

# Efektifitas Ekstrak Daun Kenikir (*Cosmos caudatus*), Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia*), dan Tepung Cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*) dalam Sediaan Granul Larut Air sebagai Koksidiostat Alami terhadap Infeksi *Eimeria tenella* pada Ayam Broiler

Karimy MF<sup>1</sup>, Julendra H<sup>1</sup>, Hayati SN<sup>1</sup>, Sofyan A<sup>1</sup>, Damayanti E<sup>1</sup>, Priyowidodo D<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bagian Pakan dan Nutrisi Ternak  
Balai Pengembangan Proses dan Teknologi Kimia (BPPTK) – LIPI  
Jl. Yogyakarta-Wonosari Km. 31,5 Gading, Playen, Gunung Kidul, Yogyakarta 55861  
E-mail: moha057@lipi.go.id; fai\_ammad@yahoo.co.id

<sup>2</sup>Laboratorium Parasitologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Jl. Agro Karangmalang, Yogyakarta 55281

(Diterima 1 Oktober 2012; disetujui 14 Februari 2013)

## ABSTRACT

Karimy MF, Julendra H, Hayati SN, Sofyan A, Damayanti E, Priyowidodo D. 2013. Effectivity of water soluble granule from kenikir leaves extract (*Cosmos caudatus*), noni leaves extract (*Morinda citrifolia*), and earthworm meal extract (*Lumbricus rubellus*) as a natural coccidiostat for broiler chickens against infection caused by *Eimeria tenella*. JITV 18(2): 88-98.

The aim of this research was to study effectivity of water soluble granule from kenikir leaves extract (*Cosmos caudatus*), noni leaves extract (*Morinda citrifolia*), and earthworm meal extract (*Lumbricus rubellus*) as a natural coccidiostat for broiler chickens against infection caused by *Eimeria tenella*. One hundred day old chick (DOC) of the *Cobb* strain broiler were randomly divided into 10 groups and each group consisted of 10 chickens. All groups were orally infected by 5000 sporulated oocyst of *E. tenella* on the 25th days old as a challenge infection. The chickens was treated by granule of kenikir leaves extract, noni leaves extract and granule of earthworm meal extract which level dosage was 100, 200 and 300 mg/kgbw, respectively on each treatment (K1, K2, K3; M1, M2, M3 and T1, T2, T3). Control (K0) did not treated by feed additive. Treatment was administered on drinking water. On the 5th days after challenge infection 5 chickens of each groups were slaughtered and necropted to evaluate lesion score and histopatologi of caeca. Oocyst per gram excreta was count on 7th days until 10th days after challenge infection of the others 5 chickens of each groups. The results showed that the lowest score of lesion was obtained on M2 and M3 whereas the lowest total oocyst per gram excreta was obtained on M3. *Histopathological* observation revealed that there was no stadia development of *E. tenella* in M2 treatment. It was concluded that granule of noni leaves extract at 200 mg/kgbw (M2) was the most effective natural coccidiostat.

**Key Words:** *Eimeria tenella*, Kenikir Leaves, Noni Leaves, Earthworm Meal, Broiler Chickens

## ABSTRAK

Karimy MF, Julendra H, Hayati SN, Sofyan A, Damayanti E, Priyowidodo D. 2013. Efektifitas ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*), daun mengkudu (*Morinda citrifolia*), dan tepung cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) dalam sediaan granul larut air sebagai koksidiostat alami terhadap infeksi *Eimeria tenella* pada ayam broiler. JITV 18(2): 88-98.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektifitas pemberian ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*), ekstrak daun mengkudu (*Morinda citrifolia*), dan ekstrak tepung cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) dalam sediaan granul larut air sebagai koksidiostat alami terhadap infeksi *Eimeria tenella* pada ayam broiler. Seratus ekor *Day Old Chick* (DOC) pedaging galur *Cobb* digunakan sebagai hewan penelitian dan dibagi menjadi 10 perlakuan secara acak yang masing-masing terdiri dari 10 ekor ayam. Infeksi dilakukan pada umur 25 hari secara oral dengan 5000 ookista *E. tenella* pada semua ayam penelitian. Perlakuan yang dicobakan adalah pemberian granul ekstrak daun kenikir, granul ekstrak tepung cacing tanah dan granul ekstrak daun mengkudu masing-masing berturut-turut dengan dosis 100, 200 dan 300 mg/kg bb (K1, K2, K3; M1, M2, M3 and T1, T2, T3). Kontrol (K0) tidak diberi imbuhan pakan selama pemeliharaan. Imbuhan pakan diberikan melalui air minum. Lima hari setelah infeksi 50 ekor ayam disembelih dan dinekropsi untuk melihat derajat perlukaan (skor lesi) dan gambaran histopatologi sekum. Hari ke-7 hingga ke-10 setelah infeksi, ekskreta dari 50 ekor ayam yang tersisa diperiksa dan dihitung jumlah ookista per gram ekskreta. Hasil penelitian menunjukkan skor lesi terendah didapatkan pada M2 dan M3, sedangkan jumlah ookista per gram ekskreta terendah didapatkan pada M3. Hasil pengamatan histopatologi menunjukkan bahwa pada M2 tidak ditemukan stadium perkembangan *E. tenella* sehingga dapat disimpulkan bahwa pemberian granul ekstrak daun mengkudu 200 mg/kg bb (M2) paling efektif sebagai koksidiostat alami.

**Kata Kunci:** *Eimeria tenella*, Daun Mengkudu, Daun Kenikir, Cacing Tanah, Ayam Broiler

## PENDAHULUAN

*Eimeria* adalah parasit intraseluler dalam saluran pencernaan. *Eimeria* penyebab koksidiosis pada ayam termasuk Filum *Apicomplexa*, Kelas *Sporozoa*, Subkelas *Coccidia*, Ordo *Eucoccidiae*, Subordo *Eimeriina*, Familia *Eimeriidae*, Genus *Eimeria* (Levine, 1995; Soulsby, 1982). Terdapat tujuh spesies *Eimeria* dan tiga diantaranya yaitu *E. acervulina*, *E. maxima*, dan *E. tenella* yang diketahui paling sering menyebabkan koksidiosis pada 50-70% peternakan unggas (Hassan et al. 2008). Banyaknya kasus resistensi obat dari strain koksidia menyebabkan obat-obat antikoksidia yang tersedia saat ini menjadi tidak efektif dan mengancam perekonomian industri perunggasan (El-Sadawy et al. 2009). Guna mencegah resistensi koksidostat pada *Eimeria* karena penggunaan yang terus menerus dalam pakan dan untuk meningkatkan keamanan produk pangan asal hewan, maka saat ini alternatif koksidostat banyak dikembangkan salah satunya melalui penggunaan koksidostat alami (Saad et al. 2006; Orengo et al. 2012).

