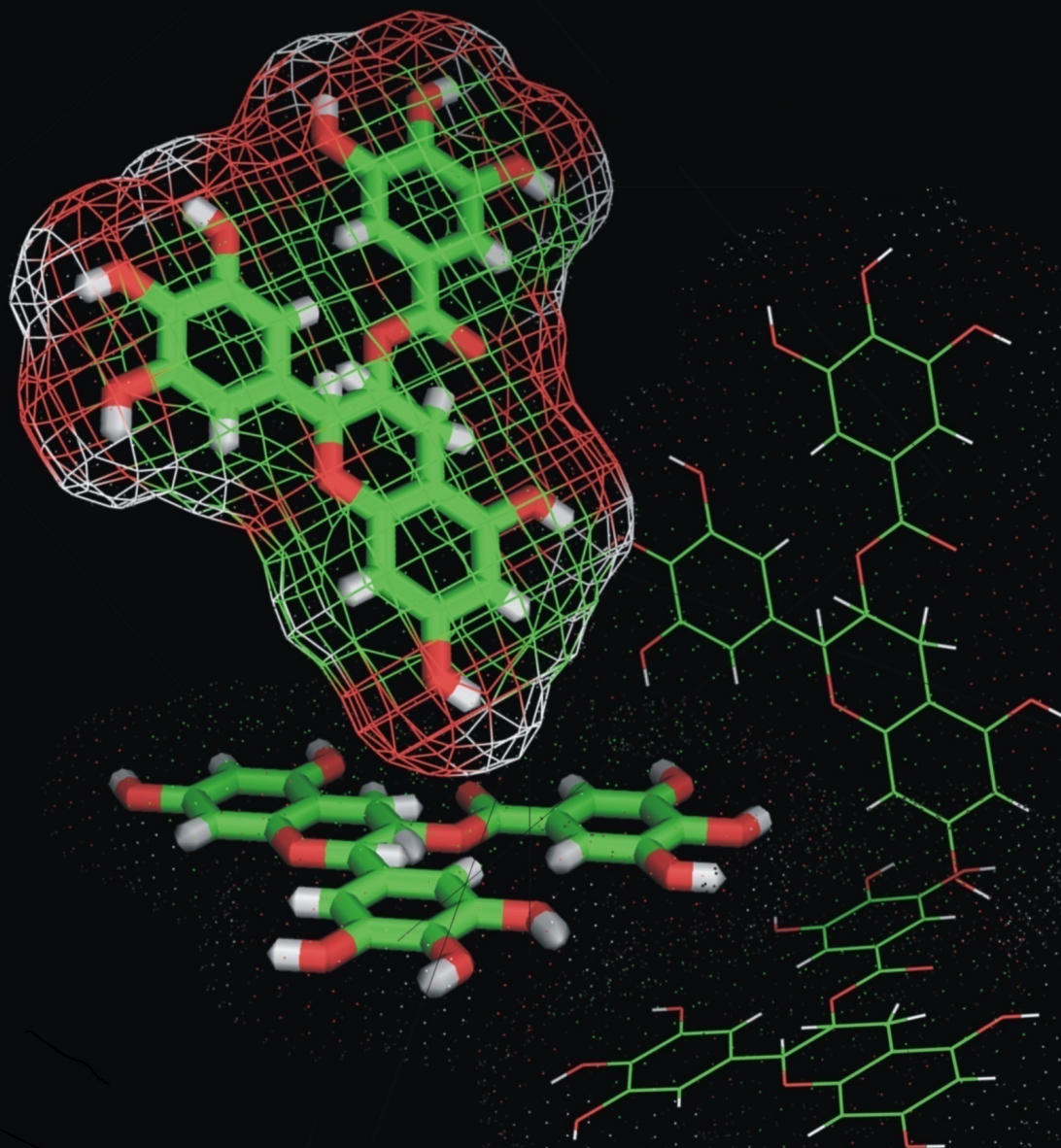


The Journal of Experimental Life Science

Discovering Living System Concept through Nano, Molecular and Cellular Biology



J. Exp. Life. Sci.	Vol 3	No 1	pages. 1-44	June 2013
--------------------	-------	------	-------------	-----------

Published by
Graduate Program, University of Brawijaya
in Cooperation With
Masyarakat Nano Indonesia (MNI)

The Journal of **Experimental** Life Science

Discovering Living System Concept through Nano, Molecular and Cellular Biology

Editorial Board

Chief Editor

Dr. Ir. M. Sasmito Djati, MS.

Editorial Team

Aida Sartimbul, M.Sc. Ph.D - UB
Adi Santoso, M.Sc. Ph.D - LIPI
Nurul Taufiq, M.Sc. Ph.D - BPPT
Arifin Nur Sugiharto, M.Sc. Ph.D -UB

Sukoso, Prof. MSc. Ph.D-UB
Etik Mardiyati, Dr. - BPPT
Soemarno, Ir., MS., Dr., Prof. - UB
Dr. Bagyo Yanuwadi

Reviewer

Ahmad Faried, MD. Ph.D – UNPAD
Trinil Susilawati, Ir., MS., Dr., Prof. - UB
Muhaimin Rifai, Ph.D - UB
Rer.nat. Ronny Martien, Dr. – UGM
Moch. Ali, Dr. - UNRAM
Widodo, S.Si., M.Si., Ph.D MED Sc - UB
Irwandi Jaswir, Prof. – UII Malaysia
Sarjono, Dr. - ITB
Muhammad Askari, Dr. – UTM Malaysia
Sutiman Bambang S., Dr., Prof. - UB
Moh. Aris Widodo, Sp.FK., Ph.D., Prof. - UB
Yanti, Dr. – UNIKA ATMAJAYA

Brian Yulianto, Dr. - ITB
Bambang Prijambudi, Dr. - ITB
Arief Boediono, drh., PhD., Prof. - IPB
M. Yedi Sumaryadi, Ir., Dr., Prof. - UNSOED
Wasmen Manalu, Dr., Prof. - IPB
Moch. Syamsul Arifin Zein, Ir., M.Si. - LIPI
Gono Semiadi, Ir. MSc. PhD. - LIPI
Yaya Rukayadi, MS., Dr. – Yonsei University Seoul
Muhaimin Rifa'i, Ph.D - UB
Widjiati, drh.,MS.,Dr. – UNAIR
Amin Setyo Leksono, S.Si.,M.Si.,Ph.D - UB

Editor Pelaksana

Afidatul Muji Astuti, S.Si.

Illustrator

M. Qomaruddin, S.Si.

Address

The Journal of Experimental Life Science
Building E, 2nd Floor, Graduate Program, University of Brawijaya
Jl. Mayor Jenderal Haryono 169, Malang, 65145
Telp: (0341) 571260 ; Fax: (0341) 580801
Email: jels@ub.ac.id
Web: <http://www.jels.ub.ac.id>

Table of Content

Karakter Biokimia dan Profil Protein Yogurt Kambing PE Difermentasi Bakteri Asam Laktat (BAL) (Lulus K Khoiriyah, Fatchiyah Fatchiyah)	1-6
DOI: http://dx.doi.org/10.21776/ub.jels.2013.003.01.01	
Mobilization of CD4+, CD8+, and B220+ on Broiler Chicken Spleen with Feed Contained <i>Polyscias obtusa</i> Post Infection of <i>Salmonella typhimurium</i> (Andi Rizki A, Pradana, Muhammad Sasmito Djati, Muhaimin Rifa'i)	7-12
DOI: http://dx.doi.org/10.21776/ub.jels.2013.003.01.02	
Profil Gr-1 dan CD34 Mencit yang Diinfeksi <i>Staphylococcus aureus</i> Pacea Pemberian Ekstrak Buah Mengkudu (<i>Morinda citrifolia</i>) (Dia Faroka, Sri Rahayu, Muhaimin Rifa'i)	13-19
DOI: http://dx.doi.org/10.21776/ub.jels.2013.003.01.03	
Effectivity of <i>Polyscias obtusa</i> <i>Simplicia</i> as Immunomodulator on CaecaTonsil of Broiler Post Infection of <i>Salmonella typhimurium</i> (Mutya Farsely, Muhammad Sasmito Djati, Muhaimin Rifa'i)	20-24
DOI: http://dx.doi.org/10.21776/ub.jels.2013.003.01.04	
Aktivitas Immunomodulator <i>Polyscias obtusa</i> Terhadap Sistem Imunitas Pada Bone Marrow Broiler Setelah Pemberian <i>Salmonella typhimurium</i> (Erin Kurnianingtyas, Muhammad Sasmito Djati, Muhaimin Rifa'i)	25-30
DOI: http://dx.doi.org/10.21776/ub.jels.2013.003.01.05	
<i>Chaetoceros ceratosporum</i> Diatomae in Feed Formula To Increase Growth and Post Larvae Immunity of Tiger Shrimp (<i>Penaeus monodon</i> Fab.) to <i>Vibrio harveyi</i> infection (Arning Wilujeng Ekawati, Happy Nursyam, Edi Widjayanto, Marsoedi Marsoedi)	31-36
DOI: http://dx.doi.org/10.21776/ub.jels.2013.003.01.06	
Pengamatan Jaringan Lambung Kijing Taiwan (<i>Anodonta woodiana</i> Lea) Yang Terdedah Pestisida Diazinon 60 EC Pada Beberapa Konsentrasi (Listiya Gita Lesmana, Diana Arfiati, Asus Maizar)	37-39
DOI: http://dx.doi.org/10.21776/ub.jels.2013.003.01.07	
Aktivitas Antibakteri Ekstrak Teripang <i>Holothuria</i> sp. Terhadap Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i> Secara In vitro (Siti Roihanah, Sukoso Sukoso, S. Handayani)	40-44
DOI: http://dx.doi.org/10.21776/ub.jels.2013.003.01.08	

Karakter Biokimia dan Profil Protein Yogurt Kambing PE Difermentasi Bakteri Asam Laktat (BAL)

Lulus Khafidhotul Khoiriyah dan Fatchiyah*

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya

Abstrak

Yogurt merupakan salah satu makanan fermentasi dari susu dengan penambahan Bakteri Asam Laktat (BAL). Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui karakter biokimia dan profil protein yogurt kambing PE difermentasi BAL. Susu kambing dan sapi di perah pada pagi hari dan dibagi menjadi 5 golongan: susu segar (sapi dan kambing), susu fermentasi kultur tunggal dengan starter bakteri *L. acidophilus*, kultur ganda dengan starter bakteri *L. acidophilus*+*S. thermophilus*, dan kultur campuran dengan starter komersial (yogurt *mix*). Protein susu dan yogurt diisolasi dan dimurnikan dengan 5x volume ekstrak buffer lisis (4mM PMSF, 1x PBS, 0,05% Tween 20) dan diekstraksi dengan sonikasi amplitudo 20%. Separasi pita protein dengan SDS-PAGE *discontinuous separating gel* 15% dan analisis hasil elektroforesis dihitung berat molekulnya berdasarkan protein standar menggunakan Rf. Analisis densitas profil protein menggunakan *software Quantity One* dan SPSS 15.0. Hasil menunjukkan bahwa pada susu sapi dan kambing segar, kultur tunggal dan ganda, serta yogurt *mix* ditemukan K-casein, β -casein, dan α -S1 casein pada berat molekul antara 30-38 kDa. Sedangkan pada susu kambing segar dan yogurt *mix* pada berat molekul 36 kDa yaitu α -S2 casein. Secara umum komposisi protein antara susu sapi dan susu kambing adalah sama, tetapi masing-masing memiliki pita protein yang berbeda, sehingga diduga memiliki fungsi yang berbeda pula.

Kata kunci: BAL, kasein, SDS-PAGE, susu kambing Etawah

Abstract

*Yogurt is one of functional food which fermented from milk by using Lactic Acid Bacteria (LAB). The aim of this study is to detect biochemistry characterization and protein profiles of Etawah goat milk yoghurt fermentation of LAB. Goat and bovine milk were squeezed in early morning and immediately divided into six-group: fresh milk, milk fermented by single bacteria starter *L. acidophilus*, double bacteria starter *L. acidophilus*+*S. thermophilus*, and commercial starter as yoghurt mix. To isolated and purified, protein milk and yoghurt were digested by 5x volume of lysis buffer (4mM PMSF+PBS-T) and extracted by sonication with 20% amplitude. The protein bands were separated by 15% discontinuous SDS-PAGE and then analysis Rf molecule weight protein each band by using Rf standard, and density of each band analyzed by Quantity One software. The result our study are found that K-casein, β -casein, and α -S1 casein were found in fresh bovine and goat milk, single and double culture, and yoghurt mix in molecule weight between 30-38 kDa. While in fresh goat milk and yoghurt in 36 kDa molecule weight are α -S2 casein. In general, the protein composition of bovine milk and goat milk is the similar, but each has different protein bands, therefore they presumed to have different function as well.*

Key words: Etawah goat milk, LAB, casein, SDS-PAGE

PENDAHULUAN

Kambing perah yang banyak dikembangkan di Indonesia umumnya kambing Peranakan Etawa yang menjadi salah satu ternak *indigenous* dan memiliki potensi genetik yang tinggi sebagai penghasil dwiguna (daging dan susu). Akan tetapi, masih lebih dominan sebagai sumber daging jika dibandingkan dengan sumber susu, karena susu kambing belum banyak dikonsumsi secara luas oleh masyarakat seperti susu sapi [1]. Meskipun masyarakat Indonesia masih belum banyak mengonsumsi susu kambing, diduga alasan utama karena aroma dari susu kambing itu sendiri.

Namun sebagian masyarakat yang beranggapan bahwa susu kambing dapat menyembuhkan berbagai macam penyakit, seperti: asma, TBC, alergi, dan kanker sudah mulai berpindah untuk lebih memilih mengonsumsi susu kambing [2, 3]. Walaupun belum terbukti secara ilmiah anggapan yang berkembang di sebagian masyarakat tersebut, namun Padaga *dkk.* (2010) melaporkan diduga ada satu polipeptida aktif yang menjadikan susu kambing berkhasiat dan dapat digunakan sebagai terapi penyakit-penyakit tersebut [4].

Untuk itu, susu kambing dapat dijadikan berbagai bentuk macam olahan, seperti: yogurt yang merupakan salah satu makanan fermentasi dengan penambahan BAL, seperti: *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, dan *Streptococcus thermophilus*. Selama proses fermentasi, terjadi perubahan secara fisik, perubahan komponen zat gizi, dan adanya

* Alamat Korespondensi
Fatchiyah

Email : fatchiya@ub.ac.id

Alamat : Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Jl. Veteran, Malang 65154

produksi metabolit primer dan sekunder. Pada proses fermentasi dengan adanya aktivitas enzim dari mikroba, komponen-komponen seperti pati, lemak, protein, zat toksik, dan senyawa-senyawa lain dapat dipecah. Teknik fermentasi ini banyak diaplikasikan pada bahan pangan terutama susu, karena adanya efek peningkatan zat gizi dan pengaruh positif bagi kesehatan [5]. Selain itu, pada proses fermentasi terutama pada yogurt, akan terjadi pemecahan gula laktosa menjadi glukosa dan galaktosa. Sehingga masalah *intolerance* dapat teratasi [6, 3].

Akan tetapi, pembuatan yogurt dengan bahan baku susu kambing masih jarang dilakukan dan belum banyak di eksplorasi. Oleh karena sebagian masyarakat menganggap bahwa susu kambing berkhasiat, maka diduga ada suatu biopeptida aktif yang dapat digunakan untuk terapi penyakit. Sehingga dilakukan penelitian ini untuk mengetahui karakter biokimia dan profil protein yogurt kambing PE difermentasi (BAL) yang berpotensi terhadap peningkatan nilai gizi sebagai pangan fungsional dengan kandungan senyawa biopeptida aktif.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini tersertifikasi Kelaihan Etik No. 90-KEP-UB tertanggal 29 Maret 2012.

Aktivasi kultur BAL

Digunakan isolat bakteri *S. thermophilus* strain FNCC 0040 dan *L. acidophilus* strain FNCC 0051 berasal dari Laboratorium Pangan dan Gizi, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Kultur bakteri diremajakan pada media *MRS Agar* untuk mengaktifkan pertumbuhan bakteri. Starter bakteri diinkubasi pada suhu optimal pertumbuhan *S. thermophilus* suhu 38°C dan *L. acidophilus* suhu 45°C masing-masing selama 24-48 jam. Kemudian diinokulasikan pada media *MRS Broth* sebanyak 1 oose dan diinkubasi selama 24-48 jam pada masing-masing suhu optimum. Sentrifuse dengan kecepatan 12000 rpm pada suhu 4°C selama 5 menit. Pelet ditambahkan NaCl fisiologis 0,85% dengan perbandingan (1:1) dan divorteks. Dilakukan sentrifugasi kembali, kemudian diinokulasikan pada susu masing-masing kultur bakteri sesuai dengan densitas sel.

Persiapan susu fermentasi

Penelitian ini menggunakan susu kambing Etawah segar yang diperah pada pagi hari, berasal dari Unit Pelaksana Teknis Ternak Daerah I Singosari. Susu dipasteurisasi suhu mencapai 80°C-90°C. Didinginkan hingga mencapai suhu ±43°C didalam LAF dan diukur pH awal. Kultur tunggal dengan starter *L. acidophilus* (La), kultur ganda dengan kombinasi starter *S. thermophilus*

(St) masing-masing dengan CFU 10⁶/ml, dan kultur campuran dengan starter komersial yogurt *mix* (YM) sebanyak 5%, kemudian diinkubasi pada suhu 45°C selama 4-6 jam dan diukur pH akhir [7].

Isolasi protein

Sampel sebanyak 1 ml ditambah 4mM PMSF+PBS-T sebanyak 5 kali volume. Campuran larutan di sonikasi dengan amplitudo 20% selama 10 menit, lalu disentrifuse dengan kecepatan 6000 rpm suhu 4°C selama 15 menit. Supernatan ditambahkan larutan etanol dingin (1:1), kemudian disimpan pada suhu 4°C selama 12 jam. Sampel disentrifuse dengan kecepatan 6000 rpm suhu 4°C selama 15 menit. Pelet dikeringkan hingga etanol hilang. Ditambahkan dengan Tris-HCl pH 6,8 (1:1), disimpan pada suhu -20°C.

Analisis SDS-PAGE

SDS-PAGE yang digunakan dengan sistem *discontinuous* pada *separating gel* 15%. Metode elektroforesis ini berdasarkan metode Laemmli. Sampel protein yang telah diukur kadar proteinya dengan Nanospektro ditambah Tris-Cl pH 6,8 dan *Reducing Sample Buffer* (1:1). Sampel dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 menit, *Running* elektroforesis dilakukan pada *constant current* 200 mA. Distribusi pita diketahui dengan pewarnaan gel *Coomasie Brilliant Blue* (CBBR-250). Pita protein hasil elektroforesis dihitung berat molekulnya. Ditentukan dengan mengukur mobilitas molekul protein dalam gel poliakrilamid berdasarkan kurva standar berat molekul dari protein standar. Analisis profil protein dilakukan dengan menghitung densitas pita protein yang terlihat dalam gel dengan *software Quantity One*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat induk pada media *MRS Agar* berupa *Agar slants* di aktivasi menggunakan media *MRS Broth* agar pertumbuhannya optimum pada suhu yang sesuai. Sehingga dapat dilakukan perhitungan jumlah koloni pada masing-masing isolat. Pada (Tabel 1.) menunjukkan bahwa bakteri *L. acidophilus* memiliki jumlah koloni yang lebih banyak dibandingkan dengan *S. thermophilus*. Hal ini menunjukkan bahwa penempatan pada suhu optimum masing-masing bakteri masih memiliki aktivitas pertumbuhan yang berbeda-beda. Karakter morfologi dari kedua isolat menunjukkan bahwa BAL memiliki bentuk *bacil* pada *L. acidophilus* dan berbentuk *coccus* pada *S. thermophilus*. Gram positif berwarna ungu yang disebabkan karena zat warna kristal violet-iodin yang tetap dipertahankan meskipun dicuci larutan alkohol. Hal ini dikarenakan adanya dinding sel bakteri berupa peptidoglikan tebal, sehingga warna akan tetap dapat dipertahankan.

Jumlah koloni starter yang digunakan dari kedua BAL tersebut adalah 10^6 CFU/ml pada (Tabel 1.). Jumlah tersebut sudah memenuhi untuk digunakan sebagai starter yogurt. Menurut Li et al. (2012) kedua BAL tersebut merupakan probiotik yang memiliki manfaat jika ditambahkan pada bahan makanan berjumlah minimum 10^6 CFU/ml yang diperlukan dalam setiap produk makanan [8]. Shah (1999) juga menyarankan jumlah tersebut, agar viabilitas jumlah probiotik masih dapat dipertahankan [9]. Elizabeth et al. (2006); Kailasapathy and James (2000) juga menyatakan jumlah tertinggi BAL yang diperlukan untuk manfaat kesehatan antara 10^8 - 10^{11} CFU/ml. Akan tetapi, untuk makanan yang mengandung probiotik seperti yogurt jumlah minimal yang diperlukan adalah 10^6 CFU/ml [10,11].

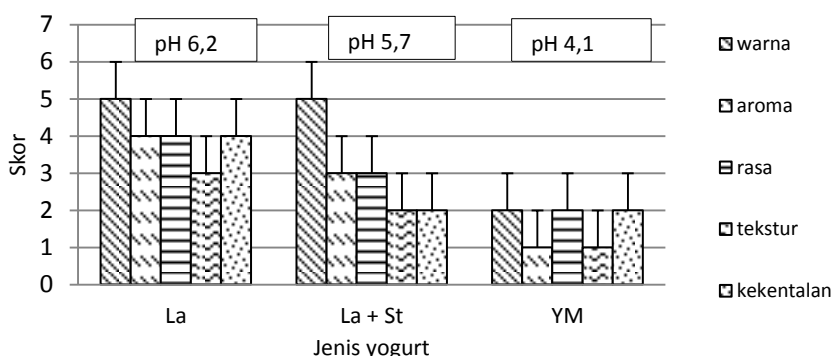
Pengamatan viabilitas pertumbuhan mikroba diikuti dengan pengukuran terhadap nilai pH (Gambar 1.). Nilai pH terendah terdapat pada susu yang difermentasi dengan starter komersial,

sedangkan pada kultur tunggal *L. acidophilus*, dan ganda *S. thermophilus* dengan kombinasinya masih berkisar antara pH 5-6. Menurut Li et al. (2012) starter *L. acidophilus* membutuhkan waktu minimal 12 jam inkubasi untuk menghasilkan metabolit primer berupa asam laktat, sedangkan untuk starter *S. thermophilus* menurut Ramadzanti (2006) memiliki sifat menyukai suasana mendekati pH 6,5. Starter ini dapat menstimulasi pertumbuhan dari starter lain dengan mensintesis asam format [8, 12].

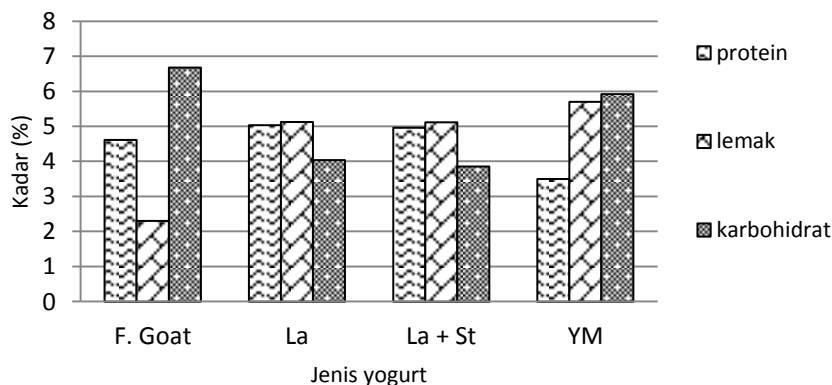
Dengan meningkatnya jumlah populasi mikroba maka aktivitas metabolismenya juga akan meningkat. Hasil metabolisme sebagian besar berupa asam laktat yang diikuti oleh adanya penurunan nilai pH yang terjadi akibat koagulasi protein dari proses fermentasi susu [8, 13]. Asam laktat merupakan produk metabolit primer sehingga produksinya akan semakin tinggi dengan semakin meningkatnya pertumbuhan sel.

Tabel 1. Karakter morfologi dan jumlah koloni kultur BAL

Kultur	Suhu optimum	Karakter morfologi	Jumlah koloni (CFU/ml)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> strain FNCC 0051	45°C	Berbentuk <i>bacil</i> , Gram positif, katalase negatif	$5,74 \times 10^6$
<i>Sterptococcus thermophilus</i> strain FNCC 0040	38°C	Berbentuk <i>coccus</i> , Gram positif, katalase negatif	$1,51 \times 10^6$



Gambar 1. Karakter susu yang difermentasi BAL. (La = *L. acidophilus*, St = *S. thermophilus*, YM = Yogurt mix)



Gambar 2. Uji proximat susu kambing dan susu yang difermentasi BAL. (F.Goat = *Fresh Goat*, La = *L. acidophilus*, St = *S. thermophilus*, YM = *Yogurt mix*)

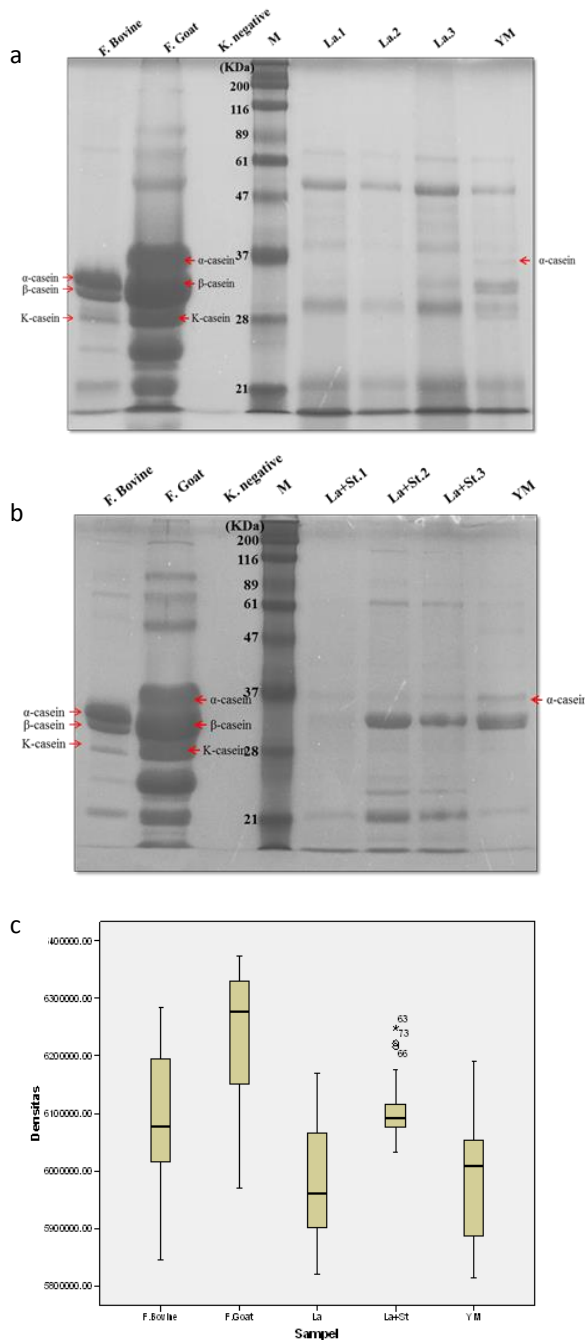
Uji organoleptik pada (Gambar 1) yang digunakan yaitu uji rangking, untuk mengetahui kondisi organoleptik masing-masing yogurt sesuai dengan kondisinya. Meliputi: warna, aroma, rasa, tekstur, dan kekentalan. Warna putih disebabkan karena kandungan kasein dan tidak adanya kandungan karoten, sedangkan warna yang agak kekuning-kuningan disebabkan oleh butiran lemak yang terdapat didalam susu kambing. Proses fermentasi susu akan menghasilkan produk dengan cita rasa tinggi serta tekstur yang lembut. Menurut Legowo (2007) komponen susu yang paling berperan selama proses fermentasi yaitu: laktosa dan kasein. Laktosa digunakan oleh mikroorganisme sebagai sumber karbon dan energi dengan hasil metabolisemenya berupa asam laktat dan menyebabkan pH susu turun menjadi asam. Suasana asam menyebabkan keseimbangan kasein terganggu dan pada titik isoelektrik \pm pH = 4,6. Kasein akan menggumpal membentuk koagulan dan terbentuk susu semi padat [14]. Sehingga sesuai dengan pernyataan Ramadzanti (2006) bahwa asam-asam lemak berantai pada susu kambing, seperti: kaproat, kaprilat, dan kaprat dapat menimbulkan bau yang khas. Hasil metabolisme dari BAL juga akan membentuk asam laktat berupa senyawa diasetil dan asetoin yang memberikan bau dan rasa yogurt yang khas. Tekstur pada yogurt pada umumnya lembut karena adanya pemecahan molekul protein menjadi peptida-peptida sehingga butiran-butiran pada susu akan berubah menjadi molekul yang lebih kecil yang disebabkan karena aktivitas dari BAL pada saat fermentasi. Hasil dari fermentasi susu akan berpengaruh pada kekentalan susu, karena molekul yang telah dipecah tersebut akan mengalami homogenitas, sehingga kekentalan dari susu yang difermentasi akan semakin meningkat [15].

