	32
3.2 Hipotesis Penelitian.....	34
<b>BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN.....</b>	<b>36</b>
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	36
4.2 Variabel Penelitian .....	36
4.2.1 Variabel bebas .....	36
4.2.2 Variabel tergantung .....	36
4.2.3 Variabel kendali .....	36
4.3 Materi Penelitian.....	37
4.3.1 Alat penelitian.....	37
4.3.2 Bahan penelitian.....	37
4.3.3 Sampel dan besar sampel .....	37
4.4 Prosedur Penelitian.....	38
4.4.1 Persiapan hewan percobaan.....	38
4.4.2 Pembagian kelompok perlakuan.....	38
4.4.3 Koleksi organ.....	39
4.5 Perhitungan Jumlah Makrofag .....	39
4.7 Perhitungan Jumlah Skizon pada Sekum Ayam .....	39
4.8 Analisis Data.....	40
4.9 Skema Penelitian.....	40
<b>BAB 5 HASIL PENELITIAN.....</b>	<b>42</b>
5.1 Aktivitas Jumlah Makrofag pada Sekum Ayam .....	42
5.2 Ekspresi Jumlah Skizon pada Sekum Ayam .....	46
<b>BAB 6 PEMBAHASAN.....</b>	<b>51</b>
6.1 Jumlah Makrofag yang Teraktivasi pada Sekum Ayam .....	51
6.2 Ekspresi Jumlah Skizon pada Sekum Ayam .....	52
<b>BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>54</b>
7.1 Kesimpulan .....	54
7.2 Saran .....	54
<b>RINGKASAN.....</b>	<b>55</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>59</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>65</b>

## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
5.1 Rerata dan simpangan baku jumlah makrofag .....	42
5.2 Rata-rata dan simpangan baku jumlah skizon .....	46

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar</b>	<b>Halaman</b>
2.1 Morfologi ookista <i>Eimeria sp</i> .....	7
2.2 Siklus hidup <i>Eimeria tenella</i> pada ayam. ....	9
2.3 Hemoragik sekum karena <i>E. tenella</i> .....	12
2.4 Tanaman meniran .....	16
2.5 Sel makrofag yang teraktivasi ditandai dengan ekspresi warna coklat tua pada sekum ayam .....	23
2.6 Logo obat tradisional .....	29
2.7 Logo obat herbal terstandar .....	30
2.8 Logo fitofarmaka .....	31
3.1 Kerangka konseptual penelitian.....	32
4.1 Skema prosedur penelitian.....	41
5.1 Hasil pengamatan jumlah makrofag.....	43
5.2 Imunohistokimia sekum .....	45
5.3 Hasil pengamatan jumlah skizon .....	47
5.4 Histopatologi sekum .....	48
5.5 Diagram korelasi antara jumlah makrofag dan jumlah skizon .....	49

**DAFTAR LAMPIRAN**

<b>Lampiran</b>	<b>Halaman</b>
Lampiran 1. Hasil persentase jumlah skizon dan jumlah sel makrofag pada sekum ayam dengan ANOVA .....	63
Lampiran 2. Hasil jumlah skizon dan jumlah sel makrofag pada sekum ayam dengan <i>Post-hoc</i> test dan uji Duncan .....	68
Lampiran 3. Korelasi aktivitas jumlah makrofag dan jumlah skizon pada sekum ayam .....	69
Lampiran 4. Perhitungan dosis meniran .....	71
Lampiran 5. Prosedur pembuatan preparat histopatologi .....	73
Lampiran 6. Proses pengecatan imunohistokimia .....	76
Lampiran 7. Foto dokumentasi .....	78

## SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

ADCC	: <i>Antibody dependent cell cytotoxicity</i>
ANOVA	: <i>Analisis of Variance</i>
ATP	: <i>Adenosine triphosphate</i>
APC	: <i>Antigen presenting cell</i>
CTL	: <i>Cytotoxic T lymphocyte</i>
CRP	: <i>C-Reactive Protein</i>
HE	: <i>Hematoxylin Eosin</i>
IFN $\alpha$	: <i>Interferon alfa</i>
IFN $\beta$	: <i>Interferon Beta</i>
IFN $\gamma$	: <i>Interferon gamma</i>
Ig A	: <i>Imunoglobulin A</i>
IgM	: <i>Imunoglobulin M</i>
IgG	: <i>Imunoglobulin G</i>
IL-2	: <i>Interleukin-2</i>
IL-4	: <i>Interleukin-4</i>
IL-10	: <i>Interleukin-10</i>
IL-12	: <i>Interleukin-12</i>
IL-1 $\beta$	: <i>Interleukin-1beta</i>
LGL	: <i>Large Granular Lymphocyte</i>
MAF	: <i>Macrophage Activating Factor</i>
MHC	: <i>Major histocompatibility complex</i>
mg	: milligram
$\mu$ m	: Mikrometer
mm	: millimeter
NO	: <i>Nitric Oxide</i>
NK	: <i>Natural Killer (cell)</i>
PGE-2	: <i>Prostaglandin E-2</i>
pH	: <i>power of Hydrogen</i>
PMN	: Polimorfonuklear
ROI	: <i>Radical oxygen intermediate</i>
RNI	: <i>Reactive nitrogen intermediate</i>
SPSS	: <i>Statistical Program and Service Solution</i>
Th	: <i>T-helper</i>
Tc	: <i>T-sitotoksik</i>
Ts	: <i>T-supressor</i>
TNF $\alpha$	: <i>Tumor Necrosis Factor- <math>\alpha</math></i>
TCR	: <i>T Cell Receptor</i>
<	: kurang dari
>	: lebih dari
$\geq$	: lebih dari, atau sama dengan



**BAB 1**  
**PENDAHULUAN**

## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Koksidiosis merupakan penyakit yang sering menimbulkan permasalahan dengan dampak kerugian ekonomi diperkirakan sebesar US\$ 2400 juta per tahun (Shirley *et al.*, 2005). Kerugian ekonomi koksidiosis bagi peternak ayam antara lain angka kematian yang tinggi, penurunan produksi telur, pertumbuhan terhambat, penurunan bobot hidup, penurunan efisiensi pakan, biaya pengobatan dan upah tenaga kerja yang tinggi. Angka kematian pada kasus koksidiosis tergolong tinggi, yaitu dapat mencapai 80-90% (Jangi *et al.*, 2006).

Pengendalian koksidiosis yang sudah dilakukan antara lain dengan pemberian koksidiostat, vaksinasi, serta sanitasi kandang yang baik (Saif, 2003). Beberapa vaksin yang pernah dicoba adalah vaksin bentuk ookista utuh yang dilemahkan tetapi penggunaan bentuk vaksin ini hanya dapat digunakan pada ayam umur lebih dari dua minggu, karena ayam umur di bawah dua minggu belum mampu mencerna ookista (Shirley, 1996). Pemberian koksidiostat yang berasal dari obat berbahan dasar kimia memiliki tingkat kesembuhan yang beragam dan memberikan efek samping apabila digunakan tidak sesuai dengan aturan dan digunakan secara terus menerus dalam jangka waktu lama, dapat menimbulkan tanda keracunan dan residu pada ayam (Allen and Fetterer, 2002; Harismah, 2006; Yanying *et al.*, 2011). Pemberian obat yang berasal dari tanaman herbal yang dapat meningkatkan sistem imun seperti meniran (*P. niruri* Linn),

khususnya pengaruh pada jumlah makrofag dan jumlah skizon pada kasus koksidiosis belum pernah dilaporkan.

*Eimeria tenella* merupakan salah satu spesies protozoa yang paling patogen pada ayam. Spesies ini dapat menyebabkan perdarahan sekum yang hebat sehingga menimbulkan kematian yang tinggi terutama pada ayam muda. Ayam yang fesesnya mengandung koksidia dalam jumlah sedikit tidak akan menunjukkan gejala klinis. Stadium ookista yang infeksi dapat menular ke unggas yang masih sehat dan seringkali menjadi pembawa penyakit untuk periode yang lama (Jangi *et al.*, 2006). Menurut McDougald (2003), parasit protozoa dari genus *Eimeria* dapat menyebabkan kerusakan jaringan, mengakibatkan gangguan pertumbuhan dan peningkatan kerentanan terhadap penyakit patogen.

Siklus hidup *E. tenella* terdiri dari tahap sporogoni, skizogoni dan gametogoni sehingga respons imun *E. tenella* sangat kompleks membangkitkan respons imun seluler maupun humoral (Lillehoj and Trout, 1993). Adanya antigen akan ditangkap oleh makrofag atau sel APC lain, kemudian antigen diproses di dalam endosom dan dipresentasikan pada permukaan sel, bersama dengan MHC class II untuk selanjutnya diekspos pada sel T-helper (Th). Major histocompatibility complex class (MHC) II akan berikatan dengan reseptor permukaan sel T (TCR). Makrofag juga akan memproduksi IL-1 yang berfungsi merangsang pertumbuhan sel Th dan IL-12 yang mampu merangsang diferensiasi sel Th CD4+ dan aktivator fungsi sitolitik oleh NK. Sel Th CD4+ akan berdiferensiasi menjadi sel Th1 dan sel Th2. Sel T-helper (Th) juga memproduksi IL-2 yang diperlukan untuk proliferasi selanjutnya. Sel T-helper 1

(Th1) berperan sebagai regulator utama imunitas seluler spesifik untuk memproduksi IFN $\gamma$  dan TNF yang kemudian memacu proses fagositosis dan *intracellular killing*. T-helper 1 (Th1) berperan dalam pertahanan tubuh terhadap infeksi antigen intraseluler, sedangkan Th2 lebih banyak berperan terhadap antigen ekstraseluler. Hanya Th2 yang mampu membantu respons sel B terhadap antigen spesifik (Kresno, 2010).

Tanaman meniran (*Phyllanthus niruri* L) adalah salah satu tanaman yang dapat digunakan pada kasus koksidirosis karena mampu meningkatkan respons imun. Zat kimia utama yang terkandung dalam meniran antara lain flavanoid dan tannin. Fungsi flavonoid sebagai imunomodulator yang berperan untuk meningkatkan sistem imun dan memperbaiki fungsi sistem imun yang terganggu, menghambat perkembangan parasit dengan bertindak sebagai inhibitor enzim dengan cara menghambat produksi energi dan asam nukleat atau protein serta dapat menurunkan permeabilitas kapiler darah, sehingga kerusakan kapiler darah dapat dicegah atau dapat diperbaiki. Tanin bersifat sebagai astringent berfungsi merapatkan dan menciutkan sel terluar usus dan mempresipitasi protein usus secara reversibel, sehingga meringankan diare dengan memperkecil selaput lendir usus (Mathivanan *et al.*, 2006; Tjay dan Raharja, 2002).

Tjandrawinata dkk. (2005) dan Maat (1997) menyatakan bahwa meniran (*Phyllanthus niruri* L) dapat memacu sistem imun melalui proliferasi dan aktivasi limfosit T dan B, sekresi sitokin spesifik seperti *Interferon gamma* (IFN $\gamma$ ), *Tumor Necrosis Factor-alpha* (TNF $\alpha$ ) dan beberapa interleukin dapat mengaktifkan

sistem komplemen, mengaktifkan sel fagosit seperti makrofag dan meningkatkan sel sitotoksik seperti sel *Natural Killer*.

Pemberian ekstrak meniran (*Phyllanthus niruri* Linn) pada ayam pedaging yang diinfeksi *Eimeria tenella* diharapkan akan meningkatkan sistem kekebalan tubuh sehingga mampu meningkatkan jumlah makrofag. Menurut penelitian Maat (1997), pemberian ekstrak tanaman meniran (*P. niruri* Linn) per oral pada ayam mampu mempengaruhi fungsi dan aktivitas sistem imun yaitu sebagai imunomodulator. Hal ini ditunjukkan antara lain dengan adanya aktivitas monosit atau makrofag pada fungsi fagositosis dan kemotaksis serta sekresi beberapa sitokin oleh sel imunogenik. Makrofag termasuk sistem imun seluler yang berperan pada endositosis partikel lipoprotein dan mampu mengikat berbagai mikroba. Makrofag berfungsi sebagai fagosit dan sebagai APC (*Antigen Presenting Cell*) yang berfungsi menyajikan antigen kepada limfosit. Fungsi sebagai fagosit, sel ini dapat menghancurkan antigen dalam fagolisosom dan juga melepaskan berbagai enzim dan isi granula ke luar sel, bersama-sama dengan sitokin seperti *Tumor Necrosis Factor* (TNF) yang dapat membunuh organisme patogen (Warren, 1993). Makrofag merupakan bagian utama dari respons imun bawaan (*innate*) pada unggas (Stabler *et al.*, 1994). Makrofag mempunyai peran antara lain berupa respons imun daptan serta bertanggung jawab terhadap pembersihan dan penghancuran patogen ekstraseluler dan intraseluler melalui fagositosis (Dalloul *and* Lillehoj, 2006).

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang diajukan pada penelitian ini adalah :

- 1) Apakah pemberian meniran (*P. niruri* Linn) dapat meningkatkan jumlah makrofag yang teraktivasi pada sekum ayam yang diinfeksi *E. tenella* ?
- 2) Apakah pemberian meniran (*P. niruri* Linn) dapat menurunkan jumlah skizon pada sekum ayam yang diinfeksi *E. tenella* ?
- 3) Apakah terdapat korelasi antara jumlah makrofag yang teraktivasi dengan jumlah skizon pada sekum ayam yang diinfeksi *E. tenella* ?

## 1.3 Tujuan Penelitian

### 1.3.1 Tujuan umum

Secara umum penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian meniran (*P. niruri* Linn) terhadap jumlah makrofag yang teraktivasi dan jumlah skizon pada sekum ayam yang diinfeksi *E. tenella*.

### 1.3.2 Tujuan khusus

Penelitian ini secara khusus bertujuan untuk mengetahui

- 1) Gambaran jumlah makrofag yang teraktivasi pada sekum ayam yang diinfeksi *E. tenella* setelah pemberian meniran (*P. niruri* Linn).
- 2) Gambaran jumlah skizon pada sekum ayam yang diinfeksi *E. tenella* setelah pemberian meniran (*P. niruri* Linn).
- 3) Hubungan antara jumlah makrofag yang teraktivasi dengan jumlah skizon pada sekum ayam yang terinfeksi *E. Tenella*.

## **1.4 Manfaat Penelitian**

### **1.4.1 Manfaat teoritis**

Manfaat penelitian ini diharapkan dapat memberikan pengetahuan tentang tanaman meniran (*P. niruri* Linn) sebagai tanaman herbal yang berfungsi sebagai imunomodulator untuk meningkatkan respons imun pada kasus koksidiosis.

### **1.4.2 Manfaat aplikatif**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang manfaat meniran (*P. niruri* Linn) pada bidang medis serta diharapkan dapat dikembangkan dan diaplikasikan pada dunia peternakan sebagai imunomodulator dalam meningkatkan repons imun pada kasus koksidiosis.

## BAB 2

# TINJAUAN PUSTAKA

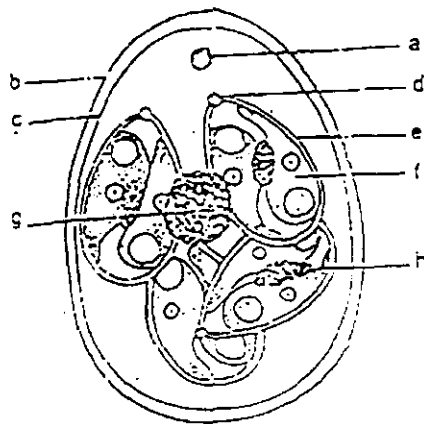


## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tinjauan tentang *E. tenella*

#### 2.1.1 Morfologi *E. tenella*

Koksidiosis adalah penyakit yang disebabkan oleh golongan protozoa dan termasuk dalam genus *Eimeria*. Berdasarkan lokasi kerusakan yang ditimbulkan koksidiosis dapat dibagi atas dua bentuk yaitu koksidiosis sekum dan koksidiosis usus halus. Pada ayam telah ditemukan sembilan spesies *Eimeria* yaitu *E. tenella*, *E. necatrix*, *E. maxima*, *E. brunetti*, *E. averculina*, *E. mitis*, *E. mivati*, *E. praecox*, dan *E. hagani*. Spesies yang paling patogen pada unggas adalah *E. tenella* dan *E. necatrix* (Levine, 1995).



Gambar 2.1 Morfologi ookista *Eimeria* sp.,(a) granula kutub, (b) dinding ookista luar, (c) dinding ookista dalam, (d) badan steida, (e) dinding sporokista, (f) sporozoit, dan (h) badan residu sporozoit. Sumber : Soulsby (1986).

