

**Pengaruh Pemberian Sinbiotik *Lactobacillus acidhopilus*
dan *Spirulina platensis* Terhadap Jumlah Relatif IFN- γ
dan Histopatologi Jejunum Tikus Putih
yang Diinfeksi *Salmonella Sp***

SKRIPSI

Oleh :
SAFIRA ZULFAYA
155130100111004



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

**Pengaruh Pemberian Sinbiotik *Lactobacillus acidhopilus* dan
Spirulina platensis Terhadap Jumlah Relatif IFN- γ dan
Histopatologi Jejunum Tikus Putih
yang Diinfeksi *Salmonella Sp***

SKRIPSI

Oleh :

**Safira Zulfaya
155130100111004**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Pengaruh Pemberian Sinbiotik *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* Terhadap Jumlah Relatif IFN- γ dan Histopatologi Jejunum Tikus Putih yang Diinfeksi *Salmonella sp*

Oleh:

**SAFIRA ZULFAYA
155130100111004**

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof.Dr.Ir. Chanif Mahdi, MS
NIP. 195204121980021001

drh. Dahliatul Qosimah, M.Kes.
NIP. 198201272015042001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Dr. Ir Sudarminto Setyo Yuwono, M. App.Sc

NIP. 19631216 198803 1 002

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Safira Zulfaya

NIM : 155130100111004

Program Studi : Pendidikan Kedokteran Hewan

Penulis Skripsi Berjudul : **“Pengaruh Pemberian Sinbiotik *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* Terhadap Jumlah Relatif IFN- γ dan Histopatologi Jejunum Tikus Putih yang Diinfeksi *Salmonella sp*”**

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 10 April 2019

Yang Menyatakan,

(Safira Zulfaya)

NIM. 155130100111004

Pengaruh Pemberian Sinbiotik *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* Terhadap Jumlah Relatif IFN- γ dan Histopatologi Jejunum Tikus Putih yang Diinfeksi *Salmonella sp*

ABSTRAK

Salmonellosis adalah penyakit *zoonosis* yang disebabkan oleh bakteri *Salmonella sp* yang menyebabkan kerugian pada ekonomi yang tinggi, sosial, dan kesehatan masyarakat seperti penurunan produktivitas ayam, kematian, dan penyakit pada manusia. Para peternak mengandalkan penggunaan antibiotik untuk menangani kerugian tersebut, namun residu antibiotik yang ditinggalkan dalam daging ternak dapat menimbulkan bahaya terhadap kesehatan. Oleh karena itu, diciptakan sinbiotik sebagai pengganti antibiotik yang lebih aman. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian sinbiotik *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* terhadap kadar relatif IFN- γ dan histopatologi jejunum pada tikus putih yang diinfeksi *Salmonella sp*. Penelitian ini menggunakan 20 ekor tikus putih jantan dengan berat 100 gram berumur 4-6 minggu. Tikus dibagi dalam 5 perlakuan dengan 4 kali ulangan pada masing-masing perlakuan. Kontrol (-) merupakan tikus tanpa perlakuan. Kontrol (+) yaitu tikus yang diinfeksi 0,5 ml *Salmonella sp* konsentrasi 1.5×10^8 CFU/ml. Perlakuan 1, 2, dan 3 yaitu tikus yang diberi sinbiotik bertingkat sebanyak 0.2%/10 gr pakan, 0.4%/10 gr pakan, dan 0.6%/10 gr pakan lalu diinfeksi 0.5 ml *Salmonella sp* konsentrasi 1.5×10^8 CFU/ml. Jumlah relatif IFN- γ diuji menggunakan *flowcytometry* lalu dianalisa menggunakan *one way anova* menggunakan *software SPSS*. Pewarnaan HE digunakan untuk pemeriksaan histopatologi jejunum lalu data dianalisa secara deskriptif berupa erosi epitel vili jejunum dan hiperplasia sel goblet. Sinbiotik tidak berpengaruh nyata dalam menurunkan kadar IFN- γ di setiap perlakuan ($P > 0.05$) namun menunjukkan minimalnya kerusakan struktur vili jejunum. Oleh karena itu, simbiotik bisa dijadikan alternatif untuk mencegah *salmonellosis*.