Hasil uji proksimat (Gambar 2) terjadi penurunan kadar protein yang disebabkan adanya aktivitas katabolisme BAL yang memecah protein menjadi peptida-peptida. Pada (Gambar 2) menunjukkan bahwa kadar protein berbanding terbalik dengan kadar karbohidrat. Kadar protein susu kambing sebesar 4,62%, mengalami penurunan pada susu yang difermentasi dengan kombinasi BAL kultur tinggal *L. acidophilus*, dan ganda *S. thermophilus* dengan kombinasinya dan yogurt *mix* sebesar 1,54%. Sedangkan kadar karbohidrat susu kambing sebesar 6,68%, mengalami peningkatan pada susu fermentasi sebesar 2,24%. Menurut Sunarlim dan Setiyanto (2001) kandungan kadar lemak yogurt menurut Standar Nasional Indonesia (SNI) sebesar 3,5% [15], berdasarkan (Gambar 2) kadar protein sebesar 3,5%. Sodiq dan Abidin (2008)

melaporkan bahwa kandungan protein pada yogurt merupakan jumlah total dari protein bahan dasar yang digunakan (susu) dan protein dari BAL. Selama proses fermentasi, protein akan dihidrolisis menjadi komponen-komponen terlarut untuk keperluan pembentukan protein sel BAL. Hanya 20% dari komponen nitrogen terlarut yang digunakan untuk pertumbuhannya [1].

Pada (Gambar 2) juga menunjukkan peningkatan kadar lemak dari susu kambing segar sebesar 2,13% dan meningkat sebesar 3,41%. Hal ini disebabkan karena jumlah butiran lemak dalam susu kambing memiliki diameter yang lebih kecil dan homogen dibandingkan dengan susu sapi, sehingga selama proses fermentasi akan meningkatkan jumlah kadar lemak. Akan tetapi pada susu yang difermentasi terjadi penurunan. Menurut Sunarlim dan Setiyanto (2008) hal ini terjadi karena adanya peningkatan asam laktat akibat proses fermentasi oleh BAL yang memiliki aktifitas lipolitik untuk mereduksi lemak susu, sehingga kadar lemak menurun karena proses lipolysis [15]. Sunarlim dan Setiyanto (2001) menyatakan bahwa kandungan kadar lemak yogurt menurut SNI maksimal 3,8% [16]. Sedangkan berdasarkan (Gambar 2) yogurt dari susu kambing memiliki kandungan lemak sebesar 5,7%. Sehingga kurang memenuhi syarat SNI untuk yogurt berbahan dasar susu ini.

Hasil separasi menggunakan SDS-PAGE ditampilkan pada Gambar 3a dan 3b. Penentuan berat molekul pada penelitian ini dilakukan dengan bantuan marka atau penanda. Menurut Cavalli *et al.* (2006) untuk menentukan berat molekul protein dilakukan dengan menghitung Rf dari masing-masing pita, dari marka yang sudah diketahui berat molekulnya dengan menggunakan rumus Rf [17]. Analisis profil protein pada (Gambar 3a, 3b) terlihat pita protein dengan mobilitas terendah sampai tertinggi yang terletak antara berat molekul 30-38 KDa, yaitu: K-casein, β -casein, α -S1, dan α -S2 casein yang terdapat pada susu sapi segar, susu kambing segar, susu fermentasi dan yogurt *mix*. Akan tetapi, pada susu kambing segar dan yogurt *mix* terdapat protein spesifik pada berat molekul 36 KDa, yaitu: α -S2 casein. Jenis protein α -S2 casein ini yang secara spesifik membedakan antara protein-protein yang terkandung dalam susu kambing dan susu sapi. Menurut Bonizzi *et al.* (2009); Haenlein (2004); Greppi *et al.* (2008); Zevchak (2007) secara keseluruhan komposisi dari protein susu terdiri dari dua fraksi utama yaitu: kasein yang berjumlah 80%, terdiri dari: α -S1casein dan α -S2 casein, β -casein, K-casein. Sedangkan whey berjumlah 20%, terdiri dari: α -laktoalbumin, β -laktoglobulin, dan laktalbumin [3,18-20].



Gambar 3. Profil protein yogurt *separating gel* 15% SDS-PAGE, (a) susu yang difermentasi La konsentrasi 1,20 mg/ml; (b) susu yang difermentasi La+St konsentrasi 1,11 mg/ml; (c) Nilai densitas ((F.Bovine = *Fresh Bovine*, F.Goat = *Fresh Goat*, K.negative = Kontrol negatif, M = Marker, La = *L. acidophilus*, St = *S. thermophilus*, YM = *Yogurt mix*)

Hasil analisis densitas pita protein pada (Gambar 3c) menunjukkan bahwa rata-rata nilai densitas tertinggi ada pada susu kambing segar dengan nilai sebesar 6234300,29 INT/mm² dan nilai median sebesar 6277223 INT/mm². Akan tetapi nilai densitas dari susu sapi dan susu yang difermentasi tidak berbeda, artinya bahwa

dengan perhitungan konsentrasi yang sama, maka distribusi pita protein hasil SDS-PAGE juga memiliki nilai densitas yang tidak berbeda nyata.

KESIMPULAN

Profil protein yang terletak pada BM 30-38 KDa, yaitu: K-casein, β-casein, α-S1 casein, dan α-S2 casein. Sedangkan profil protein spesifik yang hanya ditemukan pada susu kambing segar dan yogurt mix teletak pada berat molekul 36 KDa, yaitu: α-S2 casein. Komposisi protein secara umum antar susu sapi dan susu kambing adalah sama, tetapi masing-masing memiliki pita protein yang berbeda. Sehingga diduga memiliki fungsi yang berbeda pula.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada Program RISTEK Unggulan Perguruan Tinggi tahun 2012-2014, Program Desentralisasi DIKTI KEMENDIKBUD. Laboratorium BioSains dan Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Sodiq, A. dan Z. Abidin. 2008. Meningkatkan Produksi Susu Kambing Peranakan Etawa. PT. AgroMedia Pustaka. Jakarta.
- [2] Susilorini, T.E., M.E. Sawitri, Muharliem. 2009. Budidaya 22 Ternak Potensial. Penebar Swadaya. Jakarta.
- [3] Greppi, G.F., P. Roncada, R. Fortin. 2008. Protein Components of Goat's Milk. Dairy Goats Feeding and Nutrition. Italy. pp.71-94.
- [4] Padaga, M., Savitry M. E., Murwani S. 2010. Potensi Protein Spesifik Susu Kambing sebagai Immunomodulator dan Immunogen: Upaya Pengembangan Pangan Nutrasetika. Laporan Penelitian Universitas Brawijaya. Malang.
- [5] Khalil, A.A., 2006. Nutritional improvement of an Egyptian breed of mung bean by probiotic lactobacilli. J. Biotechnology. Egypt. pp.206-212.
- [6] Effendi, M.H., S. Hartini, A.M. Lusiastuti. 2009. Peningkatan kualitas yogurt dari susu kambing dengan penambahan bubuk susu skim dan pengaturan suhu pemeraman. J. Penelit. Med. Eksakta. pp. 185-192.
- [7] Garbut J. 1997. Essensial of Food Microbiology Chapter 10. London: Arroll a Member of Hodder Headline. P: 190-193.
- [8] Li, S., H. Walsh, S. Gokavi, M. Guo. 2012. Interactions between *Lactobacillus acidophilus* strains and the starter cultures, *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* during fermentation of goats'

- milk. J. Biotechnology. USA. pp.11271–11279.
- [9] Shah, N.P. 1999. Symposium: Probiotic Bacteria, Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. Australia.
- [10] Elizabeth, Ng W., M. Yeung, P.S. Thong. 2006. Effects of yogurt starter cultures on the survival of *Lactobacillus acidophilus*. California.
- [11] Kailasapathy, K. & J. Chin. 2000. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. J. Immunology and CellBiology. Australia. pp.80-88.
- [12] Ramadzanti, A. 2006. Aktivitas Protease dan Kandungan Asam Laktat pada Yoghurt yang Dimodifikasi *Bifidobacterium bifidum*. Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- [13] Kunaepah, U. 2009. Pengaruh Lama Fermentasi dan Konsentrasi Glukosa Terhadap Aktivitas Antibakteri, Polifenol Total. J. Media Gizi Pangan. Makassar. pp.13-20.
- [14] Legowo, A. M. 2006. Teknik Pengolahan Susu. Program Studi Teknologi Hasil Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Diponegoro: Semarang.
- [15] Sunarlim, R. dan H. Setiyanto. 2001. Penggunaan Berbagai Tingkat Kadar Lemak Susu Kambing dan Susu Sapi Terhadap Mutu dan Cita Rasa Yoghurt. BPT. Bogor. pp.371-378.
- [16] Sunarlim, R. dan H. Setiyanto. 2008. Pengaruh Kombinasi *Lactobacillus acidophilus* dengan Starter Yoghurt (*Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus*) Terhadap Mutu Susu Fermentasi. BPT. Bogor. pp.317-326.
- [17] Cavalli S.V., S.V. Silva, C. Cimino, F.X. Malcata, N. Priolo. 2006. Hydrolysis of caprine and ovine milk proteins, brought about by aspartic peptidases from *Silybum marianum* flowers: Argentina-Portugal. pp.1-7.
- [18] Bonizzi, I., J.N. Buffoni, M Feligini. 2009. Quantification of bovine casein fractions by direct chromatographic analysis of milk. J. Chromatography. Italy. pp.165-168.
- [19] Haenlein, G.F.W. 2004. Goat milk in human nutrition. J. SmallRumres. United States of America. pp.155-163.
- [20] ZEVCHAK, S.E. 2007. The Impact of Agglomeration on Flavor and Flavor Stability of Whey Proteins. The Thesis. The Graduate

Faculty of North California States University.
United States of America.

Mobilization of CD4⁺, CD8⁺, and B220⁺ on Broiler Chicken Spleen with Feed Contained *Polyscias obtusa* Post Infection of *Salmonella typhimurium*

Andi Rizki Adi Pradana, Muhammad Sasmito Djati*, Muhaimin Rifa'i

Laboratory of Animal Physiology, Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences
Brawijaya University, Malang

ABSTRACT

Farmers in Indonesia used to provide feed with additional antibiotics to prevent the endemic disease in poultry such as New Castle Disease and Avian Influenza. This has a negative impact because the antibiotic residues will accumulate in meat and harmful to consumers. The aim of this research was to determine the role of simplicia *Polyscias obtusa* leaves as immunostimulants in broiler feed that had been infected with *Salmonella typhimurium*. Sixty of DOC (days old chicks) with initial weight 37 g were used in this experiment. The broilers were offered diets containing different levels of simplicia leaves of as follows; 0% with no infection (A₁), 0% (A₂), 0,08% (A₃), 0,16% (A₄), and 0,26% (A₅). At day 14th, the broiler orally infected with 10⁸ CFU/ml *Salmonella typhimurium*, 500 µl for each broiler. Treatments were allocated in a completely randomized design. The variable observed were the relative number of lymphocyte cell CD4⁺, CD8⁺, and B220⁺ of spleen analyzed by flowcytometry. The results obtained showed that additional simplicia *Polyscias obtusa* leaves in feed can significantly affect the development (relative number) of lymphocytes cell, especially T cells CD8⁺. Treatment A₄ (*P. obtusa* 2nd dose (0.16%) + *S. typhimurium* infection) had the best ability to increase the relative number of lymphocytes cell. These result strengthens *Polyscias obtusa* role as one of immunostimulatory agent, in terms of its active compounds (saponins and flavonoids).

Keywords : Broiler, immunostimulants, lymphocyte cell, *Polyscias obtusa*, spleen.

INTRODUCTION

Indonesia as a country with a wet tropical climate is one of the sites where the development of both pathogenic viruses and bacteria occurred easily. To overcome such problems, Indonesian stock farmer always use additional antibiotics in broiler chicken feed. Broiler is specified chicken for meat production. Broiler chicken could produce large quantities of meat. Each body parts of broiler chicken are in different form, the back contained more bones, more muscular thigh and tenderer breast with less fat. Broiler chicken had digestive organs in form of evolved suitable tract which directed for flying purpose. Broiler chicken has no teeth and jaw bones [1].

Sustainable feed consumption with additional antibiotics for broiler chicken leads to antibiotics residues accumulation in meat, due to its uncomplete secretion. Furthermore, supplementary continuous feeding with additional antibiotic was also triggered target bacteria or microorganism resistance.

Consequently, it is required additional food that can improve immune system of broiler chickens, so it can be an alternative to the use of antibiotics feed and safe for consumers.

Such additional feed is leaves of *Kedondong laut* (*Polyscias obtusa*), which is one of ethnomedicinal herbs with diverse savor. Choice on this herb based on it active compounds such as saponin and flavonoid. Saponin was known for its character on membrane permeability changes, as immunostimulants and anticarsinogen agent [2]. While flavonoid is one of substantial antioxidant to prevent free radical. Flavonoid was known acted as antibacteria, antiviral, antiinflammation, antialergy, antimutagenic, antitrombotic, and vasodilatation activity [3]. Flavonoids also play an important role in inflammatory reactions when infections happened [4].

Lymphocytes cell development in broiler chicken also maximized by *Salmonella typhimurium* bacteria as infection agent. *Salmonella typhimurium* is a pathogenic intracellular facultative bacteria in human and animals when it enter orally [5]. Intracellular facultative bacteria could live and reproduced in varies of cell types, including macrophage which leads prominent in immunity. Cellular immunity mechanism is the most appropriate mechanism

* Correspondence Address

Muhammad SasmitoDjati

Email : msdjati@ub.ac.id

Address : Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Brawijaya University, Jl. Veteran, Malang 65154

to do elimination, where antibody in blood circulation unable to reach progress antigens in cells [6,7,8]. Active compounds in *Polyscias obtuse* plant were expected to enhance lymphocytes cells development which is very important in immunity function of broiler chicken, so that conventional feed usage with antibiotic contents can be reduced.

METHODS

This research was conducted on March to July 2012 in Laboratory of Microbiology and Laboratory of Animal Physiology, Department of Biology, Laboratory of Biomedic, Faculty of Medical School, and Field Laboratory of Sumber Sekar-DAU, Faculty of Animal Husbandry, Brawijaya University.

Material and Equipments

Equipments used during the study period are petri dishes, test tubes, wire, microtube, syringes, pipettes and micropipette, suction ball, graft and oose needle, objects and glass cover, vortex, incubator, chicken feed containers, and ice box.

Material for this research are NA, NB, XLD, blood agar media, KIA and LIA, H₂O₂ solution, Gram stain of A, B, C, and D, PBS solution, mill feed of BR1, and feed conversion consisted of leaves simplicia of *P. obtusa* in three different doses, DL Metionin, salt, premix, coconut oil, cassava flour, MBM, copra, fish meal, soybean meal, and yellow corn.

Research Design

Treatments in this study were divided into five treatments, with two different groups based on broiler growth phase.

Table 1. Research Design

Treatment	Group	
	Starter	Finisher
Mill Feed	A1B1	A1B2
Mill Feed + <i>Salmonella thypimurium</i>	A2B1	A2B2
<i>Polyscias obtusa</i> (0,08 %) + <i>Salmonella thypimurium</i>	A3B1	A3B2
<i>Polyscias obtusa</i> (0,16%) + <i>Salmonella thypimurium</i>	A4B1	A4B2
<i>Polyscias obtusa</i> (0,26%) + <i>Salmonella thypimurium</i>	A5B1	A5B2

Confirmation Test

XLD (Xylose Lysine Deoxycholate) test media

Pure isolates that will be tested sampled with oose and conducted streak plate on XLD media,

then incubated in 37⁰C temperature for 24 hours. Test will show a positive result when the streak region formed black colonies.

Catalase Test

Isolate of *S. typhimurium* bacteria from NA media subculture were taken one oose, then moved (aseptically) to object glass which etched with 3% hydrogen peroxide (H₂O₂). Positive results showed by the occurrence of air bubbles.

Gram Staining Test

One oose isolates were taken and put on object glass, then treacled by Gram A stain, left for 2 minute and washed with running water. Hereafter, Gram B stain was treacled, left for 1 minute and washed with running water. Treacle again with Gram C stain, left for 30 second and washed with running water, then Gram D treacled, left for 2 minutes and again washed with running water. Last step was observation with microscope. Result showed that *S. typhimurium* were red and classified as Gram negative bacteria.

KIA and LIA Test

Positive colonies obtained from selective test on XLD media were taken one graft, inserted into KIA (Kligler Iron Agar) and LIA (Lysine Iron Agar) media, then withdrawn and formed a line along the media. Next step is incubating in 37⁰C temperature for 24 hours. Formed colonies were black colored due to the generation of H₂S.

Pathogenicity Test

Isolates of *S. typhimurium* bacteria from subculture were taken one oose and inoculated (by streak) on blood agar media petri dish. Then it was incubated in 37⁰C for 24 hours. Formed colonies were translucent.

Standard Curves of Cells Number

Standard curves of cells number obtained by cultured the colonies of *S. typhimurium* in NB (Nutrien Broth) media. Isolates suspension with NB media with different dilution were then homogenated. Absorbance of such suspension was assessed by spectrophotometer on 600 nm wavelength and cell number was counted by haemocytometer.

Bacterial Growth Curves

Bacterial Growth Curves were made by bacteria culture wich taken from 1 oose and

grown in NB 10 ml media then incubated in 37°C for 24 hours. 6 ml culture taken and mixed with 54 ml of NB media. Then sampling performed in every 1 hour, by taking it 4 ml and added 500 µl of formalin. Absorbance of each suspension per one hour was assessed by spectrophotometer on 600 nm wavelength and the number of cell was counted with haemocytometer.

Manufacture of the Conversion Feed

Manufacture of conversion feed was by mixing some material which had varies function, with major function as nutrition sources to enhance broiler chicken growth. Conversion feed were made by mixing each composition with highest percentage (mix 3) to the lowest percentage (mix 1). Simplicia of *P. obtusa* itself was mixed together within less coconut oil and yellow corn (mix 4). Mixed feed of *P. Obtusa* divided into three different doses, i.e. 0,08%, 0,16%, and 0,26%. The order of conversion feed manufacturing are by mixed Mix 3 and Mix 2 first, continued by Mix 4 and Mix 1, till the feed completely mixed.

Oral Infection of *Salmonella typhimurium*

Salmonella typhimurium bacteria in Nutrient Broth was centrifugated in 10.000 rpm for 10 minutes with 25°C. Obtained pellet then resuspended with physiological saline solution NaCl 0,9% then taken as much 500 µl and fed orally (trough mouth) for each chicken by sterilized pipette.

Lymphocytes Cell Isolation

Spleen were crushed with wire, by adding 1 ml PBS to obtain homogenates. The homogenates then moved into propylene tubes, added PBS till 12 ml. Then it was centrifugated in 2500 rpm, 4°C for 5 minutes. Supernatant removed and obtained pellet was homogenized with 1 ml PBS, taken 50 µl, moved into microtube, and centrifugated again in 2500 rpm, 4°C for 5 minutes. Last was 100-200 µl antibody addition then homogenated in 100 µl PBS.

Flowcytometry Analysis

Isolated lymphocytes cells of spleen then added with antibody Rat anti-CD4, Rat anti-CD8 and RAT anti-CD45 conjugated to PE label for CD4 cell, Per CP for B220 cell, and FITC for CD8 cell. Conjugated results incubated for 15 minutes in ice box. The sample then added with 1 ml PBS placed inside flowcytometer cuvette. Then

chosen *acquire* and the flowcytometer calculated the total cell number and the number of cells detected by labeling antibody. Obtained results then processed by *BD cellquest Pro™* program to be analyzed with Complete Randomized Design by *SPSS 16 for Windows* program. Observed variables are relative cell T lymphocytes number of CD4⁺, CD8⁺, and B220⁺.

RESULT AND DISCUSSION

Profile Comparison of CD4⁺ and CD8⁺ Cells of Starter and Finisher Phase by Flowcytometry

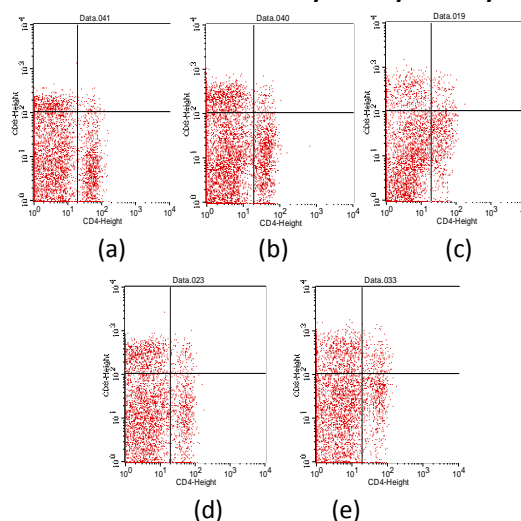


Fig 1. Profiles of CD4⁺ and CD8⁺ starter phase; (a) mill feed, (b) mill feed + *S. typhimurium*, (c) *P. obtusa* dose 0,08% + *S. typhimurium*, (d) *P. obtusa* dose 0,16% + *S. typhimurium*, (e) *P. obtusa* dose 0,26% + *S. typhimurium*

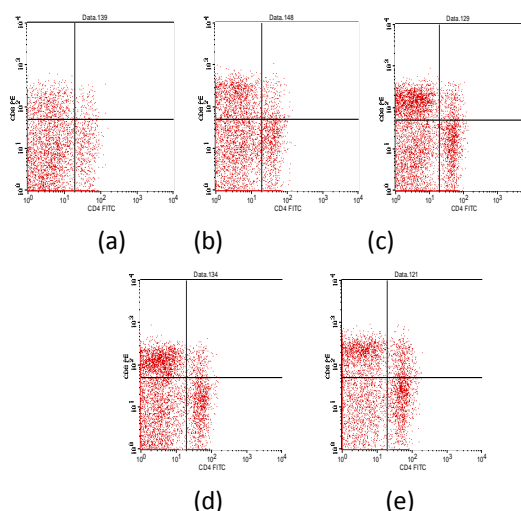


Fig 3. Profiles of CD4⁺ and CD8⁺ starter phase; (a) mill feed, (b) mill feed + *S. typhimurium*, (c) *P. obtusa* dose 0,08% + *S. typhimurium*, (d) *P. obtusa* dose 0,16% + *S. typhimurium*, (e) *P. obtusa* dose 0,26% + *S. typhimurium*

The profiles (Fig 2 and 3) showed a significance increase on relative cell number of either CD4⁺ or CD8⁺ based on growth of broiler chicken. Distinctive CD8⁺ cell, different treatment (dose of *P. obtusa* leaves simplicia in feed) also affected relative cell number growth. Best treatment for increasing relative cell number of CD8⁺ either on starter or finisher is Treatment A₄ (*P. obtusa* dose 2 (0,16%) + *S. Typhimurium* infection). The highest relative number on starter is 19,77%, whereas finisher phase is 35,69%.

Comparison of Average Cell Relative Number of CD4⁺, CD8⁺, and B220⁺ on Spleen Organ of Broiler Chicken in Starter and Finisher Phase

Result of analysis of variance or ANOVA showed that cell relative number of CD4⁺ on starter and finisher phase was significantly different (p<0,05). It showed that cell relative number of CD4⁺ affected by treatment period (different growth phase), nonetheless it was not affected by different treatments. Age factor is one determinants of immunity system in avian to had optimal works, beside external factor such as dose of infected antigen virulence ability [9].

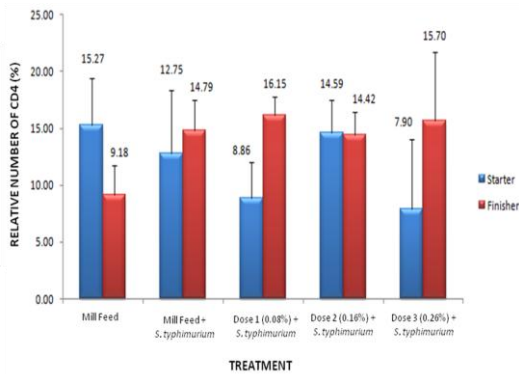


Fig 4. Relative Cell Number of T CD4⁺ (%) Starter and Finisher Phase

Increasing of relative number of CD4⁺ was needed to maximize important character enrolled by the cell itself. T helper CD4⁺ Cell can secreted IL-2 cytokines which serves as stimulus (growth factor) for other lymphocytes cell such as cell B. Activated T helper CD4 will proliferate and differentiate into effector cells that secrete IFN-γ to activate macrophages [6,7,8].

Based on ANOVA, relatives cell number of CD8⁺ on starter and finisher phase in different treatment were significantly different (p<0,05). It indicated that relative cell number of CD8⁺ besides treatment period, were also affected by the difference of treatment (including the

different dose of *P. obtusa* simplicia in feed). The highest relative cell number of CD8⁺ either in starter or finisher is Treatment A₄ (*P. obtusa* dose 2 (0,16%) + *S. typhimurium*), were starter phase had average value of 14,56%, and finisher phase 29,30%.

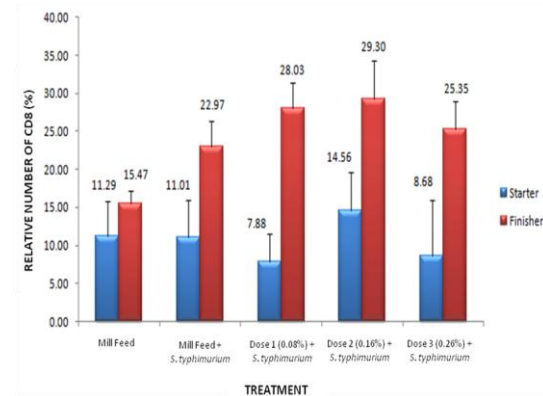


Fig 5. Relative Cell Number of T CD8⁺(%) Starter and Finisher Phase

Figure 5 showed that T CD8⁺ cell had the highest relative cell number compare to the other profile lymphocytes cell. It can be assumed from the nature of *Salmonella typhimurium* which is an intracellular facultative bacterium. Facing this pathogenic bacterium, immune system majorly handled by cellular immune responds (cell mediated immunity). Activated lymphocytes cell CD8⁺ will proliferate and differentiate into cytotoxic cell T (CTL) which can kill cell with microbes in its cytoplasm. Those microbes may be a virus which infected many types of cells, or bacteria that has been ingested by macrophage but had escaped from phagocytic vesicle and moved to cytoplasm (where it safe from phagocytic system which commonly rely on the vesicle) [6,7].

