

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK TANIN ASAL *CHESNUT* PADA SISTEM KEKEBALAN DARAH TIKUS (*Rattus norvegicus*)

(Effect of Addition Tannin Extract from Chestnut in Rat (*Rattus norvegicus*) Blood Immunity)

Tekad U P Sujarnoko¹, Dudi Firmansyah²

¹Program Studi Analisis Kimia, Sekolah Vokasi IPB, Bogor

²Program Studi Teknologi dan Manajemen Ternak, Sekolah Vokasi IPB, Bogor

E-mail : tekadurip21@apps.ipb.ac.id

Diterima : 2 Maret 2022/Disetujui : 12 April 2022

ABSTRACT

*This study aimed to observe effect of tannin from chestnut extract on the immune system of rats. Tannin in chestnut easily hydrolyzed into sugar and phenol groups, this is very different with largely tannin from other plants which are more condensed. The phenol group in chestnut tannins increased the rat immune, because it is capable of being an antioxidant and antibacterial in the digestive and blood metabolism of rats. In this observation used 8 male adult rats with age more than 90 days. The first treatment is rat feeder without chestnut extract and the second treatment is rat feeder with 0.25% chestnut extract from dry matter of feed. This research was being tested with independent T-test method with 4 replication. The results of the study that the addition of 0.25% chestnut extract from dry matter had no effect on consumption and increased body weight, increased cell capacity of rats $p < 0.05$, there was an increase in active cells $p < 0.01$, and increased bacterial mortality of *Salmonella pullorum* in the blood test.*

Key word : Chestnut, Immunity, Tannin

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengamati pengaruh pemberian tanin dari ekstrak *chestnut* terhadap daya tahan tubuh tikus. Tanin pada *chestnut* merupakan senyawa yang mudah terhidrolisis menjadi gugus gula dan fenol, hal ini sangat berbeda dengan tanin pada beberapa tumbuhan yang lebih bersifat terkondensasi. Gugus fenol pada tanin *chestnut* diperkirakan dapat meningkatkan daya tahan tubuh tikus, karena mampu menjadi antioksidan dan antibakteri di dalam metabolisme pencernaan dan darah tikus. Pengamatan pada penelitian ini dilakukan pada 8 ekor tikus dewasa dengan umur lebih dari 90 hari yang diberi perlakuan berbeda. Perlakuan pertama adalah pemberian pakan tanpa ekstrak tanin *chestnut* dan perlakuan kedua adalah tikus dengan pakan yang ditambah ekstrak tanin *chestnut* sebanyak 0,25% dari bahan kering pakan. Rancangan analisis pada penelitian ini menggunakan uji T *independent* dengan 4 ulangan pada setiap perlakuan. Hasil penelitian penambahan 0,25% ekstrak *chestnut* dari bahan kering tidak berpengaruh terhadap konsumsi dan peningkatan bobot ternak, kapasitas sel tikus meningkat $p < 0,05$, terjadi penambahan sel aktif

$p < 0,01$, dan meningkatnya kematian bakteri *Salmonella pullorum* pada uji darah tikus yang dilakukan ujiantang.

Kata kunci : Chesnut, Imunitas, Tanin

PENDAHULUAN

Peningkatan imunitas tubuh saat pandemi sangat penting, sebab itu perlu dipelajari beberapa bahan aktif yang bisa digunakan untuk meningkatkan imun tubuh. Salah satu senyawa yang mampu dan banyak terdapat di daerah tropis adalah tanin. Tanin merupakan senyawa yang mampu memproteksi protein dari proses degradasi oleh mikroba (Sujarnoko *et al.* 2020). Setiap tanaman memiliki tanin yang spesifik (EFSA 2004). Secara umum tanin diklasifikasikan menjadi dua kelompok yaitu *condensed tannin* (CT) dan *hydrolysable tannin* (HT), sifat tanin tersebut mengakibatkan perbedaan sistem metabolisme dan kemampuan antimikroba yang berbeda (Jayanegara *et al.* 2019).