Beberapa penelitian terkait koksidostat alami antara lain ekstrak air kulit kayu pinus dengan kandungan tanin 35% diketahui dapat mengurangi sporulasi ookista *E. tenella* secara signifikan (Molan et al. 2009), senyawa artemisinin dari *Artemisia sieberi* efisien untuk mengurangi ekskresi ookista dan xanthohumol, senyawa khalkon terpenilasi dari bunga *Humulus lupulus* efektif mengurangi derajat perlukaan (skor lesi) oleh *E. tenella* (Arab et al., 2006; Allen, 2007). Michels et al. (2011) juga menyebutkan ekstrak urang aring (*Eclipta alba*) yang mengandung kumarin pada konsentrasi 120 ppm efektif sebagai agen profilaksis koksidia. Aktivitas antikoksidia juga diketahui pada 1000 mg/kg ekstrak *Echinacea purpurea* (Orengo et al. 2012), ekstrak air dan etanol *Saccharum officinarum* (Awais et al. 2011), 100 µl ekstrak bawang putih (20 mg/ml) (Dkhil et al. 2011).

Beberapa jenis tanaman yang digunakan untuk pakan ternak dapat memberikan alternatif biofarmasi yang sederhana dan murah (Reda dan Dausgies, 2010). Menurut Liliwirianis et al. (2011) Kenikir (*Cosmos caudatus*) juga diketahui mengandung saponin (batang dan daun), alkaloid (batang dan daun), steroid (batang dan daun), fenol (daun), flavonoid (batang dan daun) dan terpenoid (daun). Rasdi et al. (2010) menyatakan kenikir memiliki aktifitas antimikroba baik pada bakteri Gram positif (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*), bakteri Gram negatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), dan fungi (*Candida albicans*).

Mengkudu (*Morinda citrifolia*) diketahui memiliki aktifitas anti mikroba, anti fungal, anti protozoa, anti diabetes, anti oksidan, anti hipertensi, anti diare, dan dapat mempercepat penyembuhan luka (Adnyana et al.

2004; Gautam et al. 2007; Mesia et al. 2008; Jainkittivong et al. 2009; Nayak et al. 2009; Gilani et al. 2010). Penambahan daun mengkudu sebesar 3 mg/100 mg bahan kering merupakan taraf optimum yang mampu menurunkan populasi protozoa dibandingkan dengan kontrol ( $P < 0,05$ ) (Herdian et al. 2011). Daun mengkudu diketahui mengandung vitamin C, terpenoid, alkaloid, anthraquinone, asam amino, flavone glycoside, linoleic acid, rutin dan iridoid glycoside yang diketahui memiliki aktivitas antioksidan (Chinta et al. 2010).

Antioksidan asal tanaman saat ini banyak dikaji sebagai senyawa antikoksidia yang diharapkan menjadi alternatif antikoksidia (Coombs dan Müller, 2002). Kandungan saponin asal tanaman juga diketahui memiliki aktivitas antiprotozoa dengan cara mengikat molekul sterol yang ada pada permukaan membran sel protozoa (Hassan et al. 2008).

Cacing tanah secara rutin memakan protozoa, bakteri, dan jamur sebagai makanannya dari berbagai limbah atau tanah yang menjadi tempat hidupnya (Sinha et al. 2010). Salah satu jenis cacing tanah yang berpotensi sebagai pengganti antibiotik adalah *Lumbricus rubellus*, selain memiliki kadar protein tinggi (50%-60%), tepung cacing tanah *L. rubellus* juga memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri Gram negatif *E. coli* (Julendra dan Sofyan 2007), bakteri Gram positif *S. aureus* dan jamur *C. albicans* (Damayanti et al. 2008). Penggunaan cacing tanah dapat menekan pertumbuhan *S. pullorum* secara *in vitro* dan *in vivo* pada ayam broiler (Damayanti et al. 2009). Senyawa aktif yang terkandung dalam *L. rubellus* adalah lumbricin yang merupakan golongan peptida/protein antimikrobia spektrum luas (Cho et al. 1998). Peptida antimikrobia bekerja dengan cara mempengaruhi permeabilitas membran dinding sel mikroba sehingga menghambat proses sintesis protein dan DNA (Tasiemski, 2008; Cho et al. 1998). Komposisi dinding luar ookista *E. tenella* 90% adalah protein dan sebagian kecil karbohidrat, sedangkan lapisan dalam terdiri dari 1,5% karbohidrat, 30% lemak dan 70% protein (Mai et al. 2009). Komponen seluler *Eimeria necratis* mengandung glukosa 10,47%, kolesterol 18,46% dan protein 70,35% (Patra et al. 2009). Peptida antimikrobia lumbricin bermuatan positif (Cho et al. 1998) dan peptida bermuatan positif diketahui dapat secara langsung mempengaruhi sintesis makromolekul karena kerusakan depolarisasi dinding sel (Hancock dan Rozek 2002). Berdasarkan kandungan bahan aktif dalam daun kenikir, daun mengkudu, dan cacing tanah, maka perlu diketahui kemampuan bahan-bahan tersebut sebagai koksidostat alami khususnya *E. tenella* pada ayam broiler.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektifitas granul ekstrak daun kenikir (*C. caudatus*), granul daun mengkudu (*M. citrifolia*), dan granul tepung cacing

tanah (*L. rubellus*) dalam sediaan granul larut air minum dan diharapkan akan memberikan informasi alternatif koksidiostat dari bahan alami.

## MATERI DAN METODE

### Hewan coba dan laboratorium penelitian

Penelitian ini menggunakan 100 ekor ayam pedaging galur *Cobb* yang dipelihara mulai umur satu hari (DOC) hingga 35 hari dan diberi pakan formulasi dengan komposisi seperti terlihat pada Tabel 1 tanpa tambahan antibiotik dan koksidiostat, serta ookista *E. tenella* yang telah bersporulasi. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium UPT BPPTK-LIPI Gunung Kidul dan Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada.

**Tabel 1.** Komposisi pakan perlakuan (%)

Bahan pakan	Persentase (%)
Jagung	60
Pollard	5,35
Bungkil Kedelai	23
Tepung Ikan	7,5
Minyak kelapa	2
CaCO <sub>3</sub>	0,8
Di Calcium Phospat	0,25
L-Lysin	0,8
DL-Metionin	0,27
Premix*	0,025
Jumlah	100,00
Kandungan nutrisi (berdasarkan pemberian)	
Protein kasar (PK)	21,04
Serat kasar (SK)	3,384
Lemak kasar (LK)	3,330
Ca (%)	0,827
P (%)	0,506
Energi Metabolik (kkal/kg)	3013,4
Lisin (%)	1,942
Metionin (%)	0,651

Komposisi premix\* per kg yaitu vitamin A 48.000.000 IU, vitamin D<sub>3</sub> 9.000.000 IU, vitamin E 120.000 mg, vitamin K<sub>3</sub> 9.600 mg, vitamin B<sub>1</sub> 6.000 mg, vitamin B<sub>2</sub> 20.000 mg, vitamin B<sub>6</sub> 6.500 mg, vitamin B<sub>12</sub> 70 mg, vitamin C 12.000 mg, Ca-d-pantothenate 48.000 mg, niacin 120.000 mg, folic acid 3.000 mg

### Ekstraksi dan granulasi daun mengkudu dan daun kenikir

Daun mengkudu dan daun kenikir didapatkan dari petani di Gunung Kidul. Daun dipilih yang segar dan cukup tua kemudian dicuci bersih dengan air mengalir. Daun dikeringkan dalam oven pada suhu 50-60°C kemudian dibuat serbuk secara mekanis menggunakan mesin penggiling. Serbuk daun kering diayak menggunakan ayakan dengan ukuran 30 mesh untuk memperoleh ukuran partikel yang seragam. Ekstraksi serbuk daun mengkudu dan kenikir dilakukan dengan metode maserasi menurut Dep Kes RI (2000) menggunakan pelarut etanol 40% (v/v). Serbuk simplisia direndam dalam etanol selama 3 hari sambil sesekali diaduk dan diletakkan di tempat sejuk dan kering serta terlindung dari cahaya. Selanjutnya dilakukan penyaringan untuk mendapatkan filtrat yang bebas dari ampas. Filtrat diuapkan hingga diperoleh konsistensi yang kental.