Kata Kunci : *Zoonosis*, sinbiotik, sitokin pro inflamasi, bakteri asam laktat

The Effect of Sinbiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Spirulina platensis* on IFN- γ Relative Levels and Jejunal Histopathology of White Mice Infected by *Salmonella sp*

ABSTRACT

Salmonellosis is a zoonotic disease caused by the bacterium *Salmonella sp* that causes losses to high economic, social, and public health such as a decrease in chicken productivity, mortality, and disease in humans. Farmers were use of antibiotics to deal with these losses, but antibiotic residues left in livestock meat can pose a health hazard. Therefore, synbiotics were created as a substitute for safer antibiotics. This study aims to determine the effect of synbiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Spirulina platensis* on the relative levels of IFN- γ and jejunal histopathology in white rats infected by *Salmonella sp*. This study used 20 male white rats weighing 100 grams aged 4-6 weeks. Rats were divided into 5 treatments with 4 replications in each treatment. Control (-) is an untreated mouse. Controls (+) are mice infected 0.5 ml of *Salmonella sp* concentration of 1.5×10^8 CFU / ml. Treatment 1, 2, and 3 are rats given synbiotics with levels as much as 0.2% / 10 gr of feed, 0.4% / 10 gr of feed, and 0.6% / 10 gr of feed then infected 0.5 ml of *Salmonella sp* concentration 1.5×10^8 CFU / ml. Relative levels of IFN- γ were tested using flowcytometry then analyzed using one way ANOVA using SPSS software. HE staining was used for jejunal histopathology examination and the data were analyzed descriptively in the form of jejunal villous epithelial erosion and goblet cell hyperplasia. Sinbiotics did not significantly affect IFN- γ levels in each treatment ($P > 0.05$) but showed a minimum damage to jejunal villous structures. Therefore, symbiotics can be used as an alternative to prevent *salmonellosis*.

Keyword : Zoonoses, sinbiotics, pro-inflammatory cytokines, lactic acid bacteria

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT Pencipta semesta alam dan segala isi di dalamnya, Maha Kuasa Allah dalam menentukan apapun sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi dengan judul “Pengaruh Pemberian Sinbiotik *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* Terhadap Kadar Relatif IFN- γ dan Histopatologi Jejunum Tikus Putih yang Diinfeksi *Salmonella sp*”. Shalawat serta salam semoga tetap tercurah limpahkan kepada baginda Rasulullah Muhammad SAW, iman dan teladan terbaik bagi kehidupan ini.

Dalam penyusunan skripsi ini tidak lepas akan adanya bantuan serta dukungan moril dari berbagai pihak. Pada kesempatan ini penulis berterima kasih kepada yang terhormat:

1. Dr. Ir Sudarminto Setyo Yuwono, M. App. Sc selaku dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
2. Drh. Rahadi Swastomo, M. Biomed selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan dan nasehat.
3. Prof.Dr.Ir. Chanif Mahdi, MS selaku Dosen Pembimbing I yang telah memberikan bimbingan serta arahnya dalam penyusunan proposal skripsi.
4. drh. Dahliatul Qosimah, M.Kes. selaku Dosen Pembimbing II yang telah memberikan bimbingan serta arahan dalam penyusunan proposal skripsi.
5. drh. Ani Setianingrum, M.Sc selaku Dosen Penguji I yang telah memberikan kritik dan saran serta arahan dalam penyusunan proposal skripsi.
6. drh. Desi Wulansari, M.Vet selaku Dosen Penguji II yang telah memberikan kritik dan saran serta arahan dalam penyusunan proposal skripsi.

7. Kedua orang tua penulis, Ayahanda Siswari dan Ibunda Siti Khotijah, yang telah memberikan doa, kasih sayang, dukungan, pengorbanan baik secara moril maupun materil kepada penulis, semoga Allah SWT membalas dengan sebaik-baik balasan.
8. Teman seperjuangan, Eka Wulandari, Bestari Ebhi, dan Rifan Prabawan selaku partner diskusi dan juga teman seperjuangan selama menjalankan penelitian skripsi Indri Widyastutik, Sucheska Mondayana, dan Sari Murni Indah Agustini yang telah memberi masukan dan semangat serta membantu dalam penyusunan proposal skripsi.
9. Segenap Keluarga Kelas 2015-B Veteriner yang menjadi pendorong untuk meraih kesuksesan bersama.

Penulis menyadari bahwa masih terdapat kekurangan dalam penulisan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis sangat menerima kritik atau saran yang membangun. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat karena pengalaman adalah guru terbaik.