Tanin merupakan senyawa yang memiliki antioksidan (Ozgan *et al.* 2014). Senyawa CT dan HT memiliki pengaruh yang berbeda terhadap proses metabolisme. Senyawa CT memiliki kestabilan tinggi sehingga sulit tercerna oleh enzim, panas dan asam. Tanin terhidrolisis memiliki kestabilan yang rendah sehingga mudah dipecah menjadi asam fenol dan gula sederhana (Garlack *et al.* 2018). Kestabilan CT yang tinggi dapat dimanfaatkan sebagai *by-pass* nutrisi yang baik untuk ternak ruminansia (Sujarnoko *et al.* 2020). Hal ini dapat terlihat dari penurunan jumlah mikroba yang tinggi saat pemberian terhadap rumen ternak (Jayanegara *et al.* 2019). Ekstrak tanin asal *chestnut* digunakan dalam penelitian ini karena sebagian besar komponen tanin dalam *chestnut* mengandung HT (Tabacco *et al.* 2006). *Chesnut* merupakan tanaman bergenus *Castanea* (Diaz-varela *et al.* 2011). *Chesnut* tersebar di Asia (China, Jepang, dan Korea), Eropa Selatan, Turki dan Amerika Serikat. Daun *chestnut* pada umumnya digunakan sebagai pakan ternak terutama domba, kambing dan babi (Pereira-lorenzo *et al.* 2006). *Castanea sativa* merupakan salah satu spesies *chestnut* yang dibudidayakan untuk dimanfaatkan kayu, polong, dan tanin. Ekstrak tanin asal *chestnut* banyak dimanfaatkan sebagai pakan ternak ruminansia (Petacchi & Buccioni 2007). Penambahan Ekstrak tanin asal *chestnut* diharapkan mampu mempengaruhi imunitas tikus, karena jenis tanin ini memiliki efek daya toksisitas yang tinggi terhadap mikroba dan mampu mempengaruhi imunitas dengan bekerja sebagai antioksidan (Waghorn 2008).

Pemberian ekstrak tanin asal *chestnut* yang diberikan pada tikus dievaluasi dari konsumsi bahan kering (BK), perubahan performa bobot badan, jumlah sel aktif dan ujiantang terhadap salmonella. Hasil penelitian tersebut dapat digunakan sebagai acuan penggunaan ekstrak tanin asal *chestnut* sebagai media untuk meningkatkan kekebalan tubuh dan daya tahan terhadap bakteri.

METODE PENELITIAN

Pembuatan Pakan Tikus

Bahan pakan yang digunakan pada penelitian kali ini adalah (Tepung glukosa, minyak jagung, vitamin, mineral, kasein dan ekstrak tanin). Pakan tikus dibentuk pellet dengan penambahan perlakuan *conditioning* dengan penambahan air $\pm 10\%$ dari total bahan diet yang dibuat. Diet dicetak menjadi pelet dengan panjang $\pm 2\text{cm}$ dengan *pelleter*, kemudian dikeringkan pada suhu 55°C . Nilai nutrisi pakan dapat dilihat pada tabel 1. Nilai nutrisi pakan penelitian disesuaikan dengan formula *purified diet* Astuti (2015).

Tabel 1 Nilai nutrisi pakan tikus

Bahan Kering	Protein Kasar	Lemak Kasar	Serat Kasar	Ca	P
91,00	17,80	3,02	0,42	0,60	0,20

Pemeliharaan Tikus Percobaan

Pemeliharaan tikus sebagai hewan coba dilakukan selama 4 minggu. Tikus sebanyak 8 ekor dipelihara di dalam kandang individu dengan pakan dan minum diberikan secara *ad-libitum*. Tikus yang digunakan adalah jenis *Rattus norvegicus* jantan dewasa dengan umur lebih dari 90 hari.

Pengambilan Darah

Darah tikus diambil pada minggu ke-4 setelah perlakuan diet. Pengambilan darah dilakukan setelah tikus dianestesi dengan larutan eter, setelah pingsan darah diambil melalui *Cardiac puncture* (jantung). Darah ditampung pada tabung *vacum* yang berisi EDTA (*Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid*). Sampel darah selanjutnya disimpan dalam *cooling box* berisi es untuk ditransportasikan dan analisis lanjut.

