

**SKRIPSI**

**KUANTITAS *Escherichia coli* DALAM MANURE ILEUM  
*Rattus norvegicus* YANG DIINDUKSI BENZAPIREN  
DAN DITERAPI PEPTIDA SUSU KAMBING**



Oleh :

**NOVI LINAWATI SUNYOTO**

**NIM 060710203**

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2011**

**KUANTITAS *Escherichia coli* DALAM MANURE ILEUM *Rattus norvegicus*  
YANG DIINDUKSI BENZAPIREN DAN DITERAPI PEPTIDA SUSU  
KAMBING**

Skripsi  
Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan  
pada  
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

Oleh

**NOVI LINAWATI SUNYOTO**

---

NIM. 060710203

Menyetujui

Komisi pembimbing

(Dr. Bambang Poernomo S., M.S., drh)

---

(Pembimbing Utama)

(Sri Chusniati, M.Si., drh)

---

(Pembimbing Serta)

## PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi berjudul:

**Kuantitas *Escherichia coli* Dalam Manure Ileum *Rattus norvegicus* yang  
Diinduksi Benzapiren dan Diterapi Peptida Susu Kambing**

tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan 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, Maret 2011



Novi Linawati Sunyoto  
NIM. 060710203

Telah dinilai pada Seminar Hasil Penelitian

Tanggal : 25 Februari 2011

**KOMISI PENILAI SEMINAR HASIL PENELITIAN**

- Ketua : Herman Setyono, drh, M.P.  
Sekretaris : Prof. Hj. Romziah Sidik, drh, Ph.D.  
Anggota : Dr. Anwar Ma'ruf, drh, M.Kes.  
Pembimbing Utama : Dr. Bambang Poernomo, drh, M.S.  
Pembimbing Serta : Sri Chusniati, drh, M.Kes.

Telah diuji pada

Tanggal : 11 Maret 2011

**KOMISI PENGUJI SKRIPSI**

Ketua : Herman Setyono, drh, M.P.

Anggota : Prof. Hj. Romziah Sidik, drh, Ph.D.

Dr. Anwar Ma'ruf, drh, M.Kes.

Dr. Bambang Poernomo, drh, M.S.

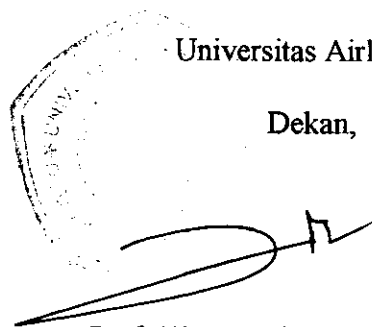
Sri Chusniati, drh, M.Kes.

Surabaya, Maret 2011

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan,



Prof. Hj. Romziah Sidik, drh, Ph.D.  
NIP. 195312161978062001

**QUANTITY OF *Escherichia coli* IN THE *Rattus norvegicus* MANURE'S ILEUM WHICH IT INDUCED BY BENZAPIRENE AND THERAPY THROUGH MILK PEPTIDE OF GOAT**

Novi Linawati Sunyoto

**ABSTRACT**

The aim of this research is to observed the effect of goat's milk peptide to reduce the quantity of *Escherichia coli* in the *Rattus norvegicus* manure's ileum which induced by Benzapirene. The research was used eleven male *Rattus norvegicus* which divided into four groups. N as a negative control group, was the group without both of an induced Benzapirene and goat's milk peptide's therapy. K1 and K2 as a positive control group, were the group that given an induced of Benzapirene without therapy of goat's milk peptide. P1 as a first treatment group, was the group that given an induced of Benzapirene and got a therapy of goat's milk peptide which had 6,055% protein's content. P2 as a second treatment group too, but only had 5,21% protein's content. Autopsy was used to got manure's ileum *Rattus norvegicus*, then all of the samples has been used Viable Count Technique (VCT) by using Standard Dropping Pippetes. The observation has been doing by calculated the colony number's. The data was processed by descriptive analysis to compared a percentage of *Escherichia coli*'s reduced in *Rattus norvegicus* manure's ileum. The research showed that the quantity of *Escherichia coli* increased after induced of Benzapirene and had a decrease effect after therapy through milk peptide of goat.

**Key word:** *Escherichia coli*, *Rattus norvegicus*, Benzapirene, peptide, manure.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas segala karunia dan rahmat-Nya, sehingga penulis dapat melaksanakan dan menyelesaikan penelitian dengan judul : **Kuantitas *Escherichia coli* Dalam Manure Ileum *Rattus norvegicus* yang Diinduksi Benzapiren dan Diterapi Peptida Susu Kambing.**

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Ibu Prof.Hj. Romziah Sidik,drh.,Ph.D. yang juga bertindak sebagai dosen pemilik dan pemberi dana dalam penelitian.

Bapak Dr.Bambang Poernomo,drh.,M.S. selaku pembimbing pertama dan Ibu Sri Chusniati,drh.,M.Kes. selaku pembimbing kedua, atas saran dan bimbingannya selama masa penelitian dan proses penulisan skripsi.

Bapak Herman Setyono,drh.,M.P. selaku ketua penguji, Ibu Prof.Hj.Romziah Sidik,drh.,Ph.D. selaku sekretaris penguji, dan Bapak Dr.Anwar Ma'ruf,drh.,M.Kes. selaku anggota penguji yang bersedia meluangkan waktu untuk menguji dan menilai, serta memberikan saran dan kritik pada penulisan skripsi ini.

Ibu Retno Sri Wahyuni,M.S.,drh. selaku dosen wali yang telah membimbing dengan penuh perhatian dan memberikan masukan-masukan yang berharga.

Seluruh staf pengajar dan laboratorium Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas wawasan keilmuan selama melakukan penelitian di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Mbak Santi serta mahasiswa dan staf Laboratorium Fakultas MIPA (Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam) Universitas Brawijaya Malang yang telah membantu dalam proses autopsi dan pengambilan sampel.

Ayah, ibu, dan kakakku yang tercinta yang telah memberikan segalanya, bantuan doa, dorongan, dan semangat. Kepada teman dan sahabat-sahabat yang telah memberikan dukungan dan semangat serta pihak-pihak lain yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu.

Akhir kata, penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini masih terdapat banyak kekurangan. Oleh karena itu, saran dan kritik sangat penulis harapkan demi kesempurnaan proses penulisan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi penulis dan pembaca sekalian.

Surabaya, Januari 2011

Penulis



## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL .....	i
LEMBAR PENGESAHAN .....	ii
HALAMAN PERNYATAAN .....	iii
HALAMAN IDENTITAS .....	iv
ABSTRAK .....	vi
UCAPAN TERIMA KASIH .....	vii
DAFTAR ISI .....	ix
DAFTAR TABEL .....	xi
DAFTAR GAMBAR .....	xii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xiii
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG .....	xiv
BAB 1     PENDAHULUAN .....	1
1.1.   Latar Belakang Penelitian .....	1
1.2.   Rumusan Masalah .....	4
1.3.   Landasan Teori .....	4
1.4.   Tujuan Penelitian .....	7
1.5.   Manfaat Penelitian .....	7
BAB 2     TINJAUAN PUSTAKA .....	8
2.1.   Struktur dan Fungsi Intestinal .....	8
2.2. <i>Escherichia coli</i> .....	9
2.2.1. Pertumbuhan <i>Escherichia coli</i> .....	11
2.2.2. Patogenesis <i>Escherichia coli</i> .....	11
2.3.   Benzapiren dan Toksisitas .....	13
2.4.   Peptida dan Protein .....	14
2.4.1. Manfaat Laktoferin dalam Peptida sebagai Anti-bakteri .....	16
2.5.   Susu Kambing .....	17
BAB 3     MATERI DAN METODE .....	19
3.1.   Tempat dan Waktu Penelitian .....	19
3.2.   Materi Penelitian .....	19
3.2.1 Hewan Penelitian .....	19
3.2.2 Bahan Penelitian .....	20
3.2.3 Alat Penelitian .....	20
3.3.   Metode Penelitian .....	21
3.3.1 Pembuatan Suspensi .....	21
3.3.2 Pemupukan pada Media <i>Eosin Methylene Blue Agar</i> .....	22
3.3.3 Penentuan Jumlah <i>Escherichia coli</i> .....	22

3.4.	Rancangan Penelitian .....	23
3.5.	Variabel Penelitian .....	23
3.6.	Analisis Data .....	24
3.7.	Alur Penelitian .....	25
BAB 4	HASIL PENELITIAN .....	26
BAB 5	PEMBAHASAN .....	28
BAB 6	KESIMPULAN DAN SARAN .....	33
6.1.	Kesimpulan .....	33
6.2.	Saran .....	33
	RINGKASAN .....	34
	DAFTAR PUSTAKA .....	36
	LAMPIRAN .....	41

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1. Komposisi Kimia Susu Kambing per 100 gram .....	18
4.1. Hasil pemeriksaan jumlah bakteri <i>Escherichia coli</i> dalam <i>manure</i> ileum <i>Rattus norvegicus</i> .....	26

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. <i>Escherichia coli</i> .....	10
3.1. Alur Penelitian .....	25

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Pengenceran dan Penanaman Sampel pada <i>Eosin Methylene Blue Agar</i> .....	41
2. Cara Penghitungan Presentase Penurunan <i>Escherichia coli</i> .....	42
3. Prinsip Metode Elektroforesis .....	43
4. Foto Dokumentasi Penelitian.....	44

## SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

1. CFU : *Colony Forming Unit*
2. BB : Berat Badan
3. BZP : Benzapiren
4. BM : Berat molekul
5. PAH : *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon*
6.  $\Sigma$  : *Summation* (jumlah)
7.  $\mu$  : satuan mikro
8. mg : miligram

# **BAB 1**

## **PENDAHULUAN**

## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang Penelitian

Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian besar yang berjudul “Pakan Komplit sebagai Prekursor Peptida Susu Kambing yang Berkhasiat sebagai Anti Bakteri dan Anti Kanker”. Adapun latar belakang yang muncul adalah tubuh manusia dan hewan memiliki sejumlah besar mikroorganisme, di antaranya disebut sebagai flora normal. Beberapa diantaranya menetap pada kulit, namun ada pula yang tinggal di bagian dalam tubuh. Konsentrasi tertinggi dari flora normal ditemukan dalam saluran gastrointestinal yang meliputi esofagus, lambung, usus halus, dan usus besar (kolon). Bakteri flora normal dapat menjadi patogen yang mengakibatkan infeksi apabila terjadi luka pada suatu jaringan atau apabila daya tahan tubuh menurun (Pelczar *et al.*, 1993).