Ookista *E. tenella* berbentuk bulat, lebar dan memiliki ukuran yang bervariasi. dengan panjang sekitar 19,5-26  $\mu\text{m}$ , lebar 16,5-22,8  $\mu\text{m}$ , dengan rata-rata panjang 22,6  $\mu\text{m}$  dan lebar 19,0  $\mu\text{m}$ . Ookista memiliki dinding yang

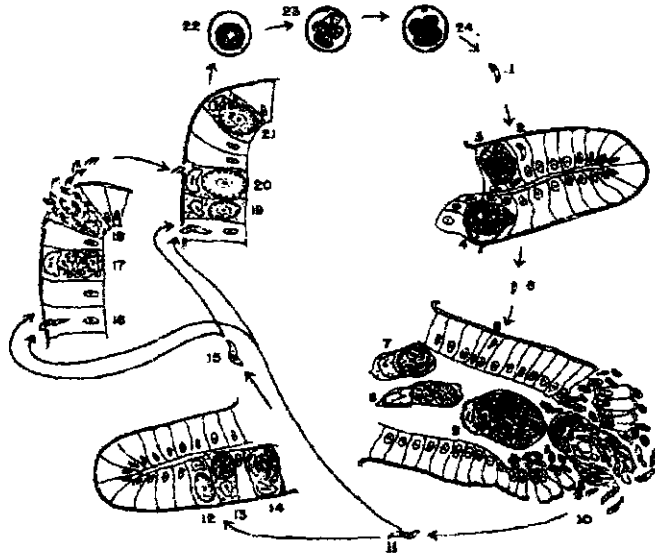
terdiri dari dua lapis yaitu sebelah dalam yang tersusun dari senyawa protein, sedangkan lapisan luar tersusun atas lemak (Bowman, 2003). Ookista akan mengalami sporulasi dalam waktu minimal 18 jam dalam suhu kamar dan kelembaban yang cukup (Conway *and* McKenzie, 2007). Ookista yang sudah berspora terdiri dari empat sporokista dan di dalam sporokista berisi dua sporozoit. Sporozoit tidak mempunyai mikrofil dan badan residu, tetapi mempunyai badan steida. Sporozoit berbentuk memanjang, salah satu ujung membulat dan yang lain meruncing seperti bentuk koma (Soulsby, 1986).

Sporozoit yang dilepaskan oleh sporokista memiliki bentuk seperti koma dengan ukuran 10 x 15  $\mu\text{m}$ , bersifat transparan dan sitoplasma bergranul. Sporozoit mampu memendek dan memanjang dengan gerakan meluncur cepat dan mungkin berisi satu atau lebih gelembung jernih dari bahan protein (Levine, 1995).

### **2.1.2 Siklus hidup *E. tenella***

Perkembangan hidup *E. tenella* terdiri dari sporogoni, skizogoni dan gametogoni (Lillehoj *and* Trout, 1993). Sporogoni terjadi di luar tubuh induk semang dan menghasilkan stadium infeksi, sementara skizogoni merupakan stadium aseksual dan gametogoni yang merupakan stadium seksual terjadi di dalam sel induk semang yang spesifik (Levine, 1995). Sporogoni dimulai saat ookista yang sudah bersporulasi tertelan oleh ayam dan merupakan stadium infeksi. Sporozoit akan tereksistensi di dalam usus karena rangsangan biokimia seperti adanya garam empedu, tripsin dan  $\text{CO}_2$ . Gerakan dari *gizzard* (tembolok)

juga membantu dalam memecahkan dinding ookista. Sporozoit masuk ke dalam induk semang melalui penetrasi villi atau permukaan epitel dari mukosa usus (Long, 1990).



Gambar 2.2 Siklus hidup *Eimeria tenella* pada ayam.

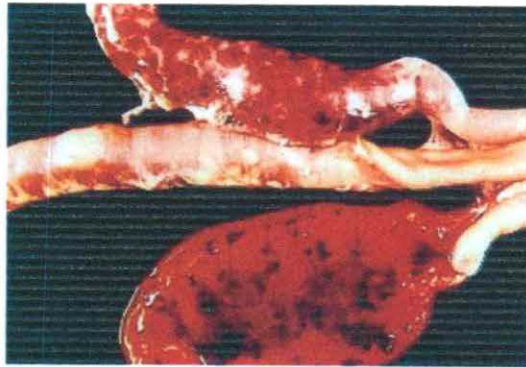
Satu sporozoit (1), masuk kedalam satu sel epitel usus (2), membulat, tumbuh dan menjadi sebuah meront generasi pertama (3), meront ini memproduksi sejumlah besar merozoit generasi pertama (4), kemudian melepaskan diri keluar dari sel induk semang (5), memasuki sel-sel epitel usus yang baru (6), membulat, tumbuh dan menjadi meront generasi kedua (7,8), meront generasi kedua ini memproduksi sejumlah besar merozoit generasi kedua (9,10) kemudian melepaskan diri keluar dari sel induk semang (11), beberapa diantaranya memasuki sel-sel epitel usus yang baru dari usus induk semang dan membulat menjadi meront generasi ketiga (14), merozoit generasi ketiga (15), dan sebagian besar merozoit generasi kedua memasuki sel-sel epitel yang baru. Beberapa diantaranya menjadi makrogamon (16,17) dan setiap mikrogamon memproduksi sejumlah besar mikrogamet (18), lainnya berubah menjadi mikrogamet (19,20), makrogamet dibuahi oleh mikrogamet dan menjadi zigot (21) yang membungkus dirinya sendiri dengan dinding tebal disekelilingnya dan berubah menjadi ookista muda. Ookista ini keluar dengan memecah sel induk semang dan keluar bersama tinja (22), ookista tersebut kemudian mulai bersporulasi. Sporon membuang badan kutub dan membentuk empat sporoblast (23), masing-masing membentuk sebuah sporokista yang berisi dua sporozoit (24), bila ookista yang telah bersporulasi (24), ditelan oleh seekor ayam, sporozoit itu dibebaskan (1). Sumber : Levine (1995).

### 2.1.3 Patogenesis dan gejala klinis koksidiosis

Patogenitas koksidiosis terjadi karena beberapa faktor antara lain jumlah ookista yang termakan oleh ayam, jenis *Eimeria*, faktor lingkungan yang berpengaruh pada tingkat ketahanan ookista, umur ayam dan status nutrisi dalam tubuh induk semang. Penularan koksidiosis secara per oral dapat terjadi melalui transmisi mekanik yang ditularkan melalui kotoran yang terbawa oleh sepatu kemudian masuk ke dalam kandang, tangan atau pakaian pekerja kandang, vektor seperti lalat, kecoa, hewan peliharaan, kumbang, hewan pengerat, dan burung liar, serta debu di udara (Kennedy, 2001). Koksidiosis bentuk sekum menyerang ayam muda dan yang paling peka adalah umur 2-4 minggu, sedang umur 1-2 minggu relatif lebih resisten (Soulsby, 1986).

Patogenesis dimulai saat sporozoit keluar dari ookista yang telah bersporulasi dalam induk semang kemudian menembus lamina propria. Perkembangan skizon di lamina propria hingga membentuk merozoit menyebabkan kerusakan mukosa sehingga terjadi perdarahan. Hal ini terjadi terutama saat perkembangan skizon generasi II yang telah matang pada hari keempat setelah infeksi dan kerusakan mukosa sekum yang disertai perdarahan menimbulkan ayam kekurangan darah. Pada hari ke-7 setelah infeksi, ayam yang bertahan hidup dapat sembuh, tetapi pertumbuhan akan terhambat dibandingkan dengan ayam yang tidak terinfeksi *E. tenella*. Pada hari ke-8 setelah infeksi, dinding sekum menebal, diikuti tahap regenerasi mukosa dan fibrosis (McDougald, 2003).

Kasus koksidiosis bervariasi mulai dari infeksi yang ringan sampai sedang, tidak tampak gejala klinis atau sub klinis. Infeksi dapat dideteksi melalui penurunan berat badan, konsumsi pakan, parameter darah dan histopatologi. Gejala klinik tampak ketika skizon generasi kedua membesar dan pecah serta mengeluarkan merozoit generasi kedua. Skizon generasi kedua pecah berukuran besar menyebabkan kerusakan pada epitel sekum. Secara klinis keadaan ini nampak dengan darah keluar bersama feses akibat kerusakan sekum (Levine, 1995).



Gambar 2.3 Hemoragik sekum karena *E. tenella*. Sumber : Barnes *et al.* (1984).

Gejala umum yang paling mudah terlihat adalah bercak darah pada feses ayam disertai dehidrasi dan gejala klinis semakin tampak pada hari ke-3 setelah infeksi antara lain ayam tampak lesu, pucat, cenderung bergerombol, nafsu makan dan minum menurun bahkan hilang sama sekali, bulu tampak kusut dan dikotori darah terutama bulu di sekitar kloaka. Pada hari ke-4 semakin banyak darah yang tampak pada feses, dan jumlah darah dalam feses paling banyak pada hari ke 5-6 setelah infeksi. Pada hari ke 8-9 ayam akan mati atau dapat sembuh dari kondisi tersebut (Kennedy, 2001).

## 2.2 Tinjauan tanaman meniran (*Phyllanthus niruri* L)

### 2.2.1 Klasifikasi

*Phyllanthus niruri* L diklasifikasikan ke dalam Kingdom Plantae, Division Spermatophyta, Subdivision Angiospermae, Class Dicotylae, Order Euphorbiales, Family Euphorbiaceae, Genus *Phyllanthus* Linn, Species *Phyllanthus niruri* Linn (Dhalimartha, 2006).

### 2.2.2 Sinonim

Di beberapa daerah di Indonesia, meniran dikenal dengan nama ba'me tano, si dukung anak, baket sikolop (Sumatera), meniran ijo (*Phyllanthus niruri* L), memcniran (Jawa), bolobungo, gosau madungi, gosau ma dungi roriha, bealang babiji (Maluku) (Kardinan, 2004).

Beberapa nama asing antara lain zhen zhuo cao, hsieh hsia chu, ye xia zhu (Cina), chanca piedra, quebra pedra, kilabelli (India), child pick a back (Inggris), stone breaker, shaterrstone, chamber bitter, leaf flower, quinine weed (Amerika Selatan) dan arrebenta pedira (Brazil) (Dhalimartha, 2006).

### 2.2.3 Morfologi

Meniran adalah tanaman perdu, tumbuh tegak, tinggi 50 cm sampai satu meter, bercabang terpenjar. Cabang mempunyai daun tunggal berseling dan tumbuh mendatar dari batang pokok. Batang berwarna hijau pucat dan hijau kemerahan. Daun berbentuk bulat telur sampai bulat memanjang, panjang daun 5 mm sampai 10 mm, lebar 2,5 mm sampai 5 mm, ujung bulat atau runcing dan

permukaan bagian bawah berbintik-bintik. Bunga pohon meniran bersifat tunggal, dengan kelopak daun berbentuk bintang, dan mahkota berwarna putih (Widayati, 2008).



Gambar 2.4 Tanaman meniran. Sumber : Ima (2008).

Bunga keluar dari ketiak daun, bunga jantan terletak di bawah ketiak daun, berkumpul 1-2 bunga, gagang bunga 0,5-1 mm, helaian mahkota bunga berbentuk bulat telur sampai bulat memanjang, tepi berwarna hijau muda, panjang 1,25–2,5 mm. Buah meniran berbentuk bulat, berwarna hijau keunguan, bulat licin dan memiliki garis tengah 2–2,5 mm, panjang gagang buah 1,2–2 mm. Karakteristik daun meniran memiliki 15-24 helai anak daun, bagian tepi daun rata, pangkal daun membulat, berujung tumpul, dan pada bagian bawah tulang daun sering dijumpai butiran kecil menggantung. Biji berukuran kecil, keras, berbentuk ginjal, dan berwarna coklat tua (Widayati, 2008).

Ekologi penyebaran tumbuh tersebar hampir di seluruh Indonesia pada ketinggian tempat antara 1 mm sampai 1000 m dari permukaan laut. Tumbuh liar di tempat terbuka, pada tanah gembur yang mengandung pasir, di ladang, di tepi sungai dan di pantai. Tanaman ini menyebar luas hampir ke setiap daerah tropis

meningkatkan fagositosis, kemotaksis makrofag, kemotaksis neutrofil, peningkatan sel sitotoksik seperti sel NK dan aktifitas hemolisis komplemen, sedangkan terhadap respons imun spesifik pemberian ekstrak *P. niruri* Linn meningkatkan proliferasi sel limfosit T, meningkatkan sekresi TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , dan IL-4 serta menurunkan aktivitas sekresi IL-10. Pada imunitas humoral dapat meningkatkan produksi imunoglobulin M (IgM) serta imunoglobulin G (IgG) (Tjandrawinata *et al.*, 2005; Munasir, 2002).

Menurut Dakpogan (2005), tanaman yang banyak mengandung tanin ditemukan kandungan senyawa phenol. Uji *in vitro* dan *in vivo* menunjukkan bahwa senyawa phenol secara spesifik dapat digunakan untuk menghambat perkembangan ookista *E. tenella* dengan merusak dinding sel parasit dari ookista *E. tenella* sehingga struktur sel menjadi terganggu. Phenol berinteraksi dengan membran sitoplasmik sehingga permeabilitas membran terhadap ion seperti H<sup>+</sup> dan K<sup>+</sup> menjadi terganggu. Kehilangan ion akan menyebabkan pembentukan sel terganggu, gangguan keseimbangan cairan osmosis, kerusakan membran, penghambatan sintesis ATP dan berakhir pada kematian sel (Cristaki *et al.*, 2004).

### 2.3 Respons imun

Imunitas (kekebalan) merupakan jawaban reaksi tubuh terhadap bahan asing secara molekuler maupun seluler. Pada proses ini terjadi serangkaian mekanisme yang meliputi pengenalan, penempatan, netralisasi dan eliminasi bahan dari dalam tubuh (Rantam, 2003). Sistem imun harus mampu melawan



patogen intraseluler seperti virus, beberapa bakteri dan protozoa serta patogen ekstraseluler (Baratawidjaya, 2000).

Immunitas terbagi menjadi dua yaitu *innate immunity* (kekebalan bawaan/sistem imun tidak spesifik) dan *adaptive immunity* (kekebalan dapatan/sistem imun spesifik). *Innate immunity* adalah sistem imun tidak spesifik yang merupakan barier terdepan pertahanan tubuh terhadap invasi penyakit. Agen eksternal seperti kulit, membran mukosa, *soluble* faktor seperti lisosom, komplemen, makrofag, granulosit dan sel NK (Hong *et al.*, 2006).

*Adaptive immunity* merupakan hasil kekebalan dalam aktivitas antigen spesifik mekanisme efektor termasuk sel T, sel B, makrofag dan produksi sel memori. Sel memori menyediakan respons lebih cepat dan kuat ketika antigen yang sama ditemui untuk kedua kali. Sel dan jaringan bertanggung jawab untuk kekebalan terletak di seluruh tubuh, di aliran darah, pada jaringan khusus dan permukaan mukosa. Ketika antigen dikenali oleh sel imun baik *innate immunity* maupun *adaptive immunity* maka segera akan diaktifkan (Hong *et al.*, 2006).

Komponen sistem imun tidak spesifik antara lain pertahanan fisik atau mekanik yang terdiri dari kulit, sel lendir, silia saluran pernafasan dan telinga, lisozim (dalam keringat, ludah, air mata dan air susu), asam neuraminik (dalam air susu ibu), asam hidroklorid (dalam asam lambung), enzim proteolitik dan empedu (dalam usus halus), pH yang rendah di vagina, spermin dalam sperma, bahan yang dilepas leukosit, lisozim yang dilepas makrofag, laktoferin dan transferin (dalam serum). Pertahanan humoral terdiri atas berbagai bahan dalam sirkulasi antara lain

komplemen yang berperan dalam meningkatkan fagositosis (opsonisasi) dan mempermudah destruksi bakteri dan parasit (Bratawidjaja, 2000).

Pertahanan seluler yang berperan antara lain fagosit yang terdiri dari sel mononuklear (monosit/makrofag), serta sel polimorfonuklear (granulosit) yang berasal dari sel asal hemopoietik. Makrofag mempunyai beberapa granula dan melepaskan berbagai bahan antara lain lisozim, komplemen, interferon, sitokin, *Large Granular Lymphocyte* (LGL), yang sebagian besar menunjukkan sifat sel NK dan *antibody dependent cell* (LGL), *cytotoxicity* (ADCC) dan *cytotoxic T lymphocyte* (CTL) (Bratawidjaja, 2000).

Imunitas spesifik terdiri dari sistem imun spesifik humoral yang berperan adalah sel B yang berasal dari sel asal multipoten bila sel B dirangsang oleh benda asing, maka sel akan berproliferasi dan berkembang menjadi sel plasma yang membentuk antibodi. Fungsi utama antibodi adalah pertahanan terhadap infeksi ekstraseluler virus, bakteri dan protozoa serta menetralkan toksin. Sistem imun spesifik seluler yang berperan dalam sistem ini adalah sel T. Fungsi utama sel T adalah untuk pertahanan terhadap bakteri yang hidup intraseluler, virus, jamur, parasit dan keganasan (Bratawidjaja, 2000).

### 2.3.1 Makrofag

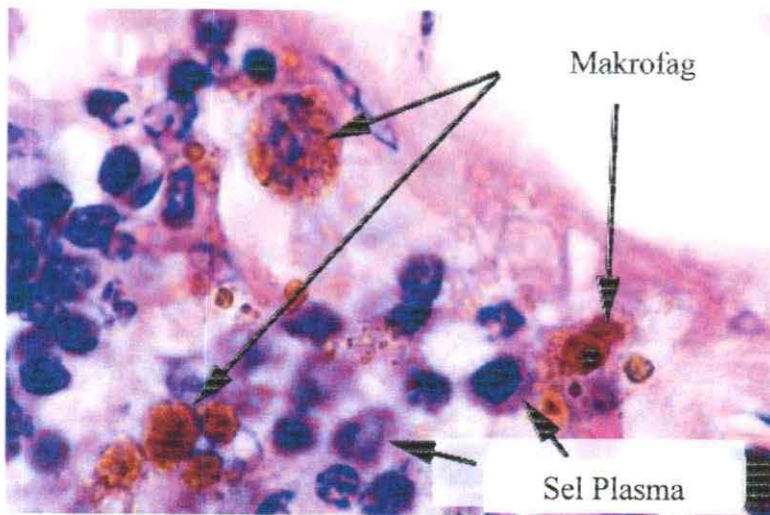
Sistem imunitas alami yang berperan melawan mikroba yang masuk menembus epitel ialah sistem fagosit. Sistem fagosit yang bersirkulasi dalam darah terdapat dua tipe, yaitu neutrofil dan monosit. Neutrofil bekerja pada tempat yang terinfeksi dengan mengenal dan mencerna mikroba. Neutrofil (leukosit

polymorfonuklear) yang berjumlah 4000-10.000 per  $\text{mm}^3$  ialah jenis leukosit yang terbanyak di dalam darah. Dalam respon terhadap infeksi, produksi neutrofil dari sumsum tulang meningkat cepat sampai 20.000 per  $\text{mm}^3$ . Produksi dari neutrofil dirangsang oleh sitokin, yaitu mediator yang diproduksi oleh berbagai macam tipe sel sebagai respon terhadap infeksi. Neutrofil ialah tipe sel pertama yang merespon infeksi baik infeksi bakteri maupun fungi (Abbas *et al.*, 2007).