Proses granulasi dilakukan dengan cara memformulasi ekstrak kental menjadi bentuk serbuk kering (Gunsel dan Kanig, 1976). Ekstrak diaglomerasi dengan penambahan laktosa sebagai bahan pengisi, menggunakan metode granulasi basah (*wet granulation method*). Tahapan granulasi basah terdiri dari penimbangan bahan (*weighing*), pencampuran (*mixing*), pengayakan granul basah (*wet sieving*), pengeringan pada suhu 40-60°C (*drying*), pengayakan granul kering (*dry sieving*), dan pengemasan (*packaging*).

### Ekstraksi dan granulasi tepung cacing tanah (TCT)

Cacing tanah (*L. rubellus*) diperoleh dari CV. Kleco Group Yogyakarta. Ekstrak cacing tanah didapatkan dari tepung cacing tanah (TCT). Pembuatan TCT mengacu pada metode Edwards (1985) yang dimodifikasi. Cacing tanah dicuci dengan air untuk menghilangkan kotoran pada kulit luar dan kotoran pada pencernaan cacing (*fecal mud*). Kemudian cacing direndam dalam air dingin 14°C selama 24 jam. Asam format 80% ditambahkan sebanyak 3% (v/b) dari berat cacing. Selanjutnya, cacing digiling menggunakan blender. Hasil gilingan dikeringkan dalam oven suhu 50°C selama 12 jam dan digiling kembali setelah kering. Ekstrak cacing tanah (ECT) dibuat dengan metode dekotta (Dep Kes RI, 2000). Sebanyak 1 bagian tepung cacing tanah (TCT) ditambah dengan 10 bagian akuadestilata dan ditambah lagi air ekstra sebanyak 2 bagian ke dalam panci. Panci yang berisi campuran air dan TCT dipanaskan di atas penangas air selama 30 menit terhitung sejak suhu air dalam panci 90°C. Filtrat didapatkan dari hasil penyaringan air rebusan TCT menggunakan kain saring. Filtrat kemudian dipekatkan dengan cara diuapkan yang disertai dengan penurunan tekanan permukaan hingga

didapatkan konsistensi yang kental. Ekstrak TCT disimpan dalam pendingin suhu -20°C sebelum digunakan.

Proses granulasi ECT menggunakan metode granulasi basah (Gunsel dan Kanig, 1976). Bahan eksipien yang digunakan adalah bahan pengisi gula atau turunan gula yaitu sukrosa, bahan pengering berupa amilum, dan agen pensuspensi yaitu kombinasi gom arab dan sodium karboksimetil selulosa.

### Produksi Ookista *E. tenella*

*E. tenella* berasal dari koleksi Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada. Produksi ookista *E. tenella* dilakukan dengan cara menginfeksi 10 ekor ayam pedaging berumur dua minggu dengan masing-masing 5000 ookista/ekor *E. tenella* yang telah bersporulasi secara per oral. Hari ketujuh pasca infeksi, ayam disembelih untuk diambil isi sekumnya. Setiap 1 gram isi sekum ditambah 20 ml kalium bikromat 2%, diaduk kemudian disaring dengan saringan 400 mesh dan dibiarkan pada suhu kamar selama 1-2 hari agar ookista yang diperoleh bersporulasi. Larutan yang mengandung ookista yang telah bersporulasi diinfeksi ke ayam percobaan secara per oral (Priyowidodo, 2005).

### Perlakuan ayam percobaan

Ayam percobaan diberi perlakuan granul daun kenikir, daun mengkudu dan TCT dengan 3 level dosis 100 - 300 mg/kg bb. Dosis didapatkan berdasarkan perhitungan dosis lazim untuk manusia yang dikonversi menjadi dosis untuk ayam dengan rumus menurut FDA (2005) sebagai berikut:

$$\text{Dosis hewan (mg/kg)} = \frac{\text{Dosis manusia (HED)}}{\text{Berat hewan (kg)/berat manusia (kg)}}$$

Seratus ayam pedaging galur *Cobb* DOC dibagi menjadi 10 perlakuan yang masing-masing terdiri dari 10 ekor ayam. Ayam dipelihara pada kandang kelompok dan diberi pakan formulasi. Granul imbuhan pakan diberikan dari awal pemeliharaan sampai masa panen melalui air minum. Perlakuan yang dicobakan ditampilkan pada Tabel 2.

Hari ke 19 ayam dibagi menjadi dua tempat pemeliharaan, yaitu di kandang litter dan kandang individu. Infeksi *E. tenella* dilakukan pada semua hewan percobaan pada usia 25 hari secara per oral. Lima hari setelah infeksi, 50 ekor ayam dari kandang litter disembelih dan dinekropsi untuk melihat skor lesi (Reid et al. 1984) dan untuk pemeriksaan histopatologi sekum ayam. Hari ke-7 hingga hari ke-10 setelah infeksi, ekskreta dari 50 ekor ayam yang tersisa di kandang individu diambil dan dihitung jumlah ookista per gram ekskreta dengan metode *McMaster* yang dimodifikasi (Georgi, 1980).

**Tabel 2.** Perlakuan ayam percobaan

Kode	Keterangan
K0	Kontrol tanpa granul imbuhan pakan
K1	Granul daun kenikir 100 mg/kg bb
K2	Granul daun kenikir 200 mg/kg bb
K3	Granul daun kenikir 300 mg/kg bb
M1	Granul daun mengkudu 100 mg/kg bb
M2	Granul daun mengkudu 200 mg/kg bb
M3	Granul daun mengkudu 300 mg/kg bb
T1	Granul tepung cacing tanah 100 mg/kg bb
T2	Granul tepung cacing tanah 200 mg/kg bb
T3	Granul tepung cacing tanah 300 mg/kg bb

Masing-masing perlakuan terdiri dari 10 ekor ayam

### Pengamatan derajat perlakuan (skoring lesi) sekum

Derajat perlakuan (skor lesi) sekum akibat infeksi *Eimeria* dikelompokkan dalam skala 0 sampai +4 (Tabbu, 2002). Nilai 0 tidak menunjukkan adanya lesi pada sekum; nilai +1 menunjukkan gejala ringan berupa *ptechie* atau perdarahan titik yang menyebar pada permukaan mukosa sekum dengan sedikit perubahan warna dinding atau isi saluran pencernaan (sekum); nilai +2 menunjukkan adanya lesi tingkat sedang yang ditandai dengan lebih banyak perdarahan dan lesi dengan sedikit penebalan pada dinding sekum; nilai +3 ditunjukkan dengan adanya lesi pada tingkat yang berat, perdarahan berat dan gumpalan darah; nilai +4 menunjukkan adanya lesi yang sangat berat, perdarahan yang sangat hebat dan meluas, adanya warna merah kebiruan pada sekum yang berisi gumpalan darah (Reid et al. 1984).