Pada awal kelahiran, saluran pencernaan steril dari bakteri, namun organisme akan segera masuk bersama dengan makanan. Dalam hitungan jam, akan terkumpul ribuan bakteri termasuk *Lactobacillus sp*, *Escherichia coli (E.coli)* dan bakteri anaerob seperti *Clostridium sp*, *Peptostreptococcus sp*, dan *Fusobacterium necrophorum*. Perubahan dari bakteri flora normal akan memberikan akses mikroorganisme patogen menuju reseptor sel epitel yang menyebabkan terjadinya infeksi (Quinn *et al.*, 2002).

Zat kimia yang terdapat di sekitar lingkungan, seringkali menjadi komponen yang berbahaya bagi tubuh, salah satunya adalah Benzapiren. Zat ini mudah



ditemukan pada asap knalpot mobil, asap rokok, dan di semua asap akibat pembakaran bahan organik. Benzapiren merupakan lima rantai hidrokarbon aromatik polisiklik yang bersifat mutagenik dan sangat karsinogenik. Komponen ini berbentuk kristal solid berwarna kuning. Benzapiren merupakan produk pembakaran tak sempurna pada temperatur tinggi antara  $300^{\circ}\text{C}$ - $600^{\circ}\text{C}$ , sehingga dapat berpotensi menyebabkan kanker (Patnaik 1999). Pada beberapa produk daging yang telah dimasak, juga dapat meningkatkan resiko kanker kolon. Telah dibuktikan bahwa terdapat Benzapiren sebanyak 4-5,5 ng/g ayam goreng dan 62,6 ng/g daging sapi panggang (Wikipedia, 2010). Beberapa jenis kanker akan disertai dengan penurunan respon imun spesifik yang dapat mengakibatkan pasien menjadi rentan terhadap infeksi virus, bakteri, jamur, dan protozoa. Melihat keadaan seperti ini, perlu dilakukan pengobatan yang bertujuan untuk meningkatkan atau sekurang-kurangnya mempertahankan kondisi kesehatan pasien tanpa efek samping yang berarti (Sudoyo *et al.*, 2006).

Susu adalah sumber gizi yang sempurna karena mengandung nutrisi seimbang dan juga menunjukkan aktivitas biologis yang dapat mempengaruhi pencernaan, respon metabolik untuk menyerap nutrisi, pertumbuhan dan perkembangan organ-organ spesifik, dan daya tahan terhadap penyakit. Aktivitas biologis ini berhubungan dengan peptida dan protein dalam susu, namun beberapa aktivitas biologis dari protein susu ini tersembunyi dan dapat dimunculkan hanya dengan proses proteolisis (Haque *and* Rattan, 2006).

Peptida adalah asam amino yang terangkai satu sama lain dalam suatu rantai, yang disebut "ikatan peptida". Jenis peptida yang dimaksud biasanya memiliki berat molekul (BM) yang rendah, hanya terdiri atas tiga sampai 10 asam amino saja, dan biasanya bersifat hidrofobik (tidak larut dalam air). Senyawa-senyawa peptida itu bekerja sangat aktif dan berefek positif bagi kesehatan saluran pencernaan manusia, meningkatkan proses metabolisme tubuh dan fungsi alat tubuh, meningkatkan sistem daya kekebalan tubuh, serta berperan sebagai senyawa bioaktif dalam makanan (Winarno, 2001). Bioaktif peptida dapat diproduksi selama proses pencernaan di dalam saluran gastrointestinal, proses fermentasi, dan pembuatan pakan. Senyawa ini memberikan efek positif pada tubuh yang dapat mempengaruhi kesehatan, di antaranya sebagai antimikroba, immunomodulator, antioksidan, antithrombosis, dan antihipertensi. Aktivitas anti mikrobial dalam susu yang utama karena adanya immunoglobulin dan kandungan protein seperti laktoferin, laktoperoxidase, dan lisozim (Meisel *and* Fitz , 2003).

Penelitian ini untuk mengetahui hubungan antara penurunan daya tahan tubuh (imunitas) yang disebabkan oleh induksi Benzapiren dengan jumlah bakteri *Escherichia coli* di dalam tubuh yang dapat diamati pada saluran pencernaan. Semua jenis bakteri flora normal, seperti *Escherichia coli* dapat berpotensi menjadi patogen (opportunistik) dan dapat menyebabkan infeksi jika ketahanan tubuh menurun. Hal ini menjelaskan bahwa bakteri flora normal dapat mengalami pertumbuhan berlebih yang disebabkan obat-obatan/senyawa tertentu menekan sistem imun dalam tubuh (Quinn *et al.*, 2002).

Peptida yang digunakan berasal dari susu kambing, karena mengandung bioaktif peptida yang mirip dengan bioaktif peptida air susu ibu (ASI). Kasein dan *whey* protein merupakan sumber protein utama dalam susu dan mengandung bioaktif peptida susu (Brink, 2000). Oleh karena itu, peneliti ingin menghitung kuantitas bakteri *Escherichia coli* dalam *manure* ileum *Rattus norvegicus* yang diinduksi Benzapiren dan setelah diterapi peptida.

## 1.2. Rumusan Masalah

Apakah terdapat penurunan kuantitas bakteri *Escherichia coli* dalam *manure* ileum *Rattus norvegicus* yang diinduksi Benzapiren dan diterapi peptida?

## 1.3. Landasan Teori

Bakteri *Escherichia coli* adalah bakteri gram-negatif yang berbentuk batang. Bakteri ini merupakan flora normal usus pada hewan dan manusia. Sebagai flora normal, *Escherichia coli* membantu menghalangi penempatan organisme patogen yang menyebabkan penyakit. Selain itu, *Escherichia coli* juga menghasilkan vitamin K dan B kompleks yang diperlukan tubuh (Forum Paramedik, 2008). Pada umumnya, *Escherichia coli* berada di saluran pencernaan sebagai mikroorganisme yang menguntungkan, namun ada pula galur *Escherichia coli* yang diketahui dapat memproduksi toksin (Organic Trade Association, 2006).

Beberapa galur *Escherichia coli* memiliki virulensi yang rendah, namun bakteri ini dapat menjadi patogen dan meimbulkan infeksi. Galur *Escherichia coli*

yang patogenik memiliki faktor virulen yang membuat bakteri ini berkoloni di permukaan mukosa dan setelah itu akan menimbulkan penyakit. Beberapa faktor yang mempengaruhi terbentuknya kolonisasi dan membuat hewan menjadi rentan terhadap berkembangnya penyakit klinis adalah umur, status kekebalan tubuh, makanan, dan paparan yang berat dari galur patogenik (Quinn *et al.*, 2002).

Usus halus merupakan bagian dari sistem pencernaan yang berfungsi mencerna dan menyerap zat-zat makanan seperti asam amino, lipid dan monosakarida (Banks, 1993). Fungsi utama usus halus adalah absorpsi mikronutrien mineral dan vitamin. Pada daerah duodenum yang pH nya cukup asam, hampir tidak memiliki bakteri flora normal. Bakteri mulai muncul pada daerah jejunum dan ileum. Karena itu, ileum memiliki jumlah bakteri yang cukup banyak dikarenakan posisinya yang jauh dari keasaman pH (Volk, 1992).

Kambing Ettawa merupakan jenis kambing perah yang tinggi produksi susunya dan nilai nutrisinya mirip air susu ibu (ASI). Di dalam susu kambing terdapat komponen protein dalam bentuk kasein, karbohidrat dalam bentuk laktosa, juga terdapat lemak susu serta vitamin dan mineral yang lengkap (Susu Segar Administrador, 2009). Dalam kasein terdapat bahan bioaktif dalam bentuk  $\alpha$ -kasein,  $\beta$ -kasein,  $\kappa$ -kasein. Selain itu dalam  $\beta$ -kasein terdapat bioaktif opioid peptida dan casomorphin, laktoferin yang berfungsi sebagai analgesik, antimikroba, dan antikanker (Haque, 2006). Susu Kambing ditengarai memiliki antiseptik alami dan diduga dapat membantu menekan pertumbuhan bakteri dalam tubuh karena mengandung fluorine 10 – 100 kali lebih besar dari susu sapi. Susu kambing juga

memiliki protein dan efek laksatifnya rendah, sehingga tidak menyebabkan diare bagi yang mengkonsumsinya (Moeljanto *et al.*, 2002).

Sebagai bagian dari *whey*, laktoferin muncul untuk memberi manfaat yang besar dalam sistem biologi dan pertimbangan sebagai garis depan pertahanan imunitas tubuh manusia. Laktoferin sebagai bagian penting dalam menunjang kesehatan dan fungsi dari saluran cerna, dan telah ditemukan bahwa laktoferin mampu mengurangi inflamasi sistemik dan intestinal dalam kondisi tertentu. Pertumbuhan bakteri jahat yang berlebihan di saluran pencernaan diketahui dapat menyebabkan beberapa masalah besar yang mengakibatkan banyak mediator *pro-inflammatory* dilepaskan, sehingga tubuh mengalami gangguan (Brink, 2000).

