

Respon Pemberian Ekstrak N-Heksan Tanaman Jaloh pada Ayam Broiler yang Diberi Cekaman Panas terhadap Ekspresi Enzim iNOS pada Jaringan Paru, Kadar Glukosa dan Kalsium dalam Serum

SUGITO

Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh
(E-mail: sugitofkhunsiyah@yahoo.co.id).

(Diterima dewan redaksi 6 Mei 2008)

ABSTRACT

SUGITO. 2008. Responses of giving n-hexane Jaloh extract on broiler chicken recieved heat stress on expression of iNOS enzyme in lung tissue, serum level of glucose and calcium. *JITV* 13(3): 174-181.

Giving extract n-hexane of jaloh bark (EHJ) lessen the impact of heat stress in broiler chicken. The studies of activity of EHJ in lessening heat stress impact at broiler chicken have not been conducted yet. An experiment was conducted to study the effect of extract n-hexane of jaloh bark (EHJ) administration on body temperature, level of calcium and glucose in serum, inducible nitric oxide synthase (iNOS) in lung tissue, and behavior of broilers exposed to heat stress at temperature $33 \pm 1^{\circ}\text{C}$. In this study 18 broiler chicks aged 20 days were divided into 3 groups. The first group was broilers without heat stress nor EHJ (control). The second group was broilers given heat stress without EHJ (CP). The third group was treated heat stress and EHJ at dose of 10 mg/kg BW (CP+EHJ). The EHJ was given 1 hour before cage temperature was raised. Broilers in group CP and CP+EHJ were divided into 3 periods of slaughtering i.e. 2 and 4 hours after given heat stress and 2 hours after heat stress termination. Each of slaughtering period consisted of 3 broilers as replication. Result of this research indicated that CP+EHJ lessen stress in the form of restlessness and increased expression of iNOS in the lung tissue. It was assumed that one of mechanism of EHJ in lessening stress on broiler related to forming of iNOS enzyme in the lung tissue.

Key Words: Salix, Heat Stress, Calcium, Glucose, i-NOS Enzyme

ABSTRAK

SUGITO. 2008. Respon pemberian ekstrak n-heksan tanaman Jaloh pada ayam broiler yang diberi cekaman panas terhadap ekspresi enzim iNOS pada jaringan paru, kadar glukosa dan kalsium dalam serum. *JITV* 13(3): 174-181.

Pemberian ekstrak n-heksan kulit batang jaloh (EHJ) dapat mengurangi dampak stres karena panas pada ayam broiler. Belum ada kajian mengenai mekanisme kerja EHJ dalam mengurangi dampak stres panas pada ayam broiler. Suatu penelitian telah dilakukan untuk mengetahui respons pemberian EHJ terhadap suhu tubuh, kadar kalsium dan glukosa dalam serum, nitrat oksida sintase inducibel (*inducible nitric oxide synthase* = iNOS) pada jaringan paru, dan tingkah laku ayam broiler yang diberi cekaman panas pada suhu $33 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Penelitian ini menggunakan 21 ekor ayam broiler umur 20 hari yang dibagi menjadi 3 kelompok. Kelompok I (kontrol) adalah ayam tanpa perlakuan cekaman panas (CP) dan ekstrak n-heksan kulit batang jaloh (EHJ). Kelompok II adalah ayam hanya diberi CP tanpa EHJ. Kelompok III adalah ayam yang diberi CP dan EHJ 10 mg/kg BB 1 jam sebelum suhu dalam kandang dinaikan. Pada kelompok I ayam 2 jam sebelum penelitian dimulai. Pada kelompok II dan III ayam dipotong 2 dan 4 jam setelah diberi cekaman panas serta 2 jam setelah cekaman panas dihentikan. Masing-masing periode pematangan terdiri atas 3 ulangan. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian CP+EHJ pada ayam broiler dapat mengurangi stres berupa kegelisahan dan dapat meningkatkan ($P < 0,05$) jumlah sel yang positif iNOS pada paru. Diduga bahwa salah satu jalur mekanisme kerja senyawa EHJ dalam mengurangi stres pada ayam broiler akibat cekaman panas terkait dengan pembentukan enzim iNOS.

Kata kunci: Salix, Cekaman Panas, Kalsium, Glukosa, Enzim i-NOS

PENDAHULUAN

Ayam broiler termasuk hewan endoterm dan pada bagian kulitnya sangat sedikit memiliki kelenjar keringat serta pola pertumbuhannya yang relatif cepat menyebabkan hewan ini menjadi sangat peka terhadap perubahan suhu lingkungan. Peningkatan suhu lingkungan berpengaruh pada kemampuan pelepasan panas tubuh dan menimbulkan peningkatan suhu tubuh

(DAWSON dan WHITTOW, 2000; LIN *et al.*, 2005). Untuk menjaga keseimbangan suhu tubuh, ayam berupaya meningkatkan pelepasan panas dan mengurangi pembentukan panas dari tubuh, baik dengan cara mengubah tingkah laku maupun aktivitas fisiologis (COOPER dan WASHBURN, 1998).