### Pengamatan histopatologi sekum

Pengamatan histopatologi sekum dilakukan dengan perbesaran 100x dan 400x dengan menggunakan mikroskop. Parameter yang diamati adalah terjadinya hemoragi dan erosi epitel sekum serta stadium perkembangan *E. tenella*. Stadium perkembangbiakan *E. tenella* meliputi fase sporogoni, skizogoni (reproduksi aseksual) dan gametogoni (reproduksi seksual) (Soulsby, 1982), pada penelitian ini hanya diamati skizon (aseksual) dan makrogamet-mikrogamet (seksual). Penilaian berdasarkan persentase jumlah ayam yang mengalami hemoragi, erosi epitel sekum, dan stadium perkembangan *E. tenella*.

### Ookista per gram ekskreta

Ookista per gram ekskreta dihitung pada hari ke-7 hingga ke-10 setelah infeksi dengan metode *McMaster* yang dimodifikasi (Georgi, 1980). Perhitungan ookista

per gram ekskreta dilakukan dengan menggunakan counter dan dilakukan dibawah mikroskop dengan perbesaran 100x.

**KOLEKSI DAN ANALISA DATA**

Derajat perlukaan (skor lesi) dan gambaran histopatologi sekum diperoleh dari ayam pada lima hari setelah infeksi yang kemudian diolah secara deskriptif. Ookista per gram ekskreta diperoleh dari ayam pada hari ke-7 hingga hari ke-10 setelah infeksi disusun dalam rancangan *split plot*. Pengujian data dilakukan dengan *Analysis of Variance* (ANOVA) yang dilanjutkan dengan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) (Gomez dan Gomez, 2007).

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Derajat perlukaan (skor lesi) sekum**

Gambaran skor lesi ayam broiler yang diinfeksi dengan *E. tenella* ditampilkan pada Gambar 1.

Berdasarkan derajat perlukaan (skor lesi) kerusakan jaringan dan perdarahan pada sekum ayam perlakuan M2 dan M3 lebih ringan jika dibandingkan dengan K0 (kontrol) seperti tampak pada Gambar 2.

Kelompok perlakuan M2 dan M3 menunjukkan hasil skor lesi yang sama, akan tetapi dari hasil pemeriksaan histopatologi menunjukkan bahwa pada perlakuan M2 tidak ditemukan fase gametogoni

*E. tenella* (makrogamet dan mikrogamet). Penelitian Youn dan Noh (2001) menunjukkan kemampuan beberapa ekstrak tanaman sebagai antikoksidia *E. tenella* pada ayam broiler dengan skor lesi antara 1,4-2,83 lebih rendah dibandingkan dengan skor lesi pada ayam kontrol tanpa pemberian ekstrak tanaman yaitu 3. Nilai skor lesi lebih rendah juga didapatkan pada ayam broiler yang diinfeksi *E. acervulina*, yang diberi *Cynnamaldehiye* dan ekstrak *E. purpurea* 1000 mg/kg bb dibandingkan control ( $P < 0,05$ ) (Orengo et al. 2011). Mengkudu juga terbukti dapat mempercepat aktifitas penyembuhan luka (Nayak et al. 2009), hal inilah yang menyebabkan kesembuhan sekum yang rusak akibat pecahnya skizon pada perlakuan M2 dan M3 menjadi lebih cepat yang dapat dilihat dari pengamatan secara makroskopis.

**Pengamatan mikroskopis (Histopatologi)**

Hasil pengamatan mikroskopis preparat histopatologi menunjukkan bahwa M2 merupakan hasil terbaik dengan tidak ditemukannya fase gametogoni (makrogamet dan mikrogamet) *E. tenella*, hemoragi dan fase skizogoni (skizon) hanya terjadi pada dua dari lima ekor ayam yang diamati (40%), sedangkan pada M3 ditemukan fase skizogoni (skizon) dan gametogoni (makrogamet dan mikrogamet) *E. tenella*. Pada kontrol (K0) juga didapatkan stadium perkembangan *E. tenella* yaitu skizon, makrogamet, dan mikrogamet. Hasil pemeriksaan histopatologi dapat dilihat pada Tabel 3 dan Gambar 3.

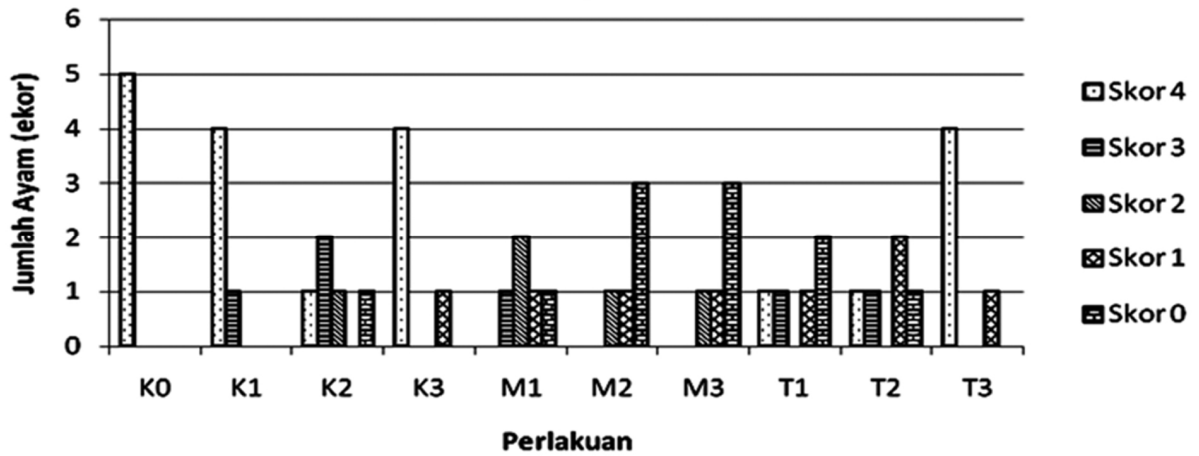
**Tabel 3.** Persentase hemoragi, erosi epitel dan stadium *E. tenella* yang diamati secara mikroskopis (histopatologi) sekum ayam yang diinfeksi 5000 ookista *E. tenella* per ekor

Perlakuan	Hemoragi	Erosi epitel	Stadium <i>E. tenella</i>		
			Skizon	Makro gamet	Mikro gamet
.....(%).....					
K0	100	100	100	40	40
K1	100	100	80	20	20
K2	80	100	60	80	80
K3	100	100	100	20	20
M1	80	100	100	20	20
M2	40	100	40	0	0
M3	40	100	20	20	20
T1	100	100	60	40	40
T2	100	100	60	100	100
T3	80	100	80	0	0

K0 = Kontrol tanpa granul imbuhan pakan  
 K1 = Granul daun kenikir 100 mg/kg bb  
 K2 = Granul daun kenikir 200 mg/kg bb  
 K3 = Granul daun kenikir 300 mg/kg bb