Tipe sel kedua dalam sistem fagosit ialah monosit. Monosit berjumlah 500-1000 per  $\text{mm}^3$  lebih sedikit dibandingkan jumlah neutrofil. Monosit mencerna mikroba dalam darah dan jaringan. Monosit masuk ke dalam jaringan ekstrasvaskuler dan dapat bertahan dalam waktu yang relatif lebih lama. Monosit akan berdiferensiasi menjadi makrofag di dalam jaringan. Monosit darah dan makrofag ialah dua sel yang sejenis, kedua sel tersebut dinamakan sistem fagosit mononuklear. Neutrofil dan monosit bermigrasi ke tempat ekstrasvaskuler dari infeksi dengan mengikat molekul adhesi endotel dan memproduksi kemokin untuk menghadapi mikroba. Jika mikroba infeksius menembus epitel dan masuk jaringan subepitel, makrofag mengenal mikroba dan merespon dengan memproduksi protein terlarut yaitu sitokin. Kedua sitokin itu ialah *tumor necrosis factor (TNF)* dan *interleukin-1 (IL-1)* (Abbas *et al.*, 2007).

Makrofag berperan penting pada mekanisme kerja sistem imunitas, baik imunitas seluler maupun sistem imun humoral. Makrofag berperan baik pada respons imun seluler alamiah maupun respon imun seluler spesifik (Warren, 1993). Makrofag merupakan sel yang relatif besar dengan diameter sekitar 10-30  $\mu\text{m}$ , bergerak dengan cara amoeboid, memberikan respon terhadap rangsangan

kemotaksis tertentu (sitokin dan kompleks antigen-antibodi) dan mempunyai kemampuan fagositik untuk mencerna mikroorganisme dan sel debris. Makrofag memiliki jangka waktu hidup yang lebih lama dan kemampuan mencerna material lebih banyak jenis. Makrofag juga dapat membatasi organisme (agen asing) yang hidup, jika tubuh tidak mampu membunuh dengan enzim lisosom (Efendi, 2003).



Gambar 2.5 Makrofag yang teraktivasi ditandai dengan ekspresi warna coklat tua pada sekum ayam. Sumber : Caceci (2008).

Makrofag pada jaringan yang mengalami radang berasal dari monosit darah yang telah bermigrasi keluar dari pembuluh darah dan mengalami aktivasi di dalam jaringan sehingga makrofag merupakan bagian dari sistem fagosit mononuklear. Pada jaringan ikat makrofag tersebar secara difus, sedangkan pada organ dijumpai makrofag yang khas seperti sel kupffer (hati), sel mikroglia (otak) atau makrofag alveolus (paru) (Efendi, 2003). Aktivasi makrofag saat bermigrasi ke daerah yang mengalami peradangan diperlihatkan dalam bentuk ukuran yang bertambah besar, sintesis protein, mobilitas, aktivitas fagositik dan kandungan enzim lisosom (Kusmardi *et al.*, 2006).

Makrofag yang sudah teraktivasi siap untuk menjalankan proses fagositosis yang akan menghasilkan produk berupa protease asam dan protease netral. Protease asam dan protease netral merupakan mediator kerusakan jaringan pada peradangan, spesies oksigen reaktif yang berfungsi dalam proses fagositosis dan degradasi mikroba, metabolit asam arakhidonat seperti prostaglandin dan leukotrien (Kumar *et al.*, 2000).

Saat radang kronik, makrofag dapat berakumulasi dan berproliferasi di tempat peradangan. Limfosit yang teraktivasi akan mengeluarkan IFN $\gamma$  yang akan mengaktivasi makrofag. Makrofag yang teraktivasi selain bekerja memfagositosis penyebab radang dan mengeluarkan mediator lain, juga akan mengeluarkan IL-1 dan TNF. Pengeluaran IL-1 dan TNF akan mengaktivasi limfosit, sehingga membentuk suatu timbal balik antara makrofag dan limfosit yang menyebabkan makrofag akan bertambah banyak di jaringan dan menyebabkan terbentuknya fokus radang (Underwood, 1999).

### **2.3.2 Limfosit**

Limfosit memiliki ukuran lebih kecil dibandingkan sel polimorfonuklear (PMN). Limfosit didominasi dengan inti yang bulat, mengandung kromatin yang padat dengan sitoplasma sedikit. Limfosit dibentuk dalam limfonodus dan kadang-kadang dalam folikel limfoid (Dellmann *and* Brown, 1992). Fungsi utama limfosit yaitu melepaskan antibodi dan memiliki umur berkisar 4-5 hari. Limfosit terdiri atas limfosit B (sel plasma) yang bertanggung jawab dalam kekebalan humoral dan limfosit T yang berperan dalam proses kekebalan seluler. Limfosit T

dan limfosit B sangat berperan dalam kekebalan spesifik. Limfosit T dan limfosit B bermigrasi ke tempat radang dengan menggunakan beberapa pasangan molekul adhesi dan kemokin yang serupa dengan molekul yang merekrut monosit (Sudiono dkk., 2003).

Limfosit dimobilisasi pada keadaan setiap ada rangsang imun spesifik (infeksi) dan peradangan yang diperantarai non imun (infark atau trauma jaringan). Aktivasi limfosit memiliki hubungan dengan aktivasi makrofag sehingga terjadi fokus radang akibat proliferasi dan akumulasi makrofag di tempat cedera. Sel plasma merupakan produk akhir dari aktivasi sel limfosit-B yang mengalami diferensiasi akhir. Sel plasma dapat menghasilkan antibodi yang diarahkan untuk melawan antigen di tempat radang atau melawan komponen jaringan yang berubah (Kumar *et al.*, 2000; Underwood, 1999).

### 2.3.3 Fagositosis

Fagositosis merupakan proses penelanan yang dilanjutkan dengan pencernaan seluler terhadap bahan asing yang masuk ke dalam tubuh dengan maksud mengganggu sistem homeostasis tubuh. Proses fagositosis secara garis besar dapat dibedakan dalam 3 tahap yaitu pengenalan dan pengikatan bahan asing, penelanan (*ingestion*) dan pencernaan. Fagositosis sebagian besar diperankan oleh makrofag karena kemampuan fagositosis makrofag jauh lebih kuat dibandingkan dengan sel fagosit yang yang lain. Membran makrofag akan menutup setelah menelan bahan asing, lalu partikel tersebut digerakkan ke dalam sitoplasma sel dan terbentuk vakuol fagosit (Abbas *et al.*, 2007).

Lisosom adalah kantung dengan enzim, bersatu dengan fagosom membentuk fagolisosom. Pada keadaan ini dimulai proses pencernaan intraseluler dan pembentukan zat bakterisidal, jika lisosom gagal menerima bahan asing yang masuk ke dalam tubuh. Saat makrofag jaringan terpapar rangsangan antigen yang sesuai, makrofag akan melepaskan diri dari jaringan dan bereaksi terhadap antigen dengan memproduksi sitokin proinflamasi untuk reaksi inflamasi (Abbas *et al.*, 2007).

#### **2.4 Respons Imun terhadap Koksidiosis**

Siklus hidup *Eimeria* terdiri tahap intraseluler, aseksual dan seksual sehingga respons imun *Eimeria* kompleks dan melibatkan banyak aspek imunitas tidak spesifik dan spesifik yang meliputi mekanisme respons imun humoral dan seluler. Ayam dapat bertahan hidup pada infeksi awal karena resistensi terhadap infeksi dan perkembangan imunitas yang protektif berlangsung selama beberapa bulan (Lillehoj *and* Lillehoj, 2000). Hal terpenting dalam siklus hidup *Eimeria* yang berkaitan dengan imunitas induk semang adalah fase penetrasi dalam intraseluler untuk perkembangbiakan, waktu yang singkat untuk siklus infeksi (selama penetrasi tersebut sistem imunitas kurang memberi respon yg baik) dan level dari imunitas induk semang masih rendah dengan paparan agen infeksi sebagai pemicu sistem kekebalan induk semang yg masih sedikit (Lillehoj *and* Lillehoj, 2000).

Koksidiosis sering terjadi terutama pada unggas muda, tetapi juga dapat terjadi pada ayam tua yang rentan. Semua jenis burung, unggas hewan mamalia

dapat terinfeksi koksidiosis. Infeksi antar spesies (induk semang) tidak terjadi, sebab koksidiosis adalah khusus untuk spesies tertentu (Sanderson *and* Walker, 1997).

Ayam yang sembuh mempunyai sedikit imunitas tetapi umur imunitas ini pendek, kecuali kalau ayam tersebut selalu berhubungan dengan koksidia. Imunitas terhadap koksidiosis bersifat lokal yang ditunjukkan dengan antibodi pada mukosa sekum. Imunitas ini khusus untuk spesies tertentu berarti imunitas terhadap satu spesies koksidia tidak melindungi terhadap serangan koksidia spesies lain (Girard *et al.*, 1997).

Paling sedikit ada 3 jenis kekebalan terhadap *E. tenella*, ayam mungkin kebal secara total terhadap parasit, dimana parasit tidak mampu berkembang biak di dalam tubuh induk semang. Ayam mungkin kebal pada derajat tertentu dimana ookista mampu menyelesaikan siklus hidup, tetapi tidak terjadi lesi di sekum. Ayam mungkin tidak menunjukkan gejala klinis dari penyakit ini tetapi terjadi menimbulkan lesi (Long, 1990).

Infeksi protozoa dapat merangsang tanggap kebal humoral dan tanggap kebal berperantara sel. Secara umum antibodi membantu mengontrol jumlah parasit yang terdapat secara bebas dalam aliran darah dan cairan jaringan, sedangkan tanggap kebal berperantara sel diarahkan terutama terhadap parasit yang intraseluler (Tizard, 1996).

Berdasarkan percobaan yang dilakukan Long (1990) menunjukkan bahwa burung yang diinokulasi dengan 400 ookista infeksi dapat memberikan perbedaan pada nilai perlukaan sekum dan resistensi bila dibanding dengan kontrol. Nilai



ketahanan terhadap infeksi koksidiosis diukur berdasarkan penambahan berat badan, nilai perlukaan sekum, tingkat produksi ookista per gram feses pada 7 hari pasca infeksi.

Menurut Jordan (1990), infeksi *E. tenella* dapat menginduksi kekebalan. Mekanisme kekebalan belum sepenuhnya diketahui tetapi respons kekebalan berperantara sel memegang peranan penting. Sekresi IgA dapat juga berperan dalam kekebalan, tetapi antibodi dalam sirkulasi walaupun diproduksi sebagai respon terhadap infeksi, kemungkinan hanya memiliki peran yang kecil. Menurut Hyde (1990), respons terhadap benda asing secara cepat dilakukan oleh sel fagosit dari sistem kekebalan tidak spesifik yaitu makrofag dan neutrofil. Sel tersebut akan memfagosit benda asing dan menghancurkannya, kemudian diikuti aktivitas yang lebih kompleks yaitu respons yang diperantai molekul antibodi hasil sekresi limfosit B (tanggap kebal humoral) dan tanggap kebal yang diperantarai oleh limfosit T (tanggap kebal berperantara sel) (Hyde, 1990).

Berbagai bentuk rangsangan (misal agen infeksi, limfokin) menyebabkan makrofag bergerak menuju pusat rangsangan melalui kemotaksis untuk berkumpul dan melaksanakan tugas. Makrofag menangkap benda asing dengan cara fagositosis (Delimann and Brown, 1992). Meskipun semua makrofag memfagosit antigen, hanya beberapa yang mempunyai kemampuan mengolah antigen sehingga dapat merangsang sel B. Makrofag meningkatkan kerja sel T dengan mengeluarkan sitokin yaitu *interleukin-1* (Tizard, 1996).

## 2.5 Obat Herbal

Indonesia merupakan negara yang memiliki banyak keanekaragaman hayati. Terdapat sekitar 30.000 jenis (spesies) yang telah diidentifikasi dan 950 spesies diantaranya diketahui memiliki fungsi biofarmaka yaitu tumbuhan, hewan, maupun mikroba yang memiliki potensi sebagai obat dan makanan yang baik untuk manusia, hewan maupun tanaman. Jenis produk obat bahan alam dikategorikan menjadi 3 antara lain obat tradisional (jamu), obat herbal terstandar dan fitofarmaka (Badan POM, 2005).



Gambar 2.6 Logo obat tradisional. Sumber : Badan POM (2004).

Obat tradisional atau jamu adalah bahan atau ramuan bahan yang berupa bahan tumbuhan, bahan hewan, bahan mineral, sediaan sarian atau galenik, atau campuran dari bahan tersebut, yang secara turun menurun telah digunakan untuk pengobatan berdasarkan pengalaman. Obat tradisional tersedia dalam berbagai bentuk yang dapat diminum (bubuk, kapsul, tablet), ditempelkan pada permukaan kulit atau mukosa (suppositoria), tetapi tidak dalam bentuk obat suntik atau gas. Salah satu contoh obat tradisional antara lain beras kencur, kunyit asam, temulawak dan brotowali (Badan POM, 2005). Logo obat tradisional dapat dilihat pada Gambar 2.6.

Obat herbal terstandar adalah sediaan obat bahan alam yang telah dibuktikan keamanan dan khasiatnya secara ilmiah dengan uji praklinik dan bahan bakunya telah distandarisasi. Beberapa contoh obat yang termasuk dalam obat herbal terstandar antara lain diabet, irex-Max, kiranti pegel linu, kiranti sehat datang bulan (Badan POM, 2005). Logo obat tradisional dapat dilihat pada Gambar 2.7.



Gambar 2.7 Logo obat herbal terstandar. Sumber : Badan POM (2004).

Fitofarmaka adalah sediaan obat bahan alam yang telah dibuktikan khasiat dan keamanan secara ilmiah dengan uji praklinik dan uji klinik, bahan baku dan produk jadinya telah distandarisasi. Uji klinik yang dilakukan meliputi : uji toksisitas, uji eksperimental pada hewan, uji klinik fitofarmaka pada manusia dengan tahapan pada manusia sehat dan pada manusia dengan penyakit terkait. Stimuno yang memiliki kandungan ekstrak *Phyllanthus niruri* L. 50 mg merupakan salah satu kelompok obat fitofarmaka (Badan POM, 2005). Logo dari obat tradisional dapat dilihat pada Gambar 2.8.

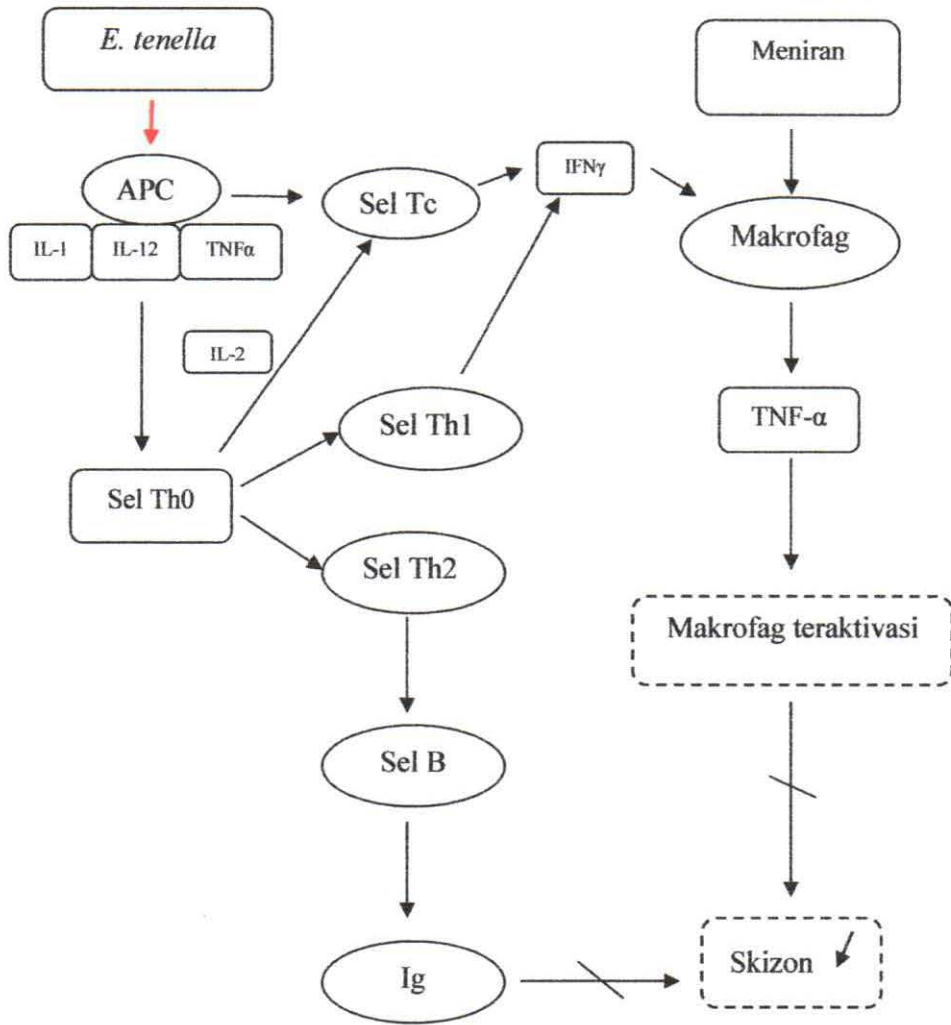


Gambar 2.8 Logo Fitofarmaka. Sumber : Badan POM (2004).