Peptida adalah suatu amida yang dibentuk dari dua asam amino atau lebih. Ikatan amida antara suatu gugus  $\alpha$ -amino dari satu asam amino dan gugus karboksil dari asam amino lain disebut ikatan peptida. Bergantung pada banyaknya satuan asam amino dalam molekul itu, maka bila peptida memiliki dua asam amino disebut sebagai dipeptida, tripeptida jika berisi tiga asam amino, dan seterusnya. Suatu polipeptida ialah suatu peptida dengan banyak sekali ( $> 10$ ) asam amino. Perbedaan peptida dengan protein sebenarnya tidak ada. Suatu poliamida dengan asam amino yang kurang dari 40 dikelompokkan sebagai suatu peptida, sedangkan poliamida yang lebih besar dianggap sebagai protein (Hart *et al.*, 2003). Bioaktif peptida yang ada dalam susu masih berada dalam bentuk inaktif dan dapat diaktifkan melalui proses proteolisis melalui inokulasi *enzymatic*, pengolahan makanan, dan proses

proteolisis melalui inokulasi dengan *starter* yang berasal dari mikroorganisme / tanaman (Sidik *et al.*, 2009).

Pemberian Benzapiren bertujuan untuk memicu terjadinya pertumbuhan jaringan abnormal, yaitu melalui mutasi gen pada sel normal secara terus menerus yang dapat mengubah sel menjadi sel kanker. Mutasi ini dapat disebabkan oleh zat kimia yang bersifat karsinogenik seperti Benzapiren. Benzapiren merupakan senyawa hidrokarbon polisiklik aromatik yang bersifat karsinogenik (Bruice, 1995).

#### **1.4. Tujuan Penelitian**

Mengetahui kemampuan peptida dalam mengurangi jumlah bakteri *Escherichia coli* pada *manure* ileum *Rattus norvegicus* yang diinduksi Benzapiren.

#### **1.5. Manfaat Penelitian**

Dapat memberikan pengetahuan bagi masyarakat dan dunia kesehatan, mengenai manfaat dari peptida susu kambing yang berfungsi sebagai anti bakteri.

## **BAB 2**

# **TINJAUAN PUSTAKA**

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Struktur dan Fungsi Intestinal

Saluran intestinal merupakan bagian dari sistem pencernaan yang memiliki respon yang besar untuk mencerna makanan dan mengabsorpsi nutrisi, air dan elektrolit. Meskipun ada perbedaan yang cukup spesifik pada panjang dan posisi organ ini secara anatomi, namun secara umum struktur dan fungsi pada semua hewan adalah sama. Ada dua bagian utama pada sistem ini, yaitu usus halus dan usus besar. Usus halus berfungsi mencerna dan menyerap zat-zat makanan seperti asam amino, lipid dan monosakarida, sedangkan usus besar berfungsi untuk menyerap air dan garam serta menyerap asam lemak rantai pendek yang dihasilkan oleh bakteri (Klurfeld, 1999). Karena makanan yang berada pada usus halus cenderung menahan keasaman dari sekresi asam lambung, maka populasi bakteri biasanya terbentuk di bagian terminal usus kecil dan usus besar, tempat bakteri bertahan di sepanjang kehidupan inangnya. Selain itu, hewan biasanya rentan terinfeksi oleh mikroorganisme patogen selama periode awal kelahiran (Quinn *et al.*, 2002).

Usus halus terdiri dari tiga bagian, yaitu duodenum dan ileum, dengan jejunum yang berada di antaranya. Duodenum yang berdekatan dengan lambung, pH nya cukup asam dan tidak memiliki banyak flora mikroba. Dari duodenum menuju ileum, perlahan-lahan pH berkurang keasamannya dan jumlah bakteri meningkat. Pada bagian bawah ileum, bakteri ditemukan pada bagian lumen usus, tercampur



dengan bahan-bahan makanan. Umumnya jumlah bakteri sekitar  $10^5$ - $10^7$  per gram feses (Madigan *et al.*, 2003).

Jumlah dan keanekaragaman flora normal pada setiap jaringan dan organ tubuh berbeda-beda tergantung pada kemampuan jenis mikroorganisme untuk tumbuh dan melakukan kolonisasi pada organ tersebut. Apabila keadaan flora normal dalam tubuh meningkat jumlahnya dan menyebabkan infeksi pada tubuh disebut sebagai patogen oportunistik. Jumlah populasi mikroorganisme dalam suatu komunitas supaya dapat mencapai jumlah yang optimal, maka mikroorganisme berinteraksi dan mempengaruhi organisme lain. Mikroorganisme harus berkompetisi dengan organisme lain dalam memperoleh nutrisi dari lingkungannya, sehingga dapat terus hidup dan berkembangbiak (Todar, 2004).

## 2.2. *Escherichia coli*

Theodor Escherich pertama kali memperkenalkan *Escherichia coli* pada tahun 1885 sebagai *Bacterium coli*, yang diisolasi dari feses bayi yang menderita diare. *Escherichia coli* termasuk famili *Enterobacteriaceae* dan merupakan bakteri gram negatif yang bersifat aerob atau fakultatif anaerob, berbentuk batang pendek tidak berspora, ada yang berkapsul dan ada yang tidak. Beberapa genus dari famili *Enterobacteriaceae* bersifat patogen pada saluran pencernaan manusia, seperti *Salmonella*, *Shigella*, dan *Yersinia*. Di luar dari bakteri-bakteri tersebut, merupakan flora normal pada saluran pencernaan, seperti *Escherichia*, *Enterobacter*, dan

*Klebsiella*. *Escherichia coli* adalah organisme normal yang ada dalam saluran pencernaan manusia dan hewan (Todar, 2004).

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) merupakan salah satu hewan yang digunakan sebagai hewan model untuk percobaan laboratorium. Tikus putih dipakai karena tikus putih seperti juga manusia, adalah omnivora, dan telah terbukti bahwa kebutuhan asam amino esensialnya menyamai kebutuhan manusia, khususnya anak-anak (Ballenger, 2001). Umumnya jumlah *Escherichia coli* pada usus halus tikus berkisar antara  $10^3$ - $10^4$  CFU/g (Jones *et al.*, 2007).



Gambar 2.1. *Escherichia coli* (Perbesaran 500 kali)  
(Sumber: Pelczar *et al.*, 1993)

Spesies dari genus *Escherichia* ini dapat dibedakan berdasarkan ciri-cirinya, yaitu kelompok yang mampu menggunakan asam sitrat dan garam dari asam sitrat sebagai sumber karbon dan yang tidak. *Escherichia coli* memiliki beberapa macam antigen yaitu O(antigen somatik), K(antigen kapsul), dan H(antigen flagella). Tidak semua strain *Escherichia coli* bersifat patogen (Jawetz *et al.*,1996).

Klasifikasi *Escherichia coli* adalah sebagai berikut: *Kingdom: Bacteria* ;  
*Phylum: Proteobacteria* ; *Class: Gamma Proteobacteria* ; *Order: Enterobacteriales* ;  
*Family: Enterobacteriaceae* ; *Genus: Escherichia* ; *Species: Escherichia coli*.

### 2.2.1. Pertumbuhan *Escherichia coli*

*Escherichia coli* akan mati dengan pemanasan 60°C selama 30 menit, tetapi ada juga beberapa strain yang tahan panas dan mampu hidup pada suhu dingin atau dalam keadaan beku sampai enam bulan (Holt *et al.*, 2000).

Media yang sering digunakan untuk menumbuhkan *Escherichia coli* adalah *Eosin Methylene Blue Agar*. Pada *Eosin Methylene Blue Agar*, *Escherichia coli* akan tumbuh dengan membentuk koloni berwarna hijau metalik yang berdiameter dua sampai empat milimikron dan pusat koloni kehitam-hitaman (Fardiaz, 1990).

### 2.2.2. Patogenesis *Escherichia coli*

*Escherichia coli* dikenal sebagai bakteri *Escherichia coli*, *Bacillus coli*, dan *Colon bacillus*. *Escherichia coli* termasuk famili *Enterobacteriaceae* yang bersifat gram negatif, berbentuk batang pendek yang pleomorfik, panjang dua sampai empat milimikron, cocobacillus dan filamentus, tidak berspora, motil dengan adanya flagella peritrich tetapi ada juga yang bersifat non motil, sebagian besar berkapsul (Boyd, 1995). Bakteri ini merupakan flora normal dalam saluran pencernaan manusia dan

hewan, tetapi ada beberapa galur *Escherichia coli* yang bersifat patogen pada induk semang terutama pada hewan muda (Jawetz *et al.*, 2001).

Galur *Escherichia coli* yang bersifat patogen adalah *Escherichia coli* enteropatogenik yang berbeda dari *Escherichia coli* yang secara normal terdapat dalam usus besar. *Escherichia coli* enteropatogenik mempunyai antigen spesifik tertentu yang menyebabkan gastroenteritis akut atau enteritis seperti disentri pada manusia. Tergolong *Escherichia coli* enteropatogenik adalah *Escherichia coli* enterotoksigenik. *Escherichia coli* enterotoksigenik memproduksi enterotoksin yang sifatnya menyerupai toksin kolera. Enterotoksin yang diproduksi oleh *Escherichia coli* enterotoksigenik dibedakan atas dua macam yaitu:

1. Enterotoksin yang tahan panas (*Stable toxin*) yang mudah aktif setelah pemanasan pada suhu 100 °C selama 30 menit.
2. Enterotoksin yang tidak tahan panas (*labile toxin*).

Bakteri *Escherichia coli* enterotoksigenik dapat memproduksi salah satu atau kedua macam toksin tadi. *Escherichia coli* merupakan penyebab *food borne disease* yang cukup penting setelah *shigella*, *salmonella*, dan *Vibrio cholerae*. Bakteri patogen yang sering menyebabkan infeksi internal seperti diare di antaranya adalah *Escherichia coli* (Fardiaz, 1990).