Malang, 10 April 2019

Penulis

DAFTAR ISI

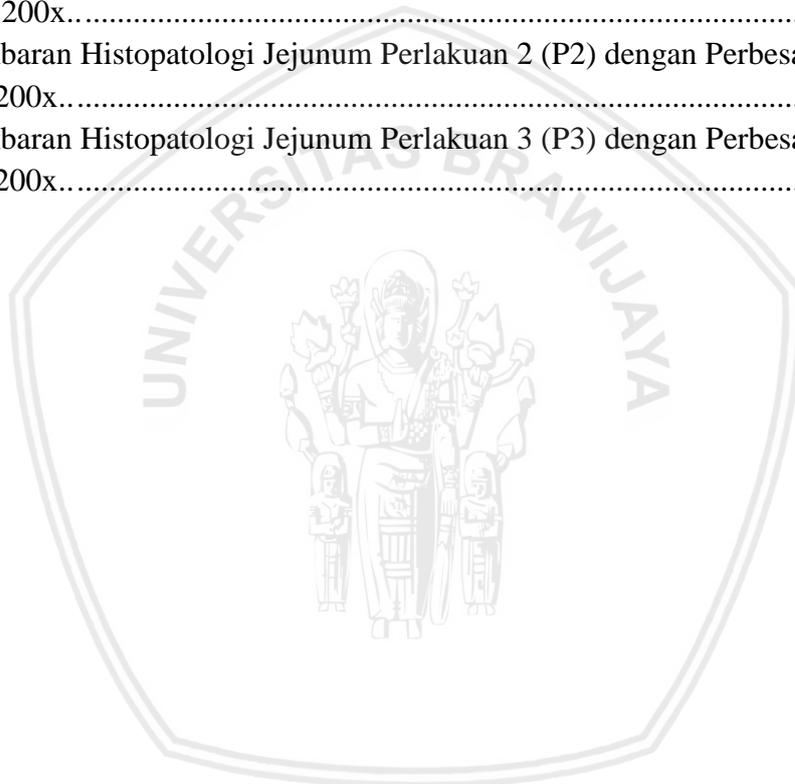
	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRACT	iv
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xiii
BAB 1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	4
1.4 Tujuan	4
1.5 Manfaat	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>)	6
2.2 <i>Salmonellosis</i>	7
2.2.1 <i>Salmonella sp</i>	7
2.2.2 Gejala Klinis	7
2.2.3 Antigen <i>Salmonella sp</i>	9
2.2.4 Patogenesis	9
2.2.5 Rute Penularan	10
2.2.6 Patologi Anatomi	11
2.3 Sinbiotik	12
2.3.1 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	13
2.4.2 <i>Spirulina platensis</i>	14
2.4 Jejunum Tikus	15
2.5 Sistem Imun	17
2.6 IFN- γ	19
BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
3.1 Kerangka Teori	21
3.2 Kerangka Konsep	24
3.3 Hipotesis Penelitian	25
BAB 4. METODE PENELITIAN	
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	26
4.2 Rancangan Penelitian	26
4.3 Variabel Penelitian	28



4.4 Alat dan Bahan	28
4.5 Tahapan Penelitian.....	29
4.5.1 Persiapan Hewan Coba.....	30
4.5.2 Persiapan Mikroenkapsulasi Sinbiotik	30
4.5.3 Persiapan Bakteri <i>Salmonella sp</i>	31
4.5.4 Perlakuan Pada Tikus	31
4.5.5 Preparasi Organ Limpa dan Jejunum.....	32
4.5.6 Pengukuran Kadar Relatif IFN- γ Limpa (<i>Flowcytometry</i>).....	33
4.5.7 Pembuatan Preparat Histopatologi	34
4.6 Analisis Data	35
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN	
5.1 Jumlah Relatif IFN- γ Tikus Putih yang Diberi Sibiobiotik Kombinasi <i>Lactobacillus acidophilus</i> dan <i>Spirulina platensis</i> dan Diinfeksi Bakteri <i>Salmonell sp</i>	36
5.2 Gambaran Histopatologi Jejunum Tikus Putih yang Diberi Sinbiotik Kombinasi <i>Lactobacillus acidophilus</i> dan <i>Spirulina platensis</i> yang Diinfeksi <i>Salmonella sp</i>	42
BAB 6. PENUTUP	
6.1 Kesimpulan.....	51
6.2 Saran	51
DAFTAR PUSTAKA.....	52