**BAB 3**  
**KERANGKA KONSEPTUAL**

**BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN**

**3.1 Kerangka Konseptual Penelitian**



Gambar 3.1 Kerangka konseptual penelitian

- = Diteliti
- = Tidak diteliti
- (red) = Ditangkap
- (with slash) = Menghambat

Pada hewan yang terserang koksidiosis yang cukup parah, sistem kekebalan humoral dan seluler secara aktif berperan dalam menghasilkan reaksi imunitas. Respons imun tubuh terhadap antigen pertama kali dikenali oleh makrofag (*innate immunity*). Antigen akan difagosit oleh makrofag yang juga berperan sebagai *Antigen Presenting Cell* (APC) dan dipresentasikan bersama MHC *class* II. Makrofag juga memproduksi beberapa interleukin (IL) untuk menstimulasi sel T yaitu IL-1 merangsang pertumbuhan sel Th, dan IL-12 sebagai faktor diferensiasi sel Th. Terjadi ikatan antara APC dengan *T-Cell Receptor* (TCR) pada permukaan sel T helper (CD4+). Diferensiasi pada sel Th menjadi Th2 karena banyak berperan terhadap antigen ekstraseluler dan membantu respons sel B terhadap antigen spesifik. Sel Th menghasilkan IL-2 untuk proliferasi sel T itu sendiri. Sel T berdiferensiasi menjadi sel Th1 dan sel Th2. Sel Th1 berperan terhadap antigen intraseluler dan mampu menghasilkan IFN $\gamma$ . Sel Th2 memiliki peran terhadap antigen ekstraseluler. Sel Th2 memproduksi IL-4, IL-6 untuk menstimulasi sel B agar bisa menghasilkan imunoglobulin. IL4 berfungsi sebagai *growth factor* sel B (Kresno, 2010).

Zat kimia utama yang terkandung dalam meniran antara lain flavanoid dan tannin. Fungsi flavonoid sebagai immunomodulator yang berperan untuk meningkatkan sistem imun dan memperbaiki fungsi sistem imun yang terganggu, menghambat perkembangan parasit dengan bertindak sebagai inhibitor enzim dengan cara menghambat produksi energi dan asam nukleat atau protein serta dapat menurunkan permeabilitas kapiler darah, sehingga kerusakan kapiler darah dapat dicegah atau dapat diperbaiki. Tanin bersifat sebagai astringent berfungsi

merapatkan dan menciutkan sel terluar usus dan mempresipitasi protein usus secara reversibel, sehingga meringankan diare dengan memperkecil selaput lendir usus (Mathivanan *et al.*, 2006; Tjay dan Raharja, 2002).

Pemberian ekstrak *P. niruri* Linn mampu meningkatkan makrofag dan proliferasi sel limfosit T yang merupakan penggerak utama dalam sistem pertahanan tubuh melawan penyakit selain itu pemberian secara peroral juga dapat meningkatkan aktivitas dan fungsi beberapa komponen sistem imun baik yang tergolong dalam imunitas humoral dan seluler (Munasir, 2002).

*Tumor Necrosis Factor* (TNF) diproduksi oleh berbagai jenis sel termasuk makrofag, sel T, B, NK, astrosit dan Kupffer. Makrofag mensekresi beberapa sitokin, yang dapat mempengaruhi pertumbuhan dan aktivitas tipe sel yang lain. Makrofag berpengaruh terhadap respon limfosit dengan 2 cara. Pertama, makrofag yang teraktivasi mensekresi peptide yang sangat penting dalam pengaturan respons imun seperti TNF dan IL-1 yang mengontrol fungsi proliferasi, diferensiasi, dan efektor dari limfosit. Kedua, makrofag yang teraktivasi juga berpengaruh terhadap *Antigen Presenting Cells* (APC), yaitu sel yang memproses dan menghancurkan substansi asing yang dapat direspon oleh limfosit. Pada akhirnya, diharapkan dengan makrofag yang teraktivasi dapat menurunkan produksi dari skizon sehingga dapat untuk menanggulangi kasus koksidosis.

### 3.2 Hipotesis

Berdasarkan rumusan masalah maka dapat diajukan suatu hipotesis yaitu :

1. Pemberian meniran (*P. niruri* Linn) dapat meningkatkan jumlah makrofag yang teraktivasi pada sekum ayam yang diinfeksi *E. tenella*.



2. Pemberian meniran (*P. niruri* Linn) dapat menurunkan jumlah skizon pada sekum ayam yang diinfeksi *E. tenella*.
3. Adanya korelasi antara jumlah makrofag yang teraktivasi dengan jumlah skizon pada sekum ayam yang diinfeksi *E. tenella*.

**BAB 4**  
**MATERI DAN METODE PENELITIAN**

## BAB 4 METODE PENELITIAN

Penelitian ini termasuk jenis penelitian eksperimental laboratoris. Rancangan penelitian menggunakan rancangan acak lengkap dengan lima kelompok perlakuan.

### 4.1 Tempat dan waktu penelitian

Tempat penelitian untuk pemeliharaan ayam dan melakukan perlakuan di kandang hewan coba FKH Universitas Airlangga Surabaya. Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga untuk pemeriksaan imunohistopatologi dan histopatologi. Waktu penelitian dimulai bulan September 2011 sampai Juni 2012.

### 4.2 Variabel Penelitian

#### 4.2.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah dosis meniran (*P. niruri* Linn).

#### 4.2.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah jumlah makrofag yang teraktivasi dan jumlah skizon pada sekum ayam yang diinfeksi *E. tenella*.

#### 4.2.3 Variable kendali

Variabel kendali pada penelitian ini adalah metode pemeliharaan ayam, pakan ayam, metode pemeriksaan, sanitasi kandang dan alat yang digunakan untuk penelitian.

### 4.3 Materi penelitian

#### 4.3.1 Alat penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain alat timbangan digital, mikroskop, hemositometer, *cover glass*, *object glass*, pipet Pasteur, gelas ukur, *disposable spuit*, pot plastik, gunting bedah, pinset, skapel, mikroskop Olympus CX21, kamera digital, *frezeer*, *microspuit injektor*.

#### 4.3.2 Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ayam broiler, pakan ayam, ekstrak meniran (*Phyllanthus niruri* L) dengan merk dagang STIMUNO<sup>®</sup> Forte dan dalam setiap kapsul mengandung ekstrak terstandar *Phyllanthus niruri* 50 mg, meniran yang digunakan dengan dosis 12,25 mg, 14.7 mg, dan 24.5 mg, *aquadest*, ookista *E. tenella*. Bahan-bahan untuk membuat preparat histologis antara lain buffer formalin, alkohol 70%, 80%, 95%, 96%, 100%, xylol, parafin, pewarnaan HE, *alcohol acide*, amoniak dan bahan imunohistokimia dengan Antichicken TNF- $\alpha$  antibodi VEGI (F141) pAb merek *bioworld*.

#### 4.3.3 Sampel dan besar sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ayam broiler (*Gallus gallus domesticus*) strain CP 707 produksi Charoen Pokphand sebanyak 25 ekor yang berumur satu hari (DOC) yang dipelihara dalam kandang starter dan setelah berumur dua minggu dipindah dalam kandang baterai. Ayam tersebut diberi pakan yang tidak mengandung koksidiostat. Pakan dan minum diberikan secara *ad libitum*. Besar sampel yang digunakan untuk setiap kelompok perlakuan adalah 5 ekor.

#### 4.4 Prosedur penelitian

##### 4.4.1 Persiapan hewan percobaan

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ayam broiler sejumlah 25 ekor umur 24 hari. Untuk perlakuan yang ditetapkan berdasarkan rumus Federer, yaitu :  $(t-1) (n-1) > 15$ , dimana  $n$  = banyaknya ulangan,  $t$  = banyaknya perlakuan (Kusriningrum, 2008). Isolat ookista *E. tenella* diambil dari persediaan Laboratorium Parasitologi yang akan diinfeksi pada ayam.

##### 4.4.2 Pembagian kelompok perlakuan

Desinfeksi kandang dilakukan 1 minggu sebelum hewan coba datang dengan menggunakan Rodallon dengan dosis 5 ml dalam 10 liter air. Kandang yang digunakan adalah kandang jenis baterai. Kandang baterai tersebut dibagi menjadi lima kelompok.

Pemberian pakan disesuaikan dengan Standar Galur Broiler dengan pemberian pakan pagi dan sore. Pemberian ekstrak meniran dilakukan selama enam hari dan diberikan pada pagi hari. Dosis ekstrak meniran yang digunakan antara lain 12,25 mg, 14,7 mg dan 24,5 mg per-hari yang diberikan secara per-oral dengan cara dimasukkan ke dalam mulut.

Pada penelitian ini dilakukan pembagian menjadi lima kelompok dari 25 ekor ayam dengan masing-masing kelompok berisi 5 ekor ayam. Ayam yang sudah diberi perlakuan akan dilakukan pengambilan data antara lain, koleksi sekum ayam.

#### 4.4.3 Koleksi organ

Ayam yang telah diberi perlakuan meniran selama enam hari disembelih untuk mendapatkan koleksi sekum. Bagian sekum dipotong 1 cm dari pangkal sekum dan sekum dibuka secara perlahan dengan pinset. Sekum dibersihkan dari kotoran yang menempel dengan aquadest. Potongan sekum diletakkan di atas potongan kecil kertas lalu dijepret keempat sisi sekum dan dimasukkan ke dalam buffer formalin untuk mencegah degenerasi dan mempermudah pemotongan dalam pembuatan preparat histopatologi maupun imunohistokimia

#### 4.5 Perhitungan jumlah makrofag yang teraktivasi

Pengamatan secara mikroskopis dari preparat imunohistokimia ditujukan pada banyaknya jumlah makrofag yang teraktivasi setelah diekspresikan terhadap antibodi TI.1a, yang ditandai dengan ekspresi warna coklat tua pada sitoplasma. Data yang didapat merupakan data kuantitatif yang ditentukan dengan cara menghitung jumlah total sel immunoreaktif yang ditemukan pada 10 lapangan pandang (LP) yang berbeda dengan pembesaran 1000x (Fuchs *and* Auer, 2010). Cara pembuatan preparat imunohistokimia dapat dilihat pada Lampiran 6.

#### 4.6 Perhitungan jumlah skizon pada sekum ayam

Preparat histopatologi jumlah skizon diamati dengan menggunakan mikroskop binokuler (OLYMPUS ® DP12 *Microscope Digital Camera System*). Pemeriksaan ini dimaksudkan untuk menghitung jumlah skizon pada mukosa sekum ayam yang terinfeksi *Eimeria*. Data yang didapat merupakan data kuantitatif yang ditentukan dengan cara menghitung jumlah total skizon yang

ditemukan pada 10 lapangan pandang (LP) yang berbeda dengan pembesaran 1000x (Fuchs *and* Auer, 2010).

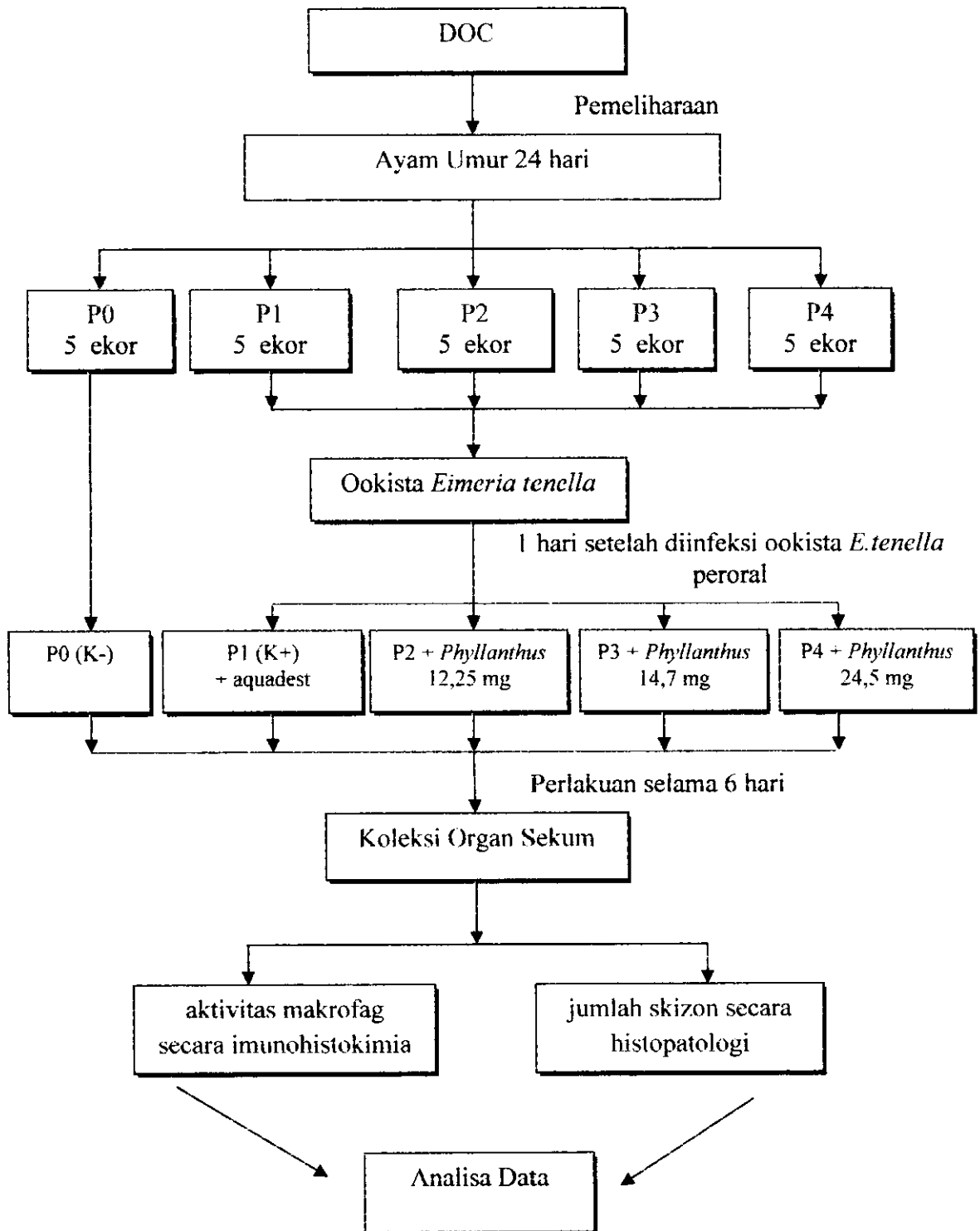
#### 4.7 Analisis Data

Data jumlah makrofag yang teraktivasi dan jumlah skizon yang diperoleh dianalisis dengan Anova (*Analisis of Variant*). Jika terdapat perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ), uji statistik dilanjutkan dengan Duncan (Kusriningrum, 2008). Analisis data pada penelitian ini menggunakan fasilitas program *SPSS (18) for Windows 2000*, kemudian dilakukan uji korelasi untuk mengetahui hubungan antara kedua variabel tersebut.

#### 4.8 Skema Penelitian

Jumlah makrofag dan jumlah skizon akibat dari pemberian meniran masing-masing perlakuan terdiri atas lima ulangan, sehingga banyak satuan percobaan dalam penelitian ini adalah 25 satuan percobaan, seperti pada Gambar 4.1.

Perlakuan kelompok P0 merupakan kontrol negatif tanpa diinfeksi dengan ookista *E. tenella* dan tanpa diberi ekstrak *P. niruri* Linn, kelompok P1 yaitu kontrol positif diinfeksi ookista *E. tenella*, kelompok P2 merupakan kelompok yang diinfeksi ookista *E. tenella* lalu diberi ekstrak *P. niruri* Linn 12,25 mg/ml, kelompok P3 merupakan kelompok yang diinfeksi dengan ookista *E. tenella* lalu diberi ekstrak *P. niruri* Linn 14,7 mg/ml, serta kelompok P4 yang diinfeksi ookista *E. tenella* lalu diberi ekstrak *P. niruri* Linn 24,5 mg/ml.