Pada ayam yang mengalami cekaman panas, jalur utama untuk menjaga keseimbangan suhu adalah pelepasan panas tubuh melalui saluran pernapasan

dengan cara *panting* dan melalui penguapan air di permukaan kulit (HOFFMAN dan WALSBURG, 1999). Perubahan mikrovaskular pada jaringan paru dan kulit adalah upaya tubuh melepaskan panas melalui evaporasi (OPHIR *et al.*, 2002). Evaporasi terjadi melalui pengaturan aliran darah dengan cara pelebaran pembuluh perifer (vasodilatasi) sehingga darah lebih banyak membawa panas dari dalam (*core*) ke permukaan tubuh (COOPER, 2002). Cekaman panas dapat meningkatkan evaporasi melalui pernapasan dan permukaan kulit (evaporasi kutaneus) pada jenis unggas hingga mencapai 40 sampai 75% dari total kehilangan air dari dalam tubuh (OPHIR *et al.*, 2002).

Nitrat oksida (NO) merupakan suatu mediator termoregulasi melalui aktivasi vasodilatasi pada pembuluh darah (TAYLOR dan BISHOP, 1993; DIAS-JUNIOR *et al.*, 2008). Nitrat oksida disintesis dari asam amino arginin oleh enzim nitrat oksida sintase (*nitric oxide synthase* = NOS) (MORI dan GOTOH, 2004). Sejauh ini, 3 bentuk (isoform) NOS yang dihasilkan dari gen, lokasi, dan regulasi yang berbeda telah diisolasi dan diidentifikasi. Enzim iNOS banyak ditemukan pada sel-sel makrofag. Isoform iNOS dianggap sebagai bentuk enzim yang diinduksi (*inducible*) dan untuk aktivitasnya tidak tergantung pada ion kalsium (*Ca-independent*) (ALDERTON *et al.*, 2001; PITT dan CROIX, 2002; MORI dan GOTOH, 2004).

Secara normal iNOS sangat rendah kadarnya di dalam sel (TEDESCHI *et al.*, 2004). Aktivasi iNOS diinduksi oleh beberapa jenis sitokin dan berbagai mediator inflamasi produk bakteri, seperti lipopolisakarida (LPS) (PITT dan CROIX, 2002; TENG *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2004; DIAS-JUNIOR *et al.*, 2008). Pemaparan berbagai induser, seperti sitokin dan LPS, ekspresi iNOS dalam jaringan meningkat dalam beberapa jam (TEDESCHI *et al.*, 2004). Pada paru, nitrat oksida memainkan peran sangat penting dalam pengaturan tekanan vaskular dalam upaya meningkatkan evaporasi (FAGAN *et al.*, 1999; LECRAS dan MCMURTRY, 2001; RICCIARDOLO *et al.*, 2004; DIAS-JUNIOR *et al.*, 2008).

Jaloh (*Jalöh* atau *Sijalöh*) dalam bahasa Aceh merupakan sebutan untuk jenis tanaman perdu dari famili Salicaceae, yaitu *Salix tetrasperma* Roxb. Pada ekstrak tumbuhan *Salix* spp. terkandung berbagai senyawa kimia, antara lain golongan glukosida, quarsetin, polifenol, pikein, salidrosida, triandrin, tremulasin, dan tannin (FABRICANT dan FARNSWORTH, 2001; KAMMERER *et al.*, 2005). Kajian terakhir menunjukkan bahwa ekstrak *salix* spp dapat mengaktivasi pelepasan tumor nekrosis faktor-alpha (TNF- α), interleukin-1 beta (IL-1 β), dan IL-6 (MARZ dan KEMPER, 2002; FIEBICH dan CHRUBASIK, 2004; ZHENG *et al.*, 2005).

Pada penelitian terdahulu menunjukkan bahwa pemberian ekstrak n-heksan kulit batang Jaloh (EHJ)

dapat mengurangi cekaman panas pada ayam broiler (SUGITO *et al.*, 2006 dan SUGITO *et al.*, 2007b) juga dapat memperbaiki performan dan morfometrik duodenum ayam broiler akibat cekaman panas secara kronis (SUGITO *et al.*, 2007a). Belum ada kajian tentang bagaimana mekanisme kerja EHJ dalam mengurangi dampak cekaman panas pada ayam broiler. Diduga mekanisme kerja senyawa aktif yang terdapat dalam EHJ terjadi melalui aktivasi enzim iNOS guna meningkatkan evaporasi paru. Menurut PRAKASH *et al.* (2005), kandungan senyawa aktif dari ekstrak tanaman tertentu dapat mengaktivasi jalur aktivitas biokimia tertentu dalam tubuh. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui ekspresi iNOS dalam jaringan paru pada ayam broiler yang mengalami cekaman panas dan diberi ekstrak heksan kulit batang jaloh.

MATERI DAN METODE

Materi penelitian

Bahan ekstrak n-heksan kulit batang Jaloh yang digunakan untuk ekstraksi diperoleh dari daerah Kecamatan Kota Baru, Kabupaten Aceh Besar, Provinsi NAD. Determinasi tanaman dilakukan di Herbarium Bogoriense, LIPI Bogor, sebagai *Salix tetrasperma* Roxb. Serbuk kulit batang Jaloh diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan etanol 70%. Untuk pengentalan dilakukan dengan alat penguap berputar. Selanjutnya, ekstrak kasar Jaloh ini dipartisi menggunakan n-heksan sehingga didapat ekstrak heksan kulit batang Jaloh (EHJ).