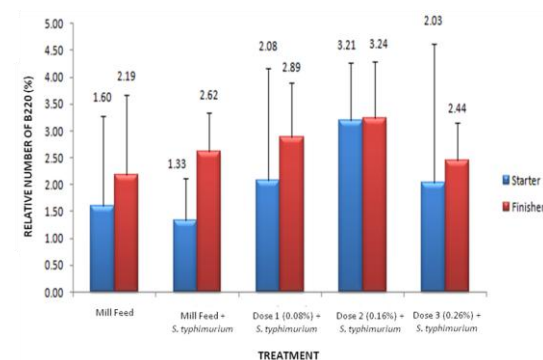


Fig 6. Relative Cell Number of B220⁺(%) on Starter dan Finisher Phase

Results on ANOVA showed that relative cell number of B220⁺ neither on starter nor finisher phase were not significantly different ($p > 0,05$). The highest relative cell number of B220⁺ either on starter or finisher phase also found in Treatment A₄ (*P. obtusa* dose 2 (0,16%) + Infection of *S. typhimurium*), i.e, starter phase had average range 3,21% while finisher had 3,24%.

Low relative number of B cells can be caused by the mechanism of B cells performance themselves. Cell B is the only cells that produce antibody [5,8]. Some pathogenic bacteria (including *Salmonella typhimurium*), parasite, and virus were replicated inside antibody undetected cells, because antibody only reaches the antigen within blood circulation and outside cell. Because of that, this pathogen destruction needs the role of lymphocytes T cells as cell mediated immunity (cellular immunity) [5].

These results confirm the role of *Polyscias obtusa* as one of immunostimulator agent, so that it can be an alternative to the requirement of broiler feed. Addition of immunostimulator compound increase lymphocytes respond and lead to cell proliferation [11,12,13,14]. Immunostimulation ability of this *Polyscias obtusa* can not be separated from its active compound, such as saponin and flavonoid. Flavonoid is an antioxidant compound that stimulates immune system by increasing the chelating and chemotaxis of lymphocytes [7,8,15]. While saponin itself was acted as anti fungal and anti bacteria, in avian (e.g. chicken), saponin functioned as additional compound to stimulate immunity system [16].

CONCLUSION

Feeding administration with addition of leaves simplicia of *Polyscias obtusa* in this research significantly affected the development (relative number) of lymphocytes cells, particularly on T cell CD8⁺ which had the highest relative cell number compare to the other two lymphocytes cell profile. This confirmed the role of *Polyscias obtusa* as one of immunomodulator agent, reviewed from its active compound. The best treatment performance in increasing relative number of lymphocytes cell is Treatment A₄ (*P. obtusa* dose 2 (0,16%) + infection of *S. typhimurium*). Results of ANOVA showed that T cell CD8⁺ development with the highest relative rate is not only affected by treatment period, but also affected by different treatments (including

the difference dose of *P. obtusa* simplicia in feed).

REFERENCES

- [1] Amrullah, I.K. 2003. *Broiler Chicken Nutrition 1st Edition*. Satu Gunung Budi, Bogor.
- [2] Francis, G., Zohar K., Harinder, P.S.M., & Klaus B. 2002. *The biological action of saponins in animal systems*, British Journal of Nutrition (2002), 88, 587–605.
- [3] Miller, A.L. 1996. *Antioxidant flavonoids: structure, function and clinical usage*. *Alt Med Rev* 1: 103-111.
- [4] Lee, D. 2008. *Vietnamese Ginseng*. <http://Vietnam Overseas - A Worldwide Resource for Vietnamese Culture, Business, and Telecommunication/2008/November.mht>. Accessed March 8th 2012.
- [5] Jawetz E., Melnick J.L., Adelberg E.A., Brooks G.F., Butel J.S., Ornston L.N. 1996. *Medical Microbiology, 20th Edition*. Jakarta : EGC
- [6] Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober J.S. 2000. *Cellular and Molecular 4 ed*. USA: W.B. Saunders Company.
- [7] Rifa'i M, Kawamoto Y., Nakashima I., Suzuki H. 2004. Essential roles of CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells in the maintenance of T cell homeostasis. *The Journal of experimental medicine*, 200 (9): 1123-1134.
- [8] Shi Z., Rifa'i M., Lee Y.H., Shiku H., Isobe K., Suzuki H. 2008. Importance of CD80/CD86–CD28 interactions in the recognition of target cells by CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells. *Immunology*, 124 (1): 121-128.
- [9] Thorns, C.J., I.M. Mc Laren & M.G. Sojka 1994. *The Use of Latex Agglutination to Specifically Detect Salmonella Enteritidis*. *Int. J. Food Microbiol.*
- [10] Janeway C. A., Paul T., Mark W., Mark J. S. 2001. *Immuno Biology*. 5th Edition. Garland Publishing, New York.
- [11] Wijayanti, L. 2005. *Lymphocytes Poliferation Activities Post Toxoplasma Dissolved Protein Intranasal Immunization during Toxoplasma gondii Infection*. *BioSMART* 7 (1): 9-13.
- [12] Rifa'i M., Shi Z., Zhang S.Y., Lee Y.H., Shiku H., Isobe K., Suzuki H. 2008. CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells recognize activated T cells via conventional MHC class I– $\alpha\beta$ TCR interaction and become IL-10-producing active regulatory cells. *International immunology*, 20 (7): 937-947.

- [13] Shi Z., Okuno Y., Rifa'i M., Endharti A.T., Akane K., Isobe K., Suzuki H. 2009. Human CD8⁺CXCR3⁺ T cells have the same function as murine CD8⁺CD122⁺ Treg. *European journal of immunology*, 39 (8): 2106-2119.
- [14] Endharti, A.T., M. Rifa'i, Z. Shi, Y. Fukuoka, Nakahara, Y. Kawamoto, K. Takeda, K. Isobe, H. Suzuki. 2005. Cutting edge: CD8+CD122+ regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN-gamma production and proliferation of CD8+ T cells. *Journal of immunology*, 175 (11): 7093-7097.
- [15] De la Fuente, M. dan V.M. Victor. 2000. *Anti-oxidants as modulators of immune function*. Immunology and Cell Biology 78: 49-54.
- [16] Cheeke, P.R., McNitt, J. I., & Patton, N.M. 2000. *Rabbit Production*. 8th Edition. Interstate publisher Inc, Denville, Illionis.

Profil Gr-1 dan CD34 Mencit yang Diinfeksi *Staphylococcus aureus* Pacsa Pemberian Ekstrak Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia*)

Dia Faroka, Sri Rahayu, Muhaimin Rifa'i*

Progam Magister Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya

Abstrak

Staphylococcus aureus menyebabkan berbagai penyakit infeksi sistemik, seperti endokarditis, osteomielitis, sindrom kulit melepuh, pneumonia dan penyakit *Toxic Shock Syndrom* (TSS). Faktor virulen *S. aureus* dapat menginduksi peningkatan neutrofil, inflamasi, serta menstimulasi sel T sehingga terjadi sekresi sitokin proinflamasi secara besar-besaran. *Staphylococcus aureus* resisten terhadap antibiotik sehingga mendorong masyarakat untuk mencari tanaman obat tradisional. Tanaman obat lebih efektif, efek samping lebih kecil, dan harga lebih murah dibandingkan obat sintetik. *Morinda citrifolia* dijadikan bahan alternatif pengobatan karena memiliki potensi sebagai anti mikroba, anti kanker, anti inflamasi dan antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil Gr-1 dan CD34 mencit yang diinfeksi *S. aureus* pacsa pemberian ekstrak air buah mengkudu (*M. citrifolia*). Penelitian menggunakan RAL faktorial. Terdapat 2 kelompok yaitu kelompok non infeksi dan infeksi. Kedua kelompok diberi ekstrak air buah *M. citrifolia* dengan dosis berturut-turut 25 mgkgBB⁻¹, 100 mgkgBB⁻¹, dan 300 mgkgBB⁻¹ selama 20 hari kemudian diinfeksi *S. aureus* sebanyak 1×10^9 sel. Deteksi jumlah relatif Gr-1 dan CD34 menggunakan *Flow cytometry*, dianalisis dengan program *CellQuest* dan dilakukan uji statistik ANOVA dan uji BNJ menggunakan program SPSS 16. Hasil penelitian menunjukkan bahwa, pada kelompok non infeksi terjadi peningkatan Gr-1 pada dosis 100 mgkgBB⁻¹, dosis 25 mgkgBB⁻¹ dan 100 mgkgBB⁻¹ serta terjadi peningkatan dan penurunan CD34 secara signifikan ($P < 0.05$). Pada kelompok infeksi terjadi penurunan Gr-1 pada dosis 300 mgkgBB⁻¹, dan peningkatan CD34 pada dosis 100 mgkgBB⁻¹. Penurunan Gr-1 dimungkinkan karena senyawa *M. citrifolia* berperan sebagai anti inflamasi.

Kata kunci: CD34, Gr-1, *Morinda citrifolia*, *Staphylococcus aureus*

Profile of Gr-1 and CD34 of Mice Which Infected by *Staphylococcus aureus*: Post-treated of Noni (*Morinda Citrifolia*) Extract

Dia Faroka, Sri Rahayu, Muhaimin Rifa'i*

Progam Magister Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya

Abstract

Staphylococcus aureus Rosenbach causes varies systemic infections, such as endocarditis, osteomyelitis, skin blister syndrome, pneumonia and *Toxic Shock Syndrome* (TSS). Virulent factors of *S. aureus* induce increases in neutrophils, inflammation and stimulate T cells resulted the massive secretion of proinflammatory cytokines. Bacteria *S. aureus* is resistant to antibiotic, encourages people to search traditional medicine plants. Medicinal plants play an important role in developing of new drugs because of their effectiveness, less side effects and relatively low cost compared to synthetic drugs. *Morinda citrifolia* L. is used as an alternative treatment because its potential as an anti-microbial, anti-cancer, anti-inflammatory and antioxidant. The purpose of this research is to determine the profile of Gr-1 and CD34 of mice which infected with *S. aureus* post-treated with noni fruit extract. Two groups of treatment are: non-infected and infected. Both groups were given extract of *M. citrifolia* fruit with doses of 25 mgkgBW⁻¹, 100 mgkgBW⁻¹, and 300 mgkgBW⁻¹ for 20 days and then infected with *S. aureus* by 1×10^9 cells. Detection of the relative amount of Gr-1 and CD34 using *Flow cytometry*, analyzed with the *Cell Quest* program and we perform ANOVA and HSD test using SPSS 16 program. The results showed that, the non-infection group increased Gr-1 at doses of 100 mgkgBW⁻¹, doses of 25 mgkgBW⁻¹ and 100 mgkgBW⁻¹ respectively, along the increase and decrease in CD34 significantly ($P < 0.05$). Infection occurs on the decline of Gr-1 at dose of 300 mgkgBW⁻¹, and increased of CD34 at doses 100 mgkgBW⁻¹. Gr-1 decline is assumed cause by the compound in *M. citrifolia* anti-inflammatory role.

Keywords: CD34, Gr-1, *Morinda citrifolia*, *Staphylococcus aureus*

* Alamat Korespondensi:

Muhaimin Rifa'i

Email : rifa123@ub.ac.id

Alamat : Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Jl. Veteran, Malang 65154

PENDAHULUAN

Staphylococcus aureus mengakibatkan berbagai macam infeksi sistemik seperti endokarditis, osteomielitis, sindrom kulit melepuh, pneumonia dan penyakit *Toxic Shock Syndrom* (TSS) [1,2]. Superantigen *S. aureus* dapat menstimulasi sel T melalui bagian V β dari *T cell reseptor* (TCR) [3,4,5], sehingga menyebabkan sekresi secara besar-besaran sitokin proinflamasi seperti, *Tumor necrosis factor- α* (TNF- α), *Interleukin-6* (IL-6) dan *Interferon- γ* (IFN- γ) [6]. Faktor virulen *S. aureus* berupa *Panton valentine leukocidin* (PVL) dapat menginduksi *Polymorphonuclear leukocytes* (PMN) dan menstimulasi mediator inflamasi [7]. Sedangkan α -toxin dapat menstimulasi kemokin CXC, yang menginduksi pergerakan neutrofil menuju daerah inflamasi di paru-paru [8].

Aktivasi neutrofil dan makrofag merupakan respon kuat imunitas *innate* dalam melawan infeksi *S. aureus* [9]. Neutrofil direkrut pada daerah inflamasi, untuk memfagosit dan menghancurkan mikroba [10]. Sel neutrofil perifer dapat dideteksi melalui mesin *Flow cytometry* dengan anti-Gr-1 [11]. Neutrofil merupakan diferensiasi akhir dari *Hematopoietic stem cell* (HSC) melalui perkembangan progenitor myeloid, yang merupakan prekursor dari granulosit [12]. Penanda dari sel hematopoietic tersebut adalah CD34.

Meningkatnya resistensi *S. aureus* terhadap antibiotik seperti penicillin, methisilin, quinolone dan vancomycin, mendorong masyarakat untuk mencari tanaman obat. Tanaman obat berperan penting terhadap perkembangan obat baru, karena lebih efektif, efek samping lebih kecil, dan harga lebih murah dibandingkan obat sintetik [13].

Salah satu tanaman obat yang dapat digunakan untuk menjaga kesehatan adalah buah mengkudu. Buah mengkudu dijadikan bahan alternatif pengobatan karena memiliki potensi sebagai anti mikroba, anti kanker, anti inflamasi dan antioksidan [14]. Senyawa kimia yang terkandung dalam buah mengkudu yaitu asam amino, antraquinon, glikosida, flavonoid, alkaloid, tannin, komponen fenol dan asam sitrat [15]. Senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, dan steroid pada buah mengkudu dengan tingkat kematangan yang berbeda, dapat berperan sebagai anti bakteri [16]. Scopoletin buah mengkudu juga berfungsi sebagai antibakteri [17]. Buah mengkudu dapat meningkatkan imunitas sel dan meningkatkan aktivitas makrofag untuk melawan pertumbuhan tumor

[18]. Sedangkan jus dari buah mengkudu dapat bersifat sebagai anti inflamasi [19]. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan mengetahui ekspresi dari jumlah relatif CD34 dan Gr-1 mencit yang diinfeksi *S. aureus* pasca pemberian ekstrak buah mengkudu.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan hewan coba mencit yang mendapat sertifikat kelaikan etik no. 112-KEP-UB. Rancangan percobaan berupa *Rancangan Acak Lengkap Faktorial* (RAL). Kriteria mencit yaitu betina, strain DDY, berumur 6 minggu, sebanyak 32 ekor. Mencit diaklimasi selama satu minggu sebelum perlakuan. Terdapat dua kelompok perlakuan, yaitu kelompok infeksi dan kelompok non infeksi, keduanya diberi ekstrak air buah mengkudu selama 20 hari, kemudian diinfeksi *S. aureus*. Tiap kelompok terdiri dari empat perlakuan, dengan 3 ulangan. Kontrol normal kelompok non-infeksi diberi aquades tanpa diinfeksi *S. aureus*, sedangkan kontrol positif kelompok infeksi diberi aquades dan diinfeksi dengan *S. aureus*.

Pembuatan Ekstrak Buah Mengkudu

Daging buah dioven pada suhu 50°C, selama lima hari, *diblender* menjadi serbuk halus, diayak sehingga diperoleh simplisia. Simplisia sebanyak 5 gram dilarutkan dalam 50 ml aquades, dipanaskan hingga mencapai 80°C, kemudian dibiarkan 15 menit [20]. Selanjutnya, disaring menggunakan kertas saring. Dosis ekstrak buah mengkudu yang aman untuk manusia adalah 500-1000 mg per hari [21], dikonversikan pada mencit dengan mengalikan 0.0026 (berat mencit 20 mg). Dosis yang digunakan antara lain 25 mgkgBB⁻¹, 100 mgkgBB⁻¹, 300 mgkgBB⁻¹. Formula ini dicekokkan sekali setiap hari secara oral menggunakan sonde selama 20 hari.

Injeksi *S.aureus*

Stok kultur bakteri *S. aureus* diinokulasikan sebanyak 4 ml, kemudian ditambahkan media *Nutrient broth* (NB) sampai 40 ml dan kultur *dishaker*. Pada jam ke-8, 1 ml dari stok kultur dimasukkan ke dalam tabung dan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit dengan suhu 25°C. Pellet hasil sentrifugasi ditambahkan 100 μ l PBS. Larutan tersebut kemudian diinjeksikan sebanyak 100 μ l pada mencit. Jumlah bakteri *S. aureus* yang diinjeksikan sebesar 1x10⁹ sel. Injeksi dilakukan pada hari ke-21 secara Intraperitoneal

menggunakan *syringe* dengan ukuran 21 ½G. Pembedahan mencit dilakukan setelah 5 hari infeksi. Proses imunitas adaptif pada umumnya bekerja 4-7 hari setelah terjadinya infeksi [12].

Isolasi Sel dan Deteksi Flow cytometry

Organ *Bone marrow* digunakan untuk mengisolasi CD34, sedangkan isolasi Gr-1 dilakukan pada paru-paru. Sebelum dilakukan isolasi, *Bone marrow* dibersihkan dari sisa jaringan otot yang menempel, kemudian di-*flush* dengan PBS 1 ml menggunakan jarum ukuran 21 ½G. Organ paru-paru ditekan dengan pangkal spuit kemudian difilter menggunakan *wire*. Sel-sel limfosit dari *bone marrow* dan paru-paru dilarutkan dalam PBS sampai 6 ml, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm pada suhu 4°C selama 5 menit. Pellet diresuspensi dengan PBS 1 ml, *dipipetting*, diambil 100 µl homogenat, dilarutkan dalam 500 µl PBS. Selanjutnya larutan disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm, suhu 4°C selama 5 menit. Pelet ditambahkan *rat anti-mouse anti-CD34 PE conjugated*, dan *rat anti-mouse anti-Gr-1 FITC conjugated*, sebanyak 50 ul, diinkubasi selama 30 menit pada suhu 4°C dalam kondisi gelap. Pelet yang sudah diberi antibodi ditambahkan 300 µl PBS, *dipipetting* dan dideteksi dengan mesin *Flow cytometry*.

Analisis Data Hasil Flow cytometry

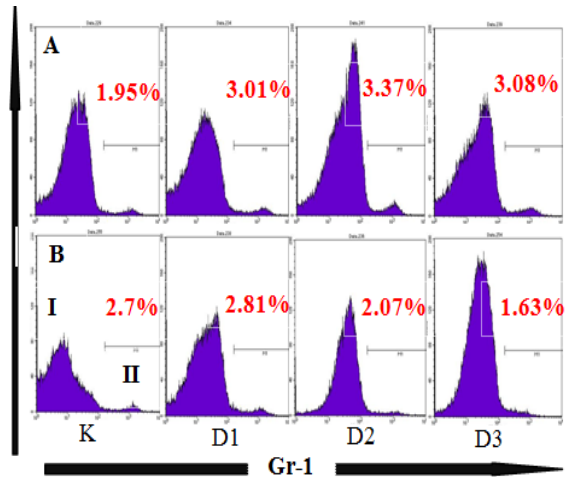
Data hasil deteksi *Flow cytometry* dianalisis menggunakan program *CellQuest*. Data yang dihasilkan berupa jumlah relatif CD34⁺ dan Gr-1, dianalisis secara statistik menggunakan ANOVA dan uji lanjut BNJ dengan menggunakan program SPSS 16.

HASIL DAN PEMBAHASAN

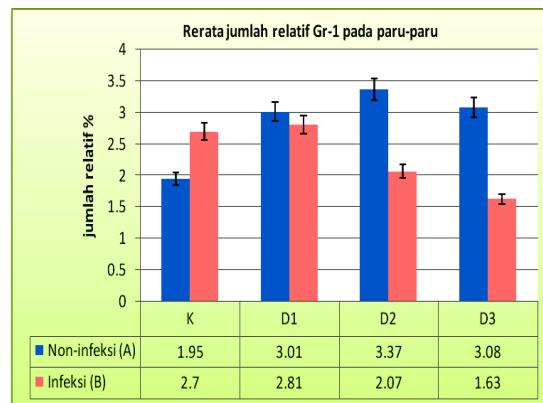
Jumlah Relatif Gr-1 di dalam Paru-Paru

Neutrofil yang bekerja dalam imunitas *innate* memiliki peranan penting untuk melawan jamur dan infeksi bakteri [22]. Berdasarkan hasil analisis program *CellQuest*, pada kontrol normal kelompok non infeksi jumlah relatif Gr-1 sebesar 1.95%, sedangkan dosis 100 mgkgBB⁻¹ menyebabkan peningkatan CD34 sebesar 3.37%. Pada kontrol positif kelompok infeksi, jumlah relative Gr-1 sebesar 2.7%, sedangkan pemberian mengkudu 300 mgkgBB⁻¹ menurunkan jumlah relative Gr-1 sebesar 1.63% (Gambar 1). Berdasarkan hasil analisis statistik uji Anova dan uji lanjut BNJ, pada kelompok non infeksi terjadi peningkatan jumlah relative Gr-1 pada dosis 100

mgkgBB⁻¹ sebesar 3.37% dibandingkan dengan kontrol normal (p>0.05), pada kelompok infeksi peningkatan dan penurunan tidak signifikan (p>0.05) (Gambar 2).



Gambar 1. Persentase jumlah relative Gr-1 pada setiap perlakuan dideteksi melalui *Flow cytometry* dan dianalisis dengan program *CellQuest* (Analisis pada organ paru-paru memakai antibodi *anti-TER119* yang dilabel dengan FITC, I=ekspresi dari sel granulosit, II = Granulosit yang mengekspresikan Gr-1, A= Non Infeksi, B= Infeksi, K= Kontrol, D1= Dosis 25 mgkgBB⁻¹, D2= Dosis 100 mgkgBB⁻¹, D3= Dosis 300 mgkgBB⁻¹).



Gambar 2. Rerata jumlah relatif Gr-1 pada setiap perlakuan hasil analisis statistik uji ANOVA RAL faktorial dan uji lanjut BNJ pada Organ spleen (K= Kontrol, D1= Dosis 25 mgkgBB⁻¹, D2= Dosis 100 mgkgBB⁻¹, D3= Dosis 300 mgkgBB⁻¹).

Sekresi neutrofil dalam proses sirkulasi secara normal 1-2% dari total populasi neutrofil pada *bone marrow* [23]. Aktivitas neutrofil secara berlebihan dalam proses inflamasi dapat menginduksi kerusakan jaringan dan disfungsi organ [24]. Peningkatan jumlah relatif Gr-1 dimungkinkan disebabkan oleh ekstrak kasar dari buah mengkudu. Menurut penelitian

sebelumnya, senyawa kimia dari ekstrak air buah mengkudu adalah karbohidrat, protein, Tannin, flavonoid, saponin, Steroid, alkaloid dan Glikosida [16]. Flavonoid dapat mempengaruhi sistem imun dan proses inflamasi [25]. Flavonoid dan Tannin merupakan komponen dari senyawa fenol yang bersifat sebagai antioksidan, antibakteri, anti-inflamasi, anti alergi, anti kanker [26].

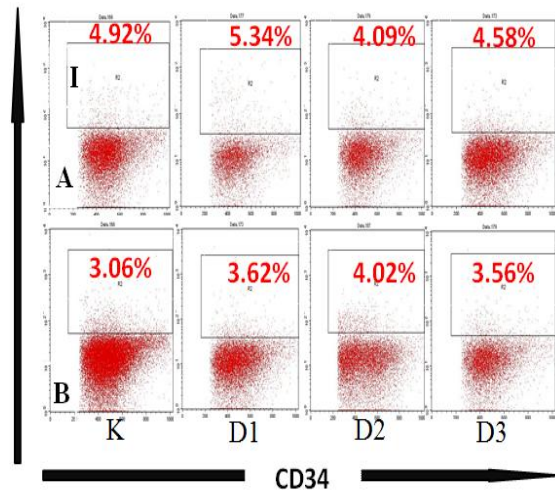
Peningkatan neutrofil pada kontrol infeksi kemungkinan disebabkan adanya *Lipoteichoic acids* (LTA) dan *peptidoglican* (PepG). Faktor virulen dari *S. aureus* memiliki kemampuan untuk membunuh neutrofil secara efektif [25]. Sedangkan protein A dapat mempengaruhi proses imunologi [28]. LTA dan PepG menyebabkan inflamasi akut pada paru-paru, melalui peningkatan PMN [29]. Infeksi *S. aureus* selama 48 jam dapat meningkatkan jumlah PMN di jaringan infeksi dan menurunkan 80% PMN didalam bone marrow [30]. Migrasi neutrofil saat terjadi infeksi, inflamasi maupun non infeksi dipengaruhi adanya sinyal kemotaktik berupa KC, MIP-2 dan receptor CXCR2 [31]. α -toxin dapat menstimulasi kemokin CXC, sehingga neutrofil menuju daerah inflamasi [8].

Pada kelompok infeksi, pemberian mengkudu dosis 300 mgkgBB⁻¹ menyebabkan penurunan jumlah neutrofil sebesar 1.63% dibandingkan dengan kontrol positif kelompok infeksi sebesar 2.7%. Hal ini disebabkan oleh senyawa dari mengkudu bersifat sebagai antiinflamasi sehingga kemungkinan dapat menurunkan jumlah relatif Gr-1. Penelitian sebelumnya menjelaskan bahwa scopoletin dari *M. citrifolia* bersifat sebagai antiinflamasi dan antibakteri [30]. Senyawa flavonoid berupa polifenol dapat menghambat ekspresi gen proinflamasi melalui penghambatan *Nuclear Factor Kappa B* (NF-Kb) [33]. Ekstrak air buah mengkudu, secara signifikan pada dosis 200 mg/kg dapat bersifat sebagai anti inflamasi [34].

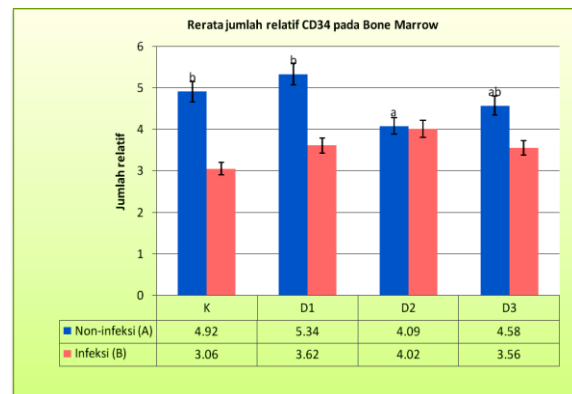
Jumlah relatif CD34 pada Bone marrow

Hasil analisis program *CellQuest* menunjukkan bahwa, pada perlakuan non infeksi dosis 25 mgkgBB⁻¹ terjadi peningkatan CD34 sebesar 5.34% dibandingkan dengan kontrol normal sebesar 4.52%. Pada kontrol positif kelompok Infeksi, jumlah relatif CD34 sebesar 3.06%, dan meningkat pada dosis 100 mgkgBB⁻¹ sebesar 4.02% (Gambar 3.) Berdasarkan hasil analisis statistik uji Anova dan uji lanjut BNJ, pemberian dosis 25 mgkgBB⁻¹ pada kelompok non infeksi, menyebabkan peningkatan CD34 sebesar 5.34%, peningkatan tersebut tidak berbeda nyata

dengan kontrol normal sebesar 4.92%. Sedangkan pemberian dosis 100 mgkgBB⁻¹ terjadi penurunan CD34 secara signifikan (P<0.05) sebesar 4.09%. Pada kelompok infeksi peningkatan dan penurunan jumlah relatif CD34 tidak signifikan (Gambar 4).



