

## Ekstrak Sambiloto Menurunkan Patogenesitas Ookista *Eimeria Tenella*

(EXTRACTS OF ANDROGRAPHIS PANICULATA DECREASED PATHOGENISITY  
OF OOCYST EIMERIA TENELLA)

Yulia Yellita<sup>1</sup>, Umi Cahyaningsih<sup>2</sup>, Dyah Iswantini Pradono<sup>3</sup>  
Wiwin Winarsih,<sup>4</sup> Wasmen Manalu<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Kesehatan Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Andalas.  
Kampus Limau Manis, Padang-Sumatera Barat. Telp./Fax: +62-751-71464

<sup>2</sup>Laboratorium Protozoologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.

<sup>3</sup>Departemen Kimia, Fakultas Matematika Ilmu Pengetahuan Alam, IPB.

<sup>4</sup>Bagian Patologi, FKH IPB .<sup>5</sup>Departemen Anatomi, Fisiologi, dan Farmakologi, FKH IPB  
Email: giyel\_revaldi@yahoo.com

### ABSTRAK

*Eimeria tenella* termasuk salah satu dari tujuh spesies *Eimeria*, suatu protozoa intraseluler patogen penyebab koksidiosis pada unggas. Infeksi oleh parasit ini dimulai dengan tertelannya ookista yang telah bersporulasi. Tujuan penelitian ialah melihat perendaman ookista *E. tenella* dalam ekstrak sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness) sebelum diinfeksikan berpengaruh pada jumlah ookista pada tinja, sel radang pada sekum, dan pertambahan bobot badan. Sebanyak 115 ekor ayam pedaging (CP 707) umur satu hari dibagi ke dalam lima kelompok perlakuan, masing-masing kelompok perlakuan terdiri atas 23 ekor ayam. Pada umur 14 hari, masing-masing ayam diinfeksi dengan *E. tenella* sebanyak  $10^5$  ookista. Kelompok pertama hanya diberi air tanpa ookista sebagai kontrol negatif, kelompok kedua diinfeksi dengan ookista direndam dalam aquades sebagai kontrol positif, tiga kelompok ayam yang lain diinfeksi dengan ookista bersporulasi yang telah direndam ekstrak sambiloto dengan waktu rendam masing-masing selama 2, 4, dan 6 jam. Pada hari ke-5 sampai 14 setelah infeksi dilakukan penghitungan jumlah ookista dalam tinja, hari ke 0,3,6,9, dan 14 setelah infeksi masing-masing tiga ekor ayam dipotong, sekum diambil dibuat preparat histopatologi selanjutnya dihitung jumlah heterofil serta makrofag, dan pertambahan bobot badan diukur dengan melakukan penimbangan ayam tiap minggu sampai ayam umur lima minggu. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa waktu perendaman ookista bersporulasi dalam ekstrak sambiloto selama enam jam sebelum diinfeksikan menurunkan jumlah ookista yang dikeluarkan bersama tinja, jumlah sel radang (makrofag dan heterofil) dalam sekum, dan meningkatkan pertambahan bobot badan. Simpulan penelitian ini memperlihatkan bahwa perendaman ookista *E. tenella* bersporulasi dalam ekstrak sambiloto menurunkan patogenesitas ookista *E. tenella*, hal ini menunjukkan bahwa ekstrak sambiloto mempunyai potensi yang baik sebagai antikoksidia.

Kata kunci: Perendaman, ookista *Eimeria tenella*, sambiloto, ekstrak metanol, ayam pedaging.

### ABSTRACT

*Eimeria tenella* is one of the nine of *Eimeria* species, a pathogenic intraseluler protozoa causing avian coccidiosis. Infection was initiated by the ingestion of sporulated oocysts. The aim of this study was to investigate the effect of *E. tenella* oocyst incubation in methanol extract of *Andrographis paniculata* before infection in broiler performance. This research used 115 broiler DOC (CP 707) divided into five groups, each group consisted of 23 broilers. The infection with  $1 \times 10^5$  oocyst were done at the 14<sup>th</sup> day old of chicken. The 1<sup>st</sup> group was placebo (KN), while the 2<sup>nd</sup> group was infected with unincubated oocyst (KP), and the other three groups i.e. : 3<sup>rd</sup>, 4<sup>th</sup>, 5<sup>th</sup> were infected with incubated oocyst in *A. paniculata* extract for 2, 4, and 6 hours, respectively. The number of oocysts in feces were counted on day 5<sup>th</sup> to 14<sup>th</sup> post-infection, the heterophile and macrophages were counted from caecum histology preparation, by slaughtered three chickens of each of groups on the day 0,3,6,9, and 14 post infection, and accretion body weight was measured by weighing chickens per week to five-week old chickens. The results of this study indicated that the incubation period the sporulated oocyst in the extract of *A. paniculata* for six hours before infection, reduced the number of oocysts production in the feces, the number of inflammatory cells (macrophages and heterophile) in the cecum, and increases body weight (gain). In conclusion *A. paniculata* extract decreased the pathogenisity of *E. tenella* oocyst, so the extract of *A. paniculata* has good potential as anticoccidia. It is high likely that *A. paniculata* extract has a potential to be anticoccidia.

Key words: Incubated oocyst *Eimeria tenella*, *Andrographis paniculata* methanol extract, broiler

## PENDAHULUAN

Koksidiosis unggas merupakan salah satu penyakit intestinal dan penyebab kerugian yang utama dalam industri perunggasan. Kerugian ekonomi setiap tahun akibat penyakit ini pada industri perunggasan di seluruh dunia mencapai sekitar US \$ 1 miliar, yaitu dalam bentuk penurunan performa ayam dan peningkatan biaya produksi (Chapman 1997; Berezin *et al.*, 2008). Di Amerika Serikat, kerugian yang dicapai akibat penyakit ini diperkirakan sebesar US \$ 1,5 miliar tiap tahun (Allen dan Fetterer 2002).

Koksidiosis disebabkan oleh protozoa intraseluler, yaitu *Eimeria* yang termasuk ke dalam filum Apikompleksa. *Eimeria* menyebabkan kerusakan pada usus sehingga menurunkan efisiensi penggunaan pakan, penambahan bobot badan, penurunan daya tahan tubuh, dan penurunan produksi telur (Min *et al.*, 2004). *Eimeria tenella* adalah salah satu dari sembilan spesies *Eimeria* yang paling patogen terdapat pada ayam, berpredileksi di sekum dan menyebabkan koksidiosis sekum (Muazu *et al.*, 2008). Ookista dari parasit tersebar dengan kemampuan reproduksi yang sangat besar, sehingga tidak mungkin ayam bebas dari koksidia, terutama pada ayam yang dipelihara secara intensif. Siklus hidup genus *Eimeria* sangat kompleks, yaitu ekstraseluler, intraseluler, stadium seksual, dan aseksual sehingga pemberian vaksin menjadi tidak efektif (Lillehoj 1998).

Kontrol terhadap koksidiosis dilakukan dengan menambahkan antikoksidia dalam pakan. Sampai saat sekarang pemakaian obat tersebut masih merupakan pilihan utama dalam industri perunggasan, karena pemberian obat lebih efektif dibandingkan hanya mengandalkan respons imun hewan (Alfaro *et al.*, 2007). Penggunaan obat secara rutin dalam waktu lama, telah menimbulkan resistensi koksidia terhadap obat (Tipu *et al.*, 2002), sehingga penggunaan antikoksidia dan antibiotik perlu dikurangi.