Penelitian ini menggunakan ayam broiler betina jenis pedaging galur Cobb berumur 20 hari. Pakan yang diberikan adalah pakan komersil ayam pedaging jenis starter. Hasil analisis proksimat menunjukkan bahwa kadar protein kasar pakan komersial adalah 18,8%, lemak kasar 6,9%, serat kasar 4,7%, dan energi bruto 3945,5 kkal/g. Ayam ditempatkan dalam kandang individu berlantai kawat berukuran panjang 45 cm, lebar 40 cm, dan tinggi 65 cm. Kandang berpemanas yang digunakan berukuran panjang 4,5 m, lebar 3,5 m, dan tinggi 3,25 m.

Pemberian cekaman panas dilakukan dengan meningkatkan suhu di dalam kandang berpemanas dengan menggunakan alat pemanas (*heater*) yang terbuat dari komponen kawat nikelin berdaya 1000 Watt. Sebagai pengontrol suhu pada *heater* dipasang termoregulator berskala 0 sampai 40°C. Untuk mengukur temperatur dan kelembaban dalam kandang, dipakai termometer dan higrometer digital *corona*. Suhu dalam kandang berpemanas dinaikkan secara perlahan-lahan yang dimulai pukul 10.00 pagi dan dipertahankan stabil pada suhu 33 \pm 1°C selama 4 jam.

Metode penelitian

Jumlah ayam yang digunakan adalah sebanyak 18 ekor yang dibagi ke dalam 2 kelompok perlakuan dan pelaksanaan penelitian ini dilakukan hanya 1 hari. Kelompok I adalah ayam yang diberi cekaman panas tanpa diberi EHJ (CP). Kelompok II adalah ayam yang diberi cekaman panas dan diberi EHJ 10 mg/kg BH (CP+EHJ). Pengambilan sampel darah dan jaringan organ pada masing-masing perlakuan dilakukan (pemotongan ayam) pada 2 jam (pengambilan sampel I), 4 jam (pengambilan sampel II) setelah diberi cekaman panas, dan 2 jam (pengambilan sampel III) setelah pemberian cekaman panas dihentikan. Masing-masing perlakuan pada waktu pengambilan sampel terdiri atas 3 ulangan. Pemberian EHJ dilakukan hanya satu kali, pada 1 jam sebelum diberi cekaman panas. Pengambilan darah dilakukan melalui jantung dan setelah pengambilan darah, ayam segera dipotong untuk pengambilan organ paru. Untuk kontrol pada pewarnaan iNOS digunakan jaringan paru yang berasal dari 3 ekor ayam yang dipotong 2 jam sebelum diberi cekaman panas.

Pengukuran suhu tubuh ayam

Suhu tubuh ayam diukur dengan menggunakan termometer digital (*Electronic Digital Clinical Thermometer* MT-B132F) dengan kisaran pengukuran 32-43°C dan akurasi 0,1°C di daerah anus setiap jam mulai dari 2 jam sebelum diberi perlakuan. Hasil pengukuran suhu tubuh ayam yang disajikan dalam laporan penelitian ini dilakukan pada kelompok perlakuan yang dipotong 2 jam setelah cekaman panas dihentikan, baik pada perlakuan CP maupun CP+EHJ. Masing-masing perlakuan terdiri atas 3 ulangan.

Pengukuran kadar kalsium dan glukosa dalam serum

Pengambilan serum darah untuk analisis kadar kalsium dan glukosa dilakukan sebelum ayam dipotong. Analisis kadar gula darah dilakukan dengan menggunakan metode enzymatic colorimetric deproteinisasi. Pembacaan kadar glukosa dilakukan dengan menggunakan Spectrofotometer 4010 pada panjang gelombang (λ) 546 dengan faktor 100. Hasil pembacaan spektrofotometer ditera dalam satuan mg %.

Pewarnaan Imunohistokimia iNOS

Untuk pembuatan preparat pewarnaan imunohistokimia iNOS dilakukan nekropsi organ paru. Sampel jaringan difiksasi dalam buffer netral formalin 10% dan ditanam (*embedding*) dalam parafin. Ketebalan pemotongan jaringan adalah 6 μ l dan