Gambar 3. Persentase jumlah relatif sel CD34 pada setiap perlakuan melalui *Flow cytometry* dan dianalisis dengan program *CellQuest* (Analisis pada organ paru-paru memakai antibodi *anti-CD34* yang dilabel dengan PE, I=ekspresi dari CD34, A = Non Infeksi, B = Infeksi, K= Kontrol, D1= Dosis 25 mgkgBB⁻¹, D2= Dosis 100 mgkgBB⁻¹, D3= Dosis 300 mgkgBB⁻¹).



Gambar 4. Rerata jumlah relatif sel CD34 pada setiap perlakuan hasil analisis uji ANOVA RAL faktorial dan uji lanjut BNJ pada organ spleen (K= Kontrol, D1= Dosis 25 mgkgBB⁻¹, D2= Dosis 100 mgkgBB⁻¹, D3= Dosis 300 mgkgBB⁻¹).

CD34 merupakan penanda dari sel-sel hematopoietik, sel-sel hematopoietik akan berdiferensiasi menjadi limfosit, granulosit maupun megakariosit [10]. Meningkatnya CD34⁺ diakibatkan adanya mitogen dan senyawa aktif dari ekstrak kasar mengkudu yang dapat

meningkatkan CD34⁺. Senyawa yang terdapat pada buah mengkudu yaitu karbohidrat, protein, asam amino, lemak, minyak, antraquinon, glycoside, flavonoid, alkaloid, tannin, fenol, asam sitrat [15]. Mitogen dari tumbuhan dapat menginduksi sistem imun yaitu proliferasi dan diferensiasi sel T dan B [35].

Penurunan CD34 dapat dimungkinkan adanya *homing* dari CD34 dan apoptosis dari CD34. Penelitian sebelumnya menjelaskan bahwa reduksi dari ekspresi CXCR4 berkontribusi terhadap mobilisasi sel CD34⁺ pada jaringan perifer [36]. Proses terjadinya apoptosis CD34 disebabkan peningkatan sel CD40⁺ pada kontrol sehat dibandingkan CD40⁻ [37]. Dalam proses apoptosis, kerja dari CD40 dimediasi oleh *Tumor necrosis factor* (TNFR) dan Fas [38]. Interaksi antara CD40 dengan Fas dapat menyebabkan proses apoptosis sel hepatosit manusia [39]. Faktor inhibitor seperti TNF α dan IFN γ dapat memediasi penghambatan sel hematopoietic [40,41,42,43,44,45]. Caspase-3/CPP32, Caspase-3/CPP32 merupakan famili dari IL-1 *converting enzyme* (ICE), yang berperan terhadap proses apoptosis pada sel mamalia [46].

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Pada kelompok non infeksi terjadi peningkatan Gr-1 pada dosis 100 mgkgBB⁻¹, dosis 25 mgkgBB⁻¹ dan 100 mgkgBB⁻¹ dapat meningkatkan dan menurunkan CD34 (P<0.05). Pada kelompok Infeksi terjadi penurunan Gr-1 pada dosis 300 mgkgBB⁻¹, dan peningkatan CD34 pada dosis 100 mgkgBB⁻¹. Penurunan Gr-1 dimungkinkan karena senyawa *M. citrifolia* yang berperan anti inflamasi.

Saran

Saran yang perlu dilakukan adalah perhitungan jumlah absolut dari parameter sel-sel hemtopoietik untuk melengkapi data jumlah relatif pada penelitian ini.

Ucapan Terimakasih

Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian Tesis, Antibodi dan Program *CellQuest* yang didanai oleh Bapak Muhaimin Rifai S.Si, Ph.D. Med.Sc. Terimakasih kepada beliau, Ibu Sri Rahayu dan Tim Immunologi yang telah banyak membantu pelaksanaan penelitian ini sehingga dapat berjalan dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Ontengco, D.C., L.A. Baltazar, R.S. Santiago, R.R. Matias, C.A. Isaac. 2003. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Filipino patients (1999-2003). *Phil. J. Microbiol. Infect. Dis.*, 17(1):4-8.
- [2] Salyers, A.A. and D.D. Whitt. 1994. *Bacterial pathogenesis a molecular approach*. Washington D.C., ASM Press, 84 p.
- [3] Llewelyn, M. and J. Cohen. 2002. Superantigens: microbial agents that corrupt immunity. *Lancet. Infect. Dis.*, 2(3): 156-162.
- [4] Rifa'i, M., Z. Shi, S.Y. Zhang, Y.H. Lee, H. Shiku, K. Isobe, H. Suzuki. 2008. CD8⁺CD12⁺ regulatory T cells recognize activated T cells via conventional MHC class I- $\alpha\beta$ TCR interaction and become IL-10-producing active regulatory cells. *International immunology*, 20 (7): 937-947.
- [5] Shi, Z., M. Rifa'i, Y.H. Lee, H. Shiku, K. Isobe, H. Suzuki. 2008. Importance of CD80/CD86-CD28 interactions in the recognition of target cells by CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells. *Immunology*, 124 (1): 121-128.
- [6] Endharti, A.T., M. Rifa'i, Z. Shi, Y. Fukuoka, Nakahara, Y. Kawamoto, K. Takeda, K. Isobe, H. Suzuki. 2005. Cutting edge: CD8+CD122+ regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN-gamma production and proliferation of CD8+ T cells. *Journal of immunology*, 175 (11): 7093-7097.
- [7] Siqueira, J.A., C. Speeg-Schatz, F.I.S. Freitas, J. Sahel, H. Monteil, G. Prevost. 1997. Channel-forming leucotoxins from *Staphylococcus aureus* cause severe inflammatory reactions in a rabbit eye model. *J. Med. Microbiol.*, 46: 486-494.
- [8] Barlett A.H., T.J. Foster, A. Hayashida, P.W. Park. 2008. α -Toxin facilitates the generation of CXC Chemokine gradients and stimulates Neutrophil homing in *Staphylococcus aureus* Pneumonia. *The Journal of Infectious Diseases*, 198(10): 1529-1535.
- [9] Small, C.L., S. McCormick, N. Gill, K. Kugathasan, M. Santosuosso, N. Donaldson, D.E. Heinrichs, A. Ashkar, Z. Xing. 2008. NK cells play a critical protective role in host defense against acute extracellular *Staphylococcus aureus* bacterial infection in the lung. *J. Immunol.*, 180(8): 5558-5568.
- [10] Abbas, K. and A. Lichtman. 2005. *Cellular and Molecular Immunology*. Fifth Edition. Philadelphia: Saunders Elsevier.

- [11] Daley, J.M., A.A. Thomay, M.D. Connolly, J.S. Reichner. And J.E. Albina. 2008. Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J. Leukoc. Biol.*, 83: 64–70.
- [12] Rifa'i, Muhaimin. 2011. *Autoimun dan Bioregulator*. Malang: UB Press.
- [13] Raj, V.B.A., V. Murugamani, P. Mounika, B. Madhuri. 2011. Preliminary phytochemical investigation of *Givotia Moluccana* Stem. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 2 (3): 1307-1313.
- [14] Wang, M.Y., B. West, C.J. Jensen, D. Nowicki, C. Su, A.K. Palu, G. Anderson. 2002. *Morinda citrifolia* (Noni): a literature review and recent advances in Noni research. *Acta Pharmacologica Sinica*, 23: 1127-1141.
- [15] Nayak, S. and S. Mengi. 2010. Preliminary physicochemical and phytochemical evaluation of *Morinda citrifolia* fruit extractives. *Int. J. Pharm. Sci.*, 2(4): 150-154.
- [16] Ramesh, S., M. Radhakrishnan, R. Anburaj, R. Elangomatavan, S. Patharajan. 2012. Physicochemical, phytochemical and antimicrobial studies on *Morinda citrifolia* l. Fruits at different maturity stages. *Int. J. Pharm. Sci.*, 4(5): 473-476.
- [17] Duncan, S.H., H.J. Flint, C.S. Stewart. 1998. Inhibitory activity of gut bacteria against *Escherichia coli* O157 mediated by dietary plant metabolites. *FEMS Microbiology Letters*, 164: 258-283.
- [18] Hirazumi, A. and E. Furusawa. 1999. An immunomodulatory polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (Noni) with antitumor activity. *Phytotherapeutic Research*, 13: 380-387.
- [19] Wang, L.S., H.J. Liu, Z.B. Xia, H.E. Broxmeyer, and L. Lu. 2000. Expression and activation of caspase-3/ CPP32 in CD34+ cord blood cells is linked to apoptosis after growth factor withdrawal. *Exp. Hematol.*, 28: 907-915.
- [20] Arifiandari and C. Condro. 2007. Pengaruh pemberian fraksi air buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) terhadap kadar Glutamat Piruvat Transaminase-Serum pada Mencit BALB/C yang diinduksi Vaksin Hepatitis B. Tesis. Pascasarjana Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.
- [21] Murray M.T. 2000. Noni juice - the passing of another panacea? *Natural Medicine Online*, 3(2): 3.
- [22] McPhail L.C., S.L. Strum, P.A. Leone, S. Sozzani. 1992. The neutrophil respiratory burst mechanism. *Immunol. Ser.*, 57: 46-76.
- [23] Semerad, C.L., F. Liu, A.D. Gregory, K. Stumpf, D.C. Link. 2002. G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood. *Immunity*, 17(4): 413-423.
- [24] Kollef, M.H. and D.P. Schuster. 1995. The acute respiratory distress syndrome. *N. Engl. J. Med.*, 332(1): 27–37.
- [25] Middelton, E.J.R., C. Kandaswami, T.C. Theoharides. 2000. The effect of plant flavonoids on mammalian cells implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacological review*, 52(4): 673-751.
- [26] Rievere, C., J.H. Van Nguyen, L. Pieters, B. Dejaegher, Y.V. Heyden, C.V. Minh, J. Quetin-Leclercq. 2009. Polyphenols isolated from antiradical extracts of *Mallotus metcalfeanus*. *Phytochemistry*, 70: 86-94.
- [27] Voyich, J.M., K.R. Braughton, D.F. Sturdevant, A.R. Whitney, B. Said-Salim, S.F. Porcella, R.D. Long, D.W. Dorward, D.J. Gardner, B.N. Kreiswirth, J.M. Musser, F.R. Deleo. 2005. Insights into Mechanisms Used by *Staphylococcus aureus* to Avoid Destruction by Human Neutrophils. *J. Immunol.*, 175: 3907–3919.
- [28] Jawetz E, J.L. Melnick, E.A. Adelberg, G.F. Brooks, J.S. Butel, L.N. Orston. 1996. *Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi 20. Diterjemahkan oleh Nugroho E, Maulany RF. Jakarta: Buku Kedokteran EGC :211-215
- [29] Leemans, J.C, M. Heikens, K.P. Kessel. 2003. Lipoteichoic acid and peptidoglycan from *Staphylococcus aureus* synergistically induce neutrophil influx into the lungs of mice. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 10: 950–953.
- [30] Kim, M.H., J.L. Granik, C. Kwok, N.J. Walker, D.L. Borjesson, F.R.E. Curry, L. Miller, S.I. Simon. 2011. Neutrophil survival and c-kit+ progenitor proliferation in *Staphylococcus aureus* infected skin wounds promote resolution. *American Society of Hematology blood*, 128(7): 1812-1820.
- [31] Belperio, J.A, M.P. Keane, M.D. Burdick. 2002. Critical role for CXCR2 and CXCR2 ligands during the pathogenesis of ventilator-induced lung injury. *J. Clin. Invest.*, 110: 1703–16.
- [32] Deng, S., A.K. Palu, B.J. West, C.X. Su, B.N. Zhou, and J.C. Jensen. 2007. Lipoxigenase inhibitory constituents of the fruits of Noni

- (*Morinda citrifolia*) collected in Tahiti. *Journal of Natural Products*, 70(5):859-862.
- [33] Ruiz, P.A. and Dirk Haller. 2006. Functional Diversity of Flavonoids in the Inhibition of the Proinflammatory NF- κ B, IRF, and Akt Signaling Pathways in Murine Intestinal Epithelial Cells. *J. Nutr.*, 136 (3): 664-671.
- [34] McKoy, M.L.G., E.A. Thomas, O.R. Simon. 2002. Preliminary investigation of the anti-inflammatory properties of an Aqueous Extract from *Morinda citrifolia* (noni). *Proc. West Pharmacol. Soc.*, 45:76-78.
- [35] Folds, J.D. and J.L. Schmitz. 2003. Clinical and laboratory assessment of immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 111(2): 702-11.
- [36] Alessandro, A., L. Turchetto, M. Cota, A. Cipponi, A. Brambilla, C. Arcelloni, R. Paroni, E. Vicenzi, E. Bordignon, G. Poli. 1999. Human CD34+ Cells Express CXCR4 and Its Ligand Stromal Cell-Derived Factor-1. Implications for Infection by T-Cell Tropic Human Immunodeficiency Virus. *Blood*, 94(1): 62-73.
- [37] Katerina, P., I. Mavroudi, P. Sidiropoulos, A.G. Eliopoulos, D.T. Boumpas, H.A. Papadaki. 2009. Increased expression of CD40 on Bone Marrow CD34 Hematopoietic Progenitor Cells in patients with Systemic Lupus Erythematosus contribution to Fas-Mediated Apoptosis. *Arthritis and Rheumatism*, 60(2):543-552.
- [38] Georgopoulos, N.T., L.P. Steele, M.J. Thomson, P.J. Selby, J. Southgate, and L.K. Trejdosiewicz. 2006. A novel mechanism of CD40-induced apoptosis of carcinoma cells involving TRAF3 and JNK/AP-1 activation. *Cell Death Differ*, 13(10): 1789-801.
- [39] Afford, S.C., S. Randhawa, A.G. Eliopoulos, S.G. Hubscher, L.S. Young, D. H. Adams. 1999. CD40 activation induces apoptosis in cultured human hepatocytes via induction of cell surface fas ligand expression and amplifies fas-mediated hepatocyte death during allograft rejection. *J. Exp. Med.*, 189: 441-6.
- [40] Yamashita, K., A. Takahashi, S. Kobayashi, H. Hirata, P.W.Jr. Mesner, S.H. Kaufman, S. Yonehara, K. Yamamoto, T. Uchiyama, M. Sasada. 1999. Caspases mediate tumor necrosis factor induced neutrophil apoptosis and down regulation of reactive oxygen production. *Blood*, 93(2): 674-85.
- [41] Rifai'i, M. 2010. Andrographolide ameliorate rheumatoid arthritis by promoting the development of regulatory T cells. *Journal of Tropical Life Science*, 1 (1): 5-8.
- [42] Lee, Y.H., M. Rifa'i. 2011. CD4⁺CD25⁺ FOXP3⁺ Regulatory T Cells In Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Journal of Tropical Life Science*, 1 (2): 69-75.
- [43] Shi, Z., Y. Okuno, M. Rifa'i, A.T. Endharti, K. Akane, K. Isobe, H. Suzuki. 2009. Human CD8⁺CXCR3⁺ T cells have the same function as murine CD8⁺CD122⁺ Treg. *European journal of immunology*, 39 (8): 2106-2119.
- [44] Lee, Y.H., Y. Ishida, M. Rifa'i, Z. Shi, K. Isobe, H. Suzuki. 2008. Essential role of CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells in the recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Immunology*, 180 (2): 825-832.
- [45] Rifa'i, M., Y. Kawamoto, I. Nakashima, H. Suzuki. 2004. Essential roles of CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells in the maintenance of T cell homeostasis. *The Journal of experimental medicine*, 200 (9): 1123-1134.
- [46] Wang, L.S., H.J. Liu, Z.B. Xia, H.E. Broxmeyer, L. Lu. 2000. Expression and activation of caspase-3/CPP32 in CD34+ cord blood cells is linked to apoptosis after growth factor withdrawal. *Exp. Hematol.*, 28: 907-915.

Effectivity of *Polyscias obtusa* Simplicia as Immunomodulator on Caeca Tonsil of Broiler Post Infection of *Salmonella typhimurium*

Mutya Farsely, Muhammad Sasmito Djati*, Muhaimin Rifa'i

Laboratory of Animal Physiology, Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences
Brawijaya University, Malang

ABSTRACT

Antibiotics usually used to protect the animals from pathogens, but antibiotics have residues which have negative side effect. Antibiotics can substituted with *Polyscias obtusa* simplicia because this plant contains a chemical compound called Flavonoid which roles in immune system as immunomodulator. This study aimed to determine the mobilization and development of CD4⁺, CD8⁺ and B220⁺ T-Cells lymphocytes from thymus of broiler that have been given additional feed *Polyscias obtusa* after infected by *Salmonella typhimurium* and determine the optimum dose of the addition of simplicia's *Polyscias obtusa* which can influence the mobilization of T-Cells lymphocyte in Thymus. The procedure are confirmation of the *Salmonella typhimurium* isolates, prepare the simplicia's *Polyscias obtusa* and *Salmonella typhimurium* bacterial culture, orally infections in 500 µl, prepare supplemented feeds by three doses (i.e. dose 1 (0.08%), dose 2 (0.16%) and dose 3 (0.26%)), thymus and T-Cells lymphocytes isolation and *Flowcytometry* analysis. The results showed that feeding with antibiotoxic feed + *Salmonella* infection and natural feed with additional *Polyscias obtusa* simplicia's dose 2 (0.16%) have increased the relative number of CD4⁺, CD8⁺ and B220⁺. T-Cells lymphocytes of thymus with different time feeding period have significant differences for relative number of CD8⁺. This result gave proof that *Polyscias obtusa* simplicia have the ability and influence to increase the body's immune system.

Keywords : Broiler, *Polyscias obtusa*, *Salmonella typhimurium*, T-Cells lymphocyte, Thymus

INTRODUCTION

Recently, drugs usage for the prevention and treatment of animal diseases is becoming increasingly important. This is due to the increasing demand of livestock products, such as meat, eggs and milk. Presence of antibiotic residues in livestock products and the development of resistant microbes consumed either by animal or human caused by less attention at sub-therapeutic levels to the antibiotics usage [1]. Therefore, to maintain production efficiency on safe consumption of broiler farms, it is necessary to arrange the use of alternative feed supplement that can boost the immune system of the chickens.

Various kinds of medicinal herbs widely used for humans and animals as a substitute for antibiotics. One such plant is *Kedondong Laut* (*Polyscias obtusa*) that contain flavonoids and new polysciosida called polysciosida AH on its leaves and root [2]. Flavonoid compound known as agent of immunomodulator, antiviral and

antioxidant [3]. Flavonoid also estimated to promote lymphocytes proliferation, increasing the number of T cell and improving IL-2 activities [4,5]. Francis *et al.* [3] mentioned that saponin is an important nutrition compound for human and animals. Saponin also known acted on membrane permeability, as immunostimulant, agent of anticarsinogen and hypocholesterolaemic.

Based on previous research, leaves extract of *Polyscias obtusa* can mobilize haematopoietic stem cells (CD34⁺, T CD4⁺, CD8⁺, CD25⁺ and CD62L) in *S. thypii* infected mice [6]. Empirical fact also found in Sleman, Yogyakarta, where this herb widely used as an animal feed and known that animals that consume these plants able to avoid the attack of avian flu outbreaks.

Based on these descriptions, scientific experiment needs to be done to determine the modulation and development of chicks cellular immunity after additional food feeding of leaves simplicia of *Polyscias obtusa* which has been infected before with *Salmonella typhimurium*, by observing the alteration cell number of CD4⁺ and CD8⁺ cell in caeca tonsil organ.

METHODS

This research was conducted in March-September 2012 in Laboratory of Microbiology, Laboratory of Animal Physiology, Department of

* Correspondence Address

Muhammad SasmitoDjati

Email : msdjati@ub.ac.id

Address : Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Brawijaya University, Jl. Veteran, Malang 65154

Biology, Facultu of Mathematics and Natural Sciences, and Field Laboratory of *Sumber Sekar-DAU* Faculty of Animal Husbandry, Brawijaya University, Malang.

Material and Equipments

Equipment of this research are cages, lights, place chicken feed containers, chaff, reaction tubes, petri dish, oose, Bunsen, vollume pipettes, suction ball, Erlenmeyer, micropipettes, blue tip, wire, syringe, propylene tubes, ice box, sentrifuge, and flowcytometer. The used materials are media of XLD, KIA, LIA, NB, NA, stain gram of A, B, C and D, H₂O₂ solution, aquades, mill feed of BR1, artificial feed (yellow corn, DL Metionin, fish meal, premix, copra, soybean meal and salt), mineral water, caeca tonsil, PBS, and antibody of Rat anti-CD4⁺ PE anti Rat anti-CD8⁺ FITC.

Confirmation Test

XLD Media Test

Subcultured colonies inoculated in XLD (*Xylose Lysine Deoxycholate*) media and then incubated for 24 hours at temperature of 37°C. Positive result on XLD media showed by black colored colonies.

Catalase Test

Subcultured colonies smeared on glass object which treaced with one drop of hydrogen peroxide (H₂O₂) 3%. Positive result showed when there were gas bubbles.

Gram Staining Test

Positive colonies on XLD smeared up on sterilled glass object, then fixated on flame and treaced with gram staining A (Hucker's crystal violet), B (Lugol'siodine), C (alcohol), and D (safranin) respectively for every 1 minutes and washed in running water, then dried and conducted morphology observation. The result showed that the bacteria is gram negative by its red colored cells.

KIA LIA Test

Positive colonies taken with graft and putted on KIA and LIA slant media then lines drawn to form lineage on slant. And then incubated in 37°C for 24-48 hours. Black colored colonies on media indicated positive test results.

Standard Curve

Isolates suspension cultured in Nutrien Broth media in different ratio between the

concentration (dillution) explained in Table 1. Each suspension absorbance was assessed with spectrophotometer on 600 nm wave length and cell number was counted with haemocytometer.

Table 1. Comparison of bacteria of *Salmonella typhimurium* with steril media

Ratio	Culture Stock (ml)	Steril Media (ml)
8:0	0	4
7:1	0,5	3,5
6:2	1	3
5:3	1,5	2,5
4:4	2	2
3:5	2,5	1,5
2:6	3	1
1:7	3,5	0,5
0:8	4	0

Growth Curve

Bacteries culture were taken for 1 oose to grown in Nutrien Broth 10 ml media then incubated in 37°C for 24 hours. A total of 6 ml of culture mixed with 54 ml of NB medium. Sampling were done in every 1 hours by taking 4 ml and the addition of 500 µl formalin. Subsequently, absorbance were calculated with a spectrophotometer at a wavelength of 600 nm and the number of cells measured with haemocytometer.

Feed Manufacture

Leaves of *P. obtusa* which has been separated from the stalks washed, wind dried and smoothed with a dry blender, then weighed to the artificial feed additives according to treatment, i.e. dose of 0,08%, 0,16% and dosis 0,26% of the total feed. Feed manufactured in order of feed percentage composition, from lowest to the highest dose.

Oral Infection of *Salmonella typhimurium*

Bakteri *Salmonella typhimurium* dalam *Nutrient Broth* disentrifuse dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit suhu 25^o C. Obtained pellet resuspended in physiological saline solution 0.9% NaCl, then taken 500 mL and fed orally (through the mouth) to infected chickens.

Isolation Lymphocytes Cell

Caeca tonsil organ taken from chickens that have been dissected. Caeca tonsils crushed clockwise with syrynge base on *wire* as filter.

Obtained results putted in propylene tubes and added 12 ml PBS, and centrifuged at 2500 rpm, temperature of 4°C, for 5 minutes. Supernatant were removed and remained pellet resuspended with 1 ml PBS. Pipetting applied then to get homogenates. 50 µl homogenates moved into another new microtube and added 500 µl PBS. Then centrifuged at 2500 rpm, temperature 4°C for 5 minutes. Supernatant was discarded and pellet containing lymphocytes was obtained.

Flowcytometry Analysis

Isolated cells from caeca tonsil incubated in 50µL *Rat* anti-CD4⁺ PE (*R-Phycoerythrin*) and *Rat* anti-CD8⁺ FITC (*Fluorescence Isothiocyanat*) antibodies for 15 minutes. Sample then added with 1 ml PBS moved into flowcytometer cuvette. Furthermore, flowcytometer calculated the relative number of total cells and the number of cells detected by antibody labeling. Obtained result processed further with *BD cellquest Pro™* program.

Statistic Analysis

Data were analyzed with factorial complete randomized design with SPSS 16.0 program. Subsequently, data were analyzed using multiple analysis of variance. If the obtained results are significant then processed further with Tukey test.

RESULT AND DISCUSSION

Comparison of Relative Cell Number of CD4⁺ on Caeca Tonsil Organ of Starter and Finisher Group

Results in Fig. 3 showed that there is no significant difference between treatment groups in all starter group. The results were not significant presumably caused by the time treatment is still in the adaptation stage, so that the antibody response in chicks confined to a particular antigen epitopes. Immunologic respond in young animals still at the lowest levels of immunological [7].

S. typhimurium that infect 1-2 weeks aged chicks only caused low antibody response. This condition may caused by the nature of hiporesponsive cells in the immune system which has not maturely functioned yet, or dissemination of lymphoid tissue is still too early and antibody formation was rudimentary [8].

While in finisher group, the relative number of CD4⁺ significantly difference in the treatment group 0.08 % dose compared with the treatment of mill feed. However, changes in the relative number of CD4⁺ occurred in the treatment group

P. obtusa dose of 0.08 %, 0.16 %, and 0.26 %, which shows the increase of relative number of CD4⁺ in group finisher than starter, i.e. 12,22 % enhancement in treatment group of 0,08% dose *P. obtusa*. Thus it is presumably that the addition of *P. Obtusa simplicia* in the artificial feed increased the relative number of CD4⁺ caeca tonsil of Broiler with optimum doses of 0.08 %.

The real difference between the relative number of CD4⁺ starter and finisher group allegedly because flavonoids as immunomodulatory properties that can be turned into immunosuppression to the average index of phagocytic macrophages, when given in large doses and for long periods of time.

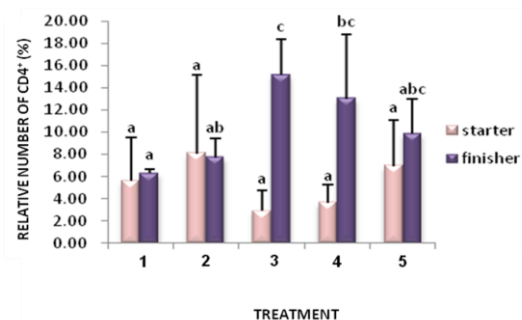


Fig 3. Cell Number of T-CD4⁺ (%) Caeca Tonsil (p<0.05)

1 = mill feed

2 = mill feed & *S. typhimurium*

3 = *P. obtusa* dose 1 (0,08 %)

4 = *P. obtusa* dose 2 (0,16 %)

5 = *P. obtusa* dose 3 (0,26 %)

Comparison of Relative Cell Number of CD8⁺ in Caeca Tonsil Organ of Starter and Finisher Group

The results in Fig. 4 shows that there is significantly no difference in the relative number of CD8⁺ in all treatment groups in both starter and finisher group (p> 0.05). However, based on the treatment period, the relative number of CD8⁺ in the *P. obtusa* treatment finisher group increased more than starter group, with the highest increase of 7.58 %, at 0.08 % dose administration of *P. obtusa*.

Mechanisms of flavonoid and alkaloid contained in *P. obtusa simplicia* as immunomodulator, i.e. by increasing the activity of IL-2 and proliferation of lymphocytes. It is known that IL-2 is a cytokine that functions as one of the factor differentiated lymphocytes. Susceptibility and resistance of animals against microbial infection depends on the activation of T-CD4⁺ cells that differentiate into two groups

based on the pattern of cytokine secretion, the response patterns of Th1 and Th2 [9,10].