Telah banyak dilakukan penelitian untuk mencari obat alternatif pengganti antibiotik dan antikoksidia. Obat pengganti kebanyakan berasal dari tanaman karena tidak menimbulkan residu dalam produk ternak. Tanaman yang dapat digunakan sebagai antikoksidia antara lain ekstrak daun *Azadirachta indica* (Biu *et al.*, 2006) dan ekstrak *Sophora flavescens* (Youn dan Noh, 2001).

Salah satu obat alternatif yang berasal dari tumbuhan yang perlu dipertimbangkan adalah tanaman sambiloto (*Andrographis paniculata*). Tanaman ini telah biasa digunakan masyarakat Indonesia sebagai bahan jamu. Sambiloto dapat digunakan sebagai antibiotik dan tonikum (Chopra *et al.*, 1992), protozoasidal (Mishra *et al.*, 2007), dan antiradang (Sheeja *et al.*, 2006). Sidharta *et al.*, (2010) melaporkan bahwa flavonoid dan tanin pada sambiloto mempunyai potensi sebagai antelmintik. Sambiloto secara *in vitro* mempunyai daya hambat terhadap  $\alpha$ -glucosidase kapang (Subramanian *et al.*, 2008). Diterpenoid dan flavonoid merupakan kandungan kimia utama sambiloto (Tang dan Eisenbrand, 1992; Saxena *et al.*, 2000). Komponen bioaktif utama tanaman ini adalah andrografolid, suatu diterpenoid yang memiliki rasa yang sangat pahit (Mishra *et al.*, 2007).

Penambahan sambiloto dalam pakan ayam pedaging dapat meningkatkan konversi pakan, bobot hidup, dan menurunkan angka kematian (Tipikorn 2002). Cahyaningsih *et al.*, (2003) dalam penelitian pemberian ekstrak sambiloto pada ayam diinfeksi *E. tenella* terhadap gambaran diferensial leukosit melaporkan bahwa sambiloto mampu meningkatkan jumlah sel fagosit ayam yang diinfeksi *E. tenella*. Pemberian campuran sambiloto dalam pakan unggas mampu mencegah penyakit serta meningkatkan performa ayam sehingga sambiloto dapat dipakai sebagai pengganti antibiotik (Srihanam 2008).

Infeksi meningkatkan jumlah sel radang di lokasi infeksi yang bertujuan antara lain mengeliminir agen infeksi dan meningkatkan daya tahan tubuh. Heterofil dan makrofag merupakan bagian utama dari respon imun bawaan (*innate*) pada unggas (Stabler *et al.*, 1994). Heterofil datang kelokasi infeksi yang bersifat akut. Selanjutnya diikuti makrofag yang mempunyai peranan antara lain berupa respons imun dapatan serta bertanggung jawab terhadap pembersihan dan penghancuran patogen ekstraseluler dan intraseluler melalui fagositosis (Dalloul dan Lillehoj 2006).

Masih sedikit informasi tentang potensi sambiloto untuk pengobatan koksidiosis sehingga perlu dilakukan penelitian untuk mencari strategi alternatif dalam pengobatan infeksi *E. tenella* menggunakan ekstrak sambiloto. Berdasarkan fungsi sambiloto yang luas maka muncul hipotesa bahwa dengan merendam ookista yang telah bersporulasi sebelum diinfeksi dalam ekstrak sambiloto akan melindungi ayam terhadap infeksi koksidia.

Penelitian ini bertujuan mengukur pengaruh perendaman ookista bersporulasi dalam ekstrak sambiloto terhadap produksi ookista dan performa ayam pedaging dengan membandingkan empat parameter yaitu jumlah ookista yang keluar bersama tinja, jumlah sel radang dalam sekum (heterofil dan makrofag), serta penambahan bobot badan.

## METODE PENELITIAN

### Penyiapan Ekstrak Tanaman dan Penapisan Fitokimia

Serbuk sambiloto yang terdiri atas batang dan daun tanaman sambiloto diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (BALITRO) Bogor. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi memakai pelarut metanol, yaitu sebanyak 1000 g serbuk sambiloto direndam dalam 3 liter pelarut metanol selama 24 jam lalu disaring. Ampas direndam lagi dengan pelarut metanol. Perendaman dilakukan 4 kali sampai warna pelarut menjadi bening. Proses ekstraksi dilakukan agar metabolit sekunder terekstraksi. Filtrat yang diperoleh diuapkan dengan *rotary evaporator*, dan diperoleh ekstrak pekat yang selanjutnya disebut ekstrak metanol herbal sambiloto. Selanjutnya dilakukan uji fitokimia yang meliputi flavonoid, alkaloid, tanin, terpenoid/steroid, saponin, dan kuinon (Harborne 1987). Uji fitokimia dilakukan di laboratorium analitik FMIPA- IPB

### Perbanyak Ookista *E. tenella*

Perbanyak ookista *E. tenella* dilakukan secara *in vivo* dengan menginfeksi ayam pedaging umur 14 hari dosis  $10^5$  ookista bersporulasi (dosis ini dipakai berdasarkan hasil penelitian pendahuluan). Tinja dikoleksi mulai hari ke-5 sampai hari ke-14 setelah infeksi. Pemisahan ookista dari tinja dilakukan dengan metode konsentrasi menggunakan garam jenuh lalu disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 1500 rpm. Supernatan yang mengandung ookista ditampung, kemudian ditambahkan air sebanyak lima kali volume supernatan, lalu disentrifus lagi. Endapan yang mengandung ookista dilarutkan dengan kalium bikhromat. Ookista selanjutnya disporulasi selama tiga hari dalam suhu kamar. Setelah terjadi sporulasi, ookista dibersihkan dari kalium bikhromat dengan cara disentrifus berkecepatan 1500 rpm selama 10 menit. Setiap kali

pencucian, supernatan dibuang (Tampubolon 2004). Endapan yang mengandung ookista siap digunakan.

### Perendaman Ookista dengan Ekstrak Sambiloto

Lima cawan petri diberi label untuk wadah perendaman ookista yang telah bersporulasi dengan ekstrak sambiloto konsentrasi 180 mg/L. Pemilihan dosis 180 mg/L adalah berdasarkan rangkaian penelitian sebelumnya bahwa pemberian dosis ekstrak sambiloto 180 mg/L pada ayam diinfeksi *E. tenella* nyata ( $P < 0.05$ ) menurunkan jumlah ookista dibandingkan Kontrol Positif (KP), namun tidak berbeda dibandingkan pemberian dengan preparat sulfakloropirazin (belum publikasi). Cawan pertama kelompok air tanpa ookista *E. tenella* Kontrol Negatif (KN), Cawan kedua untuk kelompok perlakuan perendaman ookista dengan air (KP), Tiga cawan yang lain untuk perendaman ookista *E. tenella* dengan ekstrak sambiloto, masing-masing selama 2, 4, dan 6 jam pada suhu kamar. Tiap-tiap cawan, kecuali kelompok KN, diisi dengan  $25 \times 10^5$  ookista yang telah bersporulasi. Setelah direndam, ookista dibersihkan dari ekstrak sambiloto dengan cara disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 1500 rpm. Setelah bersih dari bahan perendam, selanjutnya ookista siap untuk diinfeksi.

### Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan 115 ekor ayam pedaging (CP 707) umur satu hari yang dibagi ke dalam lima kelompok perlakuan, masing-masing perlakuan terdiri atas 23 ekor ayam. Tiga kelompok ayam diinfeksi dengan ookista *E. tenella* yang telah direndam ekstrak sambiloto dengan waktu perendaman masing-masing selama 2, 4, dan 6 jam (K2, K4, K6), satu kelompok diinfeksi dengan ookista tanpa direndam sebagai kontrol positif, dan satu kelompok dengan aquades sebagai kontrol negatif. Vaksinasi dengan vaksin tetelo galur LaSota diberikan setelah ayam berumur empat hari melalui tetes mata.

Pada saat ayam berumur 14 hari, ayam diinfeksi dengan *E. tenella* telah direndam dalam ekstrak sambiloto sebanyak  $10^5$  ookista melalui oral (berdasarkan penelitian pendahuluan). Pakan yang diberikan adalah pakan standar tanpa antibiotik (*enhancer*) dan antikoksida. Pakan dan minum diberikan secara *ad libitum*. Bobot badan ditimbang setiap minggu. Pada hari

ke-0, 3, 6, 9, dan 14 setelah infeksi, pada masing-masing kelompok perlakuan tiga ekor ayam dikorbankan nyawanya.

### **Pembuatan Sediaan Histopatologi.**

Setelah ayam dikorbankan sekum diambil, sekum dimasukkan masing-masing kedalam kantong plastik dan direndam dalam BNF 10%. Setelah 24 jam, sekum dipotong 0.5 cm di bagian distal, diletakkan dalam *tissue cassette* kemudian didehidrasi dengan alkohol konsentrasi bertingkat, dijernihkan dengan *xylol* dan dilakukan *embedding* dalam parafin. Blok parafin dipotong 0.4  $\mu$ m dengan mikrotom, sayatan diletakkan di atas gelas objek. Selanjutnya dilakukan deparafinisasi dengan *xylol*, kemudian rehidrasi dengan alkohol. Kemudian sediaan dibilas dengan air. Sediaan kemudian diwarnai dengan pewarnaan hematoxilin dan eosin/HE.

### **Pengumpulan Data**

Pengamatan terhadap performa ayam dilakukan berdasarkan analisis pertambahan bobot badan yang diamati setiap minggu. Jumlah ookista yang dihasilkan per gram tinja dihitung mulai hari ke-5 sampai hari ke-14 setelah infeksi dengan menggunakan kamar hitung McMaster (Jang *et al.*, 2007). Jumlah makrofag dan heterofil dihitung dari preparat histopatologi yaitu pada bagian epitel sekum dengan pembesaran 100 kali pada 10 lapang pandang pada setiap preparat. Kemudian dirata-ratakan.

### **Analisis Data**

Data dianalisis menggunakan *software* SAS versi 9.1 dengan pengujian sidik ragam dan uji lanjut Duncan.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Uji Fitokimia Ekstrak Metanol Sambiloto**

Hasil ekstraksi sambiloto dengan metanol didapatkan rendemen sebesar 21,43%. Hasil ini lebih tinggi dibandingkan hasil ekstraksi metanol sambiloto oleh Sheeja *et al.*, (2006) dalam penelitian aktivitas antiradang dan anti oksidan tanaman sambiloto mendapatkan rendemen 14%. Baik dalam serbuk maupun ekstrak sambiloto ditemukan semua bahan kimia, yaitu alkaloid, flavonoid, fenol hidroquinon, steroid, tannin, saponin, dan tidak terdapat triterpenoid, namun ekstrak sambiloto

pada penelitian ini tidak mengandung senyawa saponin dan triterpenoid.

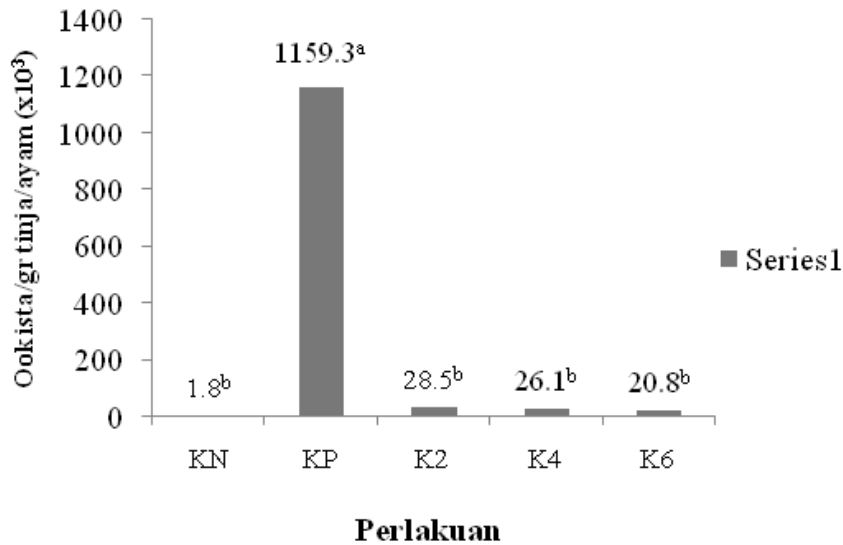
Menurut De Padua *et al.*, (1999) kandungan kimia tanaman sambiloto adalah diterpen, flavonoid, dan tanin yang mempunyai peranan sebagai antiradang. Komponen bioaktif utama sambiloto adalah andrografolid (Chen dan Liang 1982). Pada penelitian ini ditemukan kandungan komponen bioaktif andrografolid sebesar 26%.

### **Produksi Ookista**

Pengaruh perendaman ookista bersporulasi sebelum diinfeksi dengan ekstrak sambiloto disajikan pada Gambar 1. Infeksi ookista bersporulasi tanpa direndam ekstrak sambiloto pada ayam, nyata meningkatkan jumlah ookista dalam tinja (99,8%) dibandingkan kelompok tidak diinfeksi. Perendaman ookista bersporulasi dalam ekstrak sambiloto selama 2,4, dan 6 jam sebelum diinfeksi menurunkan produksi ookista masing-masing sebesar 97,5%, 97,7%, dan 98,2%. Perbedaan lama waktu perendaman tidak mempengaruhi jumlah ookista yang dikeluarkan bersama tinja, namun perendaman ookista dalam ekstrak sambiloto selama enam jam menurunkan jumlah ookista dalam tinja paling tinggi yaitu 98,2%. Tidak terjadi perbedaan waktu perendaman ookista dalam ekstrak sambiloto terhadap produksi ookista, hal ini mungkin karena jarak lama waktu perendaman yang pendek (2 jam).

Hasil penelitian ini sejalan dengan Titilincu *et al.*, (2008) yang melaporkan bahwa waktu perendaman ookista dengan campuran tiga ekstrak minyak tanaman *Artemisia anua*, *Hyssopus officinalis*, dan *Pimpinella anisum* (3 polioel) selama 96 jam menghasilkan persentase kerusakan ookista sebesar 33,4% dibandingkan perendaman 72 dan 48 jam masing-masing sebesar 8,4% dan 3% pada pengenceran media kultur 1:100. Perendaman ookista dengan ekstrak pinus selama 48 jam pada suhu kamar menyebabkan gangguan sporulasi yaitu terbentuk lebih banyak sporokista yang tidak normal dibandingkan dengan perendaman dengan kalium bikromat (Molan *et al.*, 2009).