### 2.3. Benzapiren dan Toksisitas

Benzapiren adalah lima rantai hidrokarbon aromatik polisiklik (PAH) yang merupakan komponen bahan kimia organik yang sering dijumpai di sekitar lingkungan. Benzapiren umumnya digunakan sebagai indikator adanya kontaminasi PAH dan semua hal yang mengacu pada senyawa ini. Sifat dari senyawa ini cukup toksik apabila terhirup, tertelan atau terkena kulit karena akan menyebabkan penurunan fungsi paru-paru, iritasi, infeksi, karsinogen, dan bersifat mutagen. Benzapiren biasanya ditemukan di dalam asap rokok, dapat menyebabkan bahaya secara genetik pada paru-paru normal (Bull, 2008).

Sifat karsinogenik Benzapiren disebabkan oleh sifat hidrofobik (tidak suka air), tidak memiliki gugus fungsi yang dapat mengubah senyawa menjadi polar. Hal ini dapat mengakibatkan senyawa Benzapiren sulit diekskresi dari dalam tubuh dan terakumulasi pada jaringan hati, ginjal, atau lemak tubuh. Dengan struktur molekul yang menyerupai basa nukleat, seperti adenosin, timin, guanin, dan sitosin, molekul Benzapiren dapat dengan mudah masuk pada untaian DNA. Sehingga fungsi DNA terganggu dan kerusakan ini tidak dapat diperbaiki dalam sel, dan dapat menimbulkan sel abnormal atau kanker (Jamil, 2009).

Sejumlah besar penelitian selama tiga dekade yang lalu telah mendokumentasikan adanya keterkaitan antara Benzapiren dan kanker. Sebenarnya ini merupakan hal yang sulit untuk menghubungkan kanker dengan Benzapiren secara spesifik, terutama pada manusia dan cukup sulit untuk mengukur resiko secara

kuantitas dengan berbagai macam metode (inhalasi atau ingesti). Seorang peneliti dari Kansas State University menemukan ada hubungan antara vitamin A dengan penyakit emfisema pada perokok. Benzapiren diketahui dapat menjadi penyebab defisiensi vitamin A pada tikus (ScienceBlog, 2004).

Tahun 1996, sebuah penelitian mempublikasikan bahwa adanya bukti molekuler yang secara pasti menghubungkan antara komponen tembakau pada rokok dengan kanker paru (Denissenko *et al.*, 1996). Benzapiren yang ditemukan pada rokok tembakau, diperkirakan sebagai penyebab kerusakan genetik pada sel paru-paru yang identik dengan kerusakan DNA pada penderita tumor paru ganas.

#### **2.4. Peptida dan Protein**

Peptida dan protein adalah asam amino yang terangkai satu sama lain dalam suatu rantai yang disebut sebagai ikatan amida (atau peptida). Peptida terjadi dari gabungan asam-asam amino, didahului oleh pengeluaran  $H_2O$  yang berasal dari OH-asam dan H-gugus amino sehingga terbentuk ikatan peptida. Peptida biasanya memiliki berat molekul (BM) yang rendah, hanya terdiri atas tiga sampai 10 asam amino saja, dan biasanya bersifat hidrofobik (tidak larut dalam air). Senyawa peptida tersebut memainkan peran penting dalam proses biologis. Contohnya, peptida hormon insulin untuk mengatur kadar gula darah, bradikinin mengatur tekanan darah, dan oksitosin meregulasi kontraksi uterus dan laktasi (Clayden *et al.*, 2001).

Protein merupakan suatu zat makanan yang sangat penting bagi tubuh karena zat ini berfungsi sebagai sumber energi dalam tubuh serta sebagai zat pembangun dan pengatur. Protein adalah polimer dari asam amino yang dihubungkan dengan ikatan peptida. Molekul protein mengandung unsur-unsur C, H, O, N, P, S, dan terkadang mengandung unsur logam seperti besi dan tembaga (Winarno, 1992). Protein merupakan suatu polipeptida dengan BM yang sangat bervariasi dari 5000 sampai lebih dari satu juta karena molekul protein yang besar, protein sangat mudah mengalami perubahan fisis dan aktivitas biologisnya (Sudarmadji, 1996).

Bioaktif peptida berefek positif untuk meningkatkan kesehatan saluran pencernaan manusia. Bioaktif peptida yang ada dalam susu berbentuk *Fibronectin*, *Gamma interferon*, *Lactoferrin*, dan *Lysozyme* sebagai antibakterial, memperbaiki sel yang rusak serta meningkatkan proses apoptosis (Sidik *et al.*, 2009). Senyawa-senyawa bioaktif itu biasanya terbentuk karena jasa baik dan oleh karya enzim pencernaan. Namun, beberapa enzim yang diproduksi oleh bakteri asam laktat dapat pula membentuk peptida bioaktif, dengan cara memecahkan protein yang terdapat dalam saluran pencernaan (Winarno, 2001).

Peptida dan protein tidak mempunyai perbedaan yang nyata, hanya dibedakan oleh panjang pendeknya rantai peptida. Akan tetapi, fungsi peptida dan protein sedikit berbeda: pertama, aktivitas biologis peptida tinggi, hanya  $1 \times 10^{-7}$  mol/L dapat menimbulkan aktivitas, jadi boleh dikatakan apabila satu ml peptida diurai dengan air akan tetap mempunyai aktivitas. Kedua, molekul peptida kecil, strukturnya mudah

berubah, dibandingkan dengan protein lebih mudah diproses secara kimiawi oleh manusia (Santoso, 2007).

#### 2.4.1. Manfaat Laktoferin dalam Peptida sebagai Anti-bakteri

Sebuah penelitian membuktikan bahwa laktoferin sebagai “*natural antibiotic*” dan menemukan bahwa dengan cara *in-vivo* maupun *in-vitro* dapat menghambat racun dari bakteri *Helicobacter pylori* (Dial *et al.*, 1998).

Penelitian lainnya menggunakan metode *in-vivo* dan *in-vitro* dengan menambahkan laktoferin pada air minum tikus dan membuat tikus ini terkena *Staphylococcus*. Penelitian itu menemukan bahwa tikus yang mendapat laktoferin sebanyak dua persen dapat mengurangi infeksi ginjal hingga 40%-60% dan mengurangi sejumlah bakteri, sehingga disimpulkan bahwa kemampuan dari penggunaan laktoferin sebagai protein alami yang bersifat anti-bakteri untuk mencegah infeksi bakteri (Bhimani *et al.*, 1999).

Beberapa penelitian juga menemukan bahwa laktoferin dapat menghambat bakteri gram positif dan negatif dalam skala besar, kapang dan parasit intestinal. Cholera, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus epidermis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* dan lain-lain telah terbukti dapat dihambat oleh kehadiran laktoferin (Kuwata *et al.*, 1998).



## 2.5. Susu Kambing

Susu kambing murni memiliki cita rasa yang enak, sedikit manis, dan berlemak. Bentuk lemak dan protein susu kambing lebih halus dan homogen daripada susu sapi sehingga susu kambing lebih mudah dicerna dalam tubuh. Protein pada susu kambing memiliki efek laksatif yang lembut. Susu kambing memiliki kandungan gizi lebih unggul dibandingkan susu sapi (Sarwono, 2006).

Beberapa kandungan nutrisi dalam susu kambing memiliki jumlah yang lebih tinggi dari susu sapi. Susu kambing mengandung protein 3,8%, lemak 3,6%, dan laktosa 4,8% dibandingkan susu sapi yang hanya mengandung protein 3,3%, lemak 3,8%, dan laktosa 4,7% dalam takaran per 100 gram susu. Kekurangan dari susu kambing meliputi kandungan asam lemak rantai pendek dan asam lemak rantai sedang dengan jumlah lebih besar dari susu sapi, memberikan rasa dan aroma khas kambing yang kurang disukai masyarakat (Anang *et al.*, 2006).

Kandungan nutrisi susu masing-masing individu kambing tidak sama dan selalu berubah tergantung berbagai faktor, seperti bangsa ternak, waktu pemerahan, musim, pakan, umur, dan kesehatan ternaknya. Susu kambing mempunyai sifat antiseptik alami dan bisa membantu menekan pembiakan bakteri dalam tubuh. Hal ini di sebabkan adanya Flourin yang kadarnya 10-100 kali lebih besar dari pada susu sapi dan bersifat basa (*alkaline food*) sehingga aman bagi tubuh. Selain itu, susu kambing bersifat homogen alami. Hal ini mempermudah proses pencernaan sehingga menekan timbulnya reaksi-reaksi alergi (Moeljanto *et al.*, 2002).

Tabel 2.1. Komposisi Kimia Susu Kambing per 100 gram

Komposisi Kimia	Susu Kambing
Air (g)	83-87,5
Protein (g)	3,3-4,9
Lemak (g)	4-7,3
Karbohidrat (g)	4,6
Kalori (kal)	67
Fosfor (mg)	106
Kalsium (mg)	129
Besi (mg)	1,05
Vitamin A (IU)	185
Niacin (mg)	0,3
Vitamin B1 (mg)	0,04
Vitamin B2 (mg)	0,04
Vitamin B12 (mg)	0,07

Sumber: Sodiq dan Abidin, 2008

## **BAB 3**

# **MATERI DAN METODE**

## BAB 3 MATERI DAN METODE

### 3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini telah dilakukan selama tiga bulan, mulai 10 November 2009 sampai dengan 18 Februari 2010. Penelitian ini dilakukan di dua tempat, pemberian peptida dan autopsi *Rattus norvegicus* dilaksanakan di Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang, sedangkan sampel *manure* ileum yang telah diambil, dilakukan penghitungan total bakteri *Escherichia coli* di laboratorium Bakteriologi dan Mikologi Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga Surabaya, pada tanggal 16 Februari 2010.

### 3.2. Materi Penelitian

#### 3.2.1. Hewan Penelitian

Hewan coba yang digunakan adalah 11 ekor *Rattus norvegicus* jantan (galur *Wistar*) berumur 10-12 minggu dengan berat badan sekitar 200 gram, satu ekor digunakan sebagai kontrol negatif, yaitu tikus yang tidak diinjeksi Benzapiren, 10 ekor diinjeksi intraperitoneal Benzapiren (BZP). Kemudian delapan ekor di antara tikus yang telah diinjeksi Benzapiren, diterapi dengan peptida dan dua ekor digunakan sebagai kontrol positif karena tidak diterapi.