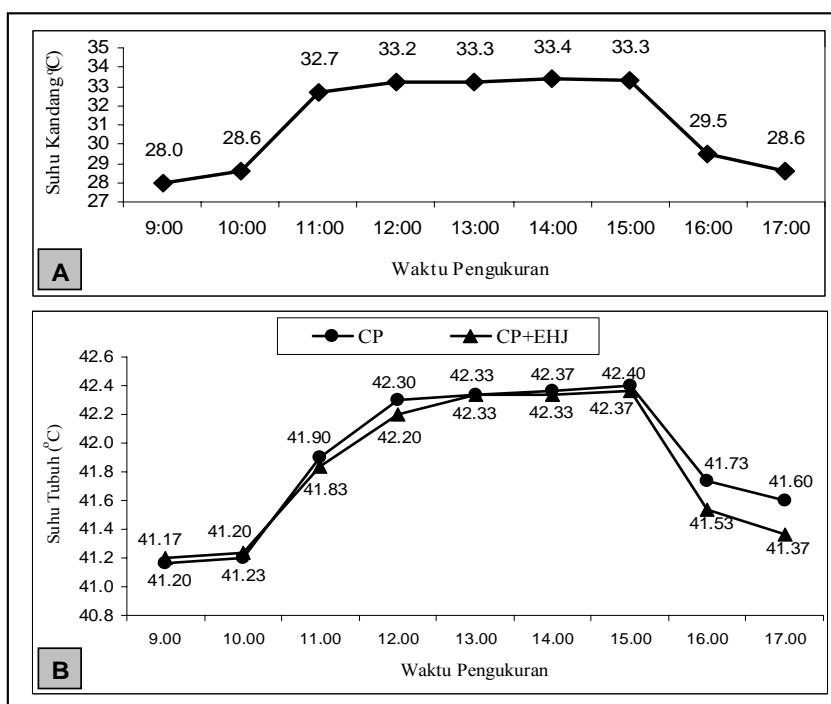
potongan ini ditempelkan pada objek gelas dengan neofren. Pengamatan ekspresi iNOS pada jaringan paru dilakukan dengan pewarnaan imunohistokimia. Secara singkat teknik imunohistokimia yang dilakukan dapat dijelaskan sebagai berikut. Penghilangan peroksidase endogen dengan H₂O₂ 0,3% dalam metanol (0,5 ml H₂O₂ ditambah 50 ml metanol) selama 15 menit. Bloking nonspesifik menggunakan serum rabbit normal 10% (Nichire Corporation, Histofine) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit. Untuk pembukaan epitop pada jaringan dilakukan retrieval dengan menggunakan enzim tripsin. Antibodi primer iNOS dilarutkan 1:100 dan diinkubasi pada suhu ruangan selama 2 jam. Antibodi sekunder (*biotinylated anti rabbit immunoglobulin* Dako Nichirel Corporation, Histofine Japan) diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit dan penambahan avidin-biotin-peroxidase complexes (ABC diproduksi Nichirei Corporation, Histofine Japan) diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Visualisasi dilakukan dengan menggunakan 3,3'-diamino-benzidine (DAB) dilarutkan dalam tris buffer dan H₂O₂ (1 mg DAB + 5 ml tris buffer + 5 μ l H₂O₂) diinkubasikan pada suhu 37°C selama 45 menit. *Counterstain* dilakukan dengan hematoksilin dan penutupan preparat (*mounting*) dengan entelan.

Perhitungan jumlah sel yang membentuk warna positif iNOS (membentuk warna kecoklat-coklatan) dihitung pada luas pandang 60 x 45 μ m² dengan menggunakan mikroskop (*Olympus*) pada pembesaran objektif 100 kali dengan bantuan video mikroskop (*Video measuring gauge* IV-560, for Company Limited) pada 5 lapang pandang setiap preparatnya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Suhu kandang dan tubuh ayam

Pada Gambar 1 terlihat bahwa satu jam setelah heater dinyalakan (pada jam 10.00) peningkatan suhu dalam kandang berpemanas mencapai 32,7°C. Keadaan suhu ini telah masuk ke dalam cakupan antara 33 \pm 1°C dan tetap dalam kisaran tersebut selama 4 jam sampai heater dimatikan pada pukul 15.00. Pemberian perlakuan cekaman panas menyebabkan peningkatan suhu tubuh ayam broiler secara perlahan-lahan sampai pemberian cekaman panas dihentikan pada pukul 15.00. Terlihat suhu tubuh ayam yang diberi cekaman panas dan EHJ 10 mg/kg BB (CP+EHJ) relatif lebih rendah dibandingkan dengan yang tanpa diberi EHJ (CP), terutama pada pengukuran pukul 11.00, 12.00, dan 16.00. Jika dihitung selisih hasil pengukuran suhu tubuh sebelum penelitian dimulai (pukul 10.00) pada ayam yang diberi cekaman panas dan EHJ, maka terdapat selisih sebesar 0,60; 0,97 dan 0,30°C secara berturut-turut pada pengukuran pukul 11.00; 12.00 dan 16.00. Pada ayam yang diberi cekaman panas tanpa EHJ



Gambar 1. Suhu kandang selama penelitian dilakukan (Gambar A) dan rata-rata suhu tubuh (Gambar B) ayam perlakuan CP (diberi cekaman panas tanpa EHJ) dan CP+EHJ (diberi cekaman panas dan EHJ dosis 10 mg/kgBB) sejak 2 jam sebelum penelitian dimulai dan 2 jam setelah cekaman panas dihentikan

didapatkan selisih kenaikan suhu tubuh pada pengukuran pukul 11.00; 12.00 dan 16.00 berturut-turut sebesar 0,70; 1,10 dan 0,53°C.