Hasil uji fitokimia ekstrak sambiloto pada penelitian ini adalah flavonoid, tannin, alkaloid, dan triterpenoid. Diduga tannin dan alkaloid yang terdapat dalam ekstrak sambiloto menurunkan kemampuan invasi sporozoit sehingga menurunkan jumlah ookista dikeluarkan bersama tinja pada kelompok ayam diinfeksi dengan ookista yang direndam dalam



Gambar 1. Jumlah total ookista dalam tinja ayam mulai hari ke-5 sampai ke-14 setelah ayam diinfeksi dengan ookista *E.tenella* yang telah direndam dalam ekstrak sambiloto.

Keterangan. KN= Kelompok tidak diinfeksi. KP = Kelompok diinfeksi dengan ookista tanpa rendam. K2= Kelompok diinfeksi dengan ookista yang direndam dalam ekstrak sambiloto selama 2 jam. K4= Kelompok diinfeksi dengan ookista yang direndam dalam ekstrak sambiloto selama 4 jam. K6= Kelompok diinfeksi dengan ookista yang direndam dalam ekstrak sambiloto selama 6 jam. Huruf yang berbeda menunjukkan hasil beda nyata (P<0,05)

ekstrak sambiloto. Tanin antara lain mempunyai kemampuan menghambat aktivitas enzim endogenus (Horigome *et al.*, 1988). Kerusakan sporokista akibat perendaman ookista dalam ekstrak kulit pinus (*Pinus radiata*) disebabkan tanin dalam ekstrak *Pinus radiata* mampu menembus dinding sel ookista selanjutnya merusak sitoplasma (*sporont*) sehingga menyebabkan sporokista menjadi rusak (Molan *et al.*, 2009).

Tanin yang terdapat dalam ekstrak *green tea* secara *in vitro* mempunyai aktivitas antiparasit, penghambatan pertunasan telur dan larva parasit serta menginaktifkan larva yang infeksi (Molan *et al.*, 2009). Schubert *et al.*, (2005) dalam penelitian inkubasi sporozoit dalam ryanodin, menghasilkan bahwa riodin (suatu alkaloid herbal) menurunkan kemampuan invasi sporozoit *E.tenella* ke sel induk semang secara *in vitro*.

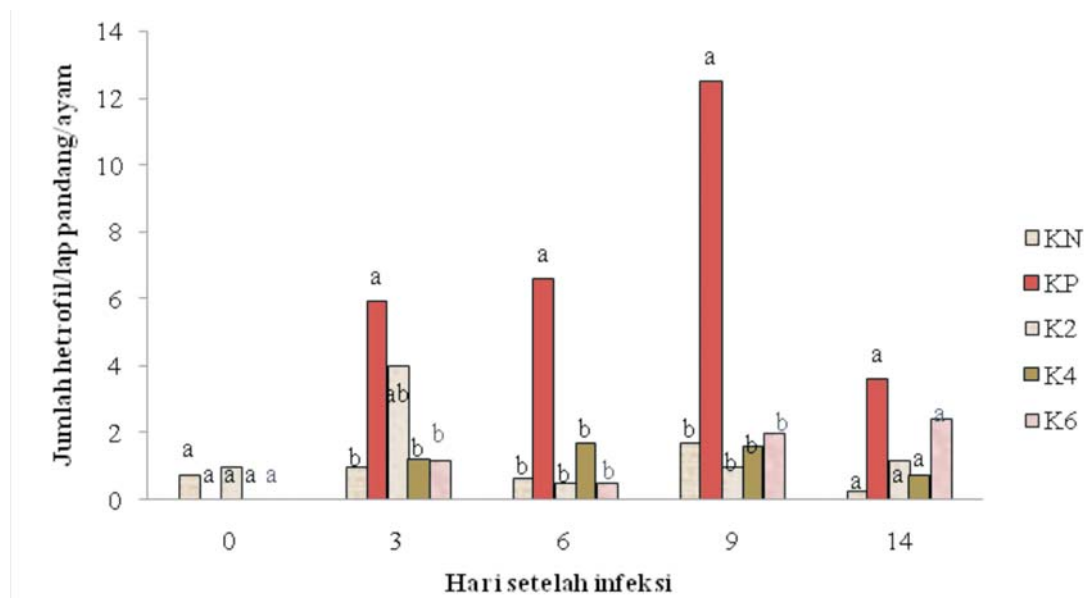
**Jumlah Heterofil**

Infeksi selalu memicu datangnya sel radang ke lokasi infeksi yang bertujuan antara lain untuk memfagositosis agen penyebab infeksi. Respon akibat peradangan ialah migrasi sel-sel pertahanan dari pembuluh darah ke tempat peradangan yang ditandai dengan akumulasi sel

polimorfnukleus dan makrofag. Jumlah heterofil pada sekum ayam akibat infeksi ookista *E. tenella* yang telah direndam dalam ekstrak sambiloto sebelum diinfeksi disajikan pada Gambar 2.

Pada saat akan diinfeksi tidak ada perbedaan jumlah heterofil pada sekum ayam pada semua kelompok ayam perlakuan, hal ini menunjukkan ayam tidak dalam kondisi terinfeksi dengan agen penyakit lain. Pada hari ketiga setelah ayam diinfeksi dengan ookista *E.tenella* bersporulasi tanpa perendaman terlihat peningkatan jumlah heterofil dalam sekum, ini menunjukkan infeksi berpengaruh terhadap modulasi heterofil dalam sekum. Perendaman ookista *E.tenella* dalam ekstrak sambiloto sebelum infeksi menurunkan jumlah heterofil dalam sekum ayam, sedangkan waktu perendaman yang berbeda tidak membedakan jumlah heterofil dalam sekum.

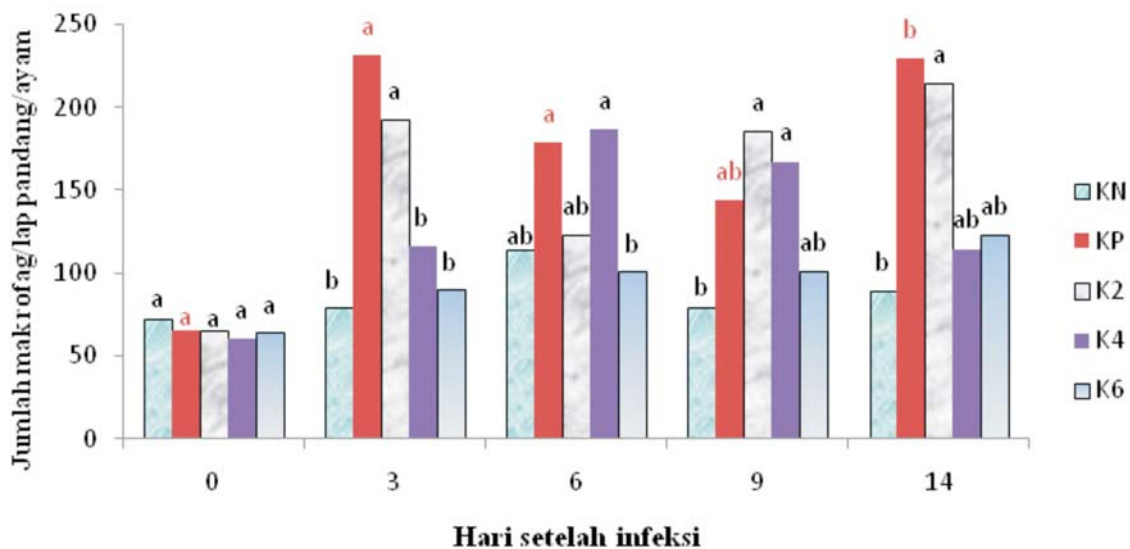
Pada hari ke-3 setelah infeksi adalah fase terbentuk skizon dalam epitel sekum sedangkan hari ke-6 setelah infeksi adalah fase ookista keluar bersama tinja, hal ini memperlihatkan pada perendaman ookista selama enam jam menurunkan jumlah heterofil dalam sekum yang paling tinggi yaitu masing-masing sebesar 80% dan 92% dibandingkan terhadap kelompok