### 3.2.2. Bahan Penelitian

Benzapiren sebanyak satu gram, dilarutkan terlebih dahulu dengan 100  $\mu$ l minyak jagung. Dosis yang diberikan yaitu 200 mg/kg BB (Berat Badan tikus). Injeksi dilakukan melalui intraperitoneal sebanyak empat kali dengan selang waktu satu hari.

Peptida yang digunakan ada dua macam yaitu peptida A dan B. Peptida ini dibedakan karena mengandung kadar protein susu kambing yang berbeda. Kadar protein susu kambing A sebesar 6,055% dan B sebesar 5,21%. Masing-masing peptida diberikan sebanyak 100  $\mu$ l dengan menggunakan sonde dan dilakukan satu kali sehari selama 7 hari berturut-turut.

Media yang digunakan adalah *Eosin Methylene Blue Agar* sebagai media selektif untuk konfirmasi bakteri Coliform dan *Escherichia coli*, sedangkan metode yang diterapkan adalah *Viable Count Technique*. Digunakan pula NaCl fisiologis 0,9% untuk membuat suspensi yang digunakan untuk melakukan pengenceran dari  $10^{-1}$  hingga  $10^{-8}$ .

### 3.2.3. Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari : scalpel, tabung reaksi, rak tabung, pipet 10 mililiter, sendok pengaduk, api bunsen dan ose, cawan petri, inkubator, *autoclave*, neraca, kapas, pinset, *Standard Dropping Pippetes*, *vortex mixer*. Beberapa alat dilakukan sterilisasi dengan *autoclave* sebelum digunakan untuk

penelitian seperti: scalpel, tabung reaksi, pipet 10 mililiter, *Standard Dropping Pippetes*, sendok pengaduk, ose, cawan petri, dan pinset.

### 3.3. Metode Penelitian

Peptida A dan peptida B didapatkan dengan proses elektroforesis protein susu kambing yang tertera dalam laporan penelitian Sidik, 2009. Autopsi *Rattus norvegicus* dilakukan di Universitas Brawijaya, Malang. Laparotomy dilakukan untuk membuka bagian perut dan mengeluarkan usus halus. Usus halus yang dikeluarkan, dipotong bagian ileumnya sepanjang 5 cm dengan menggunakan gunting bedah. Ileum tersebut dimasukkan dalam wadah pot obat steril dan dibawa ke Surabaya dengan media transport yaitu es batu dengan suhu 5<sup>0</sup>C untuk mempertahankan bakteri di dalam *manure* tetap hidup.

Setelah sampai di Surabaya, *manure* di dalamnya dikeluarkan dengan ose kemudian ditimbang sebanyak  $\pm 0,5$  gram. *Manure* ileum tersebut dibuat suspensi untuk melakukan penghitungan bakteri *Escherichia coli*. Metode penelitian yang diterapkan adalah berdasarkan *Viable Count Technique* dengan menggunakan *Standard Dropping Pippetes*.

#### 3.3.1. Pembuatan Suspensi

Sampel yang berupa *manure* dikeluarkan dari usus dengan menggunakan pinset steril dan ditimbang seberat 0,5 gram, kemudian ditambahkan NaCl Fisiologis

0,9% sebanyak 4,5 ml. Suspensi yang diperoleh dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril dan diaduk sampai homogen dengan *vortex mixer* sebagai pengenceran  $10^{-1}$ .

### 3.3.2. Pemupukan pada Media *Eosin Methylene Blue Agar*

Satu ml suspensi sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml NaCl fisiologis 0,9% untuk dibuat pengenceran  $10^{-2}$ , dan dari sini diambil 1 ml untuk pengenceran  $10^{-3}$ . Kemudian diambil 1 ml untuk pengenceran  $10^{-4}$ , seterusnya hingga pengenceran yang terakhir  $10^{-8}$ . Dari masing-masing pengenceran diambil 0,025 ml melalui pipet otomatis atau *Eppendorf* untuk ditanam pada cawan petri yang masing-masing berisi media *Eosin Methylene Blue Agar*. Sebelumnya cawan petri yang berisi media dibagi menjadi 3 bagian yang sama besar. Penetesan suspensi sampel dilakukan dari masing-masing tingkat pengenceran di setiap media. Setelah suspensi terserap sempurna dalam media  $\pm 30$  menit, media dibalik dan dimasukkan ke dalam inkubator dengan suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam. Pertumbuhan *Escherichia coli* ditandai dengan adanya koloni bakteri yang berwarna hijau metalik. Semua cawan petri dari tiap seri pengenceran yang menunjukkan adanya pertumbuhan koloni bakteri *Escherichia coli* dicatat dan dilakukan penghitungan.

### 3.3.3. Penentuan Jumlah *Escherichia coli*

Semua koloni yang tumbuh pada *Eosin Methylene Blue Agar* dihitung sebagai total bakteri *Escherichia coli* berdasarkan pertumbuhan dari tiap seri pengenceran.

Koloni yang dihitung berjumlah 5-20 koloni, terbentuk dari setiap tetesan pada permukaan media agar. Menurut Bakti (2010), penghitungan bakteri dengan *Standard Dropping Pippetes* menggunakan rumus:

$$\Sigma B = X \times Y \times Z$$

Keterangan:

$\Sigma B$  : Jumlah bakteri dalam 1 ml sampel

X : Jumlah koloni

Y : Konversi pipet *Eppendorf* (1/0,025)

Z : Tingkat pengenceran

### 3.4. Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 4 macam perlakuan yaitu N, K, P1, P2. Pada perlakuan N mendapat 1 ulangan, perlakuan K mendapat 2 ulangan, perlakuan P1 mendapat 4 ulangan, dan perlakuan P2 mendapat 4 ulangan. Jumlah ulangan pada RAL meliputi  $t(n-1) \geq 15$ , dengan t merupakan perlakuan, sedangkan n merupakan ulangan.

### 3.5. Variabel Penelitian

Pada penelitian ini terdapat 4 variabel, yaitu:

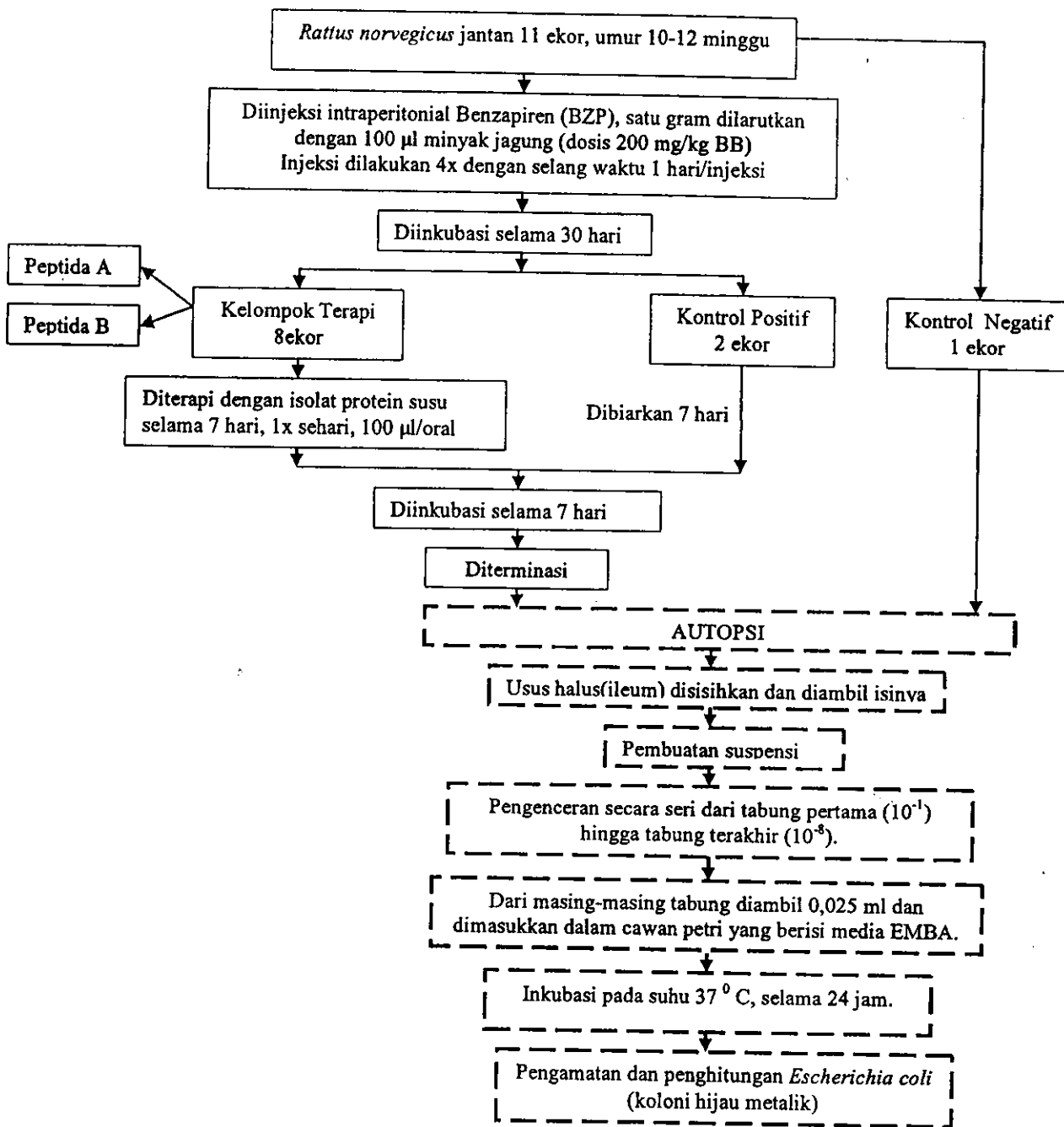


1. Variabel bebas: pemberian peptida dengan kadar yang berbeda. Peptida A dan B berasal dari protein susu kambing 6,055% dan 5,21%.
2. Variabel tergantung: jumlah bakteri *Escherichia coli* setelah mendapat pemberian Benzapiren maupun peptida.
3. Variabel kendali: tikus (*Rattus norvegicus*) yang digunakan sebagai hewan penelitian memiliki umur, berat, dan galur yang sama.
4. Variabel antara: induksi Benzapiren sebesar 200 mg/kg BB yang bertujuan untuk membuat tikus mengalami kanker paru buatan.