Analisis Aktivitas dan Kapasitas Sel Aktif Fagositosis

Pengujian aktivitas sel tikus akibat perlakuan dilakukan dengan uji darah tikus yang dicampur dengan sediaan bakteri *Staphylococcus aureus*. Darah dan bakteri dicampur dengan perbandingan bakteri dan darah 2:3. Selanjutnya campuran tersebut dihomogenkan dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang. Perhitungan aktivitas dan kapasitas fagositosis dilakukan dengan cara membuat preparat ulas dan diwarnai dengan Giemsa. Aktivitas fagositosis dihitung dari jumlah sel yang menelan bakteri per 100. Kapasitas fagositosis dihitung dari jumlah bakteri yang ditelan oleh sel yang dihitung kemudian dirata-ratakan (Wibawan dan Laemmler 1994).

Analisis Clearance test

Pengujian kemampuan darah tikus dalam melawan bakteri dilakukan dengan metode *Anderson et al.* 1984. Bakteri *Salmonella pullorum* digunakan sebagai bahan pengujian kemampuan darah tikus dalam memertahankan diri dari penyakit. Darah tikus diencerkan dengan NaCl fisiologis. Selanjutnya campuran tersebut ditumbuhkan bersama dengan perbandingan 1 bagian bakteri dan 9 bagian darah yang kemudian dihitung sebagai *Colony Forming Unit* (CFU)

akhir. Sedangkan CFU awal dihitung dengan mengamati populasi bakteri *S. pullorum* pada *Plate Count Agar* (PCA) selama 24 jam pada suhu kamar. Kemudian *Colony Forming Unit* (CFU) dihitung. Persentase kematian bakteri atau kemampuan *clearence* dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ Kematian Bakteri} = \frac{\text{Jumlah CFU awal} - \text{Jumlah CFU akhir}}{\text{Jumlah CFU awal}} \times 100\%$$

Analisis Data

Rancangan penelitian yang dilakukan pada penelitian ini adalah *independent T-test* dengan 2 perlakuan dan 4 ulangan, perlakuan pakan yang dilakukan adalah :

P0 : Pakan tikus pada tabel 1

P1 : Pakan tikus pada tabel 1 + 0,25% tanin *chesnut*

Model matematis yang berlaku pada penelitian adalah sebagai berikut:

$$Y_{ij} = A_i + B_j$$

Dengan Y_{ij} = hasil pengamatan

A_i = Pengaruh pakan terhadap hasil pengamatan

B_j = Pengaruh ulangan

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tanin merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan tanaman untuk memertahankan diri dari *stress* lingkungan, serangan predator, dan kekurangan hara serta air (Waghorn 2008). Perkembangan ilmu pengetahuan terakhir menyatakan bahwa pemberian tanin pada dosis yang tepat mampu meningkatkan kesehatan, karena tanin merupakan senyawa yang memiliki gugus fenol sehingga dapat berfungsi sebagai antioksidan dalam tubuh terutama *hydrolyzable* tanin yang akan terurai menjadi gugus gula dan gugus fenol (Perez-Maldonado 1994). Data pengamatan pada Tabel 2 merupakan pengaruh pemberian ekstrak tanin asal *chesnut* ke dalam pakan sebesar 0,25% terhadap palatabilitas, Peningkatan Bobot Badan (PBB), kapasitas sel dan sel aktif dalam darah tikus yang telah menerima perlakuan penambahan 0,25% ekstrak tanin asal *chesnut* di dalam ransum selama 4 minggu.