Gambar 4.1 Skema prosedur penelitian



**BAB 5**  
**HASIL PENELITIAN**

## BAB 5 HASIL PENELITIAN

Berdasarkan hasil pengamatan secara mikroskopis didapatkan analisis data efek pemberian meniran (*Phyllanthus niruri* Linn) terhadap jumlah makrofag yang teraktivasi dan jumlah skizon pada sekum ayam yang terinfeksi *Eimeria tenella* adalah sebagai berikut :

### 5.1 Jumlah makrofag yang teraktivasi pada sekum ayam

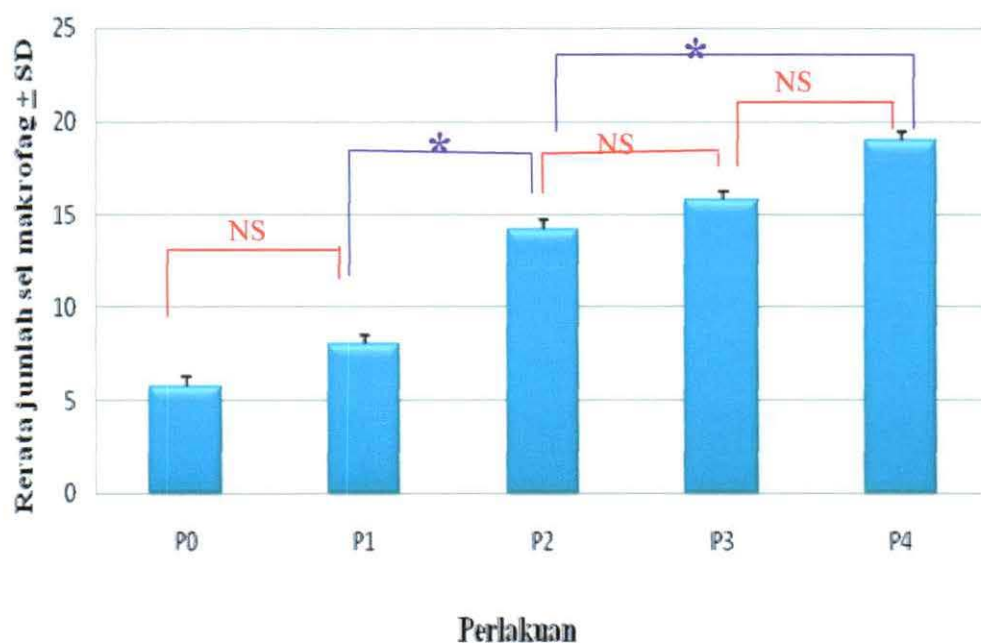
Hasil pembuatan preparat imunohistokimia menunjukkan adanya makrofag yang teraktivasi setelah diekspresikan terhadap antibodi TL1a yang ditandai dengan ekspresi warna coklat tua pada sitoplasma. Makrofag pada setiap sampel dinilai secara kuantitatif yang ditentukan dengan cara menghitung jumlah total sel immunoreaktif yang ditemukan pada 10 lapangan pandang (LP) yang berbeda dengan pembesaran 1000x (Fuchs *and* Auer, 2010). Rerata dan simpangan baku jumlah makrofag yang teraktivasi dapat dilihat pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1 Rerata dan simpangan baku jumlah makrofag.

Perlakuan	Jumlah makrofag ( $\bar{x} \pm SD$ )
P0 (Kontrol negatif)	5,8 <sup>a</sup> $\pm$ 1,789
P1 (Diinfeksi <i>E. tenella</i> )	8,0 <sup>a</sup> $\pm$ 1,871
P2 ( <i>E. tenella</i> + <i>Phyllanthus</i> 12,25 mg)	14,2 <sup>b</sup> $\pm$ 2,588
P3 ( <i>E. tenella</i> + <i>Phyllanthus</i> 14,7 mg)	15,8 <sup>bc</sup> $\pm$ 3,347
P4 ( <i>E. tenella</i> + <i>Phyllanthus</i> 24,5 mg)	19 <sup>c</sup> $\pm$ 3,317

<sup>a,b,c</sup> Superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ ).

Berdasarkan Tabel 5.1 data makrofag yang teraktivasi dari sekum ayam pedaging pasca pemberian perlakuan dianalisis dengan uji Anova yang dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan (*Duncan's multiple range test*). Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa terdapat perbedaan nyata pada makrofag yang teraktivasi di antara perlakuan setelah diinfeksi dengan *E. tenella* dan diberi terapi ekstrak meniran. Pada analisis statistik menunjukkan bahwa pemberian ekstrak meniran secara signifikan dapat meningkatkan jumlah makrofag yang dapat dilihat pada Lampiran 1 dan 2.

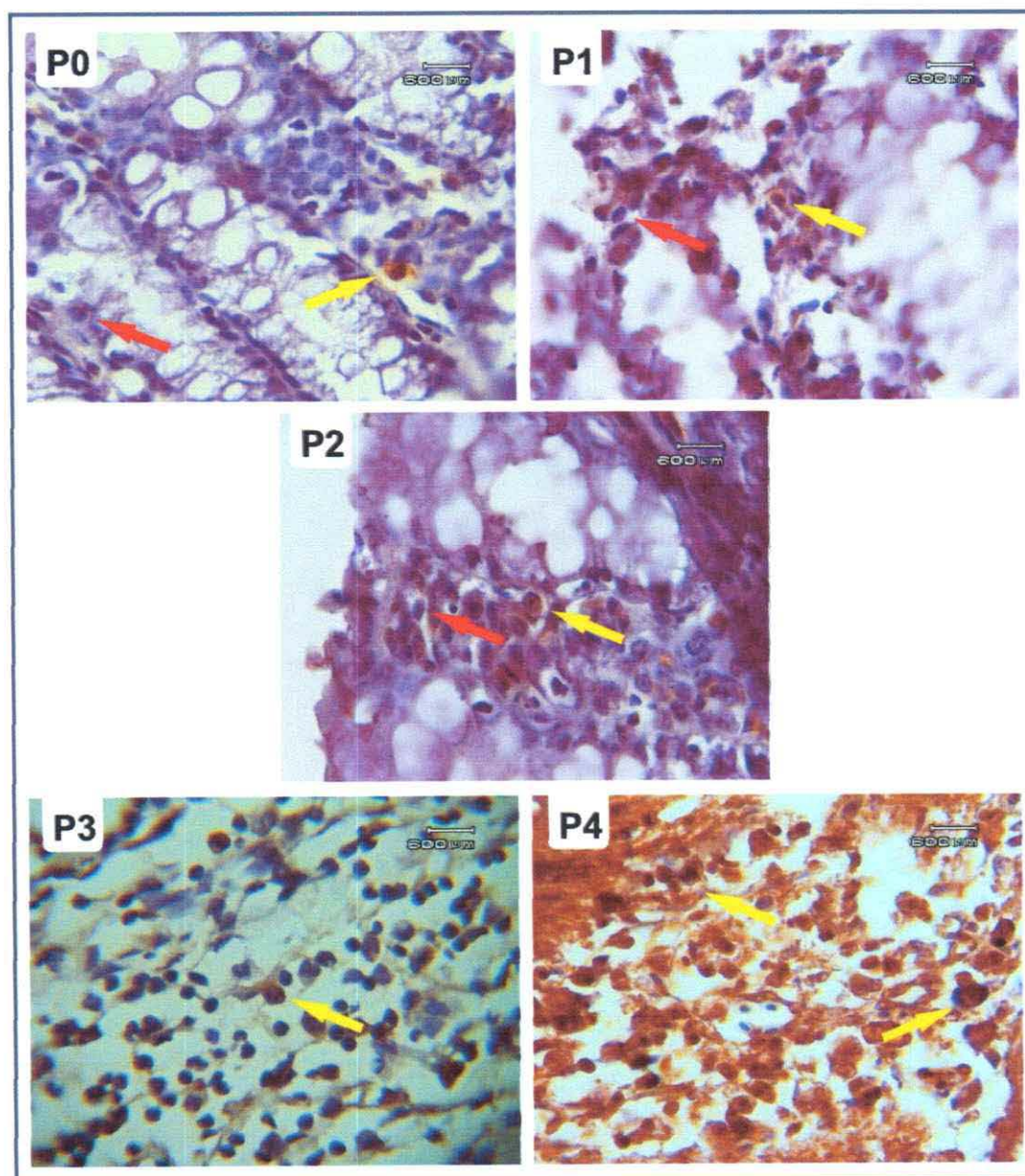


Gambar 5.1 Hasil pengamatan jumlah makrofag. P0 (Kontrol negatif), P1 (Ayam yang diinfeksi *E. tenella*), P2 (Diinfeksi *E. tenella* + *Phyllanthus* 12,25 mg), P3 (Diinfeksi *E. tenella* + *Phyllanthus* 14,7 mg), P4 (Diinfeksi *E. tenella* + *Phyllanthus* 24,5 mg), NS : Tidak berbeda nyata, \* : Berbeda nyata.

Pada Gambar 5.1 di atas diketahui bahwa kelompok P0 yaitu kelompok yang tidak diinfeksi *E. tenella* dan tidak diterapi meniran menunjukkan jumlah makrofag yang teraktivasi rendah dan tidak menunjukkan perbedaan yang nyata terhadap kelompok P1. Kelompok P1 merupakan kelompok ayam yang diinfeksi *E. tenella* tanpa diterapi meniran menunjukkan perbedaan yang nyata terhadap kelompok P2. Pada perlakuan kelompok P2 (diinfeksi *E. tenella* lalu diberi ekstrak *P. niruri* Linn 12,25 mg/ml) tidak menunjukkan perbedaan yang nyata terhadap kelompok P3.

Jumlah tertinggi dari makrofag yang teraktivasi sebesar ( $19 \pm 3,31723$ ) didapatkan pada kelompok P4 ayam yang diinfeksi *E. tenella* lalu diterapi meniran dengan dosis 24,5 mg/ml. Kelompok P4 menunjukkan perbedaan yang nyata dengan kelompok P2 ( $14,2 \pm 2,588$ ). Kelompok P4 ( $19 \pm 3,31723$ ) tidak menunjukkan perbedaan nyata dengan kelompok P3 ( $15,8 \pm 3,347$ ). Hal ini dapat disimpulkan bahwa kelompok P0 tidak menunjukkan perbedaan nyata ( $p > 0,05$ ) dengan kelompok P1, kelompok P2 tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p > 0,05$ ) dengan kelompok P3, kelompok P3 tidak menunjukkan perbedaan nyata ( $p > 0,05$ ) dengan kelompok P4, sedangkan kelompok P4 menunjukkan perbedaan nyata ( $p < 0,05$ ) dengan P0, P1 dan P2.

Pada Gambar 5.2 terlihat perbedaan jumlah makrofag yang teraktivasi di mukosa sekum pada semua perlakuan yaitu P0, P1, P2, P3, dan P4. Nampak jumlah makrofag yang teraktivasi oleh antibodi TL1a tertinggi ditemukan pada kelompok perlakuan P4. Makrofag yang teraktivasi ditandai dengan ekspresi warna coklat tua pada sitoplasma (panah).



Gambar 5.2 Imunohistokimia sekum. P0 (kontrol negatif), P1 (Ayam yang diinfeksi *E. tenella*), P2 (Ayam yang diinfeksi *E. tenella*+ *Phyllanthus* 12,25 mg), P3 (Ayam yang diinfeksi *E. tenella* + *Phyllanthus* 14,7 mg), P4 (Ayam yang diinfeksi *E. tenella* + *Phyllanthus* 24,5 mg) (pembesaran 1000x).

→ Makrofag yang teraktivasi

→ Makrofag yang tidak teraktivasi

## 5.2 Jumlah skizon pada sekum ayam

Hasil analisis statistik jumlah skizon pada sekum ayam pedaging pasca perlakuan pemberian meniran dapat dilihat pada Lampiran 1 dan 2. Berdasarkan hasil analisis statistik dengan Uji Anova yang dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan (*Duncan's multiple range test*) menunjukkan bahwa pemberian ekstrak meniran mengakibatkan perbedaan yang nyata terhadap jumlah skizon pada sekum ayam yang diinfeksi *E. tenella*.

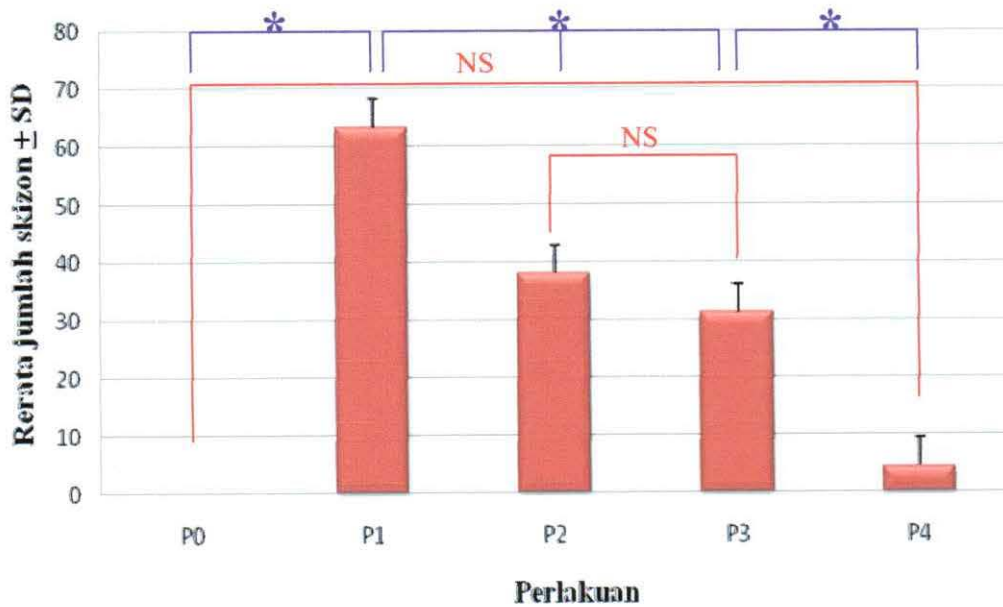
Tabel 5.2 Rerata dan simpangan baku jumlah skizon.

Perlakuan	Jumlah skizon ( $\bar{x} \pm SD$ )
P0 (Kontrol negatif)	0 <sup>a</sup> ± 0,00
P1 (Diinfeksi <i>E. tenella</i> )	63,2 <sup>c</sup> ± 22,742
P2 ( <i>E. tenella</i> + <i>Phyllanthus</i> 12,25 mg)	38,0 <sup>b</sup> ± 25,06
P3 ( <i>E. tenella</i> + <i>Phyllanthus</i> 14,7 mg)	31,2 <sup>b</sup> ± 13,971
P4 ( <i>E. tenella</i> + <i>Phyllanthus</i> 24,5 mg)	4,4 <sup>a</sup> ± 4,336

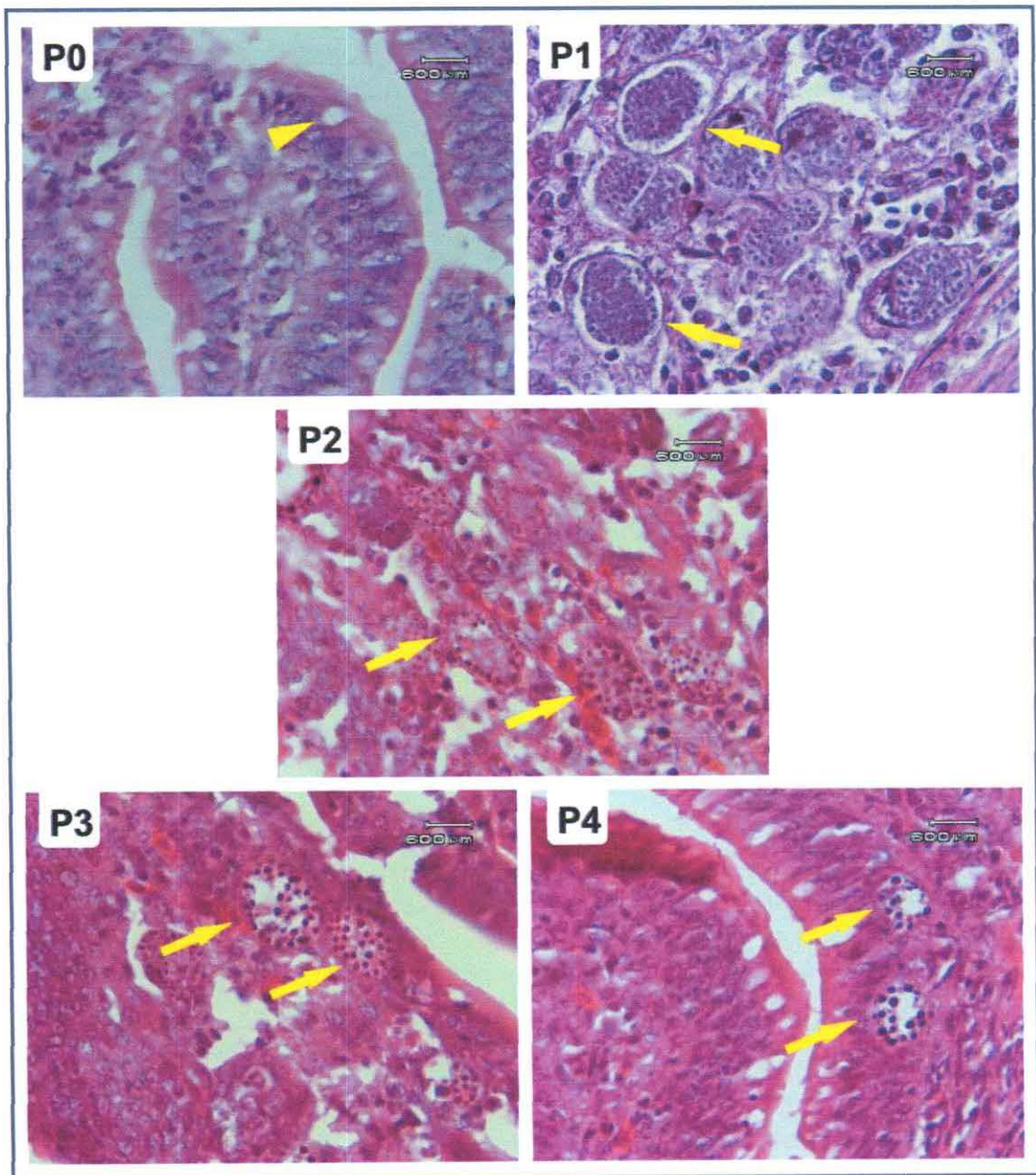
<sup>a,b,c</sup> Superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ ).