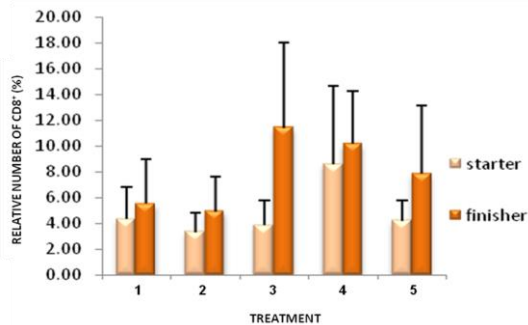


Fig 4. Number of T-CD8⁺ Cell (%) Caeca Tonsil (p<0.05)
 1 = mill feed
 2 = mill feed & *S. typhymurium*
 3 = *P. obtusa* dose 1 (0,08 %)
 4 = *P. obtusa* dose 2 (0,16 %)
 5 = *P. obtusa* dose 3 (0,26 %)

Lymphocytes subset Th1 through its production, i.e. interferon- γ (IFN- γ), IL-2 and IL-12. IFN- γ involved in the creation and presentation of antigenic peptides on the cell surface, because IFN- γ has the ability as a factor in macrophage activation. Meanwhile, IL-12 is the main and the most important cytokine in induction to Th1 subset, either *in vitro* or *in vivo* [11]. Thus, T cell differentiation into T-CD4⁺ cells increased because the role of these cytokines after administration of *P.obtusa simplicia* with different doses.

Flavonoids contained in *P. obtusa* indirectly affect the activity of T-CD8⁺ cells, so that the relative number of CD8⁺ was not significantly different among all treatment groups. Mechanism of flavonoid and alkaloid of *P. obtusa* as immunomodulator, which increased the activity of IL-2, also indirectly increase the activity of IFN- γ . IFN- γ , in addition to having a unique ability to regulate the expression of MHC II molecules, so as to improve the response of T-CD4⁺ cells lymphocytes, also increased the expression of MHC molecules I. Consequently, IFN- γ helps to improve or optimize the cytolytic activity of cytotoxic T-lymphocyte (CD8⁺) which only recognize antigen or target cell when antigen was presented with MHC molecules I. In other words, for the full differentiation, T-CD8⁺ cells need cytokines that produced by T-CD4⁺ cells or co-stimulator that expressed on infected cell [12,13,14,15,16,17].

CONCLUSION

There are significant differences between treatment groups *Polyscias obtusa* dose of 0.08% with mill feed in terms of the relative number of CD4⁺. The treatment duration lead to significant difference results on the relative number of CD4⁺ and CD8⁺ cells. The best treatment in increasing the number of CD4⁺ T lymphocytes and CD8⁺ cells were artificial feeding with dose of *Polyscias obtusa* 0.08%.

REFERENCES

- [1] Lee, D. 2008. *Vietnamese Ginseng*. Vietnam Overseas - A Worldwide Resource for Vietnamese Culture, Business, and Telecommunication. Accessed October 2nd 2012.
- [2] Huan, V.D., Sato, Y., Nguyen, T.N. & Hoang, M.C. 1998. *Oleanane Saponins From Polyscias Fruticosa*. Science direct.
- [3] Francis, G., Zohar K., Harinder, P.S.M. & Klaus, B. 2002. *The biological action of saponins in animal systems*. British Journal of Nutrition. 88, 587–605.
- [4] Abbas, A.K., Litchman, A.H. & Pober JS. 1994. *Cellular Immunology in: Cellular and molecular immunology* 2nd Ed. Philadelphia: WB. Saunders Company.
- [5] Rifa'i M., Kawamoto Y., Nakashima I., Suzuki H. 2004. Essential roles of CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells in the maintenance of T cell homeostasis. *The Journal of experimental medicine*, 200 (9): 1123-1134.
- [6] Wulan, S. 2012. *Haematopoietic Mobilization of Stem Cells by Leaves of Polyscias Obtusa in Feed to Improve Celular Immunity Broiler Chicks*. Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Brawijaya University.
- [7] Thorns, C.J., I.M. Mc Laren & M.G. Sojka 1994. *The Use of Latex Agglutination to Specifically Detect Salmonella Enteritidis*. Int. J. Food Microbiol. 21: 47– 49.
- [8] Jeurissen, S.H.M., E.M. Janse, G. Koch And G.F. Deboer. 1989. *Post Natal Development of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue in Chickens*. Cell Tissue Res. 258: 119 – 124.
- [9] Tizard, I.R. 2000. *Immunology: An Introduction* 6th Ed. New York: Saunders College Publishing. pp.98-161.
- [10] Rifa'i M., Shi Z., Zhang S.Y., Lee Y.H., Shiku H., Isobe K., Suzuki H. 2008. CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells recognize activated T cells via conventional MHC class I- $\alpha\beta$ TCR interaction and become IL-10-producing

- active regulatory cells. *International immunology*, 20 (7): 937-947.
- [11] Trinchieri, G. 1995. *Interleukin-12: A proinflammatory cytokine with immunoregulatory function that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity*. *Immunol.* 13: 251-276.
- [12] Samuel, C.E. 2001. *Antiviral actions of interferon*. *Clinical Microbiol. Rev.* 14(4): 778-809.
- [13] Lee Y.H., Ishida Y., Rifa'i M., Shi Z., Isobe K., Suzuki H. 2008. Essential role of CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells in the recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Immunology*, 180 (2): 825-832.
- [14] Shi Z., Okuno Y., Rifa'i M., Endharti AT., Akane K., Isobe K., Suzuki H. 2009. Human CD8⁺CXCR3⁺ T cells have the same function as murine CD8⁺CD122⁺ Treg. *European journal of immunology*, 39(8): 2106-2119.
- [15] Shi Z., Rifa'i M., Lee Y.H., Shiku H., Isobe K., Suzuki H. 2008. Importance of CD80/CD86–CD28 interactions in the recognition of target cells by CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells. *Immunology*, 124 (1): 121-128.
- [16] Endharti, A.T., M. Rifa'i, Z. Shi, Y. Fukuoka, Nakahara, Y. Kawamoto, K. Takeda, K. Isobe, H. Suzuki. 2005. Cutting edge: CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN-gamma production and proliferation of CD8⁺ T cells. *Journal of immunology*, 175 (11): 7093-7097.
- [17] Lee Y.H., Rifa'i M. 2011. CD4⁺CD25⁺ FOXP3⁺ Regulatory T Cells In Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Journal of Tropical Life Science*, 1 (2): 69-75.

Aktivitas Imunomodulator *Polyscias obtusa* Terhadap Sistem Imunitas Pada Bone Marrow Broiler Setelah Pemberian *Salmonella typhimurium*

Erin Kurnianingtyas¹, Muhammad Sasmito Djati¹, dan Muhaimin Rifa'i¹

¹Laboratorium Fisiologi Hewan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya, Malang

ABSTRAK

Antibiotik banyak dimasukkan dalam pakan ternak untuk menanggulangi penyakit ternak, namun pemberian antibiotik dalam waktu lama dapat menyebabkan resistensi dan juga residu bagi manusia. *Polyscias obtusa* memiliki senyawa saponin, tanin, dan flavonoid yang diduga sebagai imunomodulator dalam sistem imunitas tubuh. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh daun *P. obtusa* sebagai imunomodulator terhadap imunitas anak ayam broiler. Metode penelitian diantaranya uji konfirmasi bakteri, persiapan kultur bakteri dan daun *P. obtusa*, pembuatan pakan ransum dosis 1 (0.08%), dosis 2 (0.16%) dan dosis 3 (0.26%) dari daun *P. obtusa*, infeksi *S. typhimurium* 500 µl secara oral di hari ke-14, pembedahan pertama pada hari ke-24, pembedahan terakhir pada hari ke-34, sel limfosit diisolasi pada organ bone marrow dan diinkubasi dengan antibodi *rat-anti-CD4⁺PE*, *rat-anti-CD8⁺ FITC*, dan *rat-anti-CD45⁺PerCP* masing-masing sebanyak 50 µl kemudian dilakukan running flowcytometri. Hasil menunjukkan bahwa secara keseluruhan perlakuan yang paling menunjukkan dalam peningkatan sel limfosit adalah perlakuan yang diberi dosis daun *P. obtusa*, yaitu perlakuan pakan ransum dosis 0,08%, perlakuan pakan ransum dosis 0,16%, dan perlakuan pakan ransum dosis 0,26%. Jumlah relatif CD4⁺ mengalami peningkatan dengan hasil yang berbeda nyata. Sehingga dapat dibuktikan bahwa daun *P. obtusa* mampu berperan sebagai imunomodulator dalam sistem imunitas.

Kata kunci : Ayam broiler, *Polyscias obtusa*, *Salmonella typhimurium*, sel

ABSTRACT

Antibiotics are included in animal feed to recover the diseases, but giving antibiotics for a long term can cause resistance and also residues to humans. *Polyscias obtusa* have saponins, tannins, and flavonoids compounds which are assumed as imunomodulator in the body's immunity system. The purpose of this research was to determine the influence of *P. obtusa* leaf as imunomodulator on chicks broiler immunity. Research methods are including bacteria confirm test, bacterial culture preparation and *P. obtusa* leaves, the making of diet with 0.08%, 0.16% and 0.26% dose from *P. obtusa* leaves. Total of 500 µl *S. typhimurium* infected orally on day 14th, the first surgery on day 24th and the last surgery on day 34th. Lymphocyte cells are isolated on the bone marrow and incubated with rat anti-CD4-PE, rat anti-CD8-FITC, and rat-anti-CD45 PerCP antibodies respectively 50 µl and then runned in flowcytometri. Result show an increase in lymphocyte cells in the treatment given a dose of *P. obtusa* leaves, feed rations treatment dosage of 0.08%, 0.16%, and 0.26%. Increase in CD4 relatives number are significantly different. So, it can be proven that *P. obtusa* leaves are able to act as the immune system imunomodulator.

Keywords : Broiler, cell, *Polyscias obtusa*, *Salmonella typhimurium*

PENDAHULUAN

Kendala dalam sektor peternakan diantaranya penurunan jumlah ternak karena serangan penyakit. Salah satu penyakit yang umum menyerang ayam peternakan adalah serangan penyakit dari bakteri *Salmonella* sp. Untuk menanggulangi permasalahan tersebut para

peternak dan perusahaan peternakan unggas melakukan pemberian antibiotik.

Antibiotik telah diketahui berguna untuk memberantas penyakit dan juga dapat berfungsi sebagai *growth promotor* pada ayam. Namun pemberian antibiotik dalam waktu lama dapat menyebabkan munculnya permasalahan baru berupa resistensi bakteri patogen terhadap antibiotik yang diberikan. *Salmonella typhimurium* akan bersifat resisten terhadap antibiotik seperti ampisilin, kotrimoksasol dan tetrasiklin [1]. Antibiotik juga dapat menimbulkan residu yang berbahaya bagi manusia akibat mengkonsumsi produk unggas. Berbeda dengan

*

Alamat Korespondensi:
Muhammad Sasmito Djati
Email : msdjati@ub.ac.id
Address : Department of Biology, Faculty of Mathematics
and Natural Sciences, Brawijaya University,
Jl. Veteran, Malang 65154

antibiotik, penggunaan obat herbal memiliki keuntungan tidak menyebabkan residu pada hasil produksi ternak.

Daun *Polyscias obtusa* yang dapat meningkatkan ketahanan tubuh pada ayam. Daun pada tanaman ini memiliki kandungan asam oleanic saponin. Selain senyawa saponin, pada tanaman ini juga ditemukan senyawa flavonoid dan tanin. Saponin merupakan senyawa aktif yang bersifat seperti sabun, serta memiliki kemampuan membentuk busa dan menghemolisis sel darah merah [2]. Hasil uji secara *in vitro* dari flavonoid golongan flavones dan flavonols telah menunjukkan adanya respon imun [3]. Efek terhadap respon imun non spesifik berupa peningkatan fagositosis dan kemotaksis makrofag, kemotaksis neutrofil, sitotoksitas sel NK serta aktivitas hemolisis komplemen [4,5].

Pemberian antigen *S. typhimurium* pada anak ayam umur 1 – 2 minggu hanya menimbulkan respon antibodi yang lemah. Kondisi ini mungkin disebabkan oleh sifat hiporesponsif sel-sel pada sistem imunitas yang belum berfungsi secara *mature* [6], atau diseminasi jaringan limfoid masih sangat muda dan fungsi pembentukan antibodi belum sempurna, sehingga antibodi yang terbentuk pada anak ayam rendah [6]. Berdasarkan uraian di atas bahwa perlu diadakan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui aktifitas imunomodulator daun *Polyscias obtusa* terhadap sistem imunitas terutama pada *bone marrow* broiler setelah infeksi *Salmonella typhimurium*.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret hingga Juli 2012 di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Fisiologi Hewan, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, serta Laboratorium peternakan Sumber Sekar DAU, Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya, Malang.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu cawan petri, jarum oose, tabung reaksi, gelas obyek, pipet, inkubator, tissue, vorteks, erlenmeyer, mikropipet, bola hisap, kandang, tempat makan, tempat minum, dan lampu. Sedangkan untuk bahan yang digunakan yaitu media NA, NB, XLD, KIA, LIA, cat gram A, B, C dan D, larutan H₂O₂, aquades, formalin, batu kapur, pakan pabrik BR1, pakan ransum (DL Metionin, tepung ikan, jagung kuning, precampuran,

bungkil kopra, bungkil kedelai dan garam) dan air mineral.

Uji Konfirmasi

Uji media XLD

Isolat murni yang akan diuji, diambil dengan ose dan dilakukan *streak plate* pada media XLD kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Uji akan menunjukkan hasil positif bila pada daerah streak tersebut akan membentuk koloni berwarna hitam.

Uji Katalase

Isolat bakteri diletakkan pada gelas obyek kemudian ditetesi dengan hidrogen peroksida (H₂O₂) 3% sebanyak satu tetes. Uji positif ditunjukkan ketika terdapat gelembung pada saat penetesan H₂O₂, akan tetapi jika tidak terdapat gelembung maka uji ini dianggap negatif [8].

Uji Patogenitas

Isolat bakteri murni dilakukan *streak plate* pada media *blood agar*. Isolat bakteri diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24-48 jam. Uji akan menunjukkan hasil positif apabila media berubah warna menjadi bening secara menyeluruh di sekitar koloni.

Uji Pewarnaan Cat Gram

Isolat pada gelas obyek difiksasi di atas api. Apusan ditetesi dengan larutan Gram A (*Hucker's crystal violet*), cat gram B (*Lugol's iodine*), cat gram C (alkohol), cat gram D (safranin) masing-masing selama satu menit. Apusan bakteri dicuci kembali pada air mengalir dan dikeringanginkan. Kemudian apusan bakteri diamati dengan menggunakan mikroskop. Hasil menunjukkan bakteri bersifat gram negatif karena hasil akhir berwarna merah.

Uji Media KIA dan LIA

Isolat bakteri yang telah diremajakan diambil dengan enten, selanjutnya enten ditusukkan dan ditarik pada media KIA dan LIA. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24-48 jam. Pada uji media KIA dan LIA, jika media berubah warna menjadi hitam maka bakteri tersebut memproduksi H₂S.

Kurva Standar

Isolat bakteri ditumbuhkan pada media *Nutrien Broth* dengan konsentrasi pengenceran berbeda. Kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang

600nm dan dihitung jumlah selnya dengan haemocytometer.

Kurva Pertumbuhan

Kultur bakteri diambil 1 ose yang ditumbuhkan pada media *Nutrien Broth* 10 ml dan diinkubasi suhu 37⁰C selama 24 jam. Kemudian diambil 6 ml kultur dan dicampur media NB 54 ml. Kemudian dilakukan sampling setiap 1 jam, dengan mengambil 4 ml dan ditambah 500 µl formalin. Kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm dan dihitung jumlah selnya dengan haemocytometer. Tabel 1 menunjukkan perbandingan antara media steril dan kultur.

Tabel 1. Perbandingan stok bakteri *Salmonella typhimurium* dengan media steril

Perbandingan	Stok kultur (ml)	Media Steril (ml)
8:0	0	4
7:1	0,5	3,5
6:2	1	3
5:3	1,5	2,5
4:4	2	2
3:5	2,5	1,5
2:6	3	1
1:7	3,5	0,5
0:8	4	0

Pembuatan Pakan Konversi

Daun *P. obtusa* kemudian dicuci dan dikering anginkan. Kemudian daun dihaluskan menggunakan blender kering dan hasilnya disebut simplisia. Selanjutnya simplisia ditimbang dan ditambahkan pada pakan buatan ayam sesuai perlakuan yaitu perlakuan dengan dosis 1 berjumlah 0,08%, untuk dosis 2 berjumlah 0,16%, sedangkan untuk dosis 3 berjumlah 0,26% *Polyscias obtusa* yang diberikan.

Pemberian *Salmonella typhimurium* secara oral

Bakteri *Salmonella typhimurium* dalam *Nutrient Broth* disentrifuse dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit suhu 25⁰C. Pelet yang diperoleh diresuspensi dengan larutan garam fisiologis NaCl 0,9% yang diambil sebanyak 500 µl dan diberikan kepada ayam secara oral menggunakan pipet tetes.

Isolasi Sel Limfosit

Tulang femur ayam yang sudah dibersihkan, dipotong bagian kedua ujungnya dan sel diflush dengan PBS menggunakan jarum 19G.

Selanjutnya sel-sel yang diperoleh difilter menggunakan *wire* dan dimasukkan kedalam tabung propilen 15 ml. Ditambahkan PBS sampai 12 ml. Disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm, pada suhu 4⁰C, selama 5 menit hingga didapat pelet dilanjutkan dengan sentrifugasi kembali hingga pelet terakhir yang merupakan sel limfosit.

Analisis Flowcytometri

Sel-sel yang diisolasi dari bone marrow diinkubasi dengan *rat-anti-CD45⁺PerCP*, *rat-anti-CD8⁺FITC*, dan *rat-anti CD4⁺PE conjugated*. Sampel yang telah diinkubasi dengan antibodi ditambah 1 ml PBS dan ditempatkan pada kuvet flowcytometer. Selanjutnya dipilih *acquire* dan flowcytometer akan menghitung jumlah sel total serta jumlah sel yang terdeteksi oleh label antibodi. Hasil yang diperoleh diolah dengan program *BD cellquest ProTM*.

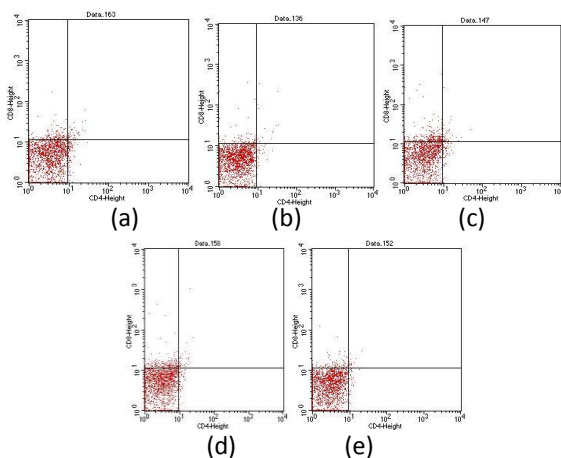
Analisis Statistika

Analisis data dilakukan dengan menggunakan metode RAL-Faktorial pada program *SPSS 16 for Windows*. Apabila diperoleh hasil yang signifikan maka dilakukan uji lanjut Tukey.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Profil Sel CD4⁺, CD8⁺ dan B220⁺

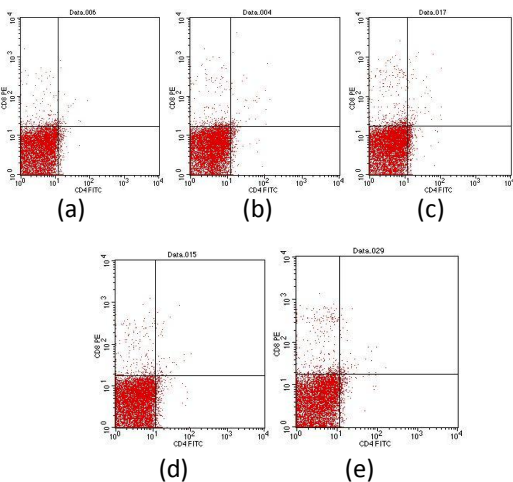
Jumlah relatif CD4⁺ dan CD8⁺ dengan analisa flowcytometry masing-masing perlakuan pada fase starter menunjukkan perbedaan yang signifikan. Jumlah relatif CD4⁺ tertinggi dihasilkan dari kelompok perlakuan pakan pabrik, yaitu sebesar 4,47%, sedangkan untuk jumlah relatif CD8⁺ tertinggi dihasilkan dari kelompok perlakuan *P.obtusa* dosis 0,08% sebesar 10,91% (Gambar 1).



Gambar 1. Profil CD4⁺ dan CD8⁺ fase starter pada perlakuan (a) pakan pabrik, (b) pakan pabrik +

infeksi *S. typhimurium*, (c) *P. obtusa* 0,08%, (d) *P. obtusa* 0,16%, (e) *P. obtusa* 0,26%

Jumlah relatif CD4⁺ dan CD8⁺ dengan analisa flowcytometry masing-masing perlakuan pada fase finisher menunjukkan perbedaan yang signifikan. Jumlah relatif CD4⁺ tertinggi dihasilkan dari kelompok perlakuan *P. obtusa* dosis 0,08%, yaitu sebesar 3,52%, sedangkan untuk jumlah relatif CD8⁺ tertinggi dihasilkan dari kelompok perlakuan *P. obtusa* dosis 0,08% sebesar 3,98% (Gambar 2). Hal ini bisa terjadi karena masih adanya suatu rangsangan antigen yang menyebabkan sel limfosit terus berproliferasi. Secara umum jumlah leukosit yang meningkat merupakan pertanda adanya infeksi [9].



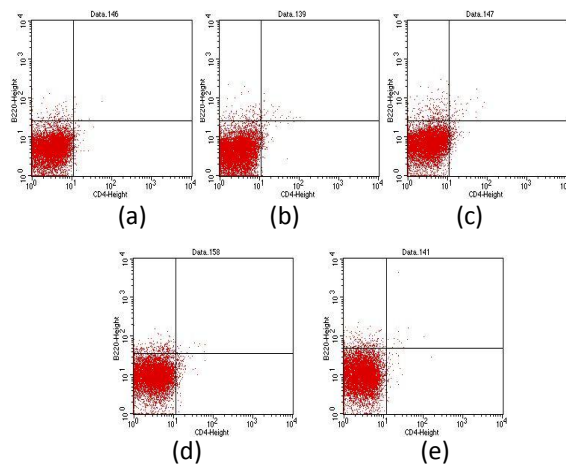
Gambar 2. Profil CD4⁺ dan CD8⁺ fase finisher pada perlakuan (a) pakan pabrik, (b) pakan pabrik + infeksi *S. typhimurium*, (c) *P. obtusa* 0,08%, (d) *P. obtusa* 0,16%, (e) *P. obtusa* 0,26%

Jumlah relatif B220⁺ dengan analisa flowcytometry masing-masing perlakuan pada fase starter menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan. Jumlah relatif B220⁺ tertinggi dihasilkan dari kelompok perlakuan *P. obtusa* dosis 0,16%, yaitu sebesar 2,60%, sedangkan untuk jumlah relatif B220⁺ terendah dihasilkan dari kelompok perlakuan pakan pabrik sebesar 1,20% (Gambar 3).

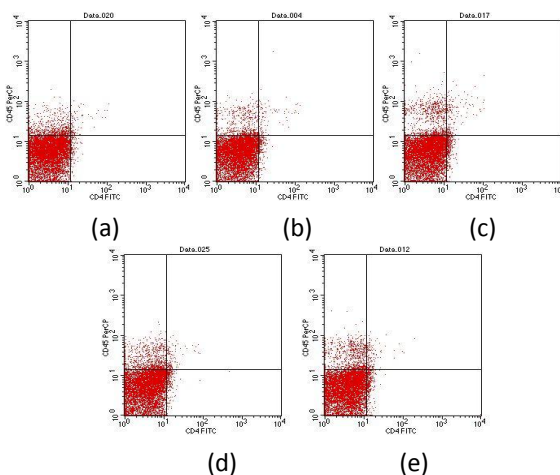
Jumlah relatif B220⁺ dengan analisa flowcytometry masing-masing perlakuan pada fase finisher menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan. Jumlah relatif B220⁺ tertinggi dihasilkan dari kelompok perlakuan *P. obtusa* dosis 0,16%, yaitu sebesar 9,34%, sedangkan untuk jumlah relatif B220⁺ terendah dihasilkan dari kelompok perlakuan pakan pabrik dengan infeksi *S. typhimurium* sebesar 5,82% (Gambar 4).

Hasil jumlah relatif sel limfosit menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan. Ini diduga

karena adanya senyawa pada tanaman *P. obtusa* yang dapat mengatur aktifitas sel limfosit untuk berproliferasi. Senyawa dari tanaman tersebut adakalanya akan meningkatkan jumlah sel limfosit, tetapi juga bisa sebagai immunosupresan. Senyawa antibakteri seperti saponin apabila berada dalam tubuh ternak terlalu lama dapat menurunkan daya tahan tubuh [10]. Jumlah relatif CD4⁺, CD8⁺ dan B220⁺ secara keseluruhan memiliki jumlah tertinggi pada kelompok perlakuan yang diberi *P. obtusa* dosis 0,08% dan 0,16%. Hal ini mengindikasikan kemungkinan dosis tersebut merupakan dosis optimum yang dapat berfungsi sebagai immunostimulator.



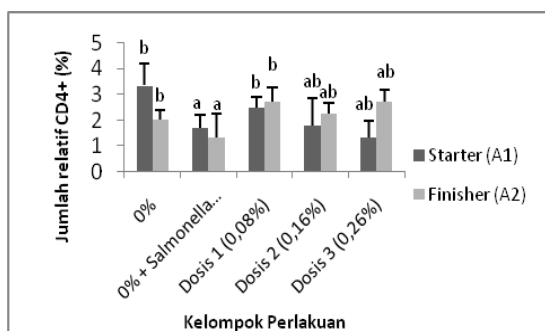
Gambar 3. Profil B220⁺ fase starter pada perlakuan (a) pakan pabrik, (b) pakan pabrik + infeksi *S. typhimurium*, (c) *P. obtusa* 0,08%, (d) *P. obtusa* 0,16%, (e) *P. obtusa* 0,26%



Gambar 4. Profil B220⁺ fase finisher pada perlakuan (a) pakan pabrik, (b) pakan pabrik + infeksi *S. typhimurium*, (c) *P. obtusa* 0,08%, (d) *P. obtusa* 0,16%, (e) *P. obtusa* 0,26%

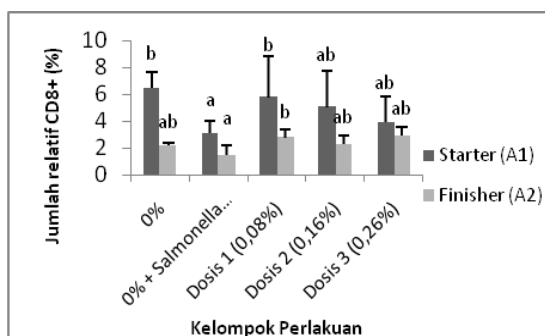
Sel CD4⁺, CD8⁺ dan B220⁺ Pada Organ Bone Marrow Ayam Broiler

Hasil pada fase starter menunjukkan bahwa jumlah relatif CD4⁺ paling tinggi yaitu pada perlakuan kontrol negatif sebesar 3,4%. Kelompok perlakuan pakan ransum dosis 0,26% memiliki nilai paling rendah yakni sebesar 1,32%. Jumlah relatif CD4⁺ yang paling rendah pada fase finisher yaitu pada perlakuan kontrol positif sebesar 1,32% dan untuk jumlah relatif sel CD4⁺ yang paling tinggi yaitu pada perlakuan pakan ransum dosis 0,08% sebesar 2,72 % (Gambar 5).