Gambar 2. Jumlah heterofil dalam sekum ayam setelah diinfeksi dengan ookista *E.tenella* yang telah direndam dalam ekstrak sambiloto

Keterangan. KN= Kelompok tidak diinfeksi. KP = Kelompok diinfeksi dengan ookista tanpa rendam. K2= Kelompok diinfeksi dengan ookista yang direndam dalam ekstrak sambiloto selama 2 jam. K4= Kelompok diinfeksi dengan ookista yang direndam dalam ekstrak sambiloto selama 4 jam. K6= Kelompok diinfeksi dengan ookista yang direndam dalam ekstrak sambiloto selama 6 jam.

Huruf yang berbeda pada kelompok hari setelah infeksi yang sama menunjukkan beda nyata  $p < 0.05$ .



Gambar 3. Jumlah makrofag dalam sekum ayam setelah diinfeksi dengan ookista *E.tenella* yang telah direndam dalam ekstrak sambiloto.

Keterangan. KN= Kelompok tidak diinfeksi. KP = Kelompok diinfeksi dengan ookista tanpa rendam. K2= Kelompok diinfeksi dengan ookista yang direndam dalam ekstrak metanol selama 2 jam. K4= Kelompok diinfeksi dengan ookista yang direndam dalam ekstrak metanol selama 4 jam. K6= Kelompok diinfeksi dengan ookista tanpa rendam. K6= Kelompok diinfeksi dengan ookista yang direndam dalam ekstrak metanol selama 6 jam.

Huruf yang berbeda pada kelompok hari setelah infeksi yang sama menunjukkan beda nyata  $p < 0.05$ .

diinfeksi tanpa perendaman. Pada hari ke-9 setelah infeksi adalah fase akhir puncak produksi ookista, perendaman ookista dalam ekstrak sambiloto selama dua jam menurunkan heterofil dalam sekum sebesar 80%. Pada hari ke-14 setelah infeksi adalah fase ookista telah keluar semua dari tubuh ayam, perendaman ookista selama empat jam menurunkan heterofil sebesar 80%.

Hasil ini menunjukkan bahwa perendaman ookista *E.tenella* selama enam jam dalam ekstrak sambiloto menurunkan jumlah heterofil paling tinggi.

Heterofil merupakan sel pertama yang datang ke tempat infeksi, merupakan pertahan sel baris pertama dan terlibat dalam *innate* imunitas. Menurut Harmon (1998) heterofil setara dengan neutrofil pada manusia yang mempunyai fungsi antara lain sebagai fagosit. Hasil penelitian Andreasen *et al.*, (1991) pada penelitian fungsi heterofil terhadap kesehatan hewan menunjukkan bahwa jumlah heterofil dalam jaringan meningkat akibat infeksi oleh bakteri. Tanin dan alkaloid dalam ekstrak sambiloto menyebabkan kerusakan ookista sehingga kemampuan invasi parasit ke sel induk semang menjadi lemah, sehingga rangsangan heterofil untuk datang ke epitel sekum menjadi rendah. Heterofil bersifat fagositik (Stabber *et al.*, 1994), setelah heterofil memfagositosis maka secara cepat jumlahnya menurun (Andreasen *et al.*, 1991). Secara *in vitro* bahwa aktivitas flavonoid dari sambiloto mampu menekan genetik ekspresi neutrofil sebagai agen inflamasi (Buyoke dan Musbau., 2011).

Perbedaan waktu perendaman tidak mempengaruhi jumlah heterofil dalam sekum, hal ini mungkin karena perbedaan jarak waktu perendaman yang pendek, sehingga tingkat kerusakan ookista tidak terlalu berbeda.

### Jumlah Makrofag

Jumlah makrofag dalam sekum ayam akibat infeksi ookista *E. tenella* yang direndam dalam ekstrak sambiloto ditampilkan pada Gambar 3. Makrofag bertanggung jawab atas pembersihan dan perusakan patogen intraseluler dan ekstraseluler melalui fagositosis. Pada koksidirosis, makrofag terlibat pada stadium yang berbeda dalam respons imun. Pada hari ke nol setelah infeksi telah ditemukan makrofag dalam sekum. Selanjutnya pada hari ke-3 setelah infeksi terlihat peningkatan jumlah makrofag dibandingkan pada hari nol setelah infeksi. Hal ini menunjukkan infeksi

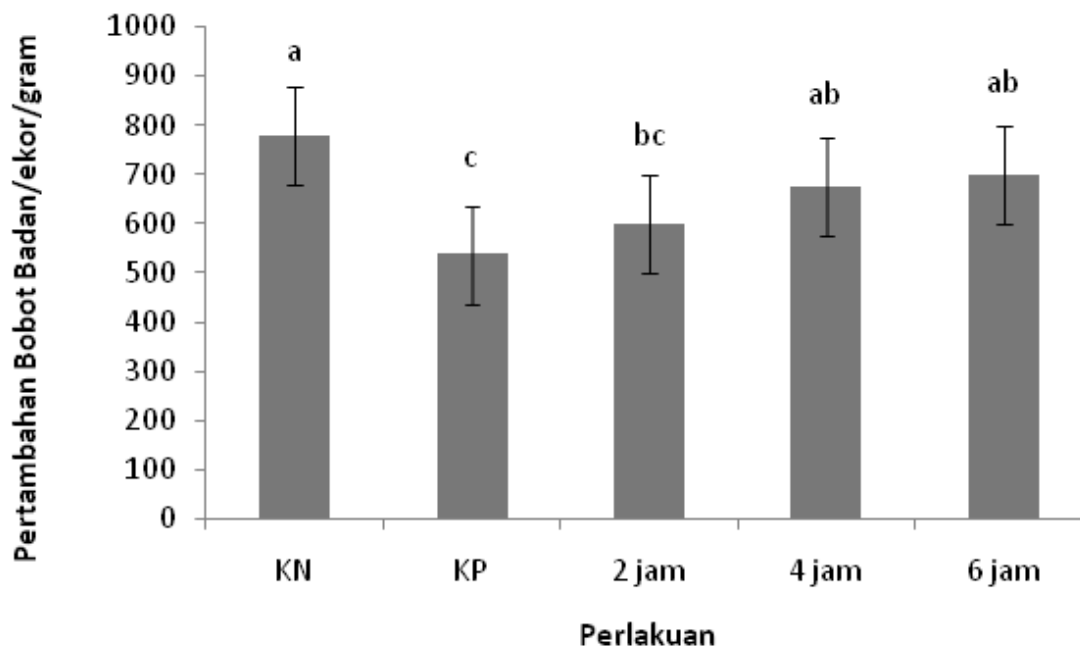
meningkatkan jumlah makrofag pada lokasi infeksi. Perendaman ookista dalam ekstrak metanol sebelum diinfeksi pada ayam, menurunkan jumlah makrofag dalam sekum.