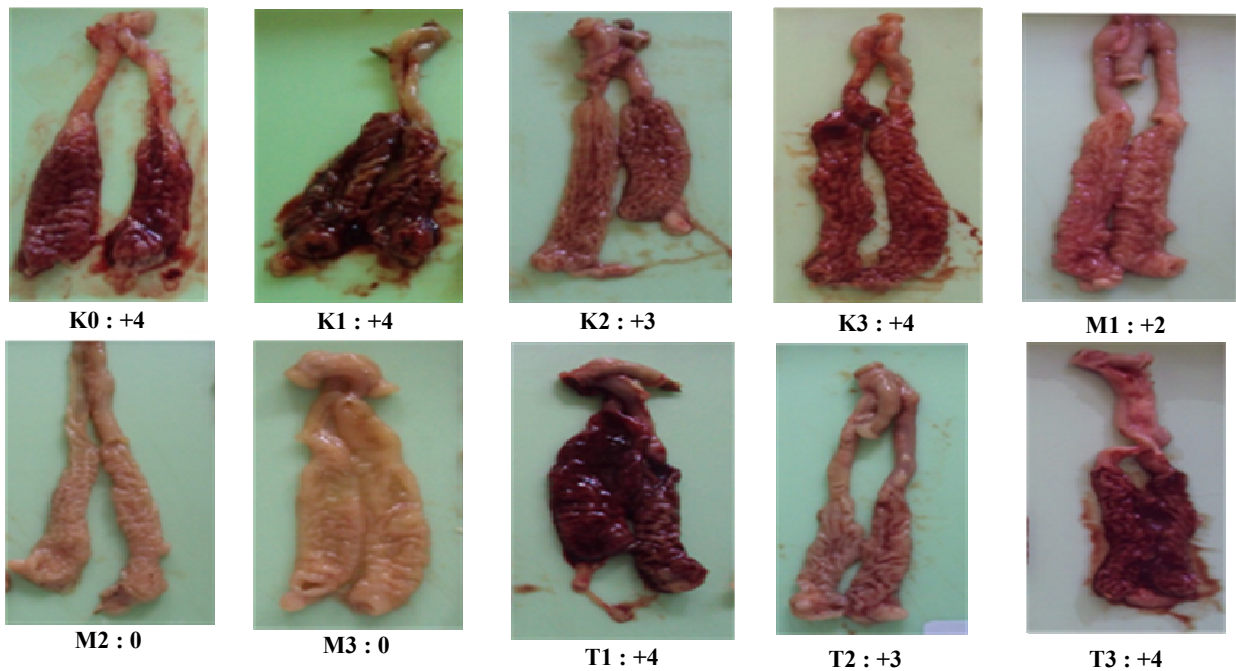
M1 = Granul daun mengkudu 100 mg/kg bb  
 M2 = Granul daun mengkudu 200 mg/kg bb  
 M3 = Granul daun mengkudu 300 mg/kg bb

T1 = Granul tepung cacing tanah 100 mg/kg bb  
 T2 = Granul tepung cacing tanah 200 mg/kg bb  
 T3 = Granul tepung cacing tanah 300 mg/kg bb



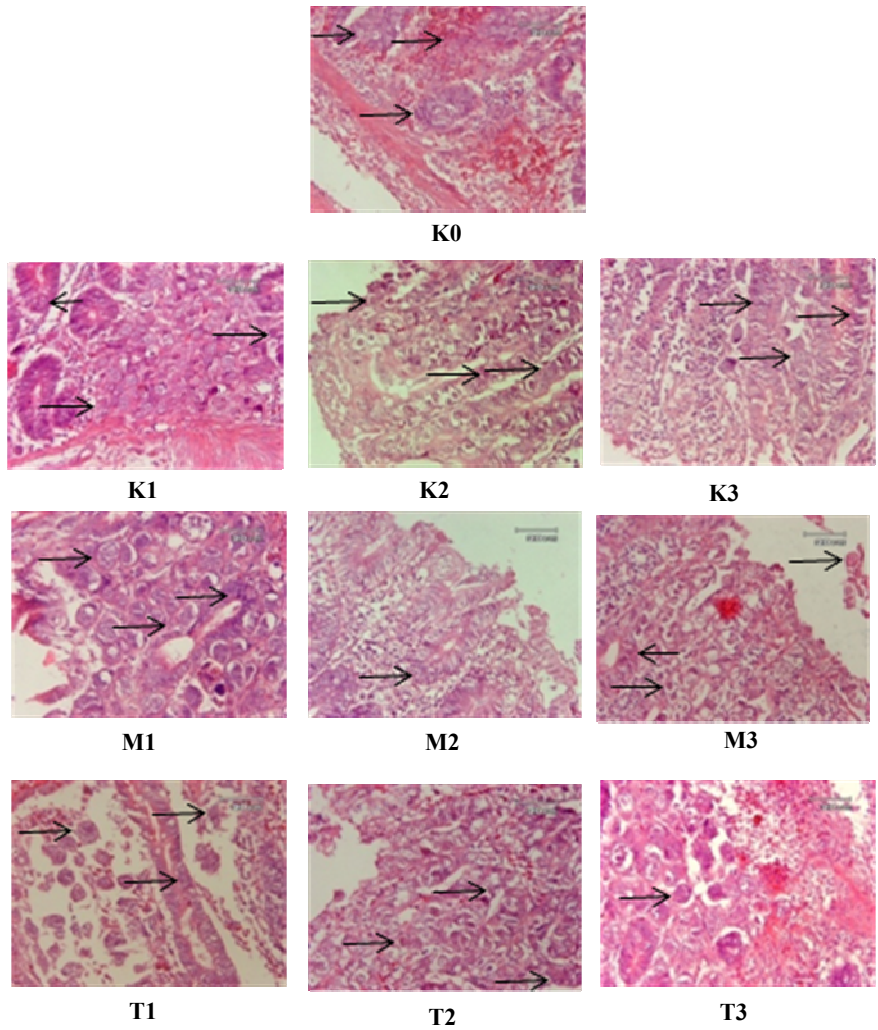
K0 = Kontrol tanpa granul imbuhan pakan  
 K1 = Granul daun kenikir 100 mg/kg bb  
 K2 = Granul daun kenikir 200 mg/kg bb  
 K3 = Granul daun kenikir 300 mg/kg bb  
 M1 = Granul daun mengkudu 100 mg/kg bb  
 M2 = Granul daun mengkudu 200 mg/kg bb  
 M3 = Granul daun mengkudu 300 mg/kg bb  
 T1 = Granul tepung cacing tanah 100 mg/kg bb  
 T2 = Granul tepung cacing tanah 200 mg/kg bb  
 T3 = Granul tepung cacing tanah 300 mg/kg bb

**Gambar 1.** Grafik penilaian derajat perlukaan (skor lesi) pada sekum ayam yang diinfeksi 5000 ookista *E.tenella* per ekor. Skor 0, +1, +2, +3, dan +4 menunjukkan derajat perlukaan (skor lesi) sekum.



K0 = Kontrol tanpa granul imbuhan pakan  
 K1 = Granul daun kenikir 100 mg/kg bb  
 K2 = Granul daun kenikir 200 mg/kg bb  
 K3 = Granul daun kenikir 300 mg/kg bb  
 M1 = Granul daun mengkudu 100 mg/kg bb  
 M2 = Granul daun mengkudu 200 mg/kg bb  
 M3 = Granul daun mengkudu 300 mg/kg bb  
 T1 = Granul tepung cacing tanah 100 mg/kg bb  
 T2 = Granul tepung cacing tanah 200 mg/kg bb  
 T3 = Granul tepung cacing tanah 300 mg/kg bb

**Gambar 2.** Gambaran makroskopis derajat perlukaan (skor lesi) sekum ayam yang diinfeksi 5000 ookista *E.tenella* per ekor.