Gambar 5. Rata-rata Jumlah Sel T CD4⁺ (%) fase Starter dan Finisher (p<0.05)

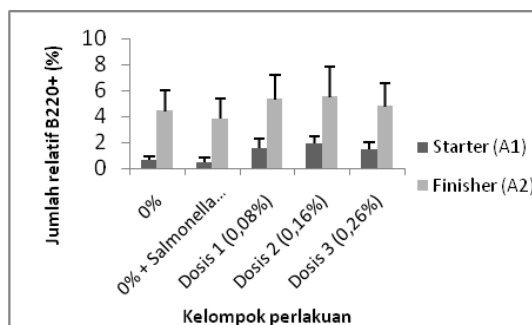
Hasil pada fase starter menunjukkan bahwa jumlah relatif CD8⁺ tertinggi pada perlakuan kontrol negatif sebesar 6,47% sedangkan untuk jumlah relatif CD8⁺ paling rendah pada perlakuan kontrol positif sebesar 3,09%. Jumlah relatif CD8⁺ terendah pada fase finisher perlakuan kontrol positif dengan nilai sebesar 1,46% dan untuk jumlah relatif CD8⁺ yang paling tinggi pada perlakuan pakan ransum dosis 0,26% sebesar 2,92% (Gambar 6).



Gambar 6. Rata-rata Jumlah Sel T CD8⁺ (%) fase Starter dan Finisher (p<0.05)

Hasil pada fase starter menunjukkan bahwa jumlah relatif B220⁺ yang paling rendah terdapat pada perlakuan kontrol positif yaitu sebesar 0,47% dan untuk jumlah relatif tertinggi pada

perlakuan pakan ransum dosis 0,16% sebesar 1,89%. Jumlah relatif B220⁺ fase finisher yang tertinggi pada perlakuan pakan ransum dosis 0,16% yakni sebesar 5,51% dan untuk jumlah relatif B220⁺ terendah pada perlakuan kontrol positif sebesar 3,80% (Gambar 7).



Gambar 7. Rata-rata Jumlah Sel B220⁺ (%) fase Starter dan Finisher (p<0.05)

Infeksi bakteri *Salmonella typhimurium* dapat menginduksi aktivasi sel T CD4⁺ dan sel T CD8⁺. Fungsi Sel T CD4⁺ membantu aktivasi dan diferensiasi sel B selain itu juga membantu pembentukan sel T CD8⁺ spesifik *Salmonella*. Pembentukan sel T juga diindikasikan dengan adanya produksi IFN-γ [11-17]. Produksi IFN-γ spesifik *Salmonella typhimurium* dari sel T CD4⁺ secara signifikan lebih besar daripada sel T CD8⁺. Jika berupa IL-2 dan IFNγ, yang berkembang adalah Th1 dan akan menekan Th2. Sebaliknya jika IL-4 yang dikeluarkan, maka Th2 yang akan berkembang [18].

Saponin memproduksi cytokines seperti interleukin dan interferons yang berperan dalam efek imunostimulan. Interleukin dan interferons akan bereaksi dengan antigen (benda-benda asing) yang masuk ke dalam tubuh [19]. Saponin dalam jumlah normal berperan sebagai imunostimulator, sedangkan dalam jumlah yang melebihi batas normal saponin akan berperan sebagai immunosupresor (zat yang menekan/menurunkan sistem imun) [20]. Batas toleransi penggunaan saponin adalah 3,7g/kg pakan [21]. Batas toleransi tanin dalam ransum ayam broiler sebesar 2,6g/kg pakan [23].

Kenaikan sel limfosit T dan sel limfosit B selain diindikasikan dari suatu senyawa yang dapat merangsang proliferasi sel limfosit tetapi juga dikarenakan adanya ekspos terhadap antigen sehingga merangsang sel limfosit untuk berganda lebih cepat.

KESIMPULAN

Pemberian dosis daun *Polyscias obtusa* yang berbeda menunjukkan profil jumlah relatif CD4⁺, CD8⁺ dan B220⁺ antara semua perlakuan memiliki perbedaan yang signifikan berdasarkan analisis *flowcytometry* dan menunjukkan adanya peningkatan. Hubungan *starter* dan *finisher* menunjukkan hasil yang tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada jumlah relatif CD4⁺, CD8⁺, dan B220⁺.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Tabbu, C.R. 2000. *Penyakit Ayam dan Penanggulangannya*. Vol 1. Kanisius. Yogyakarta.
- [2] Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Edisi ke-6. Terjemahan: K. Padmawinata. ITB-Press, Bandung.
- [3] Hollman, P.C.H, M.G.L. Hertog and M.B. Katan, 1996. Analysis and Health Effects of Flavonoids. *Food Chemistry*, 57 (1) : 43-46.
- [4] Munasir Z. 2002. Manfaat pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri* sebagai imunostimulator pada penyakit infeksi anak. <http://www.tnial.mil.id/cakrawala.php3>.
- [5] Rifa'i, M., Y. Kawamoto, I. Nakashima, H. Suzuki. 2004. Essential roles of CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells in the maintenance of T cell homeostasis. *The Journal of experimental medicine*, 200 (9): 1123-1134.
- [6] Jeurissen, S.H.M., E.M. Janse, G. Koch And G.F. Deboer.1989. Post natal development of mucosa-associated lymphoid tissue in chickens. *Cell Tissue Res.*, 258: 119 – 124.
- [7] Corkish, J.D., R.H. Davies, C. Wray and R.A. Nicholas. 1994. Observation on broiler breeder flock naturally infected with *Salmonella enteritidis phage type 4*. *Vet. Rec.* 134: 591 – 594.
- [8] Fardiaz, S. 1993. *Analisis Mikrobiologi Pangan*. Jakarta : PT.Raja Grafindo Persada.
- [9] Frandson, R. D. 1992. *Anatomi dan Fisiologi Ternak*. Edisi 4. Terjemahan. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- [10] Cheeke, P. R. 1989. *Toxicants of Plants Origin*, Volume IV. Phenolics. CRC Press.
- [11] Endharti, A.T., M. Rifa'i, Z. Shi, Y. Fukuoka, Nakahara, Y. Kawamoto, K. Takeda, K. Isobe, H. Suzuki. 2005. Cutting edge: CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN-gamma production and proliferation of CD8⁺ T cells. *Journal of immunology*, 175 (11): 7093-7097.
- [12] Lee, Y.H., Y. Ishida, M. Rifa'i, Z. Shi, K. Isobe, H. Suzuki. 2008. Essential role of CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells in the recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Immunology*, 180 (2): 825-832.
- [13] Rifa'i, M., Z. Shi, S.Y. Zhang, Y.H. Lee, H. Shiku, K. Isobe, H. Suzuki. 2008. CD8⁺CD12⁺ regulatory T cells recognize activated T cells via conventional MHC class I- α TCR interaction and become IL-10-producing active regulatory cells. *International immunology*, 20 (7): 937-947.
- [14] Shi, Z., Y. Okuno, M. Rifa'i, A.T. Endharti, K. Akane, K. Isobe, H. Suzuki. 2009. Human CD8⁺CXCR3⁺ T cells have the same function as murine CD8⁺CD122⁺ Treg. *European journal of immunology*, 39 (8): 2106-2119.
- [15] Shi, Z., M. Rifa'i, Y.H. Lee, H. Shiku, K. Isobe, H. Suzuki. 2008. Importance of CD80/CD86-CD28 interactions in the recognition of target cells by CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells. *Immunology*, 124 (1): 121-128.
- [16] Rifa'i, M. 2010. Andrographolide ameliorate rheumatoid arthritis by promoting the development of regulatory T cells. *Journal of Tropical Life Science*, 1 (1): 5-8.
- [17] Lee, Y.H., M. Rifa'i. 2011. CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Regulatory T Cells In Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Journal of Tropical Life Science*, 1 (2): 69-75.
- [18] Mastroeni P, Ménager N. 2003. Development of acquired immunity to *Salmonella*. *J. Med. Microbiol.* 52:453-59.
- [19] Tizard, I. 1988. *Pengantar Imunologi Veteriner*. Edisi Ke 2. Terjemahan Masduki Partodirejo. Airlangga University Press, Surabaya.
- [20] Francis, G., Zohar K., Harinder, P.S.M., dan Klaus B. 2002. The biological action of saponins in animal systems. *British Journal of Nutrition* 88: 587-605.
- [21] Food and Agriculture Organization. 2005. Endogenous and Exogenous Feed Toxins. http://www.fao.org/docrep/article/Agrippa/659_en_10.htm3TopOfPage2005. Diakses tanggal 20 Februari 2013.
- [22] Kumar, V, A. V. Elangovan, and A. B. Mandal. 2005. Utilization of reconstituted high-tanin sorghum in the diets of broiler chicken. *J. Anim. Sci.* 18 (4): 538-544.

***Chaetoceros ceratosporum* Diatomae in Feed Formula To Increase Growth and Post Larvae Immunity of Tiger Shrimp (*Penaeus monodon* Fab.) to *Vibrio harveyi* infection**

Arning Wilujeng Ekawati^{1*}, Happy Nursyam², Edi Widjayanto³, Marsoedi⁴

¹Faculty of Fisheries and Marine Science, Brawijaya University, Indonesia

^{2,4}Faculty of Fisheries and Marine Science, Brawijaya University, Indonesia

³ Faculty of Medicine, Brawijaya University, Indonesia

Abstract

This experiment aims to determine the effect and the best dose of *Chaetoceros ceratosporum* diatomae utilization in feed formula for post larvae of tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fab.) growth and immunity to *Vibrio harveyi* infection. This research applied Completely Randomized Design (CRD) with 4 treatments and 3 replications. The treatment use *Chaetoceros ceratosporum* diatomae in feed formula (iso protein 39.02% and iso energy 3.58 kcal/g diet) in different doses, i.e. treatment A = 0 %; B = 3.04 %; C = 6.0 8%; D = 9.12 %. Observed parameters were Survival Rate, Growth Rate, Food Conversion Ratio (FCR) and Protein Efficiency Ratio (PER). Result showed that *Chaetoceros ceratosporum* diatomae utilization in feed formula affect the increase of growth and immunity of post larvae of tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fab.) to *Vibrio harveyi* infection. The best dose in feed formula ranged from 5,75% – 5,95%.

Key words: *Chaetoceros ceratosporum*, balance energy, feed conversion, protein efficiency, *Vibrio harveyi*, tiger shrimp

INTRODUCTION

In the decade of 1991, Indonesia experienced a peak production of shrimp; ranked second after Thailand, nevertheless post 1991, one of the problem is bacterial infection [1].

Several species of *Vibrio* bacteria that can be isolated from diseased shrimp are *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio vulvificalis*, while *Vibrio damsela*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio fluvialis* rarely found. From the various types of *Vibrio*, *Vibrio harveyi* is often leading to > 100% death at larvae, post-larvae, juvenile, sub-adult and adult phase [2].

Various attempts to control the disease in shrimp farming has been carried out, i.e. health environment management, selection of healthy fry and feed processing as needed. Prevention and control of disease in shrimp should be done through an integrated approach to the factors that influence the onset of disease. These factors were associated with bacterial virulence and the shrimp's immunity.

The immune system is not separated by the availability of nutrients consumed by organisms, including shrimp. However, information on the association between the nutrients composition balance with the immune system of shrimp was not completed explored yet. An increase in

immunity against disease not only by feeding with a balanced nutrient composition, but also by the provision of immunostimulant feed. Immunostimulant directly connected to immune system cells which make them more active. Immunostimulant addition (*bacterin vibrio* and *yeast glucan*) into shrimp (*Penaeus monodon* Fab.) enhanced the system activity of pro-phenoloxidase (pro-PO)[3]. Diatomae of *Chaetoceros ceratosporum* as natural feeding also improved shrimp's larvae immunity to *Vibrio harveyi* exposure [4; 5] but whether it acts as an immunostimulant diatomaceous or not was still need to be investigated. Is the formula feed usage also promotes growth and post larvae immunity of shrimp against *Vibrio harveyi* infection or not.

This research aimed to determine the effect and best dose utilization of diatomaceous *Chaetoceros ceratosporum* in feed formula to increase growth and immunity of shrimp post-larvae (*Penaeus monodon* Fab.) towards the infection of *Vibrio harveyi*.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Materials used in this research are : Post larvae (PL) 20 Shrimp (*Penaeus monodon* Fabricus), compounds for feed formula, dried *Chaetoceros ceratosporum*, *Vibrio harveyi* bacteria and sea water with 30 ppt salinity as culture media. Chemical compound for natural feed, bacteria culture, feed compound proximate analysis and chemical compound to analyze immune responses.

* Correspondence address

Arning Wilujeng Ekawati

Email : ar_ning2000@yahoo.com

Address : Faculty of Fisheries and Marine Science, Brawijaya University, Jl. Veteran, Malang

Equipments

Equipments for this research are : natural feed culture containers, shrimp container and maintenance equipments (aeration), bacteria culture equipments, feed compound proximate tools, feed manufacturing, water quality assessment. This research was conducted in two stages:

Phase I:

Chemical composition Evaluation of standard feed (*rebun* flour and tapioca flour) and dried *Chaetoceros seratosporum* comprise: water content with Oven, Protein by Kjeldhal method, fat by soxhlet method, ashing by 600°C.

Feed formulation for tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fab.) by the addition of *Chaetoceros seratosporum* known chemical composition with various doses. Feed formula manufactured with 39.02 % protein content and 3.58 k kalg⁻¹ energy content according to previous research [6] as basic feed formula and using *Chaetoceros ceratosporum* as one of feed formula compound in different amount. Compositions of feed and feed formula were shown in Table 1 and 2. Re-proximate analysis was conducted on feed and feed size was made suitable to shrimp size (*crumble*).

Phase II:

Feed formula assessments in laboratory scale were conducted to analyze the growth and the immunity of tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fab.) to *Vibrio harveyi* infection with experimental Complete Randomized Design method.

In Vivo Experiment Feed Assessment

Used post Larvae (PL 20) in this experiment was from hatchery. Shrimps were nurtured in 45 x 45 x 45 cm³ aquarium filled with 30 ppt salinity sea water for 30 cm height. Each aquarium filled with 30 shrimps. Pada Table 2 explain the different dose of *Chaetoceros seratosporum* in each treatment, i.e. A = 0 %; B = 3.04 % C = 6.08 %; D = 9.12 %. Each treatment were replicated three times. Feeding in 15% of body weight given in every day, at 08.00, 16.00, and 21.00 GMT/UTC+7, for 30 %, 30 % and 40 % respectively. Hatchery took 30 days. Aquarium placement were shown in Fig. 1.

D	A	C	B	A	B	C	D	B	C	A	D
2	3	1	3	1	2	3	3	1	2	2	1

Figure 1. Aquarium Experiment Placement
Explanation: A, B, C, D = treatments

Table 1. Composition of experiment feed ingredients

Analysis	Rebun Flour	Plankton Flour	Tapioca Flour
Dried content (%)*	86,34	85,38	89,4
Protein (%)*	62,98	3,99	-
Fat (%)*	1,59	0,29	-
Ash content (%)*	17,05	66,84	0,59
Rugged fiber (%)*	3,01	2,61	-
BETN **	15,37	26,26	99,41
Energy (kkal/gr) **	327,69	123,65	397,64

Explanation :

* : Result Analysis of Laboratory Quality and Food Safety Assessment, Dept. of Agricultural Technology, Faculty of Agricultural Technology, Brawijaya University, Malang.

** : BETN = 100 – Protein – Fat – Ash content – rugged fiber.

*** : Energy = (4 x Protein) + (9 x Fat) + (4 x BETN).

Table 2. Experiment Feed Formula of tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fab.)

Ingredients	Treatment Dose			
	A (0 %)	B (3,04 %)	C (6,08 %)	D (9,12 %)
Rebun flour	61,96	61,96	61,96	61,96
Tapioca flour	15,77	14,38	13,88	12,93
Flour of <i>C. ceratosporum</i>	-	3,04	6,08	9,12
Fish Oil	3,75	3,75	3,75	3,75
Corn oil	6,50	6,50	6,50	6,50
Vitamin mix	2,70	2,70	2,70	2,70
Mineral mix	2,00	2,00	2,00	2,00
CMC	7,32	5,22	3,13	1,02
Total	100	100	100	100

Observed parameter are growth for every 10 days, water quality of maintenance media (temperature, pH, solved Oxygen and ammonia) and shrimp survival rates at the end of research. Furthermore, maintenance media filled with 20 shrimps infected with 10^5 cellml⁻¹ *Vibrio harveyi* and 1 week survival rate was observed.

Bacteria Culture of *Vibrio harveyi*

Ose sterilized by heated above the Bunsen till incandescent. After ose ascertained being cold, *Vibrio* bacteria taken by touching the ose tip in stock. The surface of TCBSA media scratched with the quadrant streaking method to obtain separate colonies. Then it incubated in 30°C for 24 hours. Growing pure colonies identified to ascertain the species of bacteria. Having proven the species is *Vibrio harveyi*, enrichment cultures taken to produce in large quantities.

Enrichment procedure

Pure colonies were taken by sterile Ose, then putted into Erlenmeyer containing liquid medium of TSB +. Erlenmeyer re-closed with sterile cotton, and then putted in water bath shaker. It incubated then in 30°C shaking speed 100 rpm for 2 x 24 hours. The culture results observed to make sure there is no contamination with gram staining and viewed by microscope. Then the bacterial culture density assessed with Mc Farland. Of the OD (*Optical Dencity*) measurement, diluted to get the desired bacterial density.

Data Analysis

Shrimp Survival Rate

Survived shrimp (indv.) compared to initial number of shrimp x 100%.

$$\text{Survival rate} = \frac{\sum \text{survived shrimp (indv.)}}{\sum \text{initial number of shrimp (indv.)}} \times 100\%$$

Specific Growth Rate

Specific growth rate calculations based on the average individual weight of shrimp during the study [7]:

$$\text{SGR} = \frac{\ln \bar{W}_t - \ln \bar{W}_0}{t} \times 100\%$$

Explanation:

SGR : Specific Growth Rate

\bar{W}_t : average weight of individu at time t (g)

\bar{W}_0 : average weight of individu at time t = 0 (g)

t : time (days)

Feed Conversion Ratio (FCR)

$$\text{FCR} = \frac{\text{Given Feed}}{\text{weight gain}}$$

Protein Efficiency Ratio (PER)

$$\text{PER} = \frac{\text{weight gain}}{\text{given protein}}$$

Survival rate, Spesific Growth Rate, Feed Conversion Ratio (FCR), and Protein Efficiency Ratio (PER) anylzed using ANOVA. The response were tested with F Test [8].

RESULT AND DISCUSSION

Survival rate, Spesific Growth Rate, Feed Conversion Ratio (FCR), and Protein Efficiency Ratio (PER) of tiger shrimp (*P. monodon* Fab.) showed in Table 3 as follow. Water quality range during study showed in Table 4. Survival rate of post larvae of tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fab.) were maintained for 30 days by experiments feeding that utilize plankton flour of *C. ceratosporum* were not significantly different, 78,90 – 84,43% (Table 3). Survival rate of shrimp survival is mainly determined by the physical-chemical properties of water and adequate feed. Physical-chemical properties of water in these experiments are in a good range for the survival and growth of shrimp in accordance with some expert advice (Table 5). Feed management is a key factor that affects the water quality [9] and economically produced in cultivation [10].

Feed management is an attempt to control and use feed in the cultivation in order to address these needs with the optimum feed residue and minimize environmental impact; improve the feed conversion ratio (FCR) as well as growth and maximum production [11]. Number of feeding in this research is 3%BB⁻¹hari⁻¹ with the frequency of 3 times hari⁻¹. It corresponds with Wyban and Sweeney [12] that frequency of viable feeding for the hatchery is 2 – 4 times depends on shrimp's size. Although feeding manipulation had no effect on poduction, but it improve feed conversion value [13].

In this study, growth pattern of post-larval shrimp which weighted average of 0.021 ± 0.001 g is exponential. This reflects sufficient feed for the growth of post-larval shrimp.

Table 3. Survival Rate, Growth Rate, Feed Conversion Ratio (FCR), and Protein Efficiency Ratio (PER) of Post Larval of Tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fab.)

Parameter	Treatments			
	A	B	C	D
Pre-infection of <i>V. harveyi</i>:				
Survival Rate (%)	80 ±3,3a	78,90±1,91a	84,43±1.96a	81,10±3,81a
Growth Rate (%BW/day)	6,51±0,33a	7,40±0,25b	8,23±0,25c	7,39±0,20b
FCR	1,64±0,11a	1,37±0,07b	1,18±0,05c	1,37±0,05b
PER	1,55±0,11a	1,84±0,09b	2,20±0,10c	1,89±0,07b
Post Infection of <i>V. harveyi</i>:				
Survival Rate (%)	18,33±5,77a	56,67±5,77b	81,67±7,64c	53,33±5,77b

Explanation: Same notation indicates indifference, whereas different notations indicate difference between treatments with confidence level 95%

Table 4. Range of water media quality parameters of tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fab.)

Treatments	Water Quality Parameter			
	Temperature (°C)	pH	DO (mgL ⁻¹)	NH ₃ (mgL ⁻¹)
A (0 %)	27 – 29	7,84-8,44	5,4-6,5	0,018-0,038
B (3,04 %)	27,5 - 29	7,81-8,45	5,5-5,7	0,018-0,044
C (6,08 %)	27,5 - 29	7,77-8,25	6-6,5	0,012-0,026
D (9,12 %)	27 - 29	7,67-8,21	5,6-6	0,014-0,044

Table 5. Experiment Media Quality of Tiger Shrimp (*Penaeus monodon* Fab.)

Water Quality Parameter	Water Quality Value	
	Study	References
Suhu (°C)	27 – 29	25 – 30 [14]; 25 – 31 [15]
pH	7,67 – 8,45	7,5 – 9,0 [16]; 6,8 – 8,7 [17]
DO (mgL ⁻¹)	5,4 – 6,5	5 – 8 [18]
NH ₃ (mgL ⁻¹)	0,012 – 0,44	< 0,1 [19]

Survival rate on shrimp treatment B, C and D after infected by *Vibrio harveyi* showed different results compared to control without the use of *C. ceratosporum* (treatment A) (Table 5). Correlation between the numbers of *C. ceratosporum* in feed formula (X) with a survival rate of shrimp post-larvae (Y1) after infected *V. harveyi* patterned a quadratic equation:

$$Y1 = -1,128 X^2 + 12,97 X + 23,85 ; R^2 = 0,90.$$

This equation showed that number of *C. ceratosporum* in feed formula that produced the highest survival rate (61.12 %) after infected *V. harveyi* was 5.75%.

This indicates that the use of *C. ceratosporum* in feed formula increase immunity of shrimp. It is assumed that *C. ceratosporum* contain β -(1-3)-glucans as an immunostimulant. Storseth *et al.* [20; 21] have proved the existence structures of β -D-(1-3)-glucan on *Chaetoceros mulleri*. Furthermore, prove the structure of β -D-(1-3,1-6)-glucan on *Chaetoceros debilis* [22]. Results concluded that different diatom species has a structure of β -D-(1-3)-glucan and different molecular weight. This study also explained the use of *C. mulleri* can improve the survival and growth of Cod fish larvae. In line with the role of *C. ceratosporum* to increase

immunity, then followed by an increase in specific growth rate, feed conversion ratio and protein efficiency ratios.

Growth is closely related to feed, because feed provide nutrients and energy needed for growth. Correlation between the number of *C. ceratosporum* in feed (X), growth rate (Y2), feed conversion (Y3) and efficiency ratio (Y4) post-larval shrimp with patterned quadratic equation:

$$Y2 = -0,046 X^2 + 0,538 X + 6,432 ; R^2 = 0,81$$

$$Y3 = 0,012 X^2 - 0,147 X + 1,653 ; R^2 = 0,79$$

$$Y4 = -0,016 X^2 - 0,194 X + 1,515 ; R^2 = 0,80$$

Based on these equations derived that the best rate of growth, feed conversion and protein efficiency ratio (7, 99 %BW⁻¹day⁻¹, 1,22 and 2,02 respectively), obtained the use of *C. ceratosporum* in feed formula are 5.78 %, 5.86 % and 5.95 % respectively. Growth rate is influenced by the balance of energy/protein in the feed. In this study, a proportion of energy/protein feed is 10,89 kka g⁻¹ protein. Balance energy/protein in the optimal feed for *Litopenaeus vannamei* is 11,9 kkal g⁻¹protein [23]. If the balance of feed energy/protein is 3.37 kkal g⁻¹protein then growth rate declined. With the increase of growth rate will be followed by an

increase in feed conversion and the efficiency of protein utilization.

The feed conversion ratio is affected by several factors but the most important is the quality and quantity of feed, species, size and quality of water [24]. Low feed conversion value indicates better utilization and well absorbed by the body to promote growth. The improvement of feed conversion values is caused by high nutrients that is not used optimally by the body or in other words wasted in the form of feces.

Feed Conversion in this study is 1,22. This value is better than the results of Venero [25], i.e. 1,8 with balance energy/protein in feed 9kcalg⁻¹ protein. It showed the roles of *C. ceratosporum* in increasing immunity, means energy for surviving was more efficient and the rest energy used for growth process. Furthermore, by the increase in growth rate, then feed utilization will be more efficient. Similarly, protein efficiency ratio will also be more efficient because the protein will be used for growing. These results are supported by the results of tests on the immune response of shrimp.

CONCLUSION

Based on the results, this study concluded that the use of diatomaceous *Chaetoceros ceratosporum* in feed formula increase growth and immunity of post-larvae shrimp (*Penaeus monodon* Fab.). The best dose is 5.75% - 5.95% in the feed formula.