Pada Tabel 5.2 diketahui bahwa kelompok P1 yaitu kelompok yang diinfeksi *E. tenella* menunjukkan rerata jumlah skizon tertinggi yaitu sebesar (63,2±22,742). Kelompok P2 (38,0±25,06) menunjukkan perbedaan yang tidak nyata dengan kelompok P3 (31,2±13,971). Jumlah skizon terendah didapatkan pada P0 (0±0,00) yang tidak menunjukkan perbedaan nyata ( $p > 0,05$ ) dengan P4 (4,4±4,336). Dari hasil rerata dan simpangan baku jumlah skizon diketahui bahwa

jumlah skizon kelompok P4 menunjukkan perbedaan yang nyata terhadap P1, P2 dan P3, tetapi tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ ) dengan P0.



Gambar 5.3 Hasil pengamatan jumlah skizon. P0 (Kontrol negatif), P1 (Ayam yang diinfeksi *E. tenella*), P2 (Diinfeksi *E. tenella* + *Phyllanthus* 12,25 mg), P3 (Diinfeksi *E. tenella* + *Phyllanthus* 14,7 mg), P4 (Diinfeksi *E. tenella* + *Phyllanthus* 24,5 mg), NS : Tidak berbeda nyata, \* : Berbeda nyata.



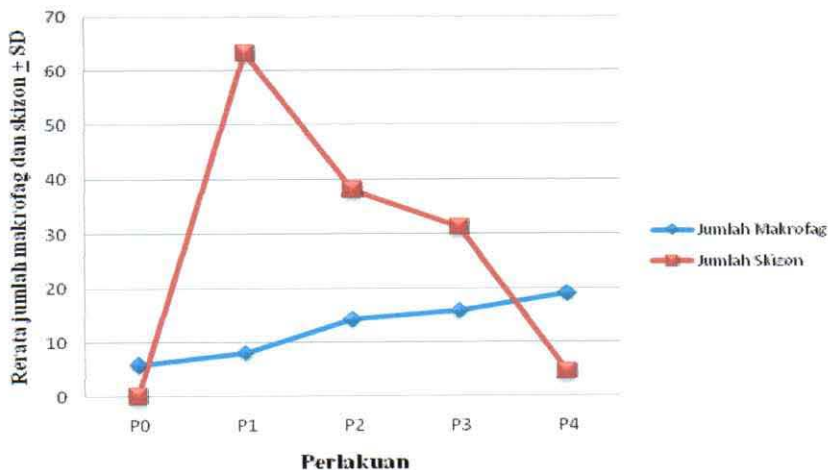
Gambar 5.4 Histopatologi sekum. P0 (kontrol negatif), P1 (Ayam yang diinfeksi *E. tenella*), P2 (Ayam yang diinfeksi *E. tenella* + *Phyllanthus* 12,25 mg), P3 (Ayam yang diinfeksi *E. tenella* + *Phyllanthus* 14,7 mg), P4 (Ayam yang diinfeksi *E. tenella* + *Phyllanthus* 24,5 mg). (pewarnaan HE; pembesaran 1000x).

- Skizon
- ▶ Nampak lapisan epitel normal



Pada Gambar 5.4 terlihat perbedaan jumlah skizon (panah) di mukosa sekum pada semua perlakuan yaitu P0, P1, P2, P3, dan P4. Nampak Jumlah skizon yang terbanyak ditemukan pada perlakuan P1, dimana parasit tersebut ditemukan hingga pada lapisan submukosa di area *central lacteal* sekum. Sementara itu, pada perlakuan P4 jumlah skizon tidak hanya menurun tetapi juga nampak jelas kerusakan mukosa yang lebih ringan dibandingkan perlakuan lainnya. Nampak lapisan epitel normal (kepala panah) seperti pada kelompok kontrol (kepala panah).

Hasil dari penelitian ini menunjukkan tingkat signifikansi 0,592 yang menandakan bahwa tidak terdapat korelasi antara jumlah makrofag yang teraktivasi dengan jumlah skizon pada sekum ayam yang diinfeksi *E. tenella*. Korelasi jumlah makrofag yang teraktivasi dan jumlah skizon pada sekum ayam yang diinfeksi *E. tenella* dapat dilihat pada Lampiran 3.



Gambar 5.5 Diagram korelasi antara jumlah makrofag dan jumlah skizon. P0 (Kontrol negatif), P1 (Ayam yang diinfeksi *E. tenella*), P2 (Diinfeksi *E. tenella* + *Phyllanthus* 12,25 mg), P3 (Diinfeksi *E. tenella* + *Phyllanthus* 14,7 mg), P4 (Diinfeksi *E. tenella* + *Phyllanthus* 24,5 mg), NS : Tidak berbeda nyata, \* : Berbeda nyata.

**BAB 6**  
**PEMBAHASAN**

## BAB 6 PEMBAHASAN

### 6.1 Jumlah Makrofag yang Teraktivasi pada Sekum Ayam

Proses pengamatan jumlah makrofag yang teraktivasi pada penelitian ini dilakukan dengan metode imunohistokimia. Hasil analisis jumlah makrofag yang teraktivasi menunjukkan bahwa kelompok perlakuan P1 terjadi peningkatan jumlah makrofag yang berbeda nyata dengan kelompok P2, P3 dan P4. Makin tinggi dosis meniran yang diberikan menunjukkan peningkatan jumlah makrofag yang teraktivasi. Hal ini membuktikan bahwa kandungan ekstrak dari tanaman meniran (*P. niruri* Linn) dengan pemberian secara per oral pada ayam bersifat sebagai imunostimulator dapat meningkatkan respons imun, baik yang termasuk dalam respon imun humoral maupun seluler, diantaranya makrofag dan sitokin proinflamatori salah satunya yaitu *Tumor Necrosis Factor* (TNF- $\alpha$ ) (Maat, 1997).

Makrofag mensekresi beberapa sitokin, yang dapat mempengaruhi pertumbuhan dan aktivitas tipe sel yang lain. Makrofag berpengaruh terhadap respon limfosit dengan 2 cara. Pertama, makrofag yang teraktivasi mensekresi peptide yang sangat penting dalam pengaturan respon imun, seperti TNF dan IL-1 yang mengontrol fungsi proliferasi, diferensiasi, dan efektor dari limfosit. Kedua, makrofag yang teraktivasi juga berpengaruh terhadap *Antigen Presenting Cells* (APC), yaitu sel yang memproses dan menghancurkan substansi asing yang dapat direspon oleh limfosit (Stites, 1991).

Hasil jumlah makrofag yang teraktivasi pada kelompok P3 tidak berbeda nyata dengan kelompok P4, menunjukkan bahwa dengan dosis *P. niruri* Linn 14,7 mg/ml pada kelompok P3 sudah mampu meningkatkan jumlah makrofag setelah

direaksikan dengan antibodi TL1a. Apabila dihubungkan dengan jumlah skizon, maka pada kelompok perlakuan P4 dengan pemberian *P. niruri* Linn dosis 24,5 mg/ml menunjukkan dosis yang paling efektif karena meningkatkan jumlah makrofag yang teraktivasi cukup tinggi dan mampu menurunkan jumlah skizon.

## 6.2 Jumlah Skizon pada Sekum Ayam

Gambaran analisis statistik jumlah skizon pada setiap perlakuan menunjukkan bahwa kelompok perlakuan P1 memiliki perbedaan yang nyata dibandingkan dengan kelompok perlakuan P2, P3 dan P4. Makin tinggi dosis *P. niruri* Linn yang diberikan mampu menurunkan jumlah skizon pada sekum ayam yang diinfeksi *E. tenella*. Pada kelompok perlakuan P0 tidak menunjukkan perbedaan yang nyata dengan kelompok perlakuan P4, berarti pada kelompok perlakuan P4 dengan pemberian dosis *P. niruri* Linn 24,5 mg/ml menunjukkan dosis yang paling efektif karena dapat menurunkan jumlah skizon mendekati jumlah skizon pada kelompok P0 yaitu kontrol negatif.

Hasil analisis ini sesuai dengan fungsi dari tanaman meniran dengan adanya zat aktif flavonoid mampu menghambat perkembangan parasit dengan bertindak sebagai inhibitor enzim peptidiltransferase. Enzim ini berfungsi dalam sintesis protein menyebabkan terjadi hambatan sintesis asam nukleat parasit sehingga terbentuk asam nukleat yang mengalami kerusakan DNA (Rohimah, 1997). Dengan adanya enzim peptidiltransferase dapat mengurangi infiltrasi sel radang pada daerah yang terinfeksi, sehingga diharapkan perkembangan parasit akan terhenti. Dalam hal ini senyawa tannin yang ada sangat penting manfaatnya dalam mengurangi nekrose vili sebagai astringen yang melapisi dinding mukosa,

sehingga meringankan diare dengan memperkecil selaput lendir usus (Mathivanan *et al.*, 2006; Tjay dan Raharja, 2002). Garis pertahanan pertama terhadap *Eimeria* disediakan oleh sel-sel epitel yang terinfeksi dan sel yang kontak dekat dengan lamina propria. Peradangan diamati pada usus yang terinfeksi *Eimeria* dikaitkan dengan infiltrasi makrofag dan sel T, disertai dengan edema dan penebalan mukosa (Roitt *and* Delves, 2001).

Antara jumlah makrofag yang teraktivasi dengan jumlah skizon pada sekum ayam yang diinfeksi *E. tenella* tidak terdapat korelasi dengan tingkat koefisien korelasi sebesar -113 dan tingkat signifikansi sebesar 0,592. Tidak terdapatnya korelasi kemungkinan tidak hanya TNF $\alpha$  yang berperan dalam mengaktivasi makrofag tetapi ada peranan dari IFN $\gamma$ . *Interferon gamma* (IFN $\gamma$ ) berperan penting dalam pembentukan subset Th1, hal ini terbukti dari pengujian *in vitro* bahwa netralisasi terhadap IFN $\gamma$  dapat menghambat pembentukan subset Th1 tetapi sebaliknya meningkatkan pembentukan subset Th2. *Interferon gamma* (IFN $\gamma$ ) memiliki kemampuan sebagai faktor aktivasi makrofag yang dapat menginduksi makrofag guna meningkatkan kemampuannya dalam membunuh bakteri intraseluler, parasit maupun sel neoplastik secara non-spesifik. *Interferon gamma* (IFN $\gamma$ ) mereduksi suseptibilitas makrofag terhadap infeksi mikroba dan meningkatkan pengenalan target pada fase awal dari imunitas nonspesifik melalui regulasi protein permukaan sel makrofag sehingga dapat meningkatkan jumlah makrofag (Abbas *et al.*, 2007).

**BAB 7**  
**KESIMPULAN DAN SARAN**

## BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

### 7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian efek pemberian meniran (*P. niruri* Linn) pada infeksi *E. tenella* terhadap aktivitas makrofag dan jumlah skizon pada ayam pedaging dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Pemberian ekstrak meniran (*P. niruri* Linn) terbukti dapat meningkatkan jumlah makrofag yang teraktivasi pada sekum ayam pedaging yang diinfeksi *E. tenella*. Pemberian meniran (*P. niruri* Linn) dengan dosis 24,5 mg/ml menunjukkan dosis paling efektif dalam meningkatkan jumlah makrofag yang teraktivasi.
2. Pemberian ekstrak meniran (*P. niruri* Linn) terbukti dapat menurunkan jumlah skizon pada sekum ayam pedaging yang diinfeksi *E. tenella*. Jumlah skizon terendah didapatkan pada perlakuan P4 menggunakan dosis meniran (*P. niruri* Linn) 24,5 mg/ml.
3. Tidak terdapat korelasi antara aktivitas jumlah makrofag yang teraktivasi dengan jumlah skizon.

### 7.2 Saran

Ekstrak meniran bermanfaat untuk meningkatkan respons imun pada infeksi *E. tenella* pada ayam pedaging, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pengaruh dosis pemberian ekstrak meniran (*P. niruri* Linn) dengan perbandingan terhadap obat antikoksidia lain serta efektivitas keamanan pada organ tubuh yang lain.

# RINGKASAN



**RINGKASAN**

ANITA TRI PARYANTI, drh. Efek meniran (*Phyllanthus niruri* Linn) terhadap aktivitas makrofag dan jumlah skizon pada sekum ayam yang terinfeksi *E. tenella*. Dibimbing oleh Prof. Dr. Dewa Ketut Meles, drh., M.S. sebagai dosen pembimbing pertama, Muchammad Yunus, drh., M.Kes., PhD. sebagai dosen pembimbing kedua dan dosen pembimbing penelitian.

Koksidiosis merupakan penyakit pada ayam yang disebabkan protozoa *Eimeria* yang telah tersebar diseluruh dunia. Siklus hidup *Eimeria* terdiri tahap intraseluler, ekstraseluler, aseksual dan seksual sehingga respons imun *Eimeria* kompleks dan melibatkan banyak aspek imunitas tidak spesifik dan spesifik yang meliputi mekanisme respons imun humoral dan seluler. Ayam dapat bertahan hidup pada infeksi awal karena adanya resistensi terhadap infeksi dan perkembangan imunitas yang protektif yang biasanya berlangsung selama beberapa bulan. *Eimeria tenella* merusak mukosa sekum ayam sehingga terjadi perdarahan. Parasit ini bermultiplikasi di dalam epitel sekum dan menimbulkan kerusakan jaringan, yang berakibat pada terganggunya absorpsi nutrisi, dehidrasi, dan kehilangan darah.

Pengendalian koksidiosis yang sudah dilakukan antara lain dengan pemberian koksidiostat, vaksinasi, serta sanitasi kandang yang baik. Beberapa vaksin yang pernah dicoba adalah vaksin bentuk ookista utuh yang dilemahkan tetapi penggunaan bentuk vaksin ini hanya dapat digunakan pada ayam umur lebih dari dua minggu, karena ayam umur di bawah dua minggu belum mampu

mencerna ookista. Pemberian koksidiostat yang berasal dari obat berbahan dasar kimia memiliki tingkat kesembuhan yang beragam dan memberikan efek samping apabila digunakan tidak sesuai dengan aturan dan digunakan secara terus menerus dalam jangka waktu lama, dapat menimbulkan tanda keracunan dan residu pada ayam. Pemberian obat yang berasal dari tanaman herbal yang dapat meningkatkan sistem imun seperti meniran (*P. niruri* Linn), khususnya pengaruh pada jumlah makrofag dan jumlah skizon pada kasus koksidiosis belum pernah dilaporkan.

Tanaman meniran (*Phyllanthus niruri* Linn) adalah salah satu tanaman yang dapat digunakan sebagai pencegahan dan pengobatan alternatif untuk mengurangi dampak kerusakan epitel mukosa sekum dan perdarahan yang disebabkan penyakit berak darah. Meniran mengandung beberapa zat aktif yang berperan untuk meminimalisir perdarahan. Zat kimia yang terkandung dalam meniran antara lain flavanoid dan tannin. Fungsi flavonoid adalah sebagai immunomodulator yang berperan untuk meningkatkan sistem kekebalan tubuh dan memperbaiki sistem imun yang fungsinya terganggu. Tanin bersifat sebagai astringent berfungsi merapatkan dan menciutkan sel terluar usus dan mempresipitasi protein usus secara reversibel, sehingga meringankan diare dengan memperkecil selaput lendir usus.

Rumusan masalah yang diajukan dalam penelitian ini yaitu bagaimana efek pemberian meniran (*P. niruri* Linn) terhadap jumlah makrofag yang teraktivasi dan jumlah skizon pada ayam yang terinfeksi *E. tenella*. Tujuan dari penelitian ini yaitu mengetahui jumlah makrofag yang teraktivasi dan jumlah skizon pada ayam yang terinfeksi *E. tenella* setelah pemberian meniran (*P. niruri*

Linn). Manfaat dari penelitian ini yaitu penelitian ini diharapkan dapat memberikan pengetahuan tentang tanaman meniran (*P. niruri* Linn) sebagai tanaman herbal yang berfungsi sebagai imunomodulator untuk meningkatkan respons imun, sehingga dapat dijadikan pencegahan maupun pengobatan alternatif pada kasus koksidiosis.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang bertujuan untuk identifikasi gambaran makrofag yang teraktivasi dengan metode imunohistokimia pada sekum ayam broiler (*Gallus gallus domesticus*) strain CP 707 umur 24 hari dengan empat perlakuan dan 25 satuan percobaan serta pengamatan jumlah skizon dengan pewarnaan *Hematoxylin Eosin*. Imunohistokimia adalah suatu metode pewarnaan substansi atau bahan aktif di dalam jaringan dengan menggunakan prinsip dasar imunologi yaitu pengikatan bahan aktif (antigen) pada sisi aktif yang spesifik oleh suatu anti bahan aktif (antibodi), dimana sekum ayam direaksikan dengan bahan Antichicken TNF- $\alpha$  antibodi VEGI (F141) pAb merek *bioworld*.

Hasil dianalisis statistik dengan uji Anova yang dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan (*Duncan's multiple range test*) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ ) makrofag yang teraktivasi maupun jumlah skizon diantara perlakuan. Jumlah makrofag terendah terdapat pada kelompok P0 yaitu sebesar  $(5,8 \pm 1,789)$ . Kelompok P4 menunjukkan jumlah makrofag tertinggi yaitu  $(19 \pm 3,31723)$  yang menunjukkan perbedaan nyata terhadap kelompok P2  $(14,2 \pm 2,588)$  dan menunjukkan perbedaan tidak nyata dengan kelompok P3  $(15,8 \pm 3,347)$ . Hasil jumlah skizon terendah didapatkan pada kelompok perlakuan P0  $(0 \pm 0,00)$  dan P4  $(4,4 \pm 4,336)$ . Hasil penelitian

menunjukkan tingkat signifikansi 0,592 yang menandakan bahwa tidak terdapat korelasi antara jumlah makrofag yang teraktivasi dengan jumlah skizon pada sekum ayam yang diinfeksi *E. tenella*.