Tabel 2 Pengaruh perlakuan terhadap konsumsi, PBB, kapasitas dan sel aktif fagositosis

Parameter	Kontrol	Kontrol + 0,25%tanin	P-value
Konsumsi	7,36 ± 0,62	8,19 ± 1,20	1,00
PBB	0,03 ± 0,03	0,03 ± 0,12	0,35
Kapasitas Fagositosis	2073 ± 51,97*	2444 ± 154,17*	0,02
Sel Aktif	73,00 ± 3,00**	86,67 ± 1,53**	0,00

*Tanda tersebut menunjukkan bahwa penambahan tanin 0,25% berpengaruh nyata dibandingkan dengan pakan kontrol ($p < 0,05$) ** Tanda tersebut menunjukkan bahwa perlakuan berpengaruh sangat nyata dibandingkan dengan kontrol ($p < 0,01$)

Pemberian ekstrak tanin asal *chesnut* tidak berpengaruh terhadap besaran konsumsi tikus, hal ini berbeda dengan beberapa literatur yang menyatakan bahwa tanin mampu menurunkan palatabilitas pada ternak (Silanikove *et al.* 2001). Perbedaan ini dapat terjadi karena dosis tanin yang diberikan sangat kecil yaitu 0,25% dari total pakan. Pengamatan ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Frutos *et al.* (2004) yang menyatakan bahwa dalam dosis yang kecil terdapat mekanisme adaptasi pada hewan, sehingga pada dosis tertentu tikus mampu menerima pakan tanpa ada penurunan terhadap palatabilitasnya. Konsumsi yang tidak berbeda merupakan hasil pengamatan yang menguntungkan, karena dengan data tersebut kemungkinan penolakan terhadap ransum dengan penambahan ekstrak tanin asal *chesnut* sangat rendah.

Perubahan bobot badan harian dipengaruhi oleh banyaknya konsumsi dan besarnya penyerapan nutrisi bahan pakan. Pengamatan terhadap pemberian ekstrak tanin asal *chesnut* terlihat bahwa konsumsi pakan antar perlakuan tidak berbeda nyata, sedangkan PBB setiap perlakuan juga tidak berbeda nyata. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan ekstrak tanin asal *chesnut* sebanyak 0,25% tidak berpengaruh terhadap palatabilitas dan PBB tikus. Hal ini dapat menunjukkan bahwa penambahan 0,25% ekstrak tani asal *chesnut* tidak mengikat nutrisi secara signifikan dan menjelaskan bahwa PBB dan konsumsi pakan tidak terpengaruh oleh penambahan ekstrak tanin asal *chesnut* karena senyawa tanin yang terdapat pada *chesnut* berupa *hydrolizable* tanin (Ozgan *et al.* 2014). Hal ini mengakibatkan tanin asal *chesnut* mudah terurai dan melepaskan senyawa nutrisi yang terikat.

Pengamatan terhadap sel aktif dan kapasitas sel fagosit menunjukkan peningkatan daya tahan tikus akibat trigger dari ekstrak tanin asal *chesnut*. Hal ini dapat terjadi karena ekstrak tanin asal *chesnut* mampu berperan sebagai antioksidan di dalam tubuh tikus (Zhong *et al.* 2011). Hasil pengamatan data statistik menunjukkan bahwa kapasitas sel berbeda nyata antara tikus perlakuan dan kontrol. Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa sel yang aktif dalam mefagositosis lebih banyak pada tikus dengan pakan yang ditambah ekstrak tanin asal *chesnut*. Kemampuan fagositosis juga dipengaruhi oleh *stress* dan kesehatan dari tikus (Wibawan *et al.* 2007), sehingga dapat disimpulkan bahwa penambahan ekstrak tanin asal *chesnut* sebanyak 0,25% dari pakan sangat membantu meningkatkan kesehatan dan daya tahan tubuh tikus. Penelitian lain tentang pemberian 1000 mg/kg ekstrak *chesnut* pada pakan ayam broiler secara signifikan meningkatkan imunitas IgG dan menurunkan kolesterol darah (Liu *et al.* 2020).