K0 = Kontrol tanpa granul imbuhan pakan  
 K1 = Granul daun kenikir 100 mg/kg bb  
 K2 = Granul daun kenikir 200 mg/kg bb  
 K3 = Granul daun kenikir 300 mg/kg bb  
 M1 = Granul daun mengkudu 100 mg/kg bb  
 M2 = Granul daun mengkudu 200 mg/kg bb  
 M3 = Granul daun mengkudu 300 mg/kg bb  
 T1 = Granul tepung cacing tanah 100 mg/kg bb  
 T2 = Granul tepung cacing tanah 200 mg/kg bb  
 T3 = Granul tepung cacing tanah 300 mg/kg bb

**Gambar 3.** Gambaran histopatologi (mikroskopis) sekum ayam dengan perbesaran 400x yang diinfeksi 5000 ookista *E. tenella* per ekor. Tanda → menunjukkan stadium perkembangan *E. tenella*.

Kelompok perlakuan M3 dari hasil pemeriksaan histopatologi ditemukan stadium perkembangan *E. tenella*, yaitu skizon, makrogamet, dan mikrogamet. Kelompok perlakuan M2 dan T3 tidak ada perkembangan fase gametogoni, akan tetapi pada perlakuan T3 80% dari lima ayam yang dilakukan pemeriksaan histopatologi ditemukan fase skizogoni (skizon). Bila dibandingkan dengan hasil pemeriksaan makroskopis (skor lesi) perlakuan T3 lebih parah kerusakan sekumnya daripada M3. Skor +4 pada T3 berjumlah empat ekor dari lima ekor yang diperiksa, sedangkan tidak ada skor +4 pada perlakuan M3. Hal ini disebabkan ekstrak etanolik mengkudu dapat mempercepat penyembuhan luka dan kandungan

antioksidan serta saponin yang dapat menurunkan viabilitas protozoa tersebut (Coombs dan Müller, 2002; Nayak et al. 2009; Herdian et al. 2011).

#### Ookista per gram ekskreta

Hasil perhitungan ookista mulai hari ke-7 hingga hari ke-10 setelah infeksi ditunjukkan Tabel 4. Hasil perhitungan ookista per gram ekskreta dapat dilihat bahwa pemberian M3 menurunkan jumlah ookista per gram ekskreta jika dibandingkan dengan K0 ( $P < 0,01$ ). Perlakuan K2, M2, dan T2 juga menurunkan jumlah ookista per gram ekskreta jika dibandingkan dengan K0



( $P > 0,01$ ). Hal ini disebabkan fase gametogoni *E. tenella* pada M2 tidak berkembang, sehingga ookista tidak terbentuk. Pengeluaran ookista pada M2 dapat terjadi karena kondisi usus yang tidak rusak parah, sehingga tidak terjadi penyumbatan di sekum. *E. tenella* sempat berkembang sebelum dikeluarkan, hal ini terlihat dari rusaknya struktur sekum dan ditemukannya fase skizogoni pada M2. Kerusakan jaringan maksimal (perdarahan dan nekrosis) dapat ditemukan pada saat skizon generasi kedua mengalami ruptur (pecah) untuk membebaskan merozoit (Tabbu, 2002). Kerusakan yang maksimal ini dapat disebabkan perbedaan panjang merozoit generasi kedua yang lebih panjang daripada merozoit generasi pertama. Menurut Levine (1995) panjang merozoit generasi kedua dapat mencapai 16  $\mu\text{m}$ , sedangkan panjang merozoit generasi pertama hanya berukuran 2-4  $\mu\text{m}$ .

Berdasarkan Tabel 4 eliminasi ookista hingga pengamatan hari ke-10 setelah infeksi belum menunjukkan pola penurunan berarti pada hampir semua perlakuan. Penelitian Orengo et al. (2011) menunjukkan pemberian 1000 mg/kg bb ekstrak *E. purpurea* hanya mampu mengeluarkan ookista *E. acervulina* dari 5,5 menjadi 4,5 (log 10/g ekskreta) pada ayam broiler yang diinfeksi dengan 100.000 ookista dari 6 hingga 11 hari pasca infeksi. Hal ini berbeda dengan hasil penelitian Nweze dan Obiwulu (2009) yang menunjukkan pengeluaran ookista dari 5,7 menjadi 0 (log 10/g ekskreta) ayam broiler yang diinfeksi 8000 ookista *E. tenella* terjadi pada pemberian

500 mg/kg bb ekstrak *Ageratum conizoides* hingga 18 hari pengamatan pasca perlakuan.

Perhitungan jumlah ookista per gram ekskreta menunjukkan hasil yang berbeda dari skor lesi dan histopatologi (pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis). Hal ini disebabkan kondisi sekum yang mengalami erupsi karena pecahnya skizon dan terjadi perdarahan serta penebalan dinding sekum menyebabkan tersumbatnya sekum, sehingga ookista yang telah dihasilkan tidak dapat dikeluarkan karena tersumbat oleh runtuhnya epitel usus dan penebalan dinding sekum. Menurut Levine (1995) ookista dapat tinggal di dalam rongga sekum untuk beberapa waktu lamanya dan karena banyaknya ookista tertahan oleh sumbat dari bahan yang ada di dalam sekum selama beberapa hari sebelum dikeluarkan. Pada saat itu sekum melekat dan masa eksudat pada membran mukosa sekum dapat menyumbat *lumen* sekum, sehingga ookista tidak dapat dikeluarkan bersama ekskreta (Soulsby, 1982). Kerusakan yang hebat dari sekum secara *in vivo* menyebabkan stadium *E. tenella* yang telah berkembang tertahan di dalam sekum (Michels et al. 2011).

Kandungan saponin dalam mengkudu dapat berfungsi sebagai koksidiostat. Saponin dapat menurunkan viabilitas protozoa dengan cara mengubah permeabilitas membran sel organisme tersebut dengan mekanisme saponin mengikat sterol yang terdapat pada permukaan protozoa (Klita et al. 1996; Francis et al. 2002; Patra et al. 2006). Mengkudu juga terbukti dapat

**Tabel 4.** Jumlah ookista (log 10/g) dari ekskreta ayam broiler yang diinfeksi dengan 5000 ookista *E. tenella* per ekor dan diberi perlakuan yang berbeda

Perlakuan	Hari setelah infeksi				Rerata eliminasi ookista (log10 per gram ekskreta)
	7	8	9	10	
K0	3,42	3,14	3,72	1,59	2,97 <sup>ab</sup> ± 0,62
K1	3,9	4,02	3,27	3,68	3,72 <sup>a</sup> ± 0,26
K2	2,54	2,25	2,18	1,77	2,19 <sup>bc</sup> ± 0,41
K3	4,27	4,21	4,19	3,45	4,03 <sup>a</sup> ± 0,19
M1	4,25	3,99	3,33	3,35	3,73 <sup>a</sup> ± 0,47
M2	2,73	2,23	2,37	2,03	2,34 <sup>bc</sup> ± 0,86
M3	1,91	1,78	1,14	2,44	1,82 <sup>c</sup> ± 0,54
T1	4,29	3,79	3,84	3,31	3,81 <sup>a</sup> ± 0,41
T2	2,96	2,05	2,10	0,50	1,90 <sup>bc</sup> ± 0,73
T3	4,80	4,10	4,20	3,92	4,10 <sup>a</sup> ± 0,36

Superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ( $p < 0,01$ ).