Kesimpulan dari hasil penelitian yaitu pemberian ekstrak meniran (*P. niruri* Linn) dengan dosis 12,25 mg/ml, 14,7 mg/ml, dan 24,5 mg/ml dapat meningkatkan jumlah makrofag serta dapat mengurangi jumlah skizon dibandingkan tanpa pemberian meniran. Pemberian meniran (*P. niruri* Linn) dengan dosis 24,5 mg/ml menunjukkan dosis paling efektif dalam meningkatkan jumlah makrofag dan mengurangi jumlah skizon skizon pada sekum ayam yang diinfeksi *E. tenella*.

Saran yang dapat disampaikan dari penelitian ini adalah perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pengaruh dosis pemberian ekstrak meniran (*P. niruri* Linn) dengan perbandingan terhadap obat antikoksidia lain serta efektivitas keamanan pada organ tubuh yang lain.

# DAFTAR PUSTAKA

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, K.A., Lichtman A.H. and S. Pillai. 2007. Cytokine. Cellular and Molecular Immunology 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia, WB Saunders C. 2007 : 267-301.
- Allen, P.C. and Fetterer R.H. 2002. Recent Advances in Biology and Immunobiology of *Eimeria* Species and in Diagnosis and Control of Infection with These Coccidian Parasites of Poultry. *J. Clinic . Microbiol.* 15: 58-65.
- Augustine, P. C., and Danforth H. D. 1990. A study of the dynamics of the invasion of immunized birds by *Eimeria* sporozoites. *Avian Dis.* 30:347-35.
- Badan POM. 2004. Keputusan Kepala BPOM tentang Ketentuan Pokok Pengelompokan dan Penandaan Obat Bahan Alam Indonesia. Jakarta : No HK 00.05.4.2411.
- Badan POM. 2005. Keputusan Kepala BPOM tentang Kriteria dan Tata Laksana Pendaftaran Obat Tradisional, Obat Herbal Terstandar dan Fitofarmaka. Jakarta : HK.00.05.41.1384.
- Barnes, H. J., Calnek B. W., Reid W. M. and Yoder, Jr. 1984. *Disease of Poultry.* 8<sup>th</sup> ed. Iowa State University Press. 692-708.
- Bowman, D. 2003. Georgis' *Parasitology for Veterinarians.* Eight Edition, Saunders, USA.
- Bratawidjaja, K.G. 2000. Imunologi dasar. Edisi IV. Jakarta : Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. 20 : 3-105.
- Bunyaphatsara, N. 1999. *Phyllanthus.* Plant Resources of South-East Asia No 12 (1) Medicinal and poisonous plants 1. Backhuys Publishers, Leiden. pp: 381-392.
- Caceci, T. 2008. Veterinary Histology. Dept. of Biomedical Sciences & Pathobiology, Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine, Blacksburg, VA 24061-0442.
- Chodidjah. 2003. Pengaruh pemberian ekstrak (*Phyllanthus niruri* L) pada sel mononuklear terhadap viabilitas sel adenokarsinoma mammae mencit C3H, penelitian invitro [Tesis]. Universitas Diponegoro. Semarang.

- Christever. 2003. Pengaruh Meniran dalam mengurangi Reaksi Peradangan secara Makroskopis serta menekan jumlah eosinofil dalam darah pada Dermatitis alergika dengan hewan coba mencit. Penelitian kesehatan. Universitas Kristen Maranatha. Bandung.
- Conway, D.P. and McKenzie M.E.. 1991. Poultry Coccidiosis. Diagnostic and Testing Procedures, 2nd Edn. Pfizer Inc., The Netherland, pp: 7-14, 37-40.
- Cristaki, E.P., Giannenas A.I., M. Papazahariadou, N.A. Botsoglou and A.B. Spais. 2004. Effect of a mixture of herbal extracts on broiler chickens infected with *Eimeria tenella*. *Anim. Res.* 53: 137-144.
- Dalloul, R.A and Lillehoj, H.S. 2006. Poultry coccidiosis: recent advancements in control measures and vaccine development. *Expert Rev Vaccines* 5: 143-163.
- Dakpogan. 2005. Free-range chick survivability in improved condition and the effect of three medicinal plants on *Eimeria tenella* [Tesis]. *The Royal Veterinary and Agricultural University*.
- Dellmann, H.D. and Brown E.M.. 1992. Buku Teks Histologi Veteriner. Diterjemahkan oleh R. Hartono. Jakarta : UI Press. Terjemahan dari : Textbook Of Veteriner Histology. Pp 84-92.
- Dhalimartha, S. 2006. Atlas Tumbuhan Obat Indonesia, Jilid II. Jakarta: Trubus Agri Widya.
- Efendi, Z. 2003. Daya Fagositosis Makrofag Jaringan Longgar Tubuh. Digital by USU digital library. Bagian Histologi Fak. Kedokteran. Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Fanatico, A. 2006. Parasite Management for Natural and Organic Poultry: Coccidiosis A PublicA Publication of ATTRA - National Sustainable Agriculture Information Service . 1-800-346-9140.
- Fuchs, S. and Auer M. 2010. Biochemistry and Histocytochemistry Research developments. Nova Science Pub, Inc. *New York*. ISBN: 978-1-60876-283-5.
- Girard, F., Fort G., Yvore P. and Quere P.. 1997. Kinetics of Specific Immunoglobulin A, M and G Production on The Duodenal and Caecal Mucosa of Chickens Infected with *Eimeria acerviulina* or *Eimeria tenella* *Int. Parasitol.* 27 (7): 803-809.
- Harismah, A. 2006. Pengaruh Pemberian Ekstrak Sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness) dengan Pelarut Air Dosis Bertingkat Terhadap Jumlah

- Skizon, Makrogamet, Mikrogamet dan Ookista *Eimeria tenella* pada Sekum Ayam [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Hong, Y.H., Lillehoj H.S., Lillehoj E.P. and Lee S.H. 2006. Changes in immune-related gene expression and intestinal lymphocyte subpopulations following *Eimeria maxima* infection of chickens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 114, 259-272.
- Hyde, J. 1990. *Molecular Parasitology*. Van Nostrand Reinhold, New York. Pp 118-120.
- Ima, A.L. 2008. Pengaruh Pemberian *Phyllanthus niruri* Linn Terhadap Respon Imunitas Seluler Mencit bal b/c Yang Diinfeksi Dengan *Salmonella typhimurium* [Thesis]. Fakultas Kedokteran. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Jangi, S., Puay-Eng Soon dan Kiew-Lian Wang. 2006. Pengenalpastian Protein Membran Putatif dalam Sporozoit *Eimeria tenella* Melalui Penyaringan Imuno. *J Parasitol Malaysian* 35(2) 23 - 28. Malaysia.
- Jeurissen, S. H. M., Janse E. M., Vermeulen A. N., and Vervelde L. 1996. *Eimeria tenella* infection in chickens: aspects of host-parasite interaction. *Vet. immunol. immunopathol.* 54:231-238.
- Jordan, F. 1990. *Poultry Disease*. 3<sup>rd</sup> ed. Bailliere Tindall. London. pp 227-241.
- Kardinan, A. 2004. Meniran penambah daya tahan tubuh alami. Jakarta: Agromedia Pustaka, 2004; 6-18
- Kennedy, J. M. 2001. *Coccidiosis in Chickens*. College of Veterinary Medicine. University of Missouri.
- Kresno, S.B. 2010. *Imunologi : Diagnosis dan Prosedur Laboratorik*, edisi kelima. Badan Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Kumar, V., Cotran R. and Robbins S.. 2000. *Buku Ajar Patologi*. Edisi ke-7. Jakarta: EGC. hlm: 56 -- 63
- Kusmardi, K. Shirly dan W. Dwita. 2006. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Johar (*Cassia siamea* Lamk.) Terhadap Peningkatan Aktivitas dan Kapasitas Sel Makrofag. <http://repository.ui.ac.id/contents/koleksi/.pdf>. [15 September 2010] .
- Kusriningrum. 2008. *Perancangan Percobaan*. Airlangga University Press. Surabaya.



- Levine, N. D. 1995. Protozoologi Veteriner. Soekardono S. Penerjemah. Yogyakarta. Gadjah Mada University Press. Terjemahan dari *Veterinary Protozoology*. hlm:180 -198.
- Lillehoj, H.S. 1998. Role of T Lymphocyte and Cytokines in Coccidiosis. *Int. J. Parasitology* 28: 1071-1081.
- Lillehoj, H. S., and Lillehoj E. P. 2000. Avian coccidiosis. A review of acquired intestinal immunity and vaccination strategies. *Avian Dis.* 44:408-425.
- Lillehoj, H. S., and Trout J. M.. 1993. Coccidia: A review of recent advances on immunity and vaccine development. *Avian Pathol.* 22:3-31.
- Long, P. L. 1990. Coccidiosis of Man Domestic Animal. CRS Press. Inc. United State. 321-1342.
- Maat, S. 1997. *Phyllanthus niruri* L sebagai imunostimulator pada mencit. Rangkuman Disertasi. Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga.
- McDougald, L.R., 2003. Coccidiosis. In: Saif, Y.M., Barnes, H.J., Fadly, A.M., Glisson, J.R., McDouglad, L.R. Swayne D.E. (Eds.), Poultry Diseases. Iowa State Press, Iowa, pp: 947-991.
- Mathivanan, R., Edwin., Amutha R., and Viswanathan K. 2006. Panchagavya and *Andrographis panicuata* as Alternative to Antibiotic Growth Promoter on Broiler Production and Carcass Characteristic. India. Departement of Poultry Science, Veterinary College and Research Institute. Namakkal-637001.
- Munasir, Z. 2002. Manfaat pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri* sebagai imunostimulator pada penyakit infeksi anak. 2002. Available from: URL: <http://www.tnial.mil.id/cakrawala.php3>. 12/1/07. [16 Juni 2011].
- Nawa, Y., Abe T., and Owhashi M. 1994. Host Response to Helminths with Emphasis on Eosinophils and Mast Cells. In Helminthology. Edition Chowdhury N and Tada I. Norasa Publishing House, New Delhi.
- Praseno, T. Nuryastuti dan Mustafa. 2001. Perbandingan efikasi infusa meniran (*Phyllanthus niruri* L.) dan kotromoksazol pada pengobatan infeksi kulit oleh *Staphilococcus aureus*. Ilmu Kedokteran. 33 : 89-93.
- Price, S.A. and Wilson. 1995. Pathophysiology, Clinical Concepts of Disease Processes. Fourth Edition. Anugrah P (Penerjemah), Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta

- Rantam, F.A. 2003. Metode Immunologi. Cetakan Pertama. Airlangga University Press. Surabaya. Hal 148-162.
- Ressang. 1984. Patologi Khusus Veteriner. Edisi ke-2. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor. 607.
- Rohimah. 1997. Identifikasi flavonoid yang Memiliki Antifungal dari Damar (*Hope mangarawan*) dan *Shoren eptosula*. [Tesis]. FMIPA-IPB. Bogor
- Roitt and Delves. 2001. Roitt's Essential Immunology. Tenth Edition, Blackwell Science Ltd. Osney Mead Oxford OX2 OEL.
- Saif. 2003. Disease of Poultry 11th Ed. Iowa : BlackWell.23-45.
- Sanderson, I. R. and Walker W.A. 1997. Mucosal Barrier An Overview. *Mucosal Immunol.* (Academic Press) p :5-14.
- Shirley, M.W., Smith, A.L. and Tomley, F.M. 2005. The biology of avian *Eimeria* with an emphasis on their control by vaccination. *Adv. Parasitol.* 60, 285-330.
- Soulsby, E.J.L. 1986. Helminth, Arthropoda and Protozoa of Domesticated Animals. 7<sup>th</sup> ed. Bailliere Tindall London. 603-635.
- Stabler, J.G., McCormick T.W., Powell K.C. and Kogut HM. 1994. Avian heterophils and monocytes : Phagocytic and bactericidal activities against *Salmonella enteritidis*. *Vet. Microbiol.* 38: 293-305.
- Stagg, J. 2006. Phyllanthus . URL: [www.supplementnews.org/phyllanthus.html](http://www.supplementnews.org/phyllanthus.html). 17/6/06. [20 Mei 2011].
- Stites. 1991. Basic and Clinical Immunology. Eight edition. Lange Medical book. Prentice\_Hall International Inc:110.
- Sudiono, J. Kurniadi, B. Hendrawan dan Djimantoro. 2003. Ilmu Patologi. Editor : Janti.
- Suprihati, E. Mufasirin dan Wahyuti R.N. 2000. Kajian Histopatologik pada Sekum Anak Ayam Akibat Pemberian Sporokista *Eimeria tenella*. Lemlit Universitas Airlangga Surabaya.
- Taylor, L. 2006. Chanca Piedra (*Phyllanthus niruri*). Available from: URL: <http://www.rain-tree.com/index.html>. 25/1/07.

- Thomson, R. G. 1988. *Special Veterinary Pathology*. 1<sup>st</sup> ed. B. C. Decker Inc. Philadelphia. 177-178.
- Tipikorn, N. 2002. *Effect of Andrographis Paniculata (Burm.F) Nees on performance, Mortality and Coccidiosis in Broiler Chickens*. {Disertasi}. Göttingen, Germany: Institute of Animal Physiology and Animal Nutrition. Georg-August-University.
- Tizard, I.R. 1996. *Veterinary Immunology an Introduction*. Fifth Edition, WB Saunders Company, a Division of Harcourt Brace and Company. The Curtis Center Independence Square West, Philadelphia, Pennsylvania.
- Tjandrawinata, R.R., Maat, S. dan Noviarney D. 2005. Effect of standardized *Phyllanthus niruri* extract on changes in immunologic parameters: correlation between preclinical and clinical studies. *Medika XXXI (6) : 367-371*.
- Tjay dan Raharja K. 2002, *Obat-Obat Penting: Khasiat Penggunaan dan Efek-Efek Sampingnya*, Edisi Kelima, Cetakan Kedua, Penerbit PT. Alex Media Komputindo: Jakarta.
- Underwood, J.C. 1999. *Patologi Umum dan Sistematik Vol 1*. Edisi ke-2. Jakarta: EGC. hlm: 247-54.
- Warren, K.S. 1993. *Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infection*. Third Edition. Oxford : Blackwell Scientific Publication.
- Widayati, P. 2008. *Efek Ekstrak Etanol Herba Meniran (Phyllanthus niruri L.) Terhadap Penurunan Kadar Asam Urat Mencit Putih Jantan Galur Balb-C Hiperurisemia [Skripsi]*. Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Wiryanawan, W. 2006. *Kilas Balik Perunggasan 2006*. Infonet Majalah Peternakan dan Kesehatan Hewan. Raganan. Jakarta Selatan.
- Yanying, Z., Xiangzhai Z., Qinghui J., Yunyu L., Peiguo L., Wenxiang Z. and Juan C. 2011. Study on differential display gene expression of *Eimeria tenella* multiple resistance strain isolated from Tangshan in chicken. *African J. Microbiol. Res.* 201-258.

# LAMPIRAN

**Lampiran 1. Hasil persentase jumlah skizon dan jumlah sel makrofag pada sekum ayam dengan ANOVA.**

Tests of Normality <sup>b</sup>							
perlakuan		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
jumlah_skizon	P1	.139	5	.200*	.995	5	.994
	P2	.312	5	.126	.813	5	.103
	P3	.345	5	.052	.786	5	.061
	P4	.310	5	.131	.871	5	.272
jumlah_makrofag	P0	.243	5	.200*	.894	5	.377
	P1	.300	5	.161	.908	5	.453
	P2	.221	5	.200*	.915	5	.501
	P3	.201	5	.200*	.881	5	.314
	P4	.218	5	.200*	.950	5	.735

a. Lilliefors Significance Correction

\*. This is a lower bound of the true significance.

b. jumlah\_skizon is constant when perlakuan = P0. It has been omitted.

Test of Homogeneity of Variance <sup>a</sup>					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
jumlah_skizon	Based on Mean	2.588	3	16	.089
	Based on Median	.848	3	16	.488
	Based on Median and with adjusted df	.848	3	9.497	.500
	Based on trimmed mean	2.412	3	16	.105
jumlah_makrofag	Based on Mean	.902	4	20	.481
	Based on Median	.419	4	20	.793
	Based on Median and with adjusted df	.419	4	14.370	.793
	Based on trimmed mean	.841	4	20	.515

a. jumlah\_skizon is constant when perlakuan = P0. It has been omitted.

Case Summaries<sup>a</sup>

			jumlah skizon	jumlah makrofag	
perlakuan	P0	1	0	7	
		2	0	4	
		3	0	8	
		4	0	6	
		5	0	4	
		Total	N	5	5
			Mean	.00	5.80
			Std. Deviation	.000	1.789
	P1	1	34	10	
		2	95	9	
		3	73	8	
		4	61	8	
		5	53	5	
		Total	N	5	5
			Mean	63.20	8.00
			Std. Deviation	22.742	1.871
	P2	1	45	16	
		2	23	12	
		3	19	17	
		4	79	15	
5		24	11		
Total		N	5	5	
		Mean	38.00	14.20	
		Std. Deviation	25.060	2.588	
P3	1	51	17		
	2	21	15		
	3	41	13		
	4	22	21		
	5	21	13		
	Total	N	5	5	
		Mean	31.20	15.80	
		Std. Deviation	13.971	3.347	
P4	1	10	15		
	2	8	24		
	3	2	20		
	4	2	18		
	5	0	18		
	Total	N	5	5	
		Mean	4.40	19.00	
		Std. Deviation	4.336	3.317	
Total	N	25	25		
	Mean	27.36	12.56		
	Std. Deviation	28.046	5.583		

a. Limited to first 100 cases.