### 3.6. Analisis Data

Dalam penelitian ini, metode pengolahan data yang digunakan adalah analisis deskriptif, yaitu dengan melihat perbandingan dan persentase berkurangnya bakteri *Escherichia coli* dalam manure ileum *Rattus norvegicus* yang telah diberi beberapa macam perlakuan.

3.7. Alur Penelitian



Keterangan:  
 - - - - = Bag yang dilakukan  
 ——— = Bag yang tidak dilakukan (penelitian sebelumnya)

Gambar 3.1. Alur Penelitian

## **BAB 4**

# **HASIL PENELITIAN**

## BAB 4 HASIL PENELITIAN

Hasil penelitian penghitungan *Escherichia coli* dalam manure ileum *Rattus norvegicus* yang diinduksi Benzapiren dan diterapi peptida susu kambing adalah sebagai berikut:

Tabel 4.1 Hasil pemeriksaan jumlah bakteri *Escherichia coli* dalam manure ileum *Rattus norvegicus*

Perlakuan	Jumlah Bakteri <i>E.coli</i>	Rata-rata	Persentase Jumlah <i>E.coli</i> yang Tersisa di Ileum	Persentase Penurunan Jumlah <i>E.coli</i> di Ileum
N	$4,0 \times 10^3$	$4,0 \times 10^3$	0,1%	99,9%
K1	$1,4 \times 10^7$	$6,2 \times 10^7$	100%	0
K2	$1,1 \times 10^8$			
P1.1	$4,8 \times 10^5$	$1,0 \times 10^7$	16,1%	83,9%
P1.2	$5,6 \times 10^6$			
P1.3	$1,0 \times 10^7$			
P1.4	$2,4 \times 10^7$			
P2.1	$2,3 \times 10^6$	$9,4 \times 10^6$	15,2%	84,8%
P2.2	$1,0 \times 10^7$			
P2.3	$1,6 \times 10^7$			
P2.4	Mati pada hari ke lima	-	-	-

Ket:

N = tikus yang tidak diberi perlakuan (kontrol negatif).

K = tikus yang telah diinjeksi oleh Benzapiren (kontrol positif).

P = tikus yang telah diinjeksi Benzapiren kemudian diterapi peptida (P1 dan P2 adalah peptida yang berasal dari protein susu kambing sebesar 6,055% dan 5,21%)

Pada tabel 4.1 menunjukkan bahwa tikus yang telah diinduksi Benzapiren dan diterapi peptida (P) mengalami penurunan jumlah bakteri *Escherichia coli*

dibandingkan pada tikus yang tidak dilakukan terapi peptida (K). Pemberian peptida A (P1) menunjukkan penurunan 83,9%, sedangkan peptida B (P2) menunjukkan penurunan 84,8%.

## **BAB 5**

# **PEMBAHASAN**

## BAB 5 PEMBAHASAN

Pengambilan *manure* ileum dilakukan di Universitas Brawijaya Malang. Setelah dilakukan autopsi, kemudian sampel dibawa ke Surabaya dalam waktu kurang lebih empat jam dengan menggunakan media transport yaitu es batu yang diletakkan dalam termos es, agar bakteri yang terdapat dalam *manure* dapat bertahan hidup. *Manure* yang akan diteliti sebanyak 10 sampel dan ditimbang sebanyak masing-masing 0,5 gram. Perhitungan bakteri *Escherichia coli* berdasarkan metode *Viable Count Technique*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tikus yang telah diinduksi Benzapiren mengalami peningkatan jumlah bakteri *Escherichia coli* dibandingkan dengan tikus normal. Hal ini sesuai dengan pernyataan Bull (2008) yang menyatakan bahwa Benzapiren merupakan senyawa yang toksik apabila terhirup, tertelan atau terkena kulit, karena akan menyebabkan penurunan fungsi paru-paru, iritasi, infeksi, karsinogen, dan bersifat mutagen. Benzapiren inilah yang menyebabkan peningkatan bakteri *Escherichia coli*, yang merupakan flora normal dalam saluran intestinal. Injeksi Benzapiren yang diberikan melalui injeksi intraperitoneal dapat mempercepat penyebaran toksisitas zat ini di dalam tubuh, terutama di daerah pencernaan, sehingga imunitas tubuh akan menurun dan menyebabkan flora normal menjadi patogen. (Sudoyo *et al.*, 2006).

Perbedaan jumlah bakteri flora normal dikaitkan dengan variasi dan besarnya kapasitas metabolik, terutama hubungannya dengan biotransformasi, sintesis, dan pengaktifan karsinogen, seperti Benzapiren dan senyawa PAH yang lain. Aktivitas metabolik ini memiliki dampak besar untuk kesehatan tubuh *host*, yang dapat dilihat berdasarkan kebaikan dan keburukan yang ditimbulkan. Bukti-bukti dari berbagai sumber menunjukkan bahwa bakteri flora normal ikut berpengaruh dalam kemunculan kanker yang disebabkan senyawa karsinogen, yang ditandai dengan bakteri pada feses mengandung bakteri yang bersifat mutagen, karsinogen, dan genotoksik (Burns *et al.*, 2000). Kiyoshi (2003) berpendapat bahwa ada hubungan kuantitatif antara karsinogenicity dan mutagenicity dari senyawa PAH dengan 4 macam galur *Salmonella typhimurium* (TA 1535). Semua galur ini berubah jadi patogen saat diuji coba dengan *Ames test*. *Ames test* adalah uji untuk mendeteksi efek mutagen dan karsinogen suatu zat/senyawa. Tes ini juga dapat dilakukan dengan bakteri *Escherichia coli*. Jumlah koloni yang tumbuh merupakan aktivitas mutagenik dari senyawa yang digunakan. Jumlah *revertants* (bakteri yang termutasi) yang melebihi kontrol menandakan senyawa tersebut mutagen/karsinogen (Mortelmans and Zeiger, 2000).

Pada tikus yang telah diinduksi Benzapiren, kemudian diterapi peptida, terlihat adanya penurunan jumlah bakteri *Escherichia coli* sebesar 83%-84% dibandingkan jumlah bakteri pada tikus yang tidak diterapi. Haque (2006) menyatakan bahwa *Minimal Inhibitory Concentrations* (MICs) peptida berkisar



Tikus terakhir yaitu P2.4 mengalami kematian pada hari ke lima. Jika melihat dari dosis Benzapiren, semestinya tidak dapat menimbulkan kematian karena Patnaik (1999) menyatakan bahwa dosis lethal pada tikus yang diinjeksi Benzapiren melalui intraperitoneal adalah 500 mg/kg BB. Jadi, kemungkinan ini erat kaitannya dengan proses farmakokinetik yang meliputi beberapa tahapan mulai dari proses absorpsi atau penyerapan obat, distribusi atau penyaluran obat ke seluruh tubuh, metabolisme obat sampai ke dalam tahap ekskresi obat itu sendiri atau proses pengeluaran obat tersebut dari dalam tubuh (Farmakologi Terapi Obat Pharmacology, 2008). Saat Benzapiren diinjeksikan dalam tubuh, kemungkinan absorpsi, distribusi, dan metabolisme zat ini begitu cepat sehingga menyebabkan efek yang buruk pada jaringan/organ reseptornya. Jamil (2009) mengungkapkan bahwa senyawa Benzapiren sulit diekskresi dari dalam tubuh karena sifat karsinogenik dan tidak adanya gugus fungsi yang dapat mengubah senyawa tersebut menjadi polar, sehingga dapat terakumulasi pada jaringan hati, ginjal, atau lemak tubuh.

## **BAB 6**

# **KESIMPULAN DAN SARAN**

## BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

- 1) Peptida mampu mengurangi jumlah bakteri *Escherichia coli* sebesar 83% - 84% pada manure ileum *Rattus norvegicus* yang diinduksi Benzapiren.
- 2) Pemberian Benzapiren menimbulkan peningkatan bakteri *Escherichia coli* yang tinggi.

### 6.2. Saran

Adapun saran yang dapat diberikan penulis antara lain:

- 1) Penggunaan peptida yang berasal dari protein susu kambing 6,055% dan 5,21% dapat menurunkan jumlah bakteri *Escherichia coli* yang berlebih di saluran pencernaan.
- 2) Agar memperoleh data yang dapat dianalisis secara bermakna, sebaiknya digunakan hewan percobaan yang jumlahnya lebih banyak dengan jumlah volume peptida yang lebih besar.
- 3) Perlu dilakukan uji coba peptida pada hewan percobaan yang telah diinfeksi dengan bakteri patogen tertentu, seperti *Salmonella sp* untuk mengetahui lebih jelas efek yang ditimbulkan sebagai bakteriosid atau bakteriostatik.

# RINGKASAN

## RINGKASAN

Benzapiren merupakan zat toksik yang bersifat mutagenik dan karsinogenik. Komponen ini biasanya ditemukan pada produk pembakaran tak sempurna, asap knalpot mobil, dan asap rokok. Selain menyebabkan kanker, pengaruh dari zat ini akan berdampak penurunan daya tahan tubuh sehingga tubuh lebih mudah terserang penyakit maupun infeksi. Salah satu bakteri flora normal, yaitu *Escherichia coli* yang dapat digunakan sebagai indikator terjadinya infeksi. Jumlah *Escherichia coli* dapat meningkat dari normal dan menjadi patogen.