Pada hari ke-3 setelah infeksi adalah fase skizon masih ada dalam sel epitel, maka perendaman ookista selama dua, empat, dan enam jam menurunkan jumlah makrofag masing-masing sebesar 16,45%, 50%, dan 61%. Pada hari ke-6 setelah infeksi, adalah fase ookista ditemukan kembali dalam tinja, penurunan jumlah makrofag pada perendaman ookista selama 2, dan 6 jam sebelum diinfeksi menurunkan jumlah makrofag masing-masing sebesar 31% dan 44% sedangkan perendaman ookista selama 4 jam dalam ekstrak sambiloto terjadi peningkatan jumlah makrofag sebesar 4%.

Pada hari ke-9 setelah infeksi adalah fase akhir puncak ookista keluar bersama tinja, jumlah makrofag meningkat pada kelompok yang diinfeksi dengan ookista direndam dalam ekstrak sambiloto sebelum diinfeksi. Perendaman ookista selama enam jam dalam ekstrak sambiloto sebelum diinfeksi paling besar menghambat datangnya makrofag ke lokasi infeksi yaitu sebesar 30%. Pada hari ke-14 setelah infeksi adalah tahap akhir keluar ookista bersama tinja. Penurunan jumlah makrofag pada kelompok diinfeksi dengan ookista direndam dalam ekstrak sambiloto sebelum diinfeksi selama 2,4, dan 6 jam masing-masing sebesar 6%, 37%, dan 46,5%.

Jumlah makrofag turun dalam sekum ayam yang diinfeksi dengan ookista yang direndam dalam ekstrak sambiloto, diduga karena sporozoit mengalami kerusakan sehingga kemampuan untuk menginvasi sel induk semang turun, mengakibatkan jumlah parasit dalam sel epitel sekum rendah sehingga jumlah makrofag juga akan turun. Lama waktu perendaman berpengaruh pada penurunan jumlah makrofag. Perendaman ookista dalam ekstrak sambiloto selama enam jam pada semua fase siklus *E. tenella* menghasilkan makrofag paling rendah, kemungkinan karena semakin banyak ookista yang rusak sebelum diinfeksi sehingga tidak mampu melakukan invasi.

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Schubert *et al.*, (2005) melaporkan bahwa sporozoit yang diinkubasi dalam 200µM rianodin (alkaloid dalam tanaman) secara *in vitro* mampu menghambat invasi sporozoit *E.tenella* ke sel induk semang sampai 70% dengan cara rianodin berikatan dengan kanal kalsium ( $Ca^{+2}$  *internal channel*) sporozoit sehingga menghambat *influx*



Gambar 4. Pertambahan bobot badan ayam pedaging yang diinfeksi ookista *E. tenella* yang direndam dalam ekstrak sambiloto.

Keterangan: Huruf yang beda menunjukkan berbeda nyata ( $p < 0.05$ ). KN= kelompok tidak diinfeksi. KP= Kelompok diinfeksi dengan ookista tanpa direndam. K2= Kelompok diinfeksi dengan ookista bersporulasi direndam dalam ekstrak sambiloto selama 2 jam. K4= Kelompok diinfeksi dengan ookista bersporulasi yang direndam dalam ekstrak sambiloto selama 4 jam. K6= = Kelompok diinfeksi dengan ookista bersporulasi direndam dalam ekstrak sambiloto selama 6 jam.

ion kalsium. Sifat menghambat kanal kalsium oleh ekstrak kering sambiloto diperlihatkan pada penelitian Burgos *et al.*, (2000) yang mana pada pemberian konsentrasi 0,4 mg/mL ekstrak kering sambiloto dalam media inkubasi vas deferens tikus, terlihat penghambatan *influks* ion kalsium secara total.

Apikompleksa parasit mengandalkan *Calcium-mediated signaling* untuk sekresi protein, pergerakan, invasi ke sel induk semang (Nagamune *et al.*, 2008). Alkaloid yang terdapat dalam ekstrak sambiloto kemungkinan berikatan dengan kanal kalsium parasit, sehingga ikatan senyawa merusak sporozoit sehingga menghambat invasi sporozoit karena terjadi gangguan sekresi kalsium, akibatnya jumlah parasit menjadi turun serta terjadi penurunan modulasi makrofag mengakibatkan jumlah makrofag rendah ditemukan dalam sekum.

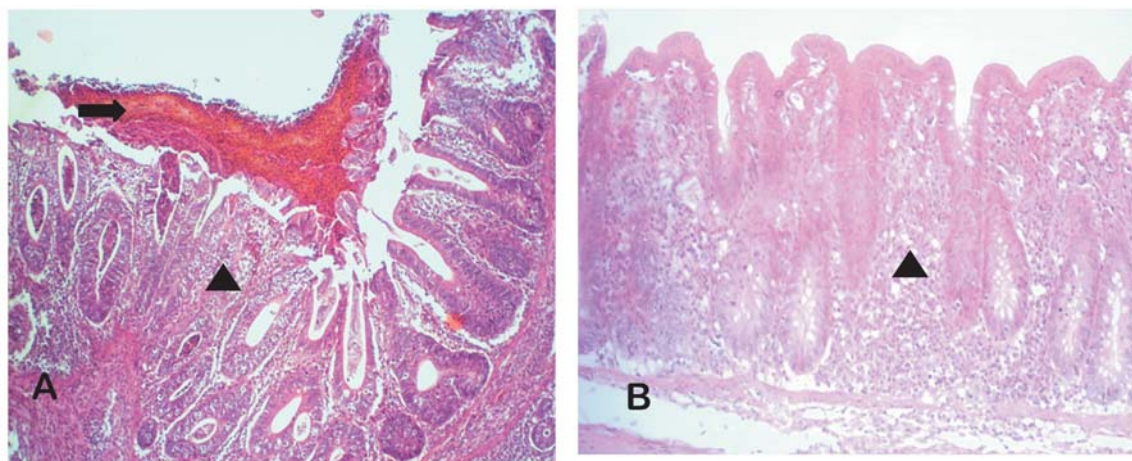
### Pertambahan Bobot Badan

Pengaruh perendaman ookista pada pertambahan bobot badan dapat dilihat pada Gambar 4. Ayam yang diinfeksi dengan ookista yang direndam dengan ekstrak sambiloto