Darah memiliki banyak fungsi dalam tubuh. Selain berfungsi sebagai transportasi nutrisi, darah juga memiliki peran dalam melindungi tubuh dari gangguan mikroba dan sistem pertahanan atau imun tubuh. Pemberian ekstrak tanin asal *chesnut* diharapkan dapat meningkatkan kemampuan *imun booster* pada tubuh tikus. Pengamatan pada parameter darah tikus dengan penambahan dan tanpa penambahan ekstrak tanin asal *chesnut* dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3 Pengaruh perlakuan terhadap kemampuan sebagai antimikroba dalam darah

Parameter Uji Darah	Kontrol bakteri <i>S. Pullorum</i>	Darah tikus dengan pakan biasa	P0+0,25%ekstrak tanin asal <i>chesnut</i>
Jumlah bakteri (cfu)	4,300X10 ⁷	2,90 X 10 ⁷	0,81 X 10 ⁷
Kematian bakteri (%)	0	99,33	99,88

Parameter uji darah merupakan salah satu petunjuk yang sangat penting untuk menentukan berhasil atau tidaknya suatu bahan meningkatkan imunitas. Karena di dalam darah terdapat beberapa sel darah putih yang berfungsi sebagai antimikroba. Penambahan tanin pada ternak babi dapat meningkatkan hematologi dan antioksidan di dalam darah (Stukel M *et al.* 2010). Pengujian darah tikus pada biakan *Salmonella* memperlihatkan bahwa darah tikus tanpa pemberian ekstrak tanin mampu mengurangi jumlah *Salmonella*, namun tikus yang mengkonsumsi ekstrak tanin memiliki kekuatan hampir 3,5 kali lipat dalam mengurangi jumlah *Salmonella*. Persentase kematian bakteri juga lebih banyak pada pakan dengan penambahan ekstrak tanin asal *chesnut* sebanyak 0,25%. Hal ini bisa terjadi karena tanin dalam darah tikus mampu menjadi antimikroba dan antioksidan (Abed M *et al.* 2013).

SIMPULAN

Penambahan ekstrak tanin asal *chesnut* sebanyak 0,25% pada bahan pakan selama 4 minggu tidak mempengaruhi palatabilitas dan PBB tikus, namun mampu meningkatkan imunitas pada darah tikus dengan cara meningkatkan jumlah sel aktif dan kapasitas sel fagositosis. Selain itu tanin dari *chesnut* juga mampu menjadi antimikroba dalam darah dengan menurunkan dan membunuh bakteri *Salmonella*.

SARAN

Perlu dilakukan pengamatan lebih dalam mengenai pengaruh tanin asal *chesnut* dalam profil darah merah dan darah putih serta metabolisme nutrisi dalam darah sebagai penguat penelitian. Selanjutnya dilakukan pengemasan yang baik agar dapat dilakukan komersialisasi produk bagi ternak, hewan kesayangan maupun manusia.

DAFTAR PUSTAKA

- [EFSA] European Food Safety Authority. 2014. Scientific Opinion on the Safety and Efficacy of Tannic Acid When Used as Feed Flavouring for All Animal Species. *EFSA Panel on Additives and Products or Substances Used in Animal Feed (FEEDAP)*. 10 : 1 - 18.
- Abed M, Herrmann T, Alzoubi K, Pakladok T, Lang F. 2013. Tannic Acid Induced Suicidal Erythrocyte Death. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 32 : 1106 - 1116.