Pemberian EHJ pada ayam yang terkena cekaman panas memberikan pengaruh kenaikan suhu yang relatif lebih lambat (pada pukul 11.00 dan 12.00) dan penurunan suhu tubuh yang relatif lebih cepat (pada pukul 16.00 dan 17.00) jika dibandingkan dengan tanpa EHJ (Gambar 1). Kelihatannya EHJ dapat membantu meningkatkan pelepasan panas sehingga akumulasi panas lebih rendah dan waktu optimum efektivitas EHJ diduga berkisar antara 1-2 jam setelah diberikan. Pada jam berikutnya (13.00; 14.00 dan 15.00) rata-rata suhu tubuh ayam sama atau hampir sama dengan kontrol, meskipun kenaikan suhu relatif kecil, berkisar antara 0 sampai 0,03°C. Namun, aktivitas EHJ tersebut masih tersisa, jika dilihat adanya selisih penurunan suhu yang relatif lebih besar setelah panas dihentikan (pengukuran pukul 16.00 dan 17.00) pada ayam yang diberi cekaman panas dan EHJ.

Kadar Glukosa dan Kalsium dalam serum

Ayam yang diberi cekaman panas maupun kombinasi cekaman panas dan EHJ dosis 10 mg/kg BH tidak memberikan respons yang nyata ($P>0,05$) pada kadar

glukosa dan kalsium dalam serum. Namun, jika dilihat pada Tabel 1, ayam yang diberi cekaman panas pada suhu $33 \pm 1^{\circ}\text{C}$ selama 2 (pengukuran I) dan 4 jam (pengukuran II) cenderung mempunyai kadar glukosa serum yang lebih rendah dibandingkan dengan kontrol dan meningkat kembali setelah cekaman panas dihentikan selama 2 jam (pengukuran III). Pada ayam yang diberi cekaman panas dan EHJ dosis 10 mg/kg BH keadaan kadar glukosa hampir menyamai kadar glukosa ayam kontrol (yang tidak diberi cekaman panas) dan meningkat relatif lebih tinggi setelah 2 jam cekaman panas dihentikan. Hal sebaliknya terlihat pada respons perubahan kadar kalsium (Ca). Pada ayam yang diberi cekaman panas tanpa EHJ, kadar Ca cenderung menurun sesuai dengan lama cekaman panas diberikan. Meskipun setelah 2 jam cekaman panas dihentikan, respons kadar Ca tetap rendah. Pada ayam yang diberi EHJ, setelah 2 jam diberi cekaman panas kadar Ca lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya dan 2 jam setelah dihentikan cekaman panas, kadar Ca meningkat kembali.

Kecenderungan penurunan kadar glukosa pada pengukuran jam ke-1 pada ayam perlakuan CP diduga terkait dengan upaya tubuh mengurangi pembentukan panas akibat adanya tekanan panas dari lingkungannya. Peningkatan kadar glukosa pada pengukuran ke-2 dan

Tabel 1. Rata-rata (\pm SD) kadar glukosa (mg%) dan kalsium (ppm) dalam serum ayam yang diberi cekaman panas tanpa diberi EHJ (CP) dan diberi cekaman panas dan EHJ 10 mg/kg BB (CP+EHJ)

Perlakuan	Parameter	Waktu pengukuran		
		I	II	III
CP	Glukosa (mg%)	220,45 \pm 9,89	240,94 \pm 12,12	254,57 \pm 19,87
	Kalsium (ppm)	10,34 \pm 0,40	9,01 \pm 1,59	9,05 \pm 1,19
CP + EHJ	Glukosa (mg%)	247,83 \pm 28,49	246,25 \pm 18,49	263,59 \pm 63,79
	Kalsium (ppm)	11,27 \pm 0,71	9,72 \pm 1,72	10,40 \pm 0,05

I = sampel darah yang diambil 2 jam setelah diberi cekaman panas

II = sampel darah yang diambil 4 jam setelah diberi cekaman panas

III = sampel darah yang diambil 2 jam setelah pemberian cekaman panas dihentikan

ke-3 diduga karena peningkatan perombakan cadangan glikogen otot dan glukoneogenesis. Adanya cekaman panas, sekresi hormon glukokortikoid meningkat dan merespons pembentukan glukosa dari sumber nonkarbohidrat (HILLMAN *et al.*, 2000).

Relatif tingginya kadar Ca dalam serum pada pengukuran I diduga terkait dengan peran ion Ca (Ca^{2+}) dalam mengurangi akumulasi panas tubuh. Kemungkinan ion Ca berperan pada pembentukan nitrat oksida (NO) untuk vasodilatasi pembuluh darah dan ion Ca juga diduga memiliki aktivitas pada pusat pengaturan panas di hipotalamus. Pada membrane sel pembuluh darah, Ca^{2+} akan mengaktifasi enzim isoform nitrat oksida sintase pada sel-sel endotel (eNOS) pembuluh darah untuk mengkatalis asam amino arginin menjadi NO (FLEMING dan BUSSE, 2003). Pada hewan mamalia, NO merupakan senyawa yang bertanggung jawab atas mekanisme aktivitas vasodilatasi pembuluh darah (FLEMING dan BUSSE, 2003; COOPER, 2002). Ion Ca berperan penting dalam mengatur suhu tubuh (HILLMAN *et al.*, 2000). Diduga respons positif pada ayam perlakuan CP+EHJ ini terkait dengan aktivitas EHJ dalam pengaturan sekresi ion Ca dan glukosa dalam serum.