K0 = Kontrol tanpa granul imbuhan pakan

M1 = Granul daun mengkudu 100 mg/kg bb

T1 = Granul tepung cacing tanah 100 mg/kg bb

K1 = Granul daun kenikir 100 mg/kg bb

M2 = Granul daun mengkudu 200 mg/kg bb

T2 = Granul tepung cacing tanah 200 mg/kg bb

K2 = Granul daun kenikir 200 mg/kg bb

M3 = Granul daun mengkudu 300 mg/kg bb

T3 = Granul tepung cacing tanah 300 mg/kg bb

K3 = Granul daun kenikir 300 mg/kg bb



mempercepat aktifitas penyembuhan luka (Nayak et al 2009), hal inilah yang menyebabkan kesembuhan sekum yang rusak akibat pecahnya skizon pada perlakuan M2 dan M3 menjadi lebih cepat yang dapat dilihat dari pengamatan secara makroskopis (skor lesi).

Mekanisme penghambatan parasit penyebab koksidia *E. tenella* oleh ekstrak mengkudu lainnya berasal dari kandungan antioksidan yang merupakan jenis obat antikoksidia yang terus dikembangkan. Antioksidan diketahui dapat menyebabkan peningkatan stres oksidatif atau mengganggu mekanisme parasit untuk melindungi diri dari oksidan sehingga dapat menurunkan viabilitas parasit. Antioksidan turunan artemisinin telah digunakan untuk parasit *Plasmodium* penyebab malaria melalui mekanisme peningkatan stres oksidatif (Coombs and Müller, 2002). Ekstrak air daun mengkudu (*M. citrifolia*) diketahui mengandung beberapa senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan pada konsentrasi ekstrak 150-300 mg/kg bb mencit (Chinta et al., 2010).

Perlakuan dengan granul ekstrak kenikir yang juga mengandung saponin kemungkinan kurang mampu dalam mencegah koksidiosis, hal ini perlu dilakukan penelitian lebih lanjut salah satunya melalui penambahan dosis dan memperpanjang waktu pemberian ekstrak kenikir. Perlakuan granul ekstrak tepung cacing tanah juga tidak dapat digunakan sebagai koksidiostat diduga senyawa aktif didalamnya hanya bekerja sebagai antimikroba baik bakteri maupun jamur tapi tidak efektif pada parasit seperti protozoa koksidia.

### KESIMPULAN

Granul larut air ekstrak daun mengkudu (*M. citrifolia*) dapat dijadikan alternatif koksidiostat alami untuk mengatasi infeksi *E. tenella* pada ayam broiler berdasarkan parameter derajat perlukaan (skor lesi), pengamatan mikroskopis (histopatologi) dan menghitung jumlah ookista per gram ekskreta. Dosis yang paling efektif sebagai koksidiostat adalah 200 mg/kg bb yang dapat mencegah kerusakan sekum (skor lesi) dan perkembangan fase gametogoni (makrogamet dan mikrogamet).

### SARAN

Perlu dilakukan pengujian lebih lanjut terhadap efektifitas pemberian mengkudu 200 mg/kg bb secara periodik (tidak terus menerus) selama masa pemeliharaan dan waktu pengamatan eliminasi ookista yang lebih lama serta membandingkan dengan koksidiostat sintetis yang ditambahkan dalam pakan komersial.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh DIPA UPT BPPTK LIPI melalui program penelitian Tematik 2011. Ucapan terimakasih diberikan penulis kepada Madina Nurohmah, S.Pt dan Nana Hidayat atas bantuan teknis yang diberikan.

### DAFTAR PUSTAKA

- Adnyana I-K, Yulinah E, Soemardji AA, Kumolosari E, Iwo MI, Sigit JI, Suwendra. 2004. Uji aktivitas antidiabetes ekstrak etanol buah mengkudu (*Morinda citrifolia L.*). Acta Pharm. Indonesia. 29:2004-2043.
- Allen PC. 2007. Anticoccidial effects of *xanthohumol*. Avian Dis. 5:21-26.
- Arab HA, Rahbari S, Rassouli A, Moslemi MH, Khosravirad F. 2006. Determination of *artemisinin* in *Artemisia sieberi* and anticoccidial effects of the plant extract in broiler chickens. Trop. Anim. Health. Prod. 38:497-503.
- Awais MM, Akhtar M, Muhammad F, Ul Haq A, Anwar MI. 2011. Immunotherapeutic effects of some sugar cane (*Saccharum officinarum L.*) extracts against coccidiosis in industrial broiler chickens. Exp Parasitol. 128:104-110.
- Chinta GC, Mullinti V, Prashanthi K, Sujata D, Pushpa KB, Ranganayakulu D. 2010. Anti-oxidant activity of the aqueous extract of the *Morinda citrifolia* leaves in triton WR-1339 induced hyperlipidemic rats. Drug Invent. Tod. 2:1-4
- Cho JH, Park CB, Yoon YG, Kim SC. 1998. *Lumbricin I*, a novel proline-rich antimicrobial peptide from the earthworm : purification, cDNA cloning and molecular characterization. Biochim. Biophys. Acta. 1408:67-76.
- Coombs GH, Müller S. 2002. Invited Review. Recent advances in the search for new anti-coccidial drugs. Int. J. for Parasitol. 32:497-508.
- Damayanti E, Sofyan A, Julendra H. 2008. Daya antimikroba tepung cacing tanah *Lumbricus rubellus* dan potensinya sebagai aditif dalam pakan ternak. J Biosfera 25:123-128.
- Damayanti E, Sofyan A, Julendra H, Untari T. 2009. Pemanfaatan tepung cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) sebagai agensia anti pullorum dalam imbuhan pakan ayam broiler. JITV 14:83-89.
- Dep Kes RI. 2000. Acuan Sediaan Herbal. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Dkhil MA, Abdel-Bakia AS, Wunderlich F, Sies H, Al-Quraishy S. 2011. Anticoccidial and antiinflammatory activity of garlic in murine *Eimeria papillata* infections. Vet Parasitol. 175:66-72.
- Edwards CA. 1985. Production of feed protein from animal waste by earthworms. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 310:299-307.