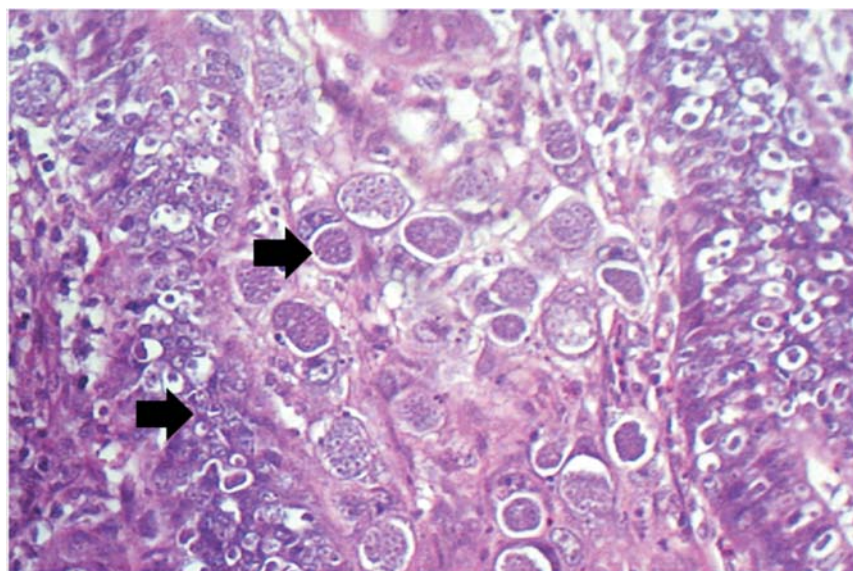
mempunyai pertambahan bobot badan yang lebih besar dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Lama waktu perendaman ookista dengan ekstrak sambiloto sebelum diinfeksi meningkatkan pertambahan bobot badan dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Persentase pertambahan bobot badan dengan waktu perendaman 2, 4, dan 6 jam masing-masing adalah 11,5%, 25,7%, dan 30,2% dibandingkan dengan kontrol positif. Persentase pertambahan bobot badan paling tinggi terdapat pada perendaman ookista dalam ekstrak sambiloto selama 6 jam, tapi tidak berbeda dengan kelompok ayam diinfeksi dengan ookista direndam dalam ekstrak sambiloto selama 4 jam. Hal tersebut menunjukkan indikasi peningkatan pertambahan bobot badan seiring dengan semakin lamanya waktu perendaman ookista dengan ekstrak sambiloto.

Pertambahan bobot badan paling rendah ditemukan pada kelompok ayam yang diinfeksi dengan ookista tanpa direndam. Menurut Min *et al.*, (2004) infeksi oleh *Eimeria* mengakibatkan kerusakan yang ekstensif pada sel epitel usus ayam sehingga menyebabkan terjadi penurunan efisiensi pakan dan pertambahan bobot badan.





Gambar 5: Fotomikrograf sediaan daerah sekum ayam, 6 hari setelah infeksi . (A). Kelompok ayam diinfeksi dengan ookista tanpa direndam dalam ekstrak sambiloto, (➡) hemorahgi dan nekrosa, (▲) infiltrasi sel radang. (B). Kelompok ayam diinfeksi ookista direndam dalam ekstrak sambiloto selama 6 jam sebelum diinfeksi. Pewarnaan HE, Pembesaran objektif 40x.



Gambar 6 : Fotomikrograf sediaan daerah sekum ayam 6 hari setelah infeksi, pada kelompok diinfeksi dengan ookista tanpa direndam dalam ekstrak sambiloto, *Eimeria tenella* stadium skizon (➡), pewarnaan HE, (pembesaran objektif 40x)

Pada Gambar 5 A, terlihat perdarahan, nekrosis dan infiltrasi sel radang pada kelompok ayam diinfeksi dengan ookista tanpa direndam dalam ekstrak sambiloto sebelum diinfeksi dan pada Gambar 6 ditemukan skizon epitel sekum. Menurut McDougald dan Reid (1997) dan Zulpo *et al.*, (2007) secara mikroskopis kerusakan pada sekum akibat infeksi *E.tenella* ditemukan perdarahan, nekrosis, dan infiltrasi heterofil pada submukosa sekum, atrofi villi, proliferasi sel epitel kriptas usus.

Kerusakan jaringan pada sekum akibat infeksi *E.tenella* terjadi pada tahap skizon generasi ke-2 yaitu pada hari ke-5 sampai ke-6 setelah infeksi dan ookista keluar bersama tinja. Kerusakan jaringan yang berlebihan menyebabkan daya regenerasi usus lambat sehingga penyerapan pakan terganggu. Faktor lain terjadi penurunan pertambahan bobot badan antara lain karena ada infeksi, leukosit terangsang untuk mensekresi sitokin (Jang *et al.*, 2007). Sitokin menyebabkan terjadi

penurunan nafsu makan, sehingga terjadi penurunan konsumsi pakan, pertumbuhan protein otot, dan meningkatkan kecepatan metabolik (Klasing dan Korver, 1997). Hal ini berpengaruh terhadap penambahan bobot badan, sehingga penambahan bobot badan pada kelompok ayam yang diinfeksi dengan ookista tanpa perendaman dalam ekstrak sambiloto menjadi rendah.

Pada Gambar 5B diperlihatkan kelompok ayam yang diinfeksi dengan ookista direndam dalam ekstrak sambiloto sebelum diinfeksi menunjukkan villi tidak mengalami kerusakan, serta tidak ditemukan perdarahan dan nekrosis. Pada kelompok ini terjadi peningkatan penambahan bobot badan pada ayam karena pengaruh perendaman telah merusak ookista, menyebabkan kemampuan ookista untuk menginfeksi menjadi turun. Hal tersebut berakibat terhadap jumlah leukosit yang datang ke lokasi infeksi menjadi lebih rendah, sehingga sekresi enzim antara lain sitokin menjadi rendah, akibatnya kerusakan sel epitel menjadi ringan sehingga penambahan bobot badan lebih tinggi karena tidak terjadi gangguan penyerapan makanan.

### SIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak sambiloto menunjukkan potensi yang baik (efektif) sebagai antikoksidia. Perendaman ookista *E.tenella* bersporulasi dalam ekstrak sambiloto selama enam jam sebelum diinfeksi menurunkan jumlah ookista dalam tinja, sel radang (heterofil dan makrofag) dalam sekum dan peningkatan penambahan bobot badan ayam.

### SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut perendaman ookista dengan ekstrak sambiloto dengan konsentrasi yang berbeda dan jarak waktu perendaman yang lebih panjang sehingga dapat diketahui konsentrasi dan waktu yang lebih optimal untuk kontrol terhadap infeksi *E.tenella*.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan tinggi, Departemen Pendidikan Nasional yang telah memberikan bantuan biaya penelitian melalui Hibah Bersaing XIV/II/2007.

### DAFTAR PUSTAKA

- Alfaro DM, Silva AVF, Borges SA, Maiorka FA. 2007. Use of *Yucca schidigera* extract in broiler diets and its effects on performance results obtained with different coccidiosis control methods. *J Appl Poult Res* 16 : 248-254.
- Allen PC, Fetterer RH. 2002. Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. *Clin Microbiol Rev* 15: 58-65.
- Andreasen CB, Latimer KS, Harmon BG, Glisson JR, Golden JM, Brown J. 1991. Heterophil function in health chickens and in chicken with experimentally induced staphylococcal tenosynovitis. *Vet Pathol* 28: 419-427.
- Berezin VE, Bogoyavlenskiy AP, Tolmacheva VP, Makhmudova NR, Khudyakova SS, Levandovskaya SV, Omirtaeva ES, Zaitceva IA, Tustikbaeva GB, Ermakova OS, Alekseyuk PG, Barfield RC, Danforth HD, Fetterer RH. 2008. Immunostimulating complexes incorporating *Eimeria tenella* antigens and plant saponins as effective delivery system for coccidia vaccine immunization. *J. Parasitol.* 94(2): 381-385.
- Biu AA, Yusuf SD, Rabo JS. 2006. Use of Neem (*Azadirachta indica*) aqueous as a treatment for poultry coccidiosis in Borneo State, Nigeria. *African Scientist* 7(3): 147-153.
- Bukoye O, Musbau A. 2011. Immune modulation of aqueous of *Andrographis paniculata* leaves in male rat. *Researcher* . 3(1): 48-57.
- Burgos RA, Imilan M, Sanchez NS, Hancke JL. 2000. *Andrographis paniculata* (Nees) selectively blocks voltage-operated calcium channels in rat vas deferens. *J.Ethnopharmacol* 71: 115-121