Immunohistokimia iNOS pada Jaringan Paru

Hasil pewarnaan imunohistokimia iNOS menunjukkan bahwa pemberian cekaman panas menyebabkan peningkatan ($P < 0,05$) pembentukan iNOS dalam jaringan paru (Gambar 2). Pemberian EHJ pada ayam yang mengalami cekaman panas dapat memicu ($P < 0,05$) pembentukan iNOS pada paru lebih banyak, terutama pada pengukuran II dan III. Adanya ekspresi iNOS positif yang terlihat dengan pewarnaan imunohistokimia ini diduga terkait dengan keberadaan makrofag pada paru, karena makrofag merupakan sel utama yang dapat menghasilkan enzim iNOS (ALDERTON *et al.*, 2001).

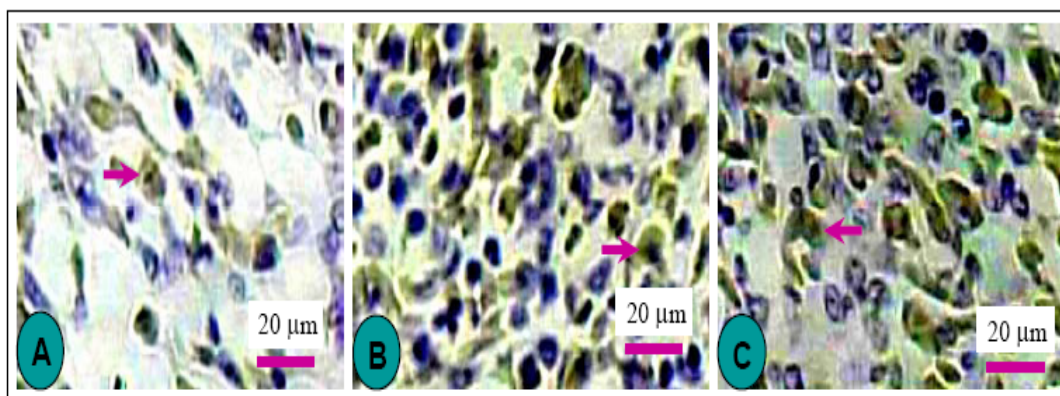
Peningkatan jumlah sel yang menghasilkan iNOS pada jaringan paru ayam yang diberi cekaman panas diduga terkait dengan peningkatan aktivitas paru berupa *panting* untuk melepaskan panas tubuh. Peningkatan aktivitas paru ini berpengaruh pada sekresi berbagai senyawa proinflamasi, termasuk sitokin dan hal ini memicu sel makrofag pada jaringan paru membentuk iNOS (PITT dan CROIX, 2002; WALLACE, 2005). Di dalam sel, iNOS menghidrolisis arginin menjadi nitrat oksida (NO) (MORI dan GOTOH, 2004). Nitrat oksida merupakan senyawa yang berperan penting dalam proses vasodilatasi (KELLOGG *et al.*, 2003). Vasodilatasi pada pembuluh darah dapat meningkatkan evaporasi melalui jaringan paru. Pada jenis unggas yang menderita cekaman panas, evaporasi pernapasan dan kulit merupakan jalur utama pelepasan panas melalui pelebaran pembuluh darah (OPHIR *et al.*, 2002).

Tabel 2. Rata-rata jumlah sel yang secara imunoreaktif positif terhadap iNOS dengan metode pewarnaan DAB yang dihitung pada luas pandang $60 \times 45 \mu\text{m}^2$

Perlakuan	Waktu pengukuran		
	Pengukuran I	Pengukuran II	Pengukuran III
CP	6,60 ^a	8,60 ^a	9,40 ^b
CP+EHJ	10,00 ^a	14,20 ^b	15,20 ^b

Huruf yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0,05$)

Pada Gambar 2 terlihat bahwa jumlah sel positif iNOS pada ayam yang diberi cekaman panas dan EHJ meningkat ($P < 0,05$) sejalan dengan waktu pengukuran. Peningkatan iNOS pada sampel yang diambil 2 jam setelah pemberian cekaman panas dihentikan, diduga merupakan efek EHJ yang bekerja dalam waktu yang relatif panjang. Namun, dalam masa 8 jam setelah pemberian, umumnya senyawa bioaktif ekstrak tanaman sebagian besar telah mengalami metabolisme (PRATT,



Gambar 2. Sel yang menunjukkan imunoreaktif positif iNOS dengan metode pewarnaan DAB (tanda panah) pada
 (A) jaringan paru ayam kontrol
 (B) jaringan paru ayam CP (diberi cekaman panas tanpa diberi EHJ)
 (C) jaringan paru ayam CP+EHJ (diberi cekaman panas dan EHJ 10 mg/kg BB)

1992). Efek EHJ yang relatif panjang ini menunjukkan bahwa jalur mekanisme kerja EHJ tidak langsung pada reseptor yang menstimulasi pembentukan iNOS tetapi lebih merupakan efek sekunder ataupun efek kaskade pada sel sasaran.