- El-Sadawy HA, El-Khateb RM, Kutkat MA. 2009. A Preliminary *in vitro* trial on the efficacy of products of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus spp.* on *Eimeria* oocyst. *Global Veterinaria* 3:489-494.
- FDA. 2005. Guidance for industry estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) p. 1-27.
- Francis G, Kerem Z, Makkar HPS, Becker K. 2002. The biological action of saponins in animal systems: A review. *Bt. J. Nutr.* 88:587-605.
- Gautam R, Saklani A, Jachak SM. 2007. Indian medicinal plants as a source of antimycobacterial agents. *J. Ethnopharmacol.* 110:200-234.
- Georgi JR. 1980. Parasitology for veterinarians. 3rd ed. Philadelphia PA: W.B. Saunders Company. p. 67.
- Gilani AH, Mandukhail SR, Iqbal J, Yasinzai M, Aziz N, Khan A, Rehman N. 2010. Antispasmodic and vasodilator activities of *Morinda citrifolia* root extract are mediated through blockade of voltage dependent calcium channels. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 10:1-9.
- Gomez KA, Gomez AA. 2007. Prosedur Statistik untuk Penelitian Pertanian. Edisi Kedua. Sjamsuddin E, Baharsjah JS, Penterjemah. Jakarta: UI-Pres.
- Gunsel WC, Kanig JL. 1976. Tablets. In: Lieberman HA, Lachman L, Kanig JL. The Theory and Practice of Industrial Pharmacy. Second Edition. Lea and Febiger. Philadelphia.
- Hancock REW, Rozek A. 2002. Mini review role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiol. Letters.* 206:143-149.
- Hassan SM, El-Gayar AK, Cadwell DJ, Bailey CA, Cartwright AL. 2008. Guar meal ameliorates *Eimeria tenella* infection in broiler chicks. *Vet Parasitol* 157:133-138.
- Herdian H, Istiqomah L, Febrisiantosa A, Setiabudi D. 2011. Pengaruh penambahan daun *Morinda citrifolia* sebagai sumber saponin terhadap karakteristik fermentasi, defaunasi protozoa, produksi gas, dan metana cairan rumen secara *in vitro*. *JITV* 16:99-104.
- Jainkittivong A, Butsarakamruha T, Langlais RP. 2009. Antifungal activity of *Morinda citrifolia* fruit extract against *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 108:394-398.
- Julendra H, Sofyan A. 2007. Uji *in vitro* penghambatan aktivitas *Escherichia coli* dengan tepung cacing tanah (*Lumbricus rubellus*). *Media Petern.* 30:41-47.
- Klita PT, Mathison GW, Fenton TW, Hardin RT. 1996. Effects of alfalfa root saponins on digestive function in sheep. *J Anim Sci.* 74:1144-1156.
- Levine ND. 1995. Protozologi Veteriner. Edisi Pertama. Soekardono S, Brotowidjojo MD, Penterjemah. Yogyakarta (Indones): Gadjah Mada University Press. hlm. 186-191.
- Liliwirianis N, Musa NLW, Zain WZWM, Kassim J, Karim SA. 2011. Preliminary studies on phytochemical screening of ulam and fruit from Malaysia. *E-Journal of Chemistry.* 8(S1):S285-S288.
- Mai K, Sharman P.A, Walker RA, Katrib M, Souza DD, McConville MJ, Wallach MG, Belli SI, Ferguson DJP, Smith NC. 2009. Oocyst wall formation and composition in coccidian parasites. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104:281-289.
- Mesia GK, Tona GL, Nangka TH, Cimanga RK, Apers S, Cos P, Maes L, Pieters L, Vlietinck AJ. 2008. Antiprotozoal and cytotoxic screening of 45 plant extracts from Democratic Republic of Congo. *J Ethnopharmacol.* 115:409-415.
- Michels MG, Bertolini LCT, Esteves AF, Moreira P, Franca SC. 2011. Anticoccidial effects of coumestans from *Eclipta alba* for sustainable control of *Eimeria tenella* parasitosis in poultry production. *Vet. Parasitol.* 177:55-60.
- Molan AL, Liu Z, De S. 2009. Effect of pine bark (*Pinus radiata*) extracts on sporulation of coccidian oocyst. *Folia Parasitol.* 56:1-5.
- Nayak BS, Sandiford S, Maxwell A. 2009. Evaluation of wound healing activity of ethanolic extract of *Morinda citrifolia* L. Leaf. *Evid Based Alternat Med.* 6:351-356.
- Nweze NE, Obiwulu IS. 2009. Anticoccidial effects of *Ageratum conyzoides*. *J Ethnopharmacol.* 122:6-9.
- Orengo J, Buendia AJ, Ruiz-Ibanez MR, Madrid J, Del Rio L, Catala-Gregori P, Garcia V, Hernandez F. 2012. Evaluating the efficacy of cinnamaldehyde and *Echinacea purpurea* plant extract in broilers against *Eimeria acervulina*. *Vet. Parasitol.* 185:158-163.
- Patra AK, Kamra DN, Agarwal N. 2006. Effect of plant extracts on *in vitro* methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. *Anim Feed Sci Technol.* 128:276-291.
- Patra G, Rajkhowa TK, Sailo L, Singh WR, Das G, Chanu KV, Ali MA. 2009. A study on biochemical composition of the inner wall of the oocyst of *Eimeria necatrix*. *Intl. J Poultry Sci.* 8:1214-1217.
- Priyowidodo D. 2005. Efektifitas pemberian vaksin koksidia melalui air minum dan pakan terhadap infeksi tantangan *Eimeria tenella*. *J Sain Veteriner.* 23:1-7.
- Rasdi NHM, Samah OA, Sule A, Ahmed QU. 2010. Antimicrobial studies of *Cosmos caudatus kunth.* (compositae). *J Med Plants Res.* 4:669-673.
- Reda EK, Dauschies A. 2010. *In vivo* evaluation of anticoccidial effect of antibody fragments expressed in pea (*Pisum sativum*) on *Eimeria tenella* sporozoites. *Parasitol Res.* 107:983-986.

- Reid WM, Long PL, McDougald LR. 1984. Protozoa in Disease of Poultry. 8<sup>th</sup> ed. Edited by Calnex BW, Barner HJ, Reid MW, Yorder HW. Iowa State University Press. Iowa-USA. p. 691-709.
- Saad MZ, Aini I, Babjee SMA, Arshad SS, Azhar I, Choo PY, Chulan U, Ganapathy K, Haas MY, Bejo MH, Jasni S, Kono Y, Mahani AH, Noordin MM, Omar AR, Saleha AA, Sani RA, Sharifah SH, Sohayati AR, Zulkifli I. 2006. Disease of Poultry in Southeast Asia. Universiti Putra Malaysia Press. Selangor Darul Ehsan. Malaysia. pp. 31-36.
- Sinha RK, Chauhan K, Valani D, Chandran V, Soni BK, Patel V. 2010. Earthworms: charles darwin's 'unheralded soldiers of mankind': protective and productive for man and environment. J Environment Protect 1:251-260.
- Soulsby E.J.L. 1982. Helminth, arthropods and protozoa of domesticated Animals. 7<sup>th</sup> ed. London: Bailliere Tindal. p. 594-645.
- Tabbu CR. 2002. Penyakit Ayam dan Penanggulanganya. Vol 2. Yogyakarta (Indones): Penerbit Kanisius. hlm. 3-9.
- Tasiemski A, Schikorski D, Le Marrec-Croq F, Camp CP-V, Boidin-Wichlacz C, Sautiere PE. 2006. Hestidin: A novel antimicrobial peptide containing bromotryptophan constitutively expressed in the NK cells-like of the marine annelid, *Nereis diversicolor*. Dev. Comp. Immunol. 31:749-762.
- Youn HJ, Wuk Noh J. 2001. Screening of the anticoccidial effects of herb extracts against *Eimeria tenella*. Vet. Parasitol. 96:257-263.