REFERENCES

- [1] Winarno, B. 1995. Shrimp aquaculture in Indonesia. In C. L. Browdy and J. S Hopkins (Eds.) Swimming through Troubled Water. Proceeding on Shrimp Farming, Aquaculture '95. World Aquaculture Society, Baton Rouge. Louisiana. USA. 24-28.
- [2] Ruangpan, L. 1998. Luminous Bacteria Associated with Shrimp Mortality. In T. W. Flegel (Ed) Advances in Shrimp Biotechnology, National Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok. 205-2011.
- [3] Devaraja, T.N., S.K. Otta, G. Shubha, I. Karunasagar, P. Tauro, I. Karunasagar. 1998. Immunostimulation of shrimp through oral administration of *Vibrio* bacterin and Yeast Glucan. In T.W. Flegel (Ed) Advances in Shrimp Biotechnology, National Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok. 167-170.
- [4] Kartikaningsih, H., A.W. Ekawati, Sukoso, Haryanti and Zafran. 1999. The use of Dried Phytoplankton *Chaetoceros ceratosporum* to Inhibit Development of *Vibrio harveyi*. ARMP. 1998/1999.
- [5] Kartikaningsih, H, A.W. Ekawati, Haryanti and Rosa. 2000. The use of Dried Phytoplankton *Chaetoceros ceratosporum* to Inhibit the Development of *Vibrio harveyi*. ARMP. 1999/2000.
- [6] Ekawati, A. W. 1990. Effect of feed protein content on the growth of post-larval of Tiger Shrimp (*Penaeus monodon* Fab.). Master Thesis, FPS, IPB, Bogor. 71 pp.
- [7] De Silva, S.S. and T.A. Anderson. Fish Nutrition in Aquaculture. Chapman & Hall, 2-6 Boundary Ror, Lndon SE1 8HN. UK. 319 pp.
- [8] Chin, T. S. and J. C. Chen. 1987. Acute toxicity of ammonia to larvae of the tiger prawn, *Penaeus monodon* Fab. Aquaculture, 66:247-253.
- [9] Boyd, C.E. and C.S. Tucker. 1998. Pond Aquaculture Water Quality Management. Kluwer Academic Publisher, Boston, Massachusetts, USA.
- [10] Jolly, C.M. and H.A. Clonts. 1993. Economics of Aquaculture. Food Product Press, Binghamton, New York.
- [11] Ali, S.A. 2002. Feed management in shrimp and finfish aquaculture. Central Institute of Brackishwater Aquaculture, CHENNAI-600028. 75-81.
- [12] Wyban, J.A. and J.N. Sweeney. 1991. Intensive shrimp production technology. The Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA.
- [13] Snedecor, G.W. and W.G. Cochran. 1980. Statistical methods (7th Ed.) The Iowa State Univ. Press. Iowa. 507 pp.
- [14] Barono, D. Adiwidjaja, M. Mariyan and B.S. Ranoemihardjo. 1986. Shrimp farming. INFIS Man. Ser. 31, 85 pp.
- [15] Soundarapandian, P., K. Sankthivel and G.K. Dinakaran. 2009. Culture of *Penaeus monodon* (Fabricius) by using cyclop-eeze feed. Current Research Journal of Biological Sciences 1(3):113-117.
- [16] Kungvankij, P., T. E. Chua, J. Pudadera, Jr. G. Corre, B. Alava, I. B. Tiro, Jr. I. O. Potestas, G.A. Taleon and J.N. Paw. 1986. Shrimp Culture: pond design, operation and management. NACA Training Manual Series. No. 2, 68 p.
- [17] Ramanathan, N., P. Padmavathy, T. Francis, S. Athithian and N. Selvaranjitham. 2005. Manual on polyculture of tiger shrimp and carps in freshwater, Tamil Nadu Veterinary and Animal Sciences University, Fisheries Cooledge and Reseach Institute. Thothukudi, 1-161.
- [18] Wardoyo, S.T.H. and D. Djokosetjanto. 1988. Water quality management in shrimp ponds. Seminar of The success and spur business

- development of shrimp aquaculture. 16 – 17 September 1988. Faculty of Fisheries, IPB, Bogor. 24 pp.
- [19] Zelaya, O. 2005. An Evaluation of Nursery Techniques and Feed Management During Culture of Marine Shrimp *Litopenaeus vannamei*. Doctoral Dissertation. Auburn University, Auburn, Alabama, USA.
- [20] Storseth, T.R., K. Hansen, J. Skejermo and J. Krane. 2004. Charakterisation of a β -D-(1-3)-glucan from marine diatom *Chaetoceros mulleri* by high-resolution magic-angle spinning NMR spectroscopy on whole algal cells. Carbohydrat Research, 339:421-424.
- [21] Storseth, T.R., K. Hansen, K.I. Reitan and J. Skejermo. 2005. Sructural characterization of β -D-(1-3)-glucans from different growth phases of the marine diatoms *Chaetoceros mulleri* and *Thalassiosira weissflogii*. Carbohydrat Research, 240:1159-1164.
- [22] Storseth, T.R., S. Kirkvold, J. Skjermo and K.I. Reitan. 2006. A branched β -D-(1-3,1-6)-glucan from the marine diatom *Chaetoceros debilis* (*Bacillariophyceae*) characterized by NMR. Carbohydrat Research, 341:2108-2114.
- [23] Cousin, M., G. Cuzon, E. Blanchet, E.F. Ruelle, AQUACOP. 1993. Protein requirements following an optimum dietary energy to protein ratio for *P. vanname* Juveniles. In: S. J. Kaushik, P. Luquet (Eds.), Fish Nutrition in Practice, INRA, Paris, France, 599-606.
- [24] NRC. 1993. Nutrient Requirements of Fish. Nutrient Requirements of Domestic. Washington DC. 144 pp.
- [25] Venero, J. 2006. Optimization of Dietary Nutrient Inputs for Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. Doctoral Dissertation. Auburn University, Auburn, Alabama, USA. 145pp.

Pengamatan Jaringan Lambung Kijing Taiwan (*Anodonta woodiana* Lea) Yang Terdedah Pestisida Diazinon 60 EC Pada Beberapa Konsentrasi

Listiya Gita Lesmana¹, Diana Arfiati¹, Asus Maizar¹

¹Jurusan Manajemen Sumberdaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Brawijaya

Abstrak

Jaringan lambung yang diamati berasal dari kijing (*Anodonta woodiana*) yang terdedah pestisida Diazinon 60 EC selama 2 minggu dengan pemberian dosis yang berbeda, yaitu $3,5 \times 10^{-6}$; $1,75 \times 10^{-6}$; $0,875 \times 10^{-6}$ dan 0 ppm. Kondisi kijing diamati sebelum pemberian pestisida dan setelah 1 minggu dan 2 minggu pendedahan. Irisan lambung dibuat dari sampel 1 dan 2 minggu pendedahan menggunakan pewarnaan HE. Analisis histologi lambung kijing menunjukkan bahwa dinding lambung setelah terdedah pestisida akan mengalami kerusakan berupa penebalan dinding (edema), dengan jarak *digestive diverticula* saling berjauhan, silia dalam lambung terlihat menyatu (fusi) dan terjadi pembengkakan silia (hyperplasia). Bahkan setelah pendedahan pestisida selama 2 minggu, dinding lambung makin menebal serta *digestive diverticula* mengalami pengerutan (atrofi) dan pemecahan atau kerusakan sel (nekrosis).

Kata Kunci : *Anodonta woodiana*, Diazinon 60 EC, Kerusakan lambung

Abstract

Stomach tissue of mussel (Anodonta woodiana) was observed. It was exposed by pesticide Diazinon 60 EC for 2 weeks by different doses: $3,5 \times 10^{-6}$; $1,75 \times 10^{-6}$; $0,875 \times 10^{-6}$ and 0 ppm. Observed tissues are the first condition of mussel or before pesticide, 1 week and 2 weeks of exposure. Stomach slice was made from before, 1 week and 2 weeks exposure by HE colouration. Histology analysis of mussel's stomach show that wall of stomach after pesticide exposure get damages as wall thickening (edema), with apart digestive diverticula distance, silia fusion and swelling (hyperplasia). Even, after for 2 week pesticide exposure, the stomach wall becoming thicker and digestive diverticula also sink (atrophy) and necrosis.

Key words: *Anodonta woodiana*, Diazinon 60 EC, stomach damaging

PENDAHULUAN

Diazinon merupakan salah satu insektisida golongan organofosfat yang banyak dipakai dalam usaha pertanian untuk mengendalikan hama pada tanaman padi, bunga dan sayuran. Diazinon merupakan racun kontak dan racun sistemik. Senyawa diazinon merupakan *thiophosphoric acid ester* dengan rumus empirik $C_{12}H_{21}N_2O_3PS$ dan nama kimia O-Diethyl-O-(2-isopropyl-6-methyl-pyrimidine-4-yl). Keracunan Diazinon dapat menimbulkan gejala klinis seperti lemas, depresi, inkoordinasi, hipersalivasi, kekejangan, kelemahan anggota gerak, dispnea, diare, tremor dan kematian. Diazinon yang telah

masuk di dalam tubuh akan menghambat kerja enzim kolinesterase yang ada di dalam darah sehingga peredaran darah yang menuju ke saraf akan terganggu [1]. Transfer pestisida dapat terjadi melalui lima cara, yaitu: adsorpsi, penguapan, aplikasi pestisida yang tidak tepat, limpasan akhir dan rembesan [2]. Pestisida tersebut secara tidak langsung akan masuk ke perairan yang berpotensi menjadi bahan pencemar.

Kehadiran pencemar pada suatu perairan dapat dideteksi dengan beberapa cara yaitu cara kimia, fisika dan biologi. Pendeteksian dengan cara biologi biasanya disebut biomonitor. Salah satu hewan yang memenuhi syarat-syarat sebagai biomonitor adalah Kijing Taiwan (*Anodonta woodiana*). Hewan ini merupakan jenis hewan kerang berbentuk simetri bilateral yang terdiri dari dua keping cangkang cembung, Kijing ini dapat hidup di air tawar, dasar laut, danau, kolam, atau sungai yang banyak

* Alamat korespondensi:

Listiya Gita Lesmana

Email : Lesmana@ub.ac.id

Alamat : Jurusan Manajemen Sumberdaya Perairan,
Fakultas Perikanan dan Kelautan,
Universitas Brawijaya

mengandung zat kapur. Zat kapur ini digunakan untuk membentuk cangkangnya. Kijing ini dapat tumbuh pada kisaran suhu air antara 16–29°C dengan oksigen terlarut 3,8–12,5 ppm dan pH 6,0–7,6. Untuk dapat tumbuh dengan baik Kijing Taiwan ini dapat mengatur tingkat metabolisme oksigen dengan baik sehingga masih dapat hidup dengan kandungan oksigen dalam air yang berjumlah sedikit [3].

Maka dalam penelitian ini *A. woodiana* dijadikan sebagai hewan uji dan yang diamati adalah bentuk lambung kijing yang telah terdedah pestisida Diazinon 60 EC. Sehingga perlu diketahui bagaimana pengaruh pencemaran pestisida terhadap jaringan lambung Kijing Taiwan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kondisi jaringan lambung Kijing Taiwan (*A. woodiana*) yang hidup pada perairan yang mengandung Diazinon 60 EC pada beberapa konsentrasi.

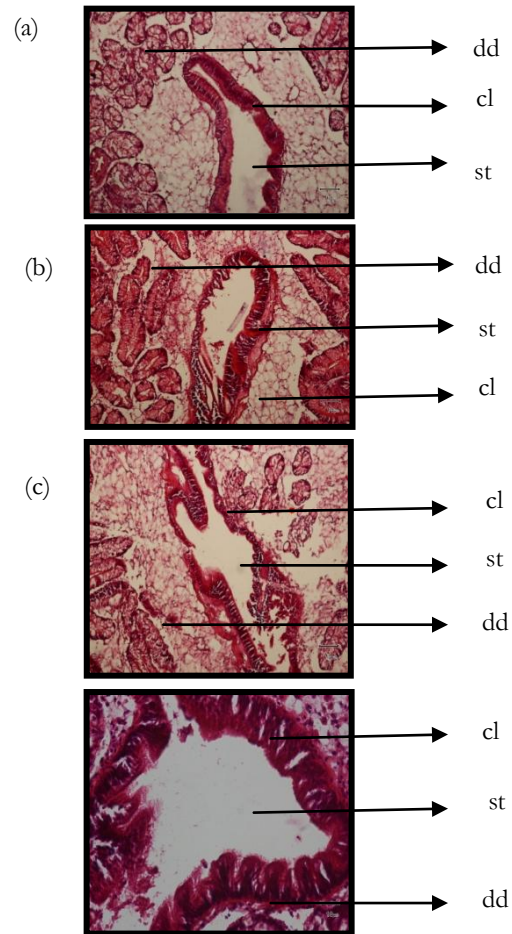
METODE PENELITIAN

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah Kerang *A. woodiana* yang diambil dari Unit Pengelolaan Budidaya Air Tawar (UPBAT) Punten dan parameter perairan yang diukur meliputi suhu, pH tanah, pH perairan, oksigen terlarut (DO), dan total bahan organik (TOM). Metode penelitian yang digunakan adalah eksperimen, yaitu dengan memberikan perlakuan dosis pestisida Diazinon 60 EC yang berbeda. Empat kijing dimasukkan ke dalam tiap bak percobaan yang telah berisi air dan sedimen dengan dosis masing-masing bak $3,5 \times 10^{-6}$; $1,75 \times 10^{-6}$; $0,875 \times 10^{-6}$ dan 0 ppm. Pendedahan dilakukan selama 2 minggu. Kondisi kijing diamati pada awal atau sebelum pemberian pestisida, 1 minggu setelah pendedahan dan 2 minggu setelah pendedahan. Selanjutnya bagian lambung kijing diambil dan dibuat irisan jaringan, kemudian diamati menggunakan mikroskop.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tebal dinding lambung kijing yang tidak mendapat pestisida berkisar antara 1,3 – 3,3 μm dan *digestive diverticula* mengelilingi dinding lambung. Hasil pendedahan pestisida Diazinon konsentrasi $0,875 \times 10^{-6}$ ppm dan $1,75 \times 10^{-6}$ ppm selama satu minggu menunjukkan lambung kijing mengalami tanda-tanda kerusakan yaitu di sekitar lambung seperti ada lendir yang mulai menutupi hingga terlihat lambung agak menebal (edema) dengan tebal dinding lambung berkisar antara 6,6-12 μm dan 6,6-17,3 μm . Silia

mengalami fusi dan juga penebalan (hyperplasia) dan *digestive diverticula* mulai mengalami pembesaran (edema) bila dibandingkan dengan lambung kijing tanpa pemberian pestisida. Sedangkan lambung kijing yang didedah konsentrasi $3,5 \times 10^{-6}$ ppm pada minggu pertama dinding lambungnya sudah mengalami penebalan (edema) dengan tebal berkisar antara 13,3 - 23,3 μm . Silia mengalami hyperplasia dan *digestive diverticulanya* menyempit (atrofi) dan mulai memencar di luar dinding lambung (Gambar 1).

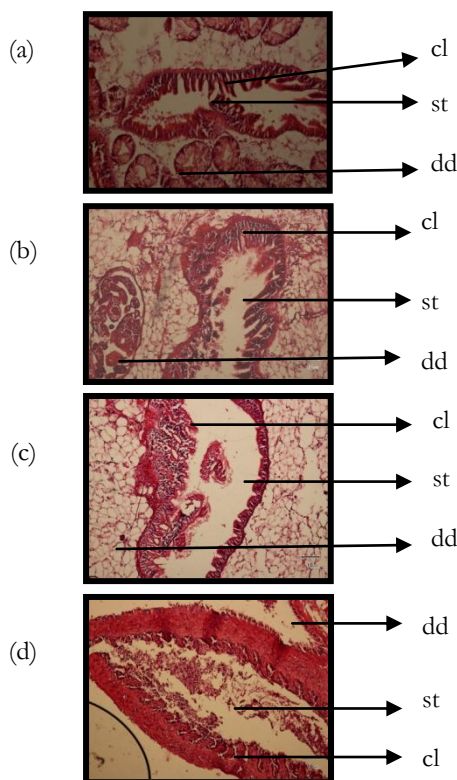


Gambar 1. Irisan melintang lambung kijing minggu pertama konsentrasi 0 ppm (a), $0,875 \times 10^{-6}$ ppm (b), $1,75 \times 10^{-6}$ ppm (c), $3,5 \times 10^{-6}$ ppm (d), (pembesaran 400x, mikroskop Olympus BX 41, kamera Olympus DP 20). st=stomach (lambung), cl=cilia, dd=digestive diverticula

Terjadinya pembesaran dinding lambung dan *diverticula* diduga disebabkan oleh penumpukan enzim asetikollin akibat adanya penghambatan enzim kolinesterase oleh pencemaran diazinon 60 EC. Pada saat tercemar organofosfat, asetilkolinesteras (AChE) dihambat sehingga terjadi akumulasi asetilkolin (ACh). ACh yang

ditimbun dalam SSP akan menginduksi tremor, inkoordinasi, dan kejang-kejang. Penghambatan AChE yang diinduksi oleh karbamat dapat pulih dengan cepat, sedangkan pada senyawa organofosfat sulit pulih [4]. Input organofosfat dalam tubuh mengganggu sistem saraf karena munculnya penghambatan oleh enzim asetilkolinesterase [5].

Hasil pengamatan minggu kedua memperlihatkan dinding lambung kijing semakin mengalami penebalan dan silianya juga mengalami kerusakan. Pada konsentrasi $0,875 \times 10^{-6}$ ppm, dinding lambung berukuran 6,6-12 μm dan konsentrasi $1,75 \times 10^{-6}$ ppm menyebabkan dinding lambung berukuran 6,6-17,3 μm . Bentuk lambung tidak beraturan, arah silia tidak beraturan (fusi) dan *digestive diverticula* menjauhi dinding lambung dan masih menyebar namun telah mengalami atrofi (Gambar 2).



Gambar 2. Irisan melintang lambung kijing hasil pendedahan minggu kedua konsentrasi 0 ppm (a), $0,875 \times 10^{-6}$ ppm (b), $1,75 \times 10^{-6}$ ppm (c), $3,5 \times 10^{-6}$ ppm (d) (pembesaran 400x, mikroskop Olympus BX 41, kamera Olympus DP 20). st=stomach (lambung), cl=cilia, dd=digestive diverticula

Sedangkan untuk lambung kijing yang didedah dalam konsentrasi $3,5 \times 10^{-6}$ ppm, penebalan dinding lambung (edema) semakin

meningkat, yaitu 10-32 μm . Silia juga mengalami penebalan dan pemendekan (hyperplasia) dengan arah yang tidak sama (fusi), sedangkan *digestive diverticula* menyebar jauh dari dinding lambung serta mengalami atrofi dan nekrosis (Gambar 2).

Kerusakan membran sel dapat menghambat masuknya zat-zat ke dalam sel, dan zat-zat dalam sel seperti ion organik, enzim dan asam amino dapat keluar dari sel. Enzim yang keluar dari sel bersama zat-zat tersebut akan menghambat metabolisme sel. Hal tersebut akhirnya akan mengakibatkan terjadinya kematian sel [6].

KESIMPULAN

Dinding lambung kijing setelah terdedah pestisida akan mengalami beberapa kerusakan, yaitu: pembengkakan (edema); jarak *digestive diverticula* menjauh; silia dalam lambung terlihat menyatu (fusi); dan pembengkakan silia (hyperplasia). Setelah pendedahan pestisida selama dua minggu, dinding lambung makin menebal, *digestive diverticula* mengalami pengerutan (atrofi) dan pemecahan dan nekrosis.

SARAN

Perlu perhatian dalam pemanfaatan perairan yang mengandung pestisida karena akan merusak jaringan organisme yang hidup di dalamnya.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Raflizar. 2001. Gejala klinis dan patologi anatomi mencit. *Jurnal Cermin Dunia Kedokteran* 131.
- [2] Manuaba, I.B. 2009. Cemaran pestisida Karbamat dalam air danau Buyan Buleleng Bali. Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Udayana. ISSN 1907-9850.
- [3] Wilda, G.H. 2003. Uji kapasitas Kijing Taiwan (*Anodonta Woodiana*) dalam menurunkan kadar polutan pestisida Karbaril pada perairan tawar. Institut Pertanian Bogor. *Oseana* XVII (5): 18-23.
- [4] Frank, C.L. 1995. Toksikologi dasar (asas, organ sasaran, dan penilaian resiko). Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta.
- [5] Hassall, K.A. 1982. The chemistry of pesticides. Macmillan Education Ltd. Basingstoke and London.
- [6] Pelczar, M.J. dan Chan. 1988. Dasar-Dasar Mikrobiologi (Jilid 2). Universitas Indonesia Press. Jakarta.

Aktivitas Antibakteri Ekstrak Teripang *Holothuria* sp. Terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophila* Secara *In vitro*

Roihanah S., Sukoso, Andayani S.

Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang

Abstrak

Banyak penyakit yang disebabkan oleh patogenitas bakteri, sebagai contoh adalah bakteri *Aeromonas hydrophila*. Salah satu alternatif yang dapat dilakukan untuk mengatasi masalah tersebut adalah dengan menggunakan Teripang (*Holothuria* sp.) yang memiliki kandungan bioaktif sebagai bahan antibakteri. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak Teripang terhadap *A. hydrophila*, mempelajari karakter dan struktur bakteri yang dihambat oleh ekstrak bioaktif Teripang dan mempelajari komponen bioaktif yang terkandung dalam teripang. Hasil uji cakram menunjukkan rerata zona hambat sebesar 13.188 mm sedangkan hasil uji MIC dan MBC menunjukkan bahwa pada dosis 0,50 mg.ml⁻¹ mampu menghambat pertumbuhan bakteri (Bakteriostatik) dan dosis 0,55 mg.ml⁻¹ telah dapat membunuh bakteri (Bakterisidal). Ekstrak kasar Teripang berpengaruh terhadap karakter dan struktur bakteri *A. hydrophila* yaitu dengan merusak dinding sel dan membran sel bakteri. Hasil analisis Spektrofometri Infra Merah dari ekstrak Teripang dan analisis Spektrofotometri Ultra Violet dengan pelarut *n*-heksan serapan diduga mengandung senyawa Triterpenoid.

Kata kunci: Aktivitas Antibakteri, Teripang (*Holothuria* sp.), *Aeromonas hydrophila*

Abstract

Many diseases caused by bacterial pathogenicity, e.g. *Aeromonas hydrophila*. One alternative to overcome these problems is to use Sea Cucumbers (*Holothuria* sp.) which contain bioactive as antibacteria. Aims of this study were to determine the antibacterial activity of sea cucumber extracts against *A. hydrophila*, to assess character and structure of bacterial which is inhibited by the bioactive extract of sea cucumbers and assess the contained bioactive components in sea cucumber. Disc test results showed a mean of 13.188 mm zone of inhibition while the MIC and MBC test results showed that at doses of 0.50 mg.ml⁻¹ could inhibit bacterial growth (bacteriostatic) and dose of 0.55 mg.ml⁻¹ was bactericidal. Crude extract of sea cucumbers affect the character and structure of *A. hydrophila* by destroying the cell walls and cell membranes. Analysis results of Infra Red and Ultra Violet Spectrophotometry on sea cucumbers' extract is assumed to contain Triterpenoid compounds.

Key words: Antibacterial Activity, Sea Cucumber (*Holothuria* sp.), *Aeromonas hydrophila*

PENDAHULUAN

Mikroorganisme patogen dapat menyebabkan infeksi pada manusia, hewan, serta tanaman. Mikroorganisme dapat menimbulkan penyakit mulai dari infeksi ringan sampai pada kematian. Salah satu mikroorganisme penyebab penyakit tersebut adalah parasit, jamur, bakteri dan virus.

Penanggulangan penyakit dapat dilakukan dengan cara pencegahan dan pengobatan. Pengobatan yang biasa dilakukan adalah memberikan bahan kimia atau sejenisnya, tetapi penggunaan bahan kimia ini mempunyai dampak lingkungan yang kurang baik. Penggunaan antibiotik dalam perkembangannya sebagai

antibakteri ternyata menimbulkan resistensi terhadap organisme target seperti *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Aeromonas salmonicida* [1] serta *Vibrio harveyi* [2].

Salah satu alternatif yang dapat dilakukan untuk mengatasi masalah tersebut adalah dengan menggunakan Teripang (*Holothuria* sp.) yang memiliki kandungan bioaktif sebagai bahan antibakteri [3]. Teripang mengandung bahan aktif antibakteri, antifungi (antijamur), antitumor dan antikoagulan (antipenggumpal) [4]. Penelitian telah menunjukkan bahwa selain penyembuhan luka, ekstrak Teripang mengandung senyawa antikoagulan dan antithrombosis [5], mereduksi senyawa kolesterol dan lipid, antikanker dan senyawa antitumor [6] dan senyawa antibakteri [7]. Seorang peneliti Rusia menunjukkan bahwa cucumarioside berasal dari spesies *Cucumaria japonica* memiliki sifat imunomodulator kuat, menunjukkan efektivitas yang tinggi terhadap *E.*

* Alamat korespondensi: S. Roihanah

Email : Roihanah@ub.ac.id

Alamat : Program Studi Pascasarjana S2 Biomedik
Universitas Brawijaya

coli, *Proteus mirabilis*, *Neisseria meningitidis* BT-2, *Salmonella minnesota*, *Salmonella typhimurium* dan *Pertusis meningoencephalitis* [8].

Kandungan bioaktif pada Teripang (*Holothuria* sp.) diharapkan dapat menjadi bakterisida baku di bidang perikanan, yang tidak menimbulkan efek resisten, bersifat alami dan ramah lingkungan. Oleh karena itu, diperlukan penelitian mengenai pemanfaatan Teripang sebagai antibakteri dan kajian yang lebih mendalam mengenai potensi bioaktif antibakteri yang ada pada Teripang yang dapat mengontrol pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila*.

Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian yang dilakukan adalah untuk:

1. Mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak Teripang terhadap *Aeromonas hydrophila*
2. Mempelajari karakter dan struktur bakteri yang dihambat oleh ekstrak bioaktif Teripang
3. Mempelajari komponen bioaktif yang terkandung dalam Teripang

MATERI DAN METODE PENELITIAN

Materi Penelitian

Bahan utama yang digunakan adalah Teripang (*Holothuria* sp.) yang diperoleh dari perairan Socah, Kabupaten Bangkalan, Jawa Timur. Biakan murni bakteri *Aeromonas hydrophila* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang.

Metode Penelitian

Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode maserasi (perendaman) dengan lima pelarut yang berbeda dari yang bersifat polar hingga non polar, yaitu air, methanol, etanol, kloroform dan heksan. Ekstraksi dilakukan dengan merendam masing-masing 500 gr Teripang segar dengan 500 ml pelarut, selama 3 kali 24 jam. Selanjutnya dilakukan penyaringan dan pemekatan untuk tahap ekstraksi yang terakhir, yaitu dengan pelarut etanol dan methanol yang dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* vakum. Pelarut non polar heksana dan kloroform dipekatkan dengan cara ditiup dengan gas N₂, sedangkan ekstrak air dipekatkan dengan cara stirer, karena air jika menggunakan *rotary evaporator* tidak dapat menguap.

Uji Cakram (Metode difusi)

Uji cakram, yaitu pengujian antimikroba dengan mengukur diameter daerah hambatan yang terjadi

di sekitar kertas cakram yang sudah mengandung bahan antimikroba dan dibandingkan dengan antibiotik kanamycin. Lempeng *Trypton Soya Agar* (TSA) ditandai dengan nama, tanggal dan mikroorganisme yang akan diuji. Kapas lidi (*cotton swab*) steril dicelupkan dalam suspensi biakan uji, dengan OD: 0,1 CFU.ml⁻¹, kemudian kapas lidi diputar pada dinding tabung (diperas) agar cairan tidak menetes dari bagian kapas tersebut. Mikroorganisme kemudian disebar pada seluruh permukaan lempeng agar dengan cara dioleskan. Untuk mendapatkan pertumbuhan yang merata, kapas lidi dioleskan secara mendatar, kemudian lempeng agar diputar 90⁰ dan dibuat olesan kedua, dengan lempeng agar diputar 45⁰ dan dibuat olesan ketiga. Lempeng agar dibiarkan mengering kurang lebih 5 menit, kemudian tempatkan kertas cakram yang sudah direndam dengan sampel yang diujikan pada permukaan lempeng agar.

Dalam 1 lempeng agar dapat digunakan 5-6 macam dosis perlakuan jarak antara kertas cakram harus cukup luas sehingga wilayah jernih tidak saling berhimpitan yang nantinya akan menyulitkan dalam proses pengukuran zona hambat. Kertas cakram ditekan dengan pinset, tidak perlu terlalu keras karena akan merusak permukaan agar. Lempeng yang sudah ditempelkan kertas cakram diinkubasi pada suhu tumbuh optimal dari bakteri patogen yang sedang diujikan. Setelah bakteri uji sudah tumbuh merata dan terlihat adanya zona jernih di permukaan agar, maka luas zona jernih dapat diukur dengan mengukur diameternya.

Uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan *Minimum Bacterial Concentration* (MBC)

Tabung reaksi steril disiapkan sebanyak 24 buah dan telah diberi label konsentrasi. Dibuat konsentrasi bahan uji sesuai dengan tabel preparasi, masing-masing 1 ml. Dimasukkan 1 ml suspensi bakteri 10⁶ CFU.ml⁻¹ ke dalam masing-masing tabung reaksi dan vortex hingga homogen. Semua tabung diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 18-24 jam. Setelah 18-24 jam, diamati dan dicatat derajat kekeruhan pada semua tabung.