Hasil analisis pada EHJ dengan menggunakan kromatografi gas massa spektrofotometer (GC-MS) teridentifikasi beberapa senyawa, antara lain: asam lemak jenuh, asam lemak tak jenuh, satu jenis golongan fitosterol, dan satu jenis golongan terpenoid (SUGITO, 2007). Kemungkinan diantara senyawa bioaktif yang terdapat dalam EHJ berperan dalam aktivasi enzim iNOS pada jaringan paru. Satu jenis golongan terpenoid yang teridentifikasi dalam EHJ, meskipun terdapat dalam jumlah relatif kecil (0,61%), diduga memainkan peran penting. Menurut ROULLET *et al.* (1996) senyawa golongan terpenoid tersebut dalam tubuh hewan terbukti memiliki efek pada tonus pembuluh darah.

Jumlah sel positif iNOS yang relatif tinggi meskipun cekaman panas telah dihentikan kemungkinan menimbulkan dampak lain. Sebab pada satu sisi pembentukan NO sangat dibutuhkan untuk berbagai fungsi fisiologis normal tubuh, namun pada sisi lain peningkatan jumlah NO menimbulkan efek negatif. Produksi NO yang berlebihan dapat menstimulasi pembentukan sitokin proinflamasi pada jaringan, dan sel-sel pertahanan tubuh bermigrasi ke jaringan tersebut dan bila terjadi secara kronis dapat menyebabkan kerusakan jaringan (RICCIARDOLO *et al.*, 2003; SIEBRA *et al.*, 2006).

KESIMPULAN

Pemberian EHJ dosis 10 mg/kg BH pada ayam broiler yang diberi cekaman panas relatif dapat

memperlambat kenaikan suhu tubuh dan mempercepat turun suhu tubuh bila cekaman panas dihentikan. Pemberian EHJ juga mampu menjaga kestabilan kadar kalsium dalam serum pada saat ayam mengalami cekaman panas dan mempercepat peningkatan kadar glukosa serum setelah cekaman panas dihentikan. Peningkatan jumlah enzim iNOS pada jaringan paru diduga terlibat dalam memperlambat kenaikan suhu tubuh pada awal-awal ayam mengalami cekaman panas dan mempercepat penurunan suhu tubuh ayam pada saat cekaman panas dihentikan.

DAFTAR PUSTAKA

- ALDERTON, W.K., C.E. COOPERA and R.G. KNOWLES. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357: 593-615.
- CHEN, J.H., G.L. TIPOE, E.C. LIONG, H.S.H. SO, K.M. LEUNG, W.M. TOM, P.C.W. FUNG and A.A. NANJI. 2004. Green tea polyphenols prevent toxin-induced hepatotoxicity in mice by down-regulating inducible nitric oxide-derived prooxidants. *Am. J. Clin. Nutr.* 80: 742-751.
- COOPER, M.A. and K.W. WASHBURN. 1998. The relationships of body temperature to weight gain, feed consumption, and feed utilization in broilers under heat stress. *Poult. Sci.* 77: 237-242.
- COOPER, KE. 2002. Molecular biology of thermoregulation: some historical perspectives on thermoregulation. *J. Appl. Physiol.* 92: 1717-1724.
- DAWSON, W.R. and G.C. WHITTOW. 2000. Regulation of Body Temperature. In: WHITTOW GC (Ed). *Sturkie's Avian Physiology*. The 5th Edition. San Diego: Academic Press. pp. 343-390.
- DIAS-JUNIOR, C.A., S.B.A. CAU and J.E. TANUS-SANTOS. 2008. Role of nitric oxide in the control of the