- Cahyaningsih U, Setiawan K, Ekastuti DR. 2003. Perbandingan gambaran diferensial leukosit ayam setelah pemberian sampiloto (*Andrographis paniculata* Nees) dengan dosis bertingkat dan koksidiostat. *Prosiding Seminar dan Pameran Nasional Tubuhan Obat Indonesia XXIV*. Pusat Studi Biofarmaka LP-IPB. Darmaga Bogor, 19-20 September 2003.
- Chapman HD. 1997. Biochemical, genetic and applied aspect of drug resistance in *Eimeria* parasite of fowl. *Avian Pathol* 28: 221.
- Chen W, Liang X. 1982. Deoxyandrographolide 19 $\alpha$ -D-glucoside from the leaves of *A. Paniculata*. *Planta Med* 15: 245-246.
- Chopra RN, Nayar SL, Chopra IC. 1992. *Glossary of Indian medicinal plants 3<sup>rd</sup>ed*. New Delhi : CSIR. P. 88.
- Dalloul RA, Lillehoj HS. 2006. Poultry coccidiosis: recent advancements in control measures and vaccine development. *Expert Rev Vaccines* 5: 143-163.
- De Padua LS, Bunyaprahatsan N and Lemmens RHMJ. 1999. *Plant Resource of South East Asia* No.12 (1): *Medicinal and Poisonous Plant*. Leiden: Blachuys publisher. P 711.
- Harborne JB. 1987. *Metode Fitokimia. Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Penerjemah; K. Padmawinata dan I Soedira. Bandung. ITB.
- Harmon BG. 1998. Avian heterophils in inflammation and disease resistance. *Poultry Sci* 77: 972-977.
- Horigome T, Kumar R, Okamoto K. 1988. Effects of condensed tannins prepared from leaves of fodder plant on digestive enzymes in vitro and in the intestine of rats. *Brit J of Nutr* 60: 275-285
- Jang SI, Jun MH, Lillehoj HS, Dalloul RA, Kong KII, Kim S, Min W. 2007. Anticoccidial effect of green tea-based diets against *Eimeria maxima*. *Vet Parasitol* 144: 172-175.
- Klasing KV and Korver DR. 1997. Leukocytic cytokines regulate growth rate and composition following activation of the immune system. *J Anim Sci* 75: 58-67
- Lillehoj HS. 1998. Role of T Lymphocyte and Cytokines in Coccidiosis. *Int. J. Parasitology* 28: 1071-1081.
- McDougald RL, Reid WM. 1997. Coccidiosis. *dalam* Calnex BW. *Disease poultry*. 10<sup>th</sup> ed. Iowa, State University Press. Chap 34: 865-882.
- Min W, Dalloul RA, Lillehoj HS. 2004. Application of biotechnological tools for coccidian vaccine development. *J Vet Sci* 5: 279-288
- Mishra SK, Sangwan NS, Sangwang RS. 2007. *Andrographis paniculata* (Kalmegh): A Review. *Pharmacognosy Rev* 1. Issue 2.
- Molan Al, Liu Z, De S. 2009. Effect of pine bark (*Pinus radiata*) extracts on sporulation of coccidian oocysts. *Folia Parasitologica* 56 (1): 1-5
- Muazu A, Masdoq AA, Ngbede J, Salihu AE, Haruna G, Habu AK, Sati MN, Jamilu H. 2008. Prevalence and identification of species of *Eimeria* causing coccidiosis in poultry within Vom, Plateau State, Nigeria. *Int J Poult Sci*. 7(9): 917-918.
- Nagamune K, Moreno SN, Chini EN, Sibley LD. 2008. Calcium regulation and signaling in apicomplexan parasites. Di dalam: Burleigh BA, Soldati-Favre D, editor. *Molecular mechanisms of parasites invasion*. Landes Biosciences and Springer Science+Business Media. P: 70-82
- Saxena S, Jain D C, Gupta MM, Bhakuni RS, Mishra HO, Sharma RP. 2000. High-performance thin layer chromatographic analysis of hepatoprotective diterpenoids from *Andrographis paniculata*. *Phytochem Anal* 11 (1): 34-36.
- Schubert U, Fuchs J, Zimmermann J, Jahn D, Zoufal J. 2005. Extracellular calcium deficiency and ryanodine inhibit *Eimeria tenella* sporozoite invasion in vitro. *Parasitol Res* 97: 59-62
- Sheeja K, Shihab PK, Kuttan G. 2006. Antioxidant and anti-inflammatory activities of the plant *andrographis paniculata* Nees. *Immunopharm and Immunotox* 28 : 129-140.
- Siddhartha S, Archana M, Jinu J, Mehta. 2010. Anthelmintic potential of *Andrographis paniculata*, *cajanus cajan* and *silybum marianum* [republished]. <http://www.phcogj.com/content/anthelmintic-potential-andrographis-paniculata-cajanus-cajan-and-silybum-marianum-republishe>. Html. [10 juni 2010].
- Srihanam N. 2008. Antibiotic-free feed benefits Thai native chickens. *Asian Feed* 168(03): 22-23.
- Stabler JG, McCormick TW, Powell KC, Kogut HM. 1994. Avian heterophils and monocytes: Phagocytic and bactericidal activities against *Salmonella enteritidis*. *Vet. Microbiol*. 38: 293-305

- Subramanian R?, Asmawi MZ, Sadikun A. 2008. In vitro  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide. *Acta Biochimica Polonica* 55 : 2391–398.
- Tampubolon MP. 2004. *Protozoologi*. Pusat Studi Ilmu Hayati. Institut Pertanian Bogor
- Titilincu A, Santha B, Cozma V. 2008. Effect of polioel 3 on sporulation and infectivity of eimeria oocyst. *Lucrări Stiintifice Medicină Veterinară*. XLI: 372-378
- Tang W, Eisenbrand G. 1992. *Chinese Drugs of Plant Origin, Chemistry, Pharmacology and Use in Traditional and Modern Medicine*. Berlin: Springer Verlag. P. 97-103.
- Tipikorn N. 2002. Effect of *Andrographis paniculata* (Burm F) Nees on performance, mortality and coccidiosis in broiler chickens. [Dissertation]. Göttingen, Germany: Institute of Animal Physiology and Animal Nutrition. Georg-August-University.
- Tipu MA, Pasha TN, Ali Z. 2002. Comparative efficacy of salinomycin sodium and Neem fruit (*Azadiracht indica*) as feed additive anticoccidials in broilers. *Int J Poult Sci* 1(4): 91-93.
- Youn HJ, Noh JW. 2001. Screening of the anticoccidial effect of herb extracts against *Eimeria tenella*. *Vet Parasitol* 96: 257-263.
- Zoulpo DL, Peretti J, Ono LM, Longhi E, Oliveira MR, Guimarães IG, Headley SA, Junior G JdS, Garcia JL. 2007. Pathogenicity and histopathological observations of commercial broiler chicks experimentally with isolates of *Eimeria tenella*, *E.acervulina* and *E.maxima*. *Semina :Ciências Agrárias, Londrina*. 28(1): 97-104