DAFTAR GAMBAR

2.1 Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>).....	7
2.2 Histologi Vili Jejunum Tikus.....	16
2.3 Histologi jejunum.....	17
5.1 Grafik Rata-Rata Jumlah Relatif IFN- γ Limpa.....	37
5.2 Gambaran Histopatologi Jejunum Kontrol Negatif dengan Perbesaran 40x dan 200x.....	43
5.3 Gambaran Histopatologi Jejunum Kontrol Positif dengan Perbesaran 40x dan 200x.....	44
5.4 Gambaran Histopatologi Jejunum Perlakuan 1 (P1) dengan Perbesaran 40x dan 200x.....	45
5.5 Gambaran Histopatologi Jejunum Perlakuan 2 (P2) dengan Perbesaran 40x dan 200x.....	46
5.6 Gambaran Histopatologi Jejunum Perlakuan 3 (P3) dengan Perbesaran 40x dan 200x.....	47



DAFTAR TABEL

4.1 Tabel Perlakuan.....	27
4.2 Rancangan Penelitian	27
4.3 ANOVA	28
5.1 Tabel Rata-Rata Jumlah Relatif IFN- γ Limpa (%)	36
5.2 Tabel ANOVA Jumlah Relatif IFN- γ Limpa.....	36



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Keterangan Laik Etik58
 Lampiran 2. Surat Keterangan Tikus Sehat59
 Lampiran 3. Hasil Reidentifikasi *Salmonella sp*.....60
 Lampiran 4. Perhitungan Dosis.....61
 Lampiran 5. Pembuatan Mikroenkapsulasi Sinbiotik62
 Lampiran 6. Kerangka Operasional63
 Lampiran 7. Identifikasi Bakteri *Salmonella sp*.....64
 Lampiran 8. Perhitungan Hasil Mikroenkapsulasi Sinbiotik65
 Lampiran 9. Hasil Uji *Flowcytometry*.....66
 Lampiran 10. Analisis Statistik Kadar Relatif IFN- γ Limpa68



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

Nama	Keterangan
SUSENAS	: Survei Sosial Ekonomi Nasional
PHMS	: Penyakit Hewan Menular Strategis
MOS	: <i>Mannan oligosakarida</i>
IFN- γ	: <i>Interferon Gamma</i>
DOC	: Day Old Chick
Sel M	: <i>Mikrofold</i>
<i>L.acidophilus</i>	: <i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>S.enteritidis</i>	: <i>Salmonella enteritidis</i>
RES	: Retikuloendotelial System
MBL	: <i>Mannose Binding Lectin</i>
Sel NK	: Sel <i>Natural Killer</i>
WHO	: World Health Organizaion
Sel Th	: Sel <i>T Helper</i>
Sel Tc	: Sel <i>T Cytotoxic</i>
APC	: <i>Antigen Presenting Cell</i>
LPS	: Lipopolisakarida
MHC	: <i>Major Histocompatibility Complex</i>
RAL	: Rancangan Acak Lengkap
FMIPA	: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
CFU	: Colony Forming Unit
MRSA	: deMann Rogosa Sharpe Agar
MRSB	: deMann Rogosa Sharpe Broth
MHA	: <i>Mueller-Hinton agar</i>
PBS	: Phospat Buffered Saline
ml	: Mililiter
Rpm	: Revolutions Per Minute
gr	: Gram
cm	: Centimeter
SPSS	: Statistical Product and Service Solutions.
C	: Celsius
μm	: Mikrometer
PBMC	: <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
AOAC	: Standar Association of Analytical Communities
NB	: Nutrien Broth
SSA	: <i>Salmonella Shigella Agar</i>
K	: Kontrol
P	: Perlakuan
ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i>



Df	: <i>Degree of Freedom</i> (Derajat Bebas)
SS	: <i>Sum Squares</i> (Jumlah Kuadrat)
MS	: <i>Mean Squares</i> (Kuadrat Tengah)
t	: Perlakuan
n	: Ulangan
O	: antigen somatik
Vi	: antigen kapsul
H	: antigen flagela
HE	: <i>Hematoxiline Eosine</i>
PMN	: Polimorfonukleus
MN	: Monoukneus
IDF	: International Dairy Federation



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Data Survei Sosial Ekonomi Nasional (SUSENAS) tahun 2011- 2014 menunjukkan bahwa perkembangan konsumsi protein hewani khususnya dari daging ayam ras per kapita masyarakat Indonesia cenderung terus meningkat sebesar 2,27% per tahun. Daging ayam merupakan salah satu produk asal ternak yang memiliki angka konsumsi cukup tinggi karena mudah diperoleh, pertumbuhan cepat, dan harganya lebih terjangkau (Saniwati, *et al