Peptida susu kambing mengandung bioaktif peptida yang dapat meningkatkan kesehatan usus, terutama dalam respon imun. Bioaktif peptida dapat diproduksi selama proses pencernaan di dalam saluran gastrointestinal, proses fermentasi, dan pembuatan pakan. Kandungan laktoferin dalam peptida dapat mengurangi infeksi dan jumlah bakteri. Penelitian ini untuk mengetahui kemampuan peptida dalam mengurangi jumlah bakteri *Escherichia coli* pada *manure* ileum *Rattus norvegicus* yang diinduksi Benzapiren.

Hewan coba yang digunakan adalah 11 ekor *Rattus norvegicus* jantan yang berumur 10-12 minggu dengan berat sekitar 200 gram, satu ekor sebagai kontrol negatif, yaitu tikus yang tidak diberikan perlakuan, 10 ekor diinjeksi intraperitoneal Benzapiren. Kemudian delapan ekor di antara tikus yang telah diinjeksi Benzapiren, diterapi dengan peptida dan dua ekor sisanya digunakan sebagai kontrol positif karena tidak diterapi. Setelah proses terapi berakhir, semua tikus di-autopsi untuk diambil *manure* ileumnya. Kemudian dilakukan pembuatan suspensi untuk

melakukan penghitungan bakteri *Escherichia coli*. Metode yang digunakan adalah *Viable Count Technique* dengan menggunakan *Standart Dropping Pippetes*. Suspensi diencerkan pada pengenceran  $10^{-1}$  hingga  $10^{-8}$ , kemudian ditanam pada media *Eosin Methylene Blue Agar*. Koloni yang tumbuh pada tiap media dihitung jumlah bakterinya.

Data yang diperoleh dari bakteri *Escherichia coli* yang dihitung, menunjukkan adanya penurunan jumlah pada tikus yang telah diterapi peptida setelah injeksi Benzapiren. Presentase penurunannya yaitu antara 83%-84% dari total bakteri *Escherichia coli* pada tikus yang belum diterapi peptida.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa peptida susu kambing bermanfaat untuk menekan atau menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* pada *manure* ileum *Rattus norvegicus* yang telah diinduksi Benzapiren. Selain itu, terlihat hubungan antara penurunan imunitas dengan peningkatan jumlah bakteri flora normal dalam tubuh yang disebabkan oleh induksi Benzapiren.

Berdasarkan hasil penelitian dapat disarankan bahwa perlunya menggunakan hewan percobaan yang lebih banyak dan volume peptida yang lebih besar agar dapat dianalisis secara bermakna. Di samping itu, peptida diujicobakan pada hewan yang telah terinfeksi bakteri tertentu misalnya *Salmonella sp* untuk mengetahui lebih jelas efek bakteriosid maupun bakteriostatik yang ditimbulkan.

# DAFTAR PUSTAKA

## DAFTAR PUSTAKA

- Anang, M.L., Al-Baarri, A.N., Adnan, M., dan Santosa, U. 2006. *Intensitas Aroma "Prengus" dan Deteksi Asam Lemak Pada Susu Kambing*. *Journal Tropical Animal Production* 31:30-33.
- Bakti, A. 2010. *Total Plate Count*. <http://www.daengsituju.wordpress.com/2010/12/06/total-plate-count>. (10 Januari 2010)
- Ballenger, L. 2001. *Rattus norvegicus*. *Animal Diversity Web*. [http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Rattus\\_norvegicus.html](http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Rattus_norvegicus.html). (1 Maret 2011)
- Banks, W. J. 1993. *Applied Veterinary Histology*. 3<sup>rd</sup> Edition. Philadelphia. 61-69.
- Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K., and Tomita, M. 1992. *Identification of the bactericidal domain of lactoferrin*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1121:130-136
- Bhimani, R.S., Vendrov, Y., and Furmanski, P. 1999. *Influence of Lactoferrin Feeding and Injection Against Systemic Staphylococcal Infections in Mice*. *J Appl Microbiol*. 86(1):135-44.
- Boyd, R.F. 1995. *Basic Medical Microbiology*. 5<sup>th</sup>.ed. Little, Brown and Company Inc. New York. 293-298.
- Brink, W. 2000. *The Bioactive Peptide that Fights Diseases*. E.Magazine, October. <http://www.lef.org>. (8 May 2010)
- Bruice, P.Y. 1995. *Organic Chemistry*. Prentice-Hall, Inc. New Jersey. 564-625 , 1043-1085.
- Bull, S. 2008. *Polycyclic aromatic hydrocarbons (Benzo[a]pyrene)*. [http://www.hpa.org.uk/web/HPAwebFile/HPAweb\\_C/1227169967975](http://www.hpa.org.uk/web/HPAwebFile/HPAweb_C/1227169967975). (14 Agustus 2010)
- Burns, A.J., and Rowland, I.R. 2000. *Anti-Carcinogenicity of Probiotics and Prebiotics*. *Curr Issues Intest Microbiol*. 1(1):13-24.
- Clayden, J., Greeves, N., Warren, S., and Wothers, P. 2001. *Organic Chemistry*. Oxford University Press. New York. 549-555 , 1353-1359.



- Denissenko, M.F., Pao, A., Tang, M., and Pfeifer, G.P. 1996. *Preferential Formation of Benzo[a]pyrene Adducts at Lung Cancer Mutational Hotspots in P53*. *Science*. 274(5286):430-2.
- Dial, E.J., Hall, L.R., Serna, H., Romero, J.J., Fox, J.G., and Lichtenberger, L.M. 1998. *Antibiotic properties of bovine lactoferrin on Helicobacter pylori*. *Dig Dis Sci*. 43(12):2750-6.
- Fardiaz, S. 1990. *Analisis Mikrobiologi Pangan*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi PAU Pangan dan Gizi. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 184
- Farmakologi Terapi Obat Pharmacology. 2008. *Pengertian Farmakokinetik*. <http://www.farmakologi-pharmacology.blogspot.com> (31 Januari 2011)
- Forum Paramedik. 2008. *E.coli Bakteria Kawan dan Lawan*. <http://paramedik.bbfr.net/penyakit-berjangkit-f73/e-coli-bakteria-kawan-dan-lawan-t2408.htm>. (18 Januari 2010)
- Haque, E., and Rattan, C. 2006 . *Milk Protein Derived Bioactive Peptides*. <http://www.dairyscience.info/exploitation-of-anti-microbial-proteins/111-milk-protein-derived-bioactive-peptides.html>. (7 May 2010).
- Hart, H., Craine, L.E., and Hart, D.J. 2003. *Kimia Organik-Suatu Kuliah Singkat*. Ed. 11. Terjemahan Penerbit Erlangga. Penerbit Erlangga. Jakarta. 145-150, 519-545.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., and Williams, S.T. 2000. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9<sup>th</sup>. ed. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia. 179-180.
- Ikhwan, Y. 2010. *Farmakodinamika*. <http://www.scribd.com/doc/29177752/Farmakodinamika> (29 Januari 2011)
- Jamil, D.O. 2009. *Pelacakan Aktivitas Antikanker terhadap Tiga Senyawa Santon Terpenilasi dari Spesies Garcinia* [Skripsi]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Teknologi Sepuluh November. Surabaya.

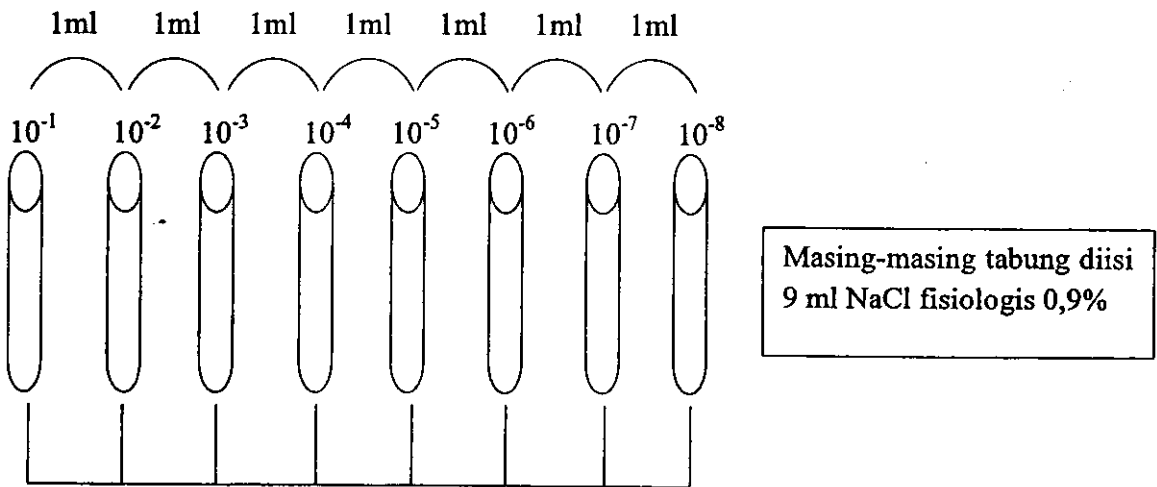
- Jawetz, E., Melnick, J.L., and Adelberg, E.A. 2001. *Mikrobiologi Kedokteran* (Medical Microbiology). Ed. 22. Terjemahan Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Salemba Medika. Jakarta. 170-171, 205-282, 351-364.
- Jones, S.A., Chowdhury, F.Z., and Fabich, A.J. 2007. *Respiration of Escherichia coli in the Mouse Intestine*. American Society for Microbiology. 75(10):4891-4899.
- Kiyoshi, T., Hamada, K., and Hiromu, W. 2003. *Quantitative relationship between carcinogenicity and mutagenicity of polyaromatic hydrocarbons in Salmonella typhimurium mutants*. <http://www.sciencedirect.com>. (9 Januari 2011)
- Klurfeld, D.M. 1999. *Nutritional Regulation of Gastrointestinal Growth*. <http://www.bioscience.org>. (15 Juni 2010)
- Korhonen, H. and Pihlanto, A. 2003. Food-derived bioactive peptides—opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design* 9:1297–1308.
- Kuwata, H., Yip, T.T., Tomita, M., and Hutchens, T.W. 1998. *Direct evidence of the generation in human stomach of an antimicrobial peptide domain (lactoferricin) from ingested lactoferrin*. *Biochim Biophys Acta*.1429(1):129-41.
- Lahov, E. and Regelson, W. 1996. *Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: casecidin, isracidin peptides*. *Food Chemical Toxicology* 34:131–145.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., and Parker, J. 2003. *Brock Biology of Microorganisms*. Pearson Education Inc. New Jersey. 733-735.
- Meisel, H. and Fitz, G.R.J. 2003. *Biofunctional peptides from milk proteins. Mineral binding and cytomodulatory effects*. *Current Pharmaceutical Design* 9:1289–1295.
- Moeljanto, Damayanti, R., Wiryanta, B.T., dan Wahyu. 2002. *Khasiat dan Manfaat Susu Kambing*. Agromedia Pustaka. Depok. 6-7
- Organic Trade Association. 2006. *E.Coli Facts*. <http://www.ota.com/organic/foodsafety/ecoli.html>. (19 Januari 2010)