- Anderson LC, Rush HG, Glorioso JC. 1984. Strain Differences in the Susceptibility and Resistance of *Pasteurella multocida* to Phagocytosis and Killing Rabbit *Polymorphonuclear neutrophils*. *American Journal of Veterinary Research* 45 (1) : 193-198.
- Astuti DA. 2015. Diet untuk Hewan Model. Bogor (ID) : Institut Pertanian Bogor Press.
- Diaz-Varela RA, Alvarez PA, Diaz-Varela E, Calvo-Iglesias S. 2011. Prediction of Stand Quality Characteristics in Sweet Chestnut Forest in NW Spain by Combining Terrain Attributes, Spectral Textural Features and Landscape Metrics. *Journal of Forest Ecology and Management*, 261 : 1962 – 1972.
- Frutos P, Hervas G, Giraldez G J, Mantecon R. 2004. Rivew. Tannin and Ruminant Nutrition. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2 : 191- 202.
- Gerlach K, Pries M, Südekum KH 2018. Effect of Condensed Tannin Supplementation on in Vivo Nutrient Digestibilities and Energy Values of Concentrates in Sheep. *Small Rumin. Res.* 161 : 57–62.
- Jayanegara A, Sujarnoko TUP, Ridla M, Kondo M, Kreuzer M. 2019. Silage Quality as Influenced by Concentration and Type of Tannins Present in the Material Ensiled : A Meta-Analysis. *Journal Animal Physiology and Animal Nutrition*. 103 : 456-465.
- Liu HS, Mahfuz SU, Wu D, Shang QH, Piao XS Piao. 2020. Effect of Chestnut Wood Extract on Performance, Meat Quality, Antioxidant Status, Immune Function, and Cholesterol Metabolism in Broilers. *Poultry Science* 99 : 4488 - 4495
- Ozgan CK, Ozgunay H, Kalender D 2014. Determination of Antioxidant Properties of Commonly Used Vegetable Tannins and Their Effectson Prevention of Cr(VI) Formation. *Journal Society of Leather and Chemists*. 99(5) : 245 - 249.
- Pereira-Lorenzo S, Ramos-Carber AM, Diaz-Hernandes MB, Ciordia-Ara M, Rios-Mesa D. 2006. Chemical Composition of Chestnut Cultivars from Spain. *Science Horticultural Amsterdam*. 107 : 306 – 314.
- Perez-Maldonado RA. 1994. The Chemical Nature and Biological Activity of Tannins in Forage Legumes Fed to Sheep and Goats [PhD Thesis]. University of Queensland, Australia.
- Petacchi F & Buccioni A. 2007. Effect of Chestnut Tannin in the Diet of Lactating Ewes on Milk and Cheese Quality. *Italian Journal of Animal Science*. 6 : 582 - 584.
- Silanikove N, Perevolotsky A, Provenza FD. 2001. Use of Tannin-binding Chemicals to Assay for Tannins and Their Negative Postingestive Effects in Ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. 91 : 69 – 81.
- Štukelj M, Valenčak Z, Krsnik M, Svete A N. 2010. The Effect of the Combination of acids and tannin in diet on the performance and selected biochemical, hematological and antioxidant enzyme parameters in grower pigs. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 52 (19) : 1-8.
- Sujarnoko TUP, Ridwan R, Nahrowi, Jayanegara A. 2020. Extraction of Tannin from Acacia (*Acacia mangium*) Bark and Its Use as a Feed Additive for

Protecting in vitro Ruminant Degradation of Tofu Dregs. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*. 8 : 1 – 5

- Tabbaco E, Borreani, Crovetto GM, GlassiG, D. Colombo and L. Cavallarin. 2006. Effect of Chestnut Tannin on Fermentation Quality, Proteolysis, and Protein Rumen Degradability of Alfalfa Silage. *Journal Dairy Science*. 89 : 4736 – 4746.
- Waghorn G. 2008. Beneficial and Detrimental Effects of Dietary Condensed Tannins for Sustainable Sheep and Goat Production—Progress and Challenges. *Animal Feed Science and Technology*. 147 (1/3) : 116-139.
- Wibawan IWT, Laemmler C. 1994. Relationship Between Encapsulation and Various Properties of Streptococcus suis. *Journal Veterinary Medicine*, B-4 (I) : 453 - 459.
- Wibawan IWT, Winarsih W, Priosoeryanto BP, Lay BW, Kompian IP. 2007. Pengaruh Probiotik Terhadap Fagositosis Sel Polimorfonuklear Ayam Broiler. *Jurnal Medis Veteriner Indonesia* 11(2) : 37-43.
- Zhong R, Xiao W, Ren G, Zhou D, Tan C, Tan Z, Han X, Tang S, Zhou C, Wang M. 2011. *Asian-Australian Journal Animal Science*. 24 : 1681 – 1689.