- pulmonary circulation: physiological, pathophysiological, and therapeutic implications. *J. Bras. Pneumol.* 34: 412-419.
- FAGAN, K.A., R.C. TYLER, K. SATO, B.W. FOUTY, K.G. MORRIS, P.L. HUANG, I.F. MCMURTRY and D.M. RODMAN. 1999. Relative contributions of endothelial, inducible, and neuronal NOS to tone in the murine pulmonary circulation. *Am. J. Physiol.* 277: L472-L478.
- FABRICANT, D.S. and N.R. FARNSWORTH. 2001. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ. Health Perspect.* 109: 69-75.
- IEBICH, B.L. and S. CHRUBASIK. 2004. Effects of an ethanolic salix extract on the release of selected inflammatory mediators in vitro. *Phytomedicine* 11: 135-138.
- FLEMING, I. and R. BUSSE. 2003. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 284: R1-R12.
- HILLMAN, P.E., N.R. SCOT and A. VAN TIENHOVEN. 2000. Physiological, Responses and Adaptations to Hot and Cold Environments. In: YOUSEF MK. (Ed). *Stress Physiology in Livestock*. Vol 3, Poultry. Florida: CRC Pr. pp. 1-71.
- HOFFMAN, T.Y.C.M. and G.E. WALSBERG. 1999. Inhibiting ventilatory evaporation produce an adaptive increase in cutaneous evaporation in mourning doves *Zenaida macroura*. *J. Experiment Biol.* 202: 3021-3028.
- KAMMERER, B., R. KAHLICH, C. BIEGERT, C.H. GLEITER and L. HEIDE. 2005. HPLC-MS/MS Analysis of willow bark extracts contained in pharmaceutical preparations. *Phytochem. Anal.* 16: 470-478.
- KELLOGG, D.L., J.L. ZHAO, C. FRIEL and L.J. ROMAN. 2003. Nitric oxide concentration increases in the cutaneous interstitial space during heat stress in humans. *J. Appl. Physiol.* 94: 1971-1977.
- LECRAS, T.D. and I.F. MCMURTRY. 2001. Nitric oxide production in the hypoxic lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 280: L575-L582.
- LIN, H., H.F. ZHANG, H.C. JIAO, T. ZHAO, S.J. SUI, X.H. GU, Z.Y. ZHANG, J. BUYSE and E. DECUYPERE. 2005. Thermoregulation responses of broiler chickens to humidity at different ambient temperatures. II. Four weeks of age. *Poult. Sci.* 84: 1173-1178.
- MARZ, R.W. and F. KEMPER. 2002. Willow bark extract-effects and effectiveness. Status of current knowledge regarding pharmacology, toxicology and clinical aspects. *Wien Med. Wochenschr.* 152: 354-359.
- MORI, M. and T. GOTOH. 2004. Arginine metabolic enzymes, nitric oxide and infection. *J. Nutr.* 134: 2820S-2825S.
- OPHIR, E.Y., J. ARIELI, M. MARDER and M. HOROWITZ. 2002. Cutaneous blood flow in the pigeon *Columba livia*: its possible relevance to cutaneous water evaporation. *J. Exp. Biol.* 205: 2627-2636.
- PITT, B.R. and C.M.S. CROIX. 2002. Complex regulation of iNOS in lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 26: 6-9.
- PRAKASH, H., A. ALI, M. BALA and H.C. GOEL. 2005. Anti-inflammatory effects of *Podophyllum hexandrum* (RP-1) against lipopolysaccharides induced inflammation in mice. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 8: 107-114.
- PRATT, DE. 1992. Natural Antioxidants from Plant material. In: Huang, MT, CT Ho, CY Lee. (Eds). *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II Antioxidants and Cancer Prevention*. Proc. of The ACS Symposium Series, New York, 25-30 August 1991. American Chemical Society. pp. 54-71.
- RICCIARDOLO, F.L.M., P.J. STERK, B. GASTON and G. FOLKERTS. 2003. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol. Rev.* 84: 731-765.
- ROULLET, J.B., H. XUE, J. CHAPMAN, P. MCDUGAL, C.M. ROULLET and D.A. MCCARRON. 1996. Farnesyl analogues inhibit vasoconstriction in animal and human arteries. *J. Clin. Invest.* 97: 2384-2390.
- SIEBRA, M.X., M.A. SANTOS, T.L.P. ALMEIDA, A.C.R.M. LEITE, F.Q. CUNHA and F.A.C. ROCHA. 2006. Evidence for the participation of nitric oxide in pemphigus. *Brazil J. Med. Biol. Res.* 39: 671-675.
- SUGITO, W. MANALU, D.A. ASTUTI, E. HANDHARYANI dan CHAIRUL. 2006. Evaluasi pemberian ekstrak jaloh (*Salix tetrasperma* Roxb) terhadap performans dan indikator stres pada ayam broiler yang diberi cekaman panas. *Majalah Obat Tradisional.* 11: 29-36.
- SUGITO. 2007. Kajian Penggunaan Ekstrak Kulit Batang Jaloh (*Salix tetrasperma* Roxb) sebagai Antistres pada Ayam Broiler yang Diberi Cekaman Panas. Disertasi. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- SUGITO, W. MANALU, D.A. ASTUTI, E. HANDHARYANI dan CHAIRUL. 2007a. Morfometrik usus dan performans ayam broiler yang diberi cekaman panas dan ekstrak n-heksan kulit batang "jaloh" (*Salix tetrasperma* Roxb). *Media Peternakan* 30: 198-206.
- SUGITO, W. MANALU, D.A. ASTUTI, E. HANDHARYANI dan CHAIRUL. 2007b. Efek cekaman panas dan pemberian ekstrak heksan tanaman jaloh (*Salix tetrasperma* Roxb) terhadap kadar kortisol, triiodotironin dan profil hematologi ayam broiler. *JITV.* 12: 175-182.
- TAYLOR, W.F. and V.S. BISHOP. 1993. A role for nitric oxide in active thermoregulatory vasodilation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 264: H1355-H1359.
- TEDESCHI, E., M. MENEGAZZI, Y. YAO, H. SUZUKI, U. FORSTERMANN and H. KLEINERT. 2004. Green tea inhibits human inducible nitric-oxide synthase expression by down-regulating signal transducer and activator of transcription-1- α activation. *Mol. Pharmacol.* 65: 111-120.
- TENG, X., H. ZHANG, C. SNEAD and J.D. CATRAVAS. 2002. Molecular mechanisms of iNOS induction by IL-1 β and IFN- γ in rat aortic smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 282: C144-C152.
- WALLACE, J.L. 2005. Nitric oxide as a regulator of inflammatory processes. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* 100 (Suppl. I): 5-9.

ZHENG, Y.N., J. ZHANG, L.K. HAN and K. SEKIYA. 2005. Effect of compounds in leaves of *Salix matsudana* on arachidonic acid metabolism. *Yakugaku Zasshi*. 125: 1005-1008.