**Oneway****Descriptives**

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
jumlah_skizon	P0	5	.00	.000	.000	.00	.00	0	0
	P1	5	63.20	22.742	10.171	34.96	91.44	34	95
	P2	5	38.00	25.060	11.207	6.88	69.12	19	79
	P3	5	31.20	13.971	6.248	13.85	48.55	21	51
	P4	5	4.40	4.336	1.939	-.98	9.78	0	10
	Total	25	27.36	28.046	5.609	15.78	38.94	0	95
jumlah_makrofag	P0	5	5.80	1.789	.800	3.58	8.02	4	8
	P1	5	19.00	3.317	1.483	14.88	23.12	15	24
	P2	5	15.80	3.347	1.497	11.64	19.96	13	21
	P3	5	14.20	2.588	1.158	10.99	17.41	11	17
	P4	5	8.00	1.871	.837	5.68	10.32	5	10
	Total	25	12.56	5.583	1.117	10.26	14.86	4	24

**ANOVA**

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
jumlah_skizon	Between Groups	13440.960	4	3360.240	12.361	.000
	Within Groups	5436.800	20	271.840		
	Total	18877.760	24			
jumlah_makrofag	Between Groups	605.760	4	151.440	21.270	.000
	Within Groups	142.400	20	7.120		
	Total	748.160	24			

**Lampiran 2. Hasil jumlah skizon dan jumlah sel makrofag pada sekum ayam dengan *post-hoc* test dan uji Duncan.**

**Post Hoc Tests**

**Homogeneous Subsets**

**jumlah\_skizon**

Duncan<sup>a</sup>

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
P0	5	.00		
P4	5	4.40		
P3	5		31.20	
P2	5		38.00	
P1	5			63.20
Sig.		.678	.522	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

**jumlah\_makrofag**

Duncan<sup>a</sup>

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
P0	5	5.80		
P1	5	8.00		
P2	5		14.20	
P3	5		15.80	15.80
P4	5			19.00
Sig.		.207	.354	.072

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

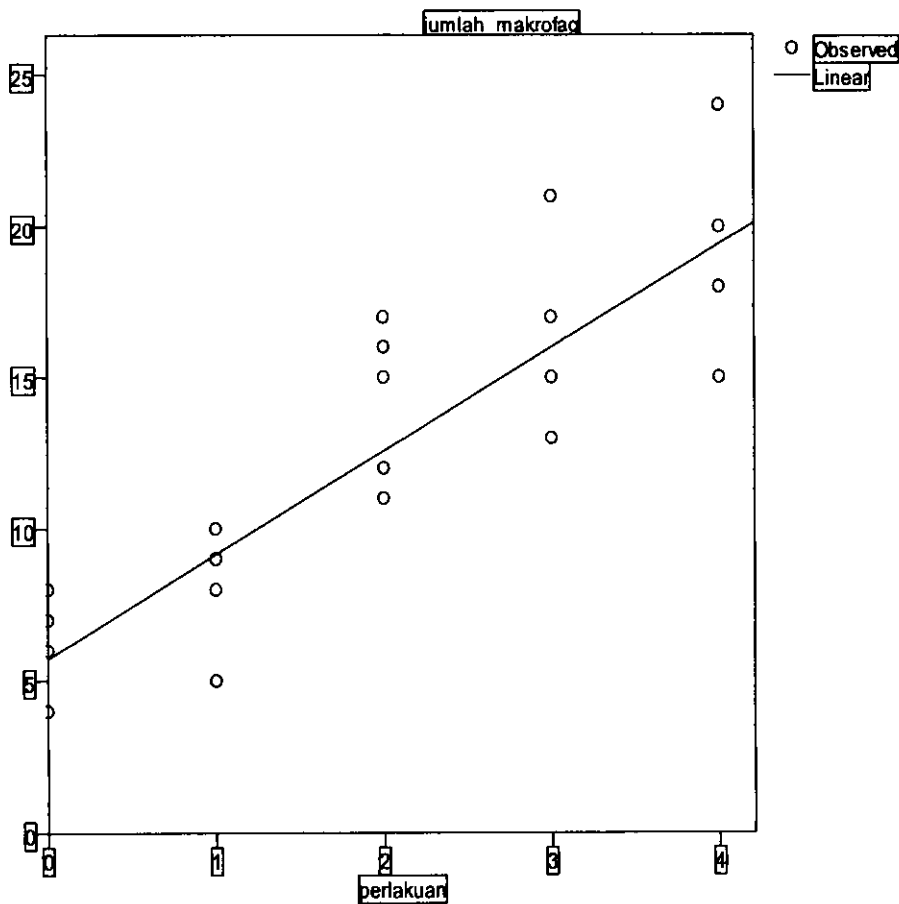


**Lampiran 3. Korelasi aktivitas jumlah makrofag dan jumlah skizon pada sekum ayam**

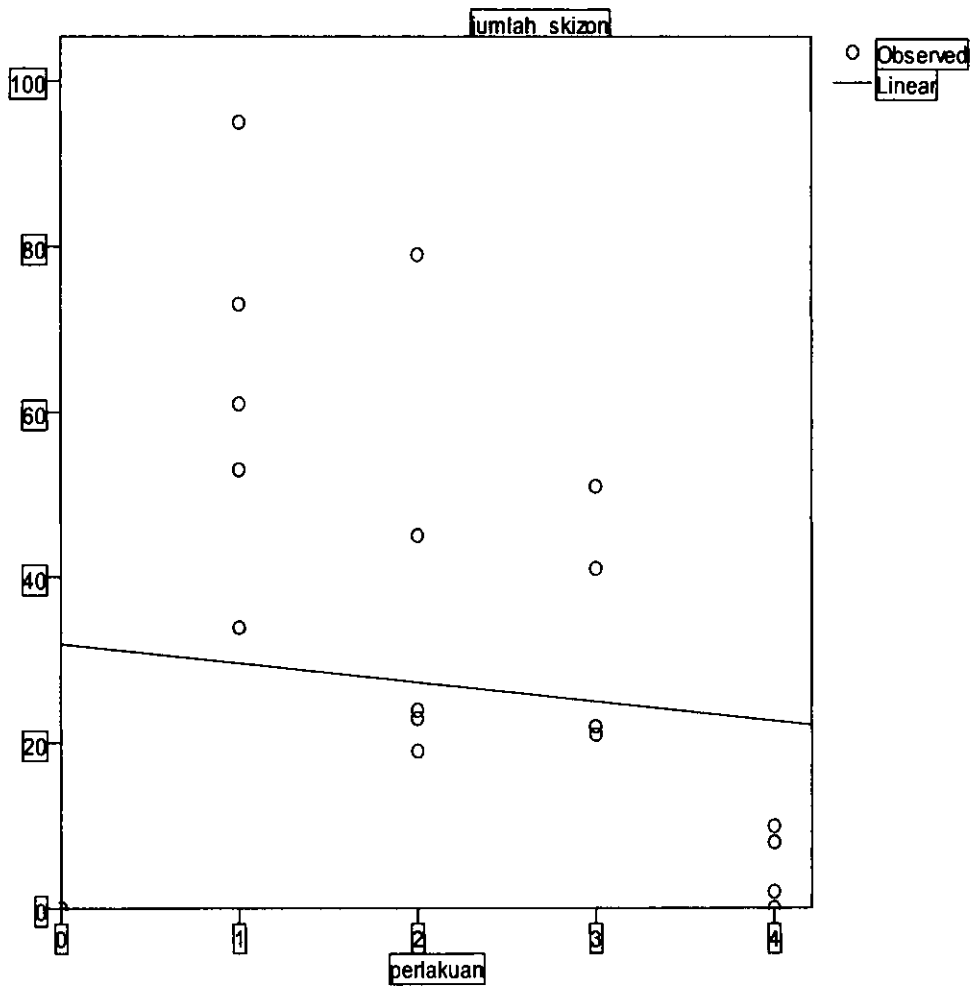
**Correlations**

		jumlah_skizon	jumlah_makrofag
jumlah_skizon	Pearson Correlation	1	-.113
	Sig. (2-tailed)		.592
	N	25	25
jumlah_makrofag	Pearson Correlation	-.113	1
	Sig. (2-tailed)	.592	
	N	25	25

**Curve Fit Makrofag**



**Curve Fit Skizon**



**Lampiran 4. Perhitungan dosis meniran (*Phyllanthus Niruri L*)****PERHITUNGAN DOSIS MENIRAN (*Phyllanthus Niruri L*)**

Pada manusia *Phyllanthus Niruri L* (nama dagang STIMUNO® Forte kapsul) diberikan dengan dosis yaitu 3 kali sehari 50 mg. Karena tidak ada literature yang menunjukkan konversi dosis dari manusia ke ayam, jadi dilakukan eksplorasi dosis dengan menggunakan dosis bertingkat atau range dosis. Berat badan ayam di setarakan dengan berat badan kelinci 1,5 kg.

Dosis untuk ayam berat 1,5 kg, didapatkan melalui konversi perhitungan dosis *Phyllanthus Niruri L* yang diberikan pada manusia berdasarkan tabel konversi dosis obat dari Laurence dan Bacharach (Donatus and Nurlaila, 1986).

Adapun tabel konversi dosis obat tersebut adalah sebagai berikut :

**Tabel konversi perhitungan dosis untuk berbagai jenis hewan dan manusia**

	Mencit 20 g	Tikus 200 g	Marmot 400 g	Kelinci 1,5 kg	Kucing 2 kg	Kera 4 kg	Anjing 12 kg	Manusia 70 kg
Mencit 20 g	1,0	7,0	12,25	27,8	29,7	64,1	124,2	387,9
Tikus 200 g	0,14	1,0	1,74	3,9	4,2	9,2	17,8	56,0
Marmot 400 g	0,08	0,57	1,0	2,25	2,4	5,2	10,2	31,5
Kelinci 1,5 kg	0,04	0,25	0,44	1,0	1,08	2,4	4,5	14,2
Kucing 2 kg	0,03	0,23	0,41	0,92	1,0	0,22	4,1	13,0
Kera 4 kg	0,016	0,11	0,19	0,42	0,45	1,0	1,9	6,1
Anjing 12 kg	0,008	0,06	0,10	0,22	0,24	0,52	1,0	3,1
Manusia 70 kg	0,0026	0,018	0,031	0,07	0,076	0,16	0,32	1,0

(Sumber: Farmakometriks, Donatus dan Nurlaila, 1986)

Jika diketahui :

1. Dosis *Phyllanthus Niruri* L per oral pada manusia adalah 3x sehari 50 mg.
2. Faktor konversi manusia - rabbit adalah 0,07

Maka : Dosis *Phyllanthus Niruri* L pada manusia sehari adalah  $3 \times 50 \text{ mg} = 150 \text{ mg}$ .

Jika berat badan rata-rata manusia adalah 70 kg, maka jumlah dosis per oral pada manusia  $70/50 \times 150 \text{ mg} = 210 \text{ mg}$ . Jika berat badan rata-rata ayam disetarakan dengan berat badan rata-rata kelinci 1,5 kg, maka  $0,07 \times 210 \text{ mg} = 14,7 \text{ mg}$ . Dibuat range dosis atau interval dosis dengan batas atas dan batas bawah. Dibuat  $\log 14,7 = 1,2$  dosis efektif terletak diantara  $\log 10$  dan  $\log 100$  jadi dosis bertingkatnya :

$$\underline{\text{Log } 10} \times 14,7 \text{ mg} = 12,25 \text{ mg} \quad \text{(Dosis I)}$$

$$\text{Log } 14,7$$

$$\underline{\text{Log } 14,7} \times 14,7 \text{ mg} = 14,7 \text{ mg} \quad \text{(Dosis II)}$$

$$\text{Log } 14,7$$

$$\underline{\text{Log } 100} \times 14,7 \text{ mg} = 24,5 \text{ mg} \quad \text{(Dosis III)}$$

$$\text{Log } 14,7$$

## Lampiran 5. Prosedur Pembuatan Preparat Histopatologi

### PROSEDUR PEMBUATAN PREPARAT HISTOPATOLOGI

Proses pembuatan preparat histopatologi sekum ayam dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya, melalui tahapan-tahapan sebagai berikut :

#### 1. Fiksasi dan pencucian

Tujuan : - Mencegah terjadinya degenerasi post mortem.

- Mematikan bakteri.
- Meningkatkan afinitas jaringan terhadap berbagai zat warna.
- Membuat jaringan lebih keras sehingga mengawetkan bentuk semula dan mudah dipotong.
- Meningkatkan indeks refraksi berbagai komponen jaringan.

Reagen : formalin 10 %.

Cara kerja : setelah hewan percobaan mati maka, segera dilakukan otopsi, alu organ hati diambil dan dimasukkan dalam formalin 10% selama 24 jam. Selanjutnya dilakukan pencucian dengan air kran.

#### 2. Dehidrasi dan clearing

Tujuan : - untuk menarik air dari dalam jaringan.

- membersihkan dan menjernihkan jaringan.

Reagen : Alkohol 70%, 80%, 96%, alcohol absolute I, II, III, xylol I dan xylol II.

Cara kerja : organ hati yang telah dicuci dengan air kran selama 30 menit, kemudian dimasukkan ke reagen dengan urutan

alcohol 70%, 80%, 96%, alcohol absolute I, II, III, xylol I dan II, masing – masing selama 30 menit.

### **3. Infiltrasi**

Tujuan : untuk menginfiltrasi dengan paraffin. Paraffin akan menembus ruang antar sel dan dalam sel sehingga, jaringan lebih tahan terhadap pemotongan.

Reagen : paraffin I dan II

Cara kerja : jaringan dimasukkan ke dalam paraffin I dan II yang mencair kemudian, dimasukkan ke dalam oven selama 30 menit, setelah itu dimasukkan ke dalam paraffin I dan II dan dimasukkan ke dalam oven selama 30 menit pada suhu 80°C.

### **4. Pembuatan blok paraffin**

Tujuan : untuk memudahkan pemotongan jaringan.

Reagen : paraffin cair.

Cara kerja : beberapa cetakan besi yang telah diolesi gliserin dengan tujuan untuk mencegah lengketnya paraffin dan cetakan, kemudian hati yang telah dipotong dimasukkan dengan pinset dan ditunggu hingga paraffin membeku.

### **5. Pewarnaan**

Tujuan : untuk memudahkan melihat perubahan pada jaringan. Pada tahap ini digunakan pewarnaan Hematoxylin Eosin ( HE ).

Cara kerja : pewarnaan HE dilakukan dengan menggunakan metode Harris yaitu jaringan yang telah dikeringkan dimasukkan ke dalam :

1. Xylol I : 3 menit dalam tempat khusus
2. Xylol II : 1 menit
3. Alkohol absolute I dan II : 1 menit
4. Alkohol 96%, 80% dan 70% : 1 menit
5. Air kran : 1 menit.
6. Zat warna : 5 – 10 menit
7. Air kran : 2- 5 menit
8. Acid alkohol : 3 – 10 celupan
9. Air kran : 4 –7 celupan
10. Amoniak : 6 celupan
11. Aquades secukupnya
12. Zat warna eosin : 15 menit
13. Aquades : 1- 2 menit
14. Alkohol 70% dan 80% : 1 – 2 menit
15. Dan selanjutnya dibersihkan dari sisa- sisa pewarnaan.

#### **6. Mounting :**

Tujuan : penutupan obyek glass dengan cover glass yang telah ditetesi dengan Canada balsem.

## Lampiran 6. Proses pengecatan imunohistokimia

### PROSES PENGECATAN IMUNOHISTOKIMIA

Gelas objek perlu dilapisi poly L-lysine sebelum jaringan dilekatkan kemudian dikeringkan pada hotplate

#### 1. Deparafinisasi

- a. Xylol I, II dan III masing-masing didiamkan selama 10 menit
- b. Alkohol absolute I dan II masing-masing didiamkan selama 3 menit
- c. Alkohol 96% I dan II masing-masing didiamkan selama 3 menit
- d. Alkohol 80% didiamkan selama 3 menit
- e. Alkohol 70%, didiamkan selama 1 menit

#### 2. Digesti proteolitik

- a. Menggunakan Trypsin 0,025% dalam inkubator dengan temperatur 37°C selama 15 menit

#### 3. Staining protokol

- a. PBS (10%) 2 kali masing-masing didiamkan selama 5 menit
- b. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% didiamkan selama 10 menit
- c. PBS 2 kali masing-masing didiamkan 5menit
- d. Antibodi primer diencerkan dengan diluent AB 5 % diteteskan pada jaringan selama 45 – 60 menit
- e. PBS 2 kali masing-masing didiamkan 5 menit
- f. Biotinylated link (yellow) drops, didiamkan selama 5 menit
- g. PBS 2 kali masing-masing didiamkan selama 5 menit
- h. Streptavidin (red) drops, didiamkan selama 30 menit
- i. PBS 2 kali masing-masing didiamkan selama 5 menit



- j. DAB (3,3 - diamino benzidine) chromogen, didiamkan selama 6-10 menit  
(diencerkan dengan diluent 2%)
  - k. PBS, didiamkan selama 5 menit
  - l. Aquades, didiamkan selama 5 menit
4. Counterstaina. Hematoxillin, didiamkan selama 5-15 menit
- b. Air mengalir, didiamkan selama 5 menit
  - c. Amoniak air, didiamkan selama 3 menit
  - d. Dipping aquades, didiamkan selama 3-5 menit
5. Mounting
- a. Mengencerkan entelan, canada balsam / DAKO® Faramount

### Lampiran 7. Foto Dokumentasi Penelitian



Infeksi *E. tenella*



Ekstrak terstandar meniran (*Phyllanthus niruri* L)  
pada merk dagang Stimuno Forte