- Patnaik, P. 1999. *A Comprehensive Guide to the Hazardous Properties of Chemical Substances*. John Wiley & Sons, Inc. New York. 494-495.
- Pelczar, M.J., Chan, E.C.S., and Krieg, N.R. 1993. *Microbiology Concepts and Applications*. McGraw-Hill, Inc. New York. 454-470.
- Percival M. 1997. *Intestinal Health*. Clin. Nutri. Insights. 5(5): 1-6.
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., and Donnelly, W.J.C. 2002. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Blackwell Publishing Company. Oxford. 106-111,457-460.
- Recio, I., and Visser, S. 1999. Two ion-exchange methods for the isolation of antibacterial peptides from lactoferrin—in situ enzymatic hydrolysis on an ion-exchange membrane. *Journal of Chromatography* 831:191-201.
- Sarwono, B. 2006. *Beternak Kambing Unggul*. Penebar Swadaya. Jakarta. 15-20.
- Sidik, R., Ma'ruf, A., Yong, H. P., dan Wahyuni, R.S. 2009. *Pakan Komplit sebagai Prekursor Peptida Susu Kambing yang Berkhasiat sebagai Anti Bakteri dan Anti Kanker*. Hibah kompetitif penelitian untuk publikasi Internasional Batch III, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga. 26 Oktober 2009
- Santoso, H., 2007. *(Tiens) Bubuk Protein Poli-peptida*. <http://www.health.dir.groups.yahoo.com/group/haditiens.html>. (7 Desember 2009)
- ScienceBlog. 2004. *Researcher links cigarettes, vitamin A and emphysema*. <http://www.tobacco.org/news/171229.html>. (23 Februari 2010)
- Sodiq, A., dan Abidin, Z. 2008. *Meningkatkan Produksi Susu Kambing Peranakan Ettawa*. Agro Media Pustaka. Jakarta. 22-24.
- Sudarmadji, S., 1996. *Teknik Analisa Biokimiawi*. Edisi Pertama. Liberty. Yogyakarta. 60-63.
- Sudoyo, A.W., Setiyohadi, B., Alwi, I., K.Marcellus, S., dan Setiati, S. 2006. *Ilmu Penyakit Dalam*. Pusat Penerbitan Departemen Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Ed.4. Jakarta. 235-236, 298-300.
- Susu Segar Administrator. 2009. *Pengobatan dengan Susu Kambing*. <http://www.sususegar.com/index.php/the-news/46-pengobatan-dengan-susu-kambing.pdf>. (3 Februari 2010)

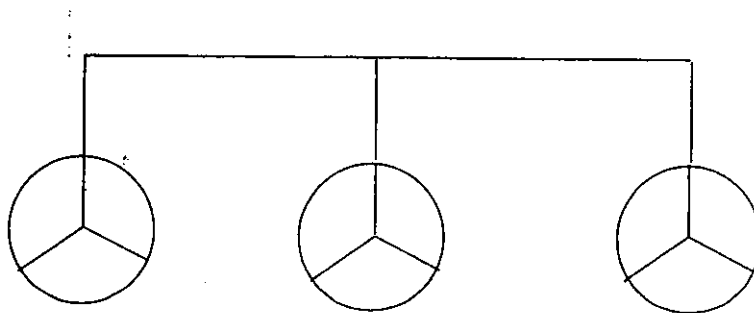
- Todar, K. 2004. *The Good, the Bad, and the Deadly*. SCIENCE Magazine. 304:1421.
- Volk, W.A. 1992. *Basic Microbiology 7<sup>th</sup> Edition*. HarperCollins Publishers Inc. New York. 345-346
- Wikipedia. 2010. *Benzo(a)pyrene*. [http://en.wikipedia.org/wiki/Benzo\(a\)pyrene](http://en.wikipedia.org/wiki/Benzo(a)pyrene). (10 Agustus 2010)
- Winarno, F. G., 1992. *Kimia Pangan dan Gizi*. Penerbit Gramedia. Jakarta. 45-48.
- Winarno, F.G. 2001. *Protein dan Peptida Bioaktif bagi Pengobatan dan Pangan*. <http://groups.yahoo.com/group/mmaipb/message/4414>. (7 Desember 2009)

# LAMPIRAN

**Lampiran 1: Skema Pengenceran dan Penanaman Sampel pada *Eosin Methylene Blue Agar*.**



Masing-masing ditetaskan 0,025 ml pada tiap petak media EMBA



EMBA

Diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 24 jam

Penghitungan koloni *Escherichia coli* yang tumbuh

**Lampiran 2: Cara Penghitungan Persentase Penurunan *Escherichia coli***

Perlakuan	Jumlah Bakteri <i>E.coli</i>	Rata-rata	Persentase Jumlah <i>E.coli</i> yang Tersisa di ileum	Persentase Penurunan Jumlah <i>E.coli</i> di ileum
N	$4,0 \times 10^3$	$4,0 \times 10^3$	0,1%	99,9%
K1	$1,4 \times 10^7$	$6,2 \times 10^7$	100%	0
K2	$1,1 \times 10^8$			
P1.1	$4,8 \times 10^5$	$1,0 \times 10^7$	16,1%	83,9%
P1.2	$5,6 \times 10^6$			
P1.3	$1,0 \times 10^7$			
P1.4	$2,4 \times 10^7$			
P2.1	$2,3 \times 10^6$	$9,4 \times 10^6$	15,2%	84,8%
P2.2	$1,0 \times 10^7$			
P2.3	$1,6 \times 10^7$			
P2.4	Mati pada hari ke lima	-	-	-

Diumpamakan % akhir K1 dan K2 = 100% , maka:

$$\% \text{ Pengurangan Bakteri P1} = \frac{6,2 \times 10^7 - 1,0 \times 10^7}{6,2 \times 10^7} \times 100\% = 83,9\%$$

$$\% \text{ Akhir P1} = 100\% - 83,9\% = 16,1\%$$

$$\% \text{ Pengurangan Bakteri P2} = \frac{6,2 \times 10^7 - 9,4 \times 10^6}{6,2 \times 10^7} \times 100\% = 84,8\%$$

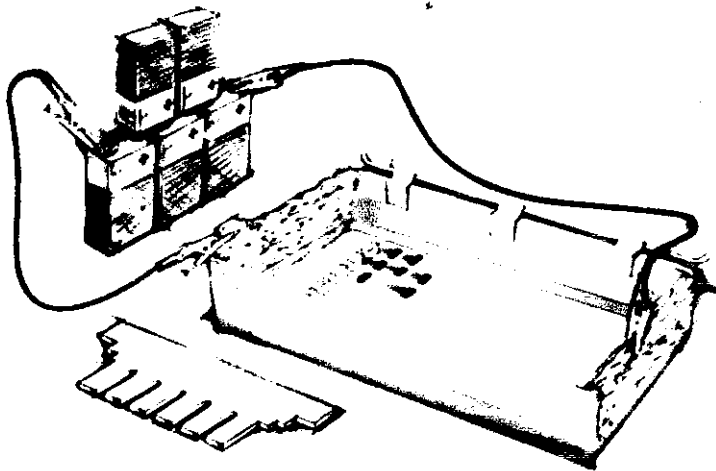
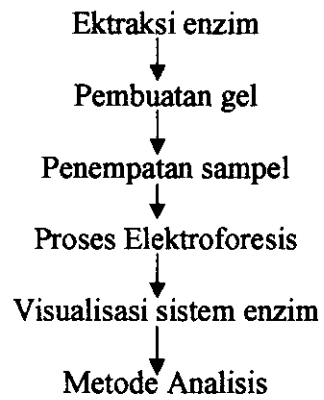
$$\% \text{ Akhir P2} = 100\% - 84,8\% = 15,2\%$$

$$\% \text{ Pengurangan Bakteri N} = \frac{6,2 \times 10^7 - 4,0 \times 10^3}{6,2 \times 10^7} \times 100\% = 99,9\%$$

$$\% \text{ Akhir N} = 100\% - 99,9\% = 0,1\%$$

### Lampiran 3: Prinsip Metode Elektroforesis

Cara kerja metode elektroforesis menurut Sudarmadji, 1996 adalah sebagai berikut:





**Lampiran 4: Foto Dokumentasi Penelitian**



*Autopsi Rattus norvegicus*



*Tempat penyimpanan ileum Rattus norvegicus*



Pengenceran suspensi dari  $10^{-1}$  sampai  $10^{-8}$



Hasil pertumbuhan *Escherichia coli* pada media EMBA



Paru-paru *Rattus norvegicus* sehat



Paru-paru *Rattus norvegicus* yang diinduksi Benzapiren