Selain itu dicatat nilai MIC yang merupakan konsentrasi terendah dari tabung yang tidak menunjukkan adanya kekeruhan. Untuk mengetahui nilai MBC, dilakukan *streak* pada medium TSA dan diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah koloni yang tumbuh pada media agar dengan *colony counter*. Dari hasil perhitungan koloni tersebut dapat ditentukan MIC dan MBC dari ekstrak kasar bahan antibakteri tersebut.

Pengamatan dengan Mikroskop Elektron (SEM)

Sebelum pengamatan mikroskopis SEM dilakukan pewarnaan gram. Sediaan dibuat di atas cover glass dan dikeringkan pada suhu kamar, jika sudah kering difiksasi dengan cara dipanaskan di atas nyala api 3-4 kali lalu dibiarkan dingin. Setelah dingin diletakan di atas rak pewarnaan. Dituangkan larutan kristal violet di atas sediaan, diamkan selama 1 menit. Sediaan dibilas dengan air, kemudian dituangi larutan Lugol dan didiamkan 1 menit dan dibilas dengan air. Sediaan dilunturkan dengan Alkohol 96% hingga warna violet memudar dan dibilas dengan air. Kemudian sediaan dituangi larutan safranin, didiamkan 30 detik, dibilas dengan air, dikering anginkan. Setelah sediaan kering dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop SEM.

HASIL DAN PEMBAHASAN

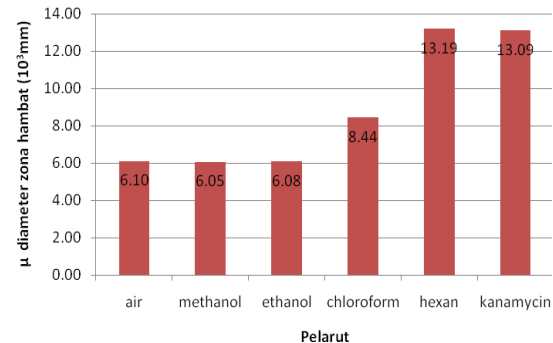
Uji Cakram (*Disk Diffusion*)

Efektivitas antibakteri ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di sekitar cakram. Larutan ekstrak kasar Teripang digunakan untuk pengujian aktivitas antibakteri dengan menggunakan metode difusi cakram Kirby-Bauer, yaitu pengujian antimikroba dengan mengukur diameter daerah hambatan yang terjadi di sekitar kertas cakram yang sudah mengandung bahan antimikroba sesuai dengan konsentrasi perlakuan [9].

Diameter zona hambat dari ekstrak teripang dengan pelarut air dengan rerata sebesar 6.096 mm, methanol 6.054 mm, etanol 6.076 mm, cloroform 8.442 mm dan *n*-heksan 13.188 mm (Gambar 1). Pelarut *n*-heksan paling efektif dalam menghambat bakteri, karena adanya bioaktif pada Teripang berfungsi sebagai bahan antibakteri tidak bisa terlarut pada pelarut yang bersifat polar. Menurut Kimball [10], senyawa antibakteri (Triterpenoid) larut dalam pelarut non polar. Sedangkan menurut Martoyo [11], Teripang dari Famili Holothuriidae genus *Holothuria*, *Actinopyga* dan *Stichopus* banyak mengandung zat ekstraktif seperti senyawa Terpenoid dimana hasil hidrolisisnya mudah larut dalam pelarut organik (seperti Cloroform, eter dan *n*-heksan) dan tidak larut dalam air [12].

Zona jernih pada lapisan agar yang terbentuk karena senyawa antibakteri berdifusi ke dalam lapisan tersebut dan menghambat pertumbuhan mikroorganisme (bakteri), sedangkan lapisan agar yang ditumbuhi mikroorganisme akan tampak keruh [13]. Kanamycin sebagai antibakteri kontrol dapat menghambat seluruh bakteri uji. Kanamycin dengan konsentrasi $0,2 \text{ mg.ml}^{-1}$ dengan

daya penghambatan rata-rata sebesar 13,09 mm terlihat bahwa ekstrak teripang menunjukkan aktivitas yang hampir sama daya hambatnya dengan Kanamycin (Gambar 1).



Gambar 1. Diameter daerah hambat ekstrak Teripang terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila*

Uji MIC dan MBC

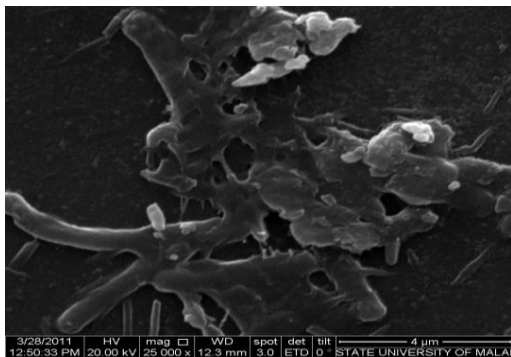
Pada *Aeromonas hydrophila* konsentrasi $0,50 \text{ mg.ml}^{-1}$ sudah terlihat sedikit jernih, yang menandakan bahwa pertumbuhan bakteri dapat dihambat (bakterostatik) oleh ekstrak teripang dengan total bakteri $2,75.10^1 \text{ CFU.plate}^{-1}$ dan pada konsentrasi $0,55 \text{ mg.ml}^{-1}$ terlihat sangat jernih, menandakan bahwa pertumbuhan bakteri telah dapat dihentikan dan bakterisidal. Pelczar dan Chan [14] menyatakan bahwa antibakteri bersifat bakteriostatik atau bakterisid tergantung dari konsentrasinya. Ekstrak kasar bersifat bakterisidal karena ekstrak mampu membunuh bakteri dan bakteristatis karena ekstrak kasar hanya mampu menghambat pertumbuhan bakteri.

Senyawa antibakteri bekerja dengan cara berinteraksi dengan dinding sel bakteri sehingga mengakibatkan permeabilitas pada sel bakteri dan juga berdifusi ke dalam sel sehingga mengakibatkan pertumbuhan bakteri terhambat (bakteriostatik) atau mati (bakteriosidal) [15]. Selain itu, senyawa antibakteri juga dapat menembus membran dan berinteraksi dengan material genetik sehingga bakteri mengalami mutasi.

Golongan bakteriostatik bekerja dengan jalan menghambat sintesis protein pada ribosom bakteri melalui proses difusi pasif melalui kanal hidrofilik dan sistem transportasi aktif. Setelah antibakteri masuk ke dalam ribosom, maka akan berikatan dengan ribosom dan menghalangi masuknya kompleks tRNA-asam amino pada lokasi asam amino, sehingga bakteri tidak dapat berkembang biak [10].

Karakter dan Struktur Bakteri yang Terhambat

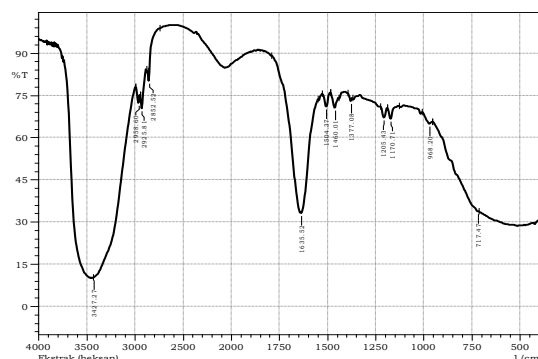
Hasil penelitian diduga ekstrak dari pelarut *n*-heksan mengandung senyawa Triterpenoid. Efek penghambatan yang terjadi pada koloni bakteri *Aeromonas hydrophila* disebabkan oleh kandungan senyawa aktif Teripang salah satunya adalah Triterpenoid. Secara umum golongan Triterpenoid mampu merusak membran sel, menginaktivkan enzim dan mendenaturasi protein sehingga dinding sel mengalami kerusakan karena penurunan permeabilitas. Perubahan permeabilitas membran sitoplasma memungkinkan ion-ion organik yang penting masuk ke dalam sel sehingga berakibat terhambatnya pertumbuhan bahkan hingga mematikan sel (Gambar 2).



Gambar 2. Bakteri Setelah Diberi Perlakuan

Hasil Pengujian Spektrofotometri Inframerah

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak Teripang (*Holothuria* sp.) dengan menggunakan alat alat FT- IR = 8400 S Shimadu dapat terdeteksi sebanyak 12 peak dan hasil identifikasinya dapat dilihat pada Gambar 3 berikut :



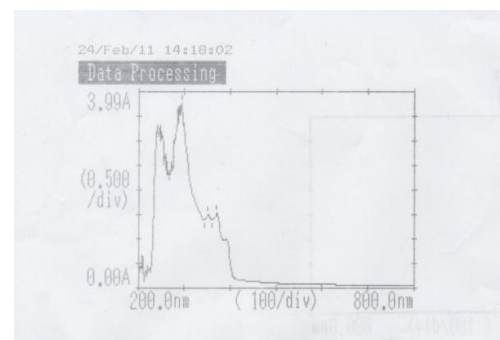
Gambar 3. Spektrum spektrofotometri Inframerah dari ekstrak n-heksan

Gambar 3 menunjukkan adanya serapan pada daerah bilangan gelombang (cm^{-1}) 2958,60; 2925,81 ; 2852,52 yang diduga serapan dari gugus

CH_2 . Pita serapan yang tajam pada daerah gelombang (cm^{-1}) 1635,52 dengan intensitas kuat mengidentifikasi gugus karbonil ($\text{C}=\text{O}$) yang pita serapannya diperkuat oleh pita serapan pada bilangan gelombang (cm^{-1}) 1205,43 ; 1170,71. Pita serapan pada bilangan gelombang 1377,08 cm^{-1} menunjukkan serapan oleh gugus CH_3 . Pita serapan pada daerah gelombang 3427,27 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus Karboksilat. Pita serapan tersebut diperkuat oleh serapan pada daerah gelombang 1635 cm^{-1} dengan adanya gugus $\text{C}=\text{O}$.

Hasil Pengujian Spektrofotometri Ultra Violet

Hasil analisis ekstrak teripang dengan pelarut *n*-heksan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis memberikan tiga puncak serapan. Spektrum spektrofotometri UV-Vis dari ekstrak *n*-heksan ditunjukkan pada Gambar 3. Munculnya serapan maksimum pada panjang gelombang 241,0 nm diduga diakibatkan oleh adanya transisi elektron dari $\pi - \pi^*$ yang disebabkan oleh adanya suatu kromofor $\text{C}=\text{O}$. Hal ini didukung dari hasil analisis spektrofotometri inframerah yang menunjukkan isolat mempunyai gugus pada panjang gelombang 1635,52 nm. Serapan Ultra Violet yang landai pada panjang gelombang 352,0 nm dan 371,0 nm kemungkinan diakibatkan oleh terjadinya transisi elektron dari $n - \pi^*$ dari ikatan rangkap $\text{C}=\text{O}$ [16]. Dari hasil pengujian dengan Spektrofotometri Ultra Violet diduga ekstrak *n*-heksan mengandung senyawa Triterpenoid.



Gambar 4. Spektrum spektrofotometri UV-Vis dari ekstrak n-heksan

Kesimpulan

1. Ekstrak kasar Teripang (*Holothuria* sp.) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Aeromonas hydrophila*
2. Ekstrak kasar Teripang berpengaruh terhadap karakter dan struktur bakteri *A. hydrophila* yaitu dengan merusak dinding sel dan membran sel bakteri

3. Hasil analisis Spektrofometri Infra Merah dan analisis Spektrofotometri Ultra Violet dengan pelarut *n*-heksan serapan dari ekstrak Teripang diduga mengandung senyawa Triterpenoid.

Saran

Disarankan untuk melakukan penelitian lebih lanjut secara *In-Vivo* dan melakukan purifikasi pada ekstrak kasar Teripang.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Serrano, P. H. 2005. Responsible use of antibiotics in aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- [2] Karunasagar I., R. Pai, G. R. Malathi. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*, 128:203–209.
- [3] Lawrence A. J., R. Afifi, M. Ahmed, Khalifa and T. Paget. 2009. Bioactivity as an options value of Sea Cucumbers in the Egiptian Red Sea. *Conserv. Biol.*, 24 (1): 217-225.
- [4] Farrouk Abd Hamid Ghous and B.H. Ridzwan. 2007. New species isolated from Malaysian Sea Cucumber with optimized secreted antibacterial activity, *American J. of Biochem. and Biotech.*, 3(2): 60-65.
- [5] Zancan, P. and P.A. Mourao, 2004. Venous and arterial thrombosis in rat models: dissociation of the antithrombotic effects of glycosaminoglycans. *Blood Coagul. Fibrinolysis*, 15: 45-54.
- [6] Hatakeyama, T., N. Matsuo, K. Shiba, S. Nishinohara, N. Yamasaki, H. Sugawara and H. Aoyagi. 2002. Amino acid sequence and carbohydrate-binding analysis of the N-acetyl-D-galactosamine-specific C-type lectin, CEL-I, from the Holothuroidea, *Cucumaria echinata*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66: 157-163.
- [7] Afiyatullo, S. S., A. I. Kalinovsky, T. A. Kuznetsova, V. V. Isakov, M. V. Pivkin, P. S. Dmitrenok and G. B. Elyakov, 2002. New diterpene glycosides of the fungus *Acremonium striatisporum* isolated from a sea cucumber. *J Nat. Prod.*, 65: 641-4.
- [8] Sedov, A. M., I. B. Shepeleva, N. S. Zakharova, O. G. Sakandelidze and V. V. Sergeev. 1984. Effect of Cucumarioside (a triterpene glycoside from the Holothurian *Cucumaria japonica*) on the development of an immune response in mice to corpuscular pertussis vaccine. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.*, 9: 100-104.
- [9] Bauer, A. W., W. M. Kirby, J. O. Sherrero, M. Turck. 1996. Antibiotic susceptibility testing by a standard single disc method. *American Journal of clinical pathology*, 45: 493-496.
- [10] Kimball, John W.. 2008. Bacteria, Kimball's Biology Pages. Creative Commons Attribution 3.0 Unported (CC BY 3.0) and The Saylor Foundation. <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/E/Eubacteria.html>.
- [11] Martoyo, J., N. Aji, dan T. Winanto, 2006, Budidaya Teripang, Cet. 6, edisi revisi, Penebar Swadaya, Jakarta.
- [12] Trease, G. E., W. C. Evans. 1983. Drugs of Biological Origin. In: Pharmacognosy 12th Ed. United Kingdom: Balliere Tindall, 309-540.
- [13] Zweig, G. and J.R. Whitaker, 1971. Paper Chromatography and Electrophoresis. Academic Press. London, 397-400.
- [14] Pelczar, M. J dan E.C.S. dan Chan. 1988. Dasar-Dasar Mikrobiologi Jilid 2. Alih Bahasa R.S. Hadioetomo, T. Imas, S.S. Tjitrosomo dan S.L. Angka. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta. 88 hal.
- [15] Edberg, S. C. 1983. Tes kerentanan antimikroba. *Dalam* Antibiotika dan Infeksi. Alih bahasa: Chandra Sanusi. CV. EGC. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta. 219 hal.
- [16] Sastroamidjojo, H. 1985, Spektroskopi, Liberty, Yogyakarta.

MANUSCRIPT SUBMISSION

FOCUS AND SCOPE

Journal of Experimental Life Science (JELS) is scientific journal published by Graduate Program of Brawijaya University as distribution media of Indonesian researcher's results in life science to wider community. JELS is published in every four months. JELS published scientific papers in review, short report, and life sciences especially nanobiology, molecular biology and cellular biology. JELS is scientific journal that published compatible qualified articles to academic standard, scientific and all articles reviewed by expert in their field.

Journal of Experimental Life Science (JELS) have vision to become qualified reference media to publish the best and original research results, and become the foundation of science development through invention and innovation on cellular, molecular, and nanobiology rapidly to community.

Journal of Experimental Life Science (JELS) have objectives to published qualified articles on research's results of Indonesian researchers in life science scope. JELS encompasses articles which discuss basic principles on nature phenomenon with cellular, molecular, and nanobiology approach.

PEER REVIEW PROCESS

Publication of articles by JITODE is dependent primarily on their validity and coherence, as judged by peer reviewers, who are also asked whether the writing is comprehensible and how interesting they consider the article to be. All submitted manuscripts are read by the editorial staff and only those articles that seem most likely to meet our editorial criteria are sent for formal review. All forms of published correction may also be peer-reviewed at the discretion of the editors. Reviewer selection is critical to the publication process, and we base our choice on many factors, including expertise, reputation, and specific recommendations. The editors then make a decision based on the reviewers' advice, from among several possibilities:

Accepted, with or without editorial revisions
Invite the authors to revise their manuscript to address specific concerns before a final decision

Rejected, but indicate to the authors that further work might justify a resubmission

Rejected outright, typically on grounds of specialist interest, lack of novelty, insufficient conceptual advance or major technical and/or interpretational problems

PUBLICATION FREQUENCY

JELS publish 2 Issues per year.

OPEN ACCESS POLICY

This journal provides immediate open access to its content on the principle that making research freely available to the public supports a greater global exchange of knowledge.

COPYRIGHT NOTICE

Authors who publish with this journal agree to the following terms:

Authors retain copyright and grant the journal right of first publication with the work simultaneously licensed under a Creative Commons Attribution License that allows others to share the work with an acknowledgement of the work's authorship and initial publication in this journal.

Authors are able to enter into separate, additional contractual arrangements for the non-exclusive distribution of the journal's published version of the work (e.g., post it to an institutional repository or publish it in a book), with an acknowledgement of its initial publication in this journal.

Authors are permitted and encouraged to post their work online (e.g., in institutional repositories or on their website) prior to and during the submission process, as it can lead to productive exchanges, as well as earlier and greater citation of published work (The Effect of Open Access).

PRIVACY STATEMENT

The names and email addresses entered in this journal site will be used exclusively for the stated purposes of this journal and will not be made available for any other purpose or to any other party.

ETHICS PUBLICATION

Research that using animal, human, and clinical testing is should already have ethical clearance certificate from authorized institution.

**Title Typed in Bold, Capitalize each First Letter of Each Word, Except
Conjunctive, *Scientific name* should not be Abbreviated
(Calibri 14 Bold Center, should not exceed 12 words, except conjunctive)**

First Author^{1*}, Second Author², Third Author³ (Calibri 12 Center, without title)

¹First Author Affiliation, Correspondence author should be indicated by * symbol (Calibri 9 Center)

²Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Brawijaya, Malang, Indonesia

³Laboratorium of Physiology, Faculty of Medicine, University of Brawijaya, Malang, Indonesia

Abstract (Calibri 9 Bold Center)

This article illustrates preparation of your paper using MS-WORD (.doc or .rtf). Manuscript was numbered consecutively. Main text typed in two columns (67 characters), except title and abstract in one column. The manuscript should be written in English. The length of manuscript should not exceed 10 pages including table and figure in this format using A4 paper single space. The text should be in the margin of 3 cm up, down and left side, 2.5 cm on right side. Abstract includes the research purposes, research method and research results in one paragraph of *essay*, not *enumerative*. No citation in abstract. Abstract should not exceed 200 words. Keywords typed after abstract. (Calibri 9 Justify).

Keywords: manuscript, English, format, 5 words maximum (Calibri 9 Left)

INTRODUCTION* (Calibri 10 Bold, Left, Capslock)

All submitted manuscripts should contain original research which not previously published and not under consideration for publication elsewhere. Articles must be written in ENGLISH and manuscripts may be submitted for consideration as research report articles, short reports or reviews.

The introduction explains the background of the problem, the study of literature and research purposes. Some initial introduction paragraphs explain the problem and background to these problems [1]. The next few paragraphs explain the study of literature that contains recent knowledge development which is directly related to the issues. The last paragraph of the introductory section contains a description of the purposes of the study. (Calibri 10 Justify)

MATERIAL AND METHOD (Calibri 10 Bold, Left, Capslock)

This section describes the types of methods (qualitative, quantitative or mixed-method) with details of methods of data collection and data analysis [2]. This section also describes the perspective that underlying the selection of a particular method. (Calibri 10 Justify)

Data Collection (Calibri 10 Bold, Left)

Explain the data collection methods, i.e. surveys, observations or archive, accompanied by details of the use of such methods. This section also describes the population, sampling and sample selection methods. (Calibri 10 Justify)

The use of English language should followed proper grammar and terms. Name of organism should be followed by its full scientific name in the first mention, in *italic* [3]. Author of the scientific name and the word of “var.” typed regular. Example: *Stellaria saxatillis* Buch. Ham. First abbreviation typed in colon after the abbreviated phrase.

Author must use International Standard Unit (SI). Negative exponent used to show the denominator unit. Example: g l⁻¹, instead of g/l. The unit spaced after the numbers, except percentage [4]. Example: 25 g l⁻¹, instead of 25gl⁻¹; 35% instead of 35 %. Decimal typed in dot (not coma). All tables and figures should be mentioned in the text.

RESULT AND DISCUSSION (Calibri 10 Bold, Left, Capslock)

This section contains the results of the analysis and interpretation or discussion of the results of the analysis. Describe a structured, detailed, complete and concise explanation, so that the reader can follow the flow of analysis and thinking of researchers [5]. Part of the results study should be integrated with the results of the

Correspondence address: (Calibri 8 Bold, Left)

Full name of correspondence author

Email : sapto@jurnal.ub.ac.id

Address : affiliation address include post code

analysis and the results and discussion are not separated.

Table

Table should be submitted within the manuscript and in separated file of *Microsoft Excel* (xls.). Table would not exceed 8 cm (one column) and 17 cm (two columns). Table should be embedded in different page after references.

Table should be numbered in sequence. Table title should be brief and clear above the table, with uppercase in initial sentence. Vertical line should not be used. Footnote use number with colon and superscripted. Symbol of (*) or (**) was used to show difference in confidence interval of 95 and 99%.

Table 1. Example of the Table (Calibri 8.5 Left)

No	Point (Calibri 8.5 Justify)	Description
1		
2		
3		
4		
5		

Sources: Journal of PPSUB (Calibri 8.5 Left)

Figures

Figures should be in high resolution and well contrast in JPEG or PDF with the following conditions:

- Monochrome image (line art), figures of black and white diagram (solid/no shades of gray), resolution 1000-1200 dpi (dot per inch).
- Combination Halftone, combine figure and text (image containing text) and coloured graphic or in grayscale format. Resolution 600-900 dpi.
- Halftone, coloured figure or grayscale format without text. Resolution 300 dpi.

- Black and white figure should be in the grayscale mode, while coloured figures should be in RGB mode.
- Figure should not exceed the width of 8 cm (one column), 12.5 cm (1.5 columns) or 17 cm (two columns).
- Figures title typed clearly below the figure.
- Figure with pointing arrow should be grouped (grouping).
- Figures were recommended in black and white.
- Legend or figure description should be clear and complete. If compressed, the figure should be readable.
- Statistic graphic should be supplemented with data sources.
- If the figures come from the third party, it should have the copyright transfer from the sources.

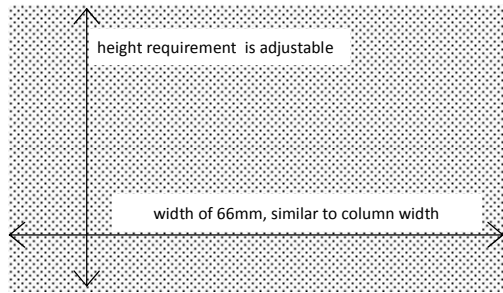


Figure 1. Illustration of Dimensional Figure of one column width. Figure dimension adjusted to the width of one column. Name the figure (diagram) written below the image. (Calibri 8.5 Justify)

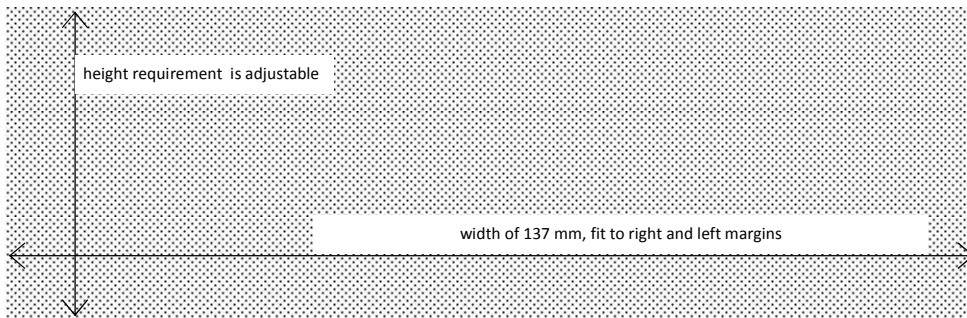


Figure 2. . Illustration of Dimensional Figure of two column width. Figure dimension adjusted to the width of two columns (137 mm). Figure were align top or bottom of the page. (Calibri 8.5 Justify)

References

1. Primary references include journal, patent, dissertation, thesis, paper in proceeding and text book.
 2. Avoid self citation.
 3. Author should avoid reference in reference, popular book, and internet reference except journal and private ana state institution.
 4. Author was not allowed to use abstract as references.
 5. References should been published (book, research journal or proceeding). Unpublished references or not displayed data can not be used as references.
 6. References typed in numbering list (format number 1,2,3,...), ordered sequentially as they appear in the text (system of Vancouver or author-number style).
 7. Citation in the manuscript typed only the references number (not the author and year), example: Obesity is an accumulation of fat in large quantities which would cause excessive body weight (overweight) [1]. Obesity is a risk factor of diabetic, hypertension dan atherosclerosis [2].
- [4].Syafi'i, M., Hakim, L., dan Yanuwiyadi, B. 2010. Potential Analysis of Indigenous Knowledge (IK) in Ngadas Village as Tourism Attraction. pp. 217-234. In: Widodo, Y. Noviantari (eds.) *Proceed-ing Basic Science National Seminar 7* Vol.4. Universitas Brawijaya, Malang. (Article within conference proceeding)
- [5].Dean, R.G. 1990. Freak waves: A possible explanation. p. 1-65. *In* Torum, A., O.T. Gudmestad (eds). *Water wave kinetics*. CRC Press. New York. (Chapter in a Book)
- [6].Astuti, A.M. 2008. The Effect of Water Fraction of *Stellaria* sp. on the Content of TNF- α in Mice (*Mus musculus* BALB-C). Thesis. Department of Biology. University of Brawijaya. Malang. (Thesis)

CONCLUSION (Calibri 10 Bold, Left, Capslock)

Conclusion of the study's findings are written in brief, concise and solid, without more additional new interpretation. This section can also be written on research novelty, advantages and disadvantages of the research, as well as recommendations for future research. (Calibri 10 Justify)

ACKNOWLEDGEMENT (Calibri 10 Bold, Left, Capslock)

This section describes gratitude to those who have helped in substance as well as financially. (Calibri 10 Justify)

REFERENCES (Calibri 10 Bold, Left, Capslock)

- [1].(Calibri 10 Justify, citation labelling by references numbering)
- [2].Vander, A., J. Sherman., D. Luciano. 2001. *Human Physiology: The Mecanisms of Body Function*. McGraw-Hill Higher Education. New York. (Book)
- [3].Shi, Z., M. Rifa'i, Y. Lee, K. Isobe, H. Suzuki. 2007. Importance of CD80/CD86-CD28 interaction in the recognition of target cells by CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells. *Journal Immunology*. 124. 1:121-128. (Article in Journal)

Cover Images:

3D Structure of EGCG (*Epigallocatechin-3-Gallate*)
Green Tea Component

Created by:

Widodo, S.Si.,M.Si.,Ph.D MED Sc.

Address:

Building E, 2nd Floor, Graduate Program, University of Brawijaya

Jl. Mayor Jenderal Haryono 169, Malang, 65145

Telp: (0341) 571260 ; Fax: (0341) 580801

Email: jels@ub.ac.id

Web: jels.ub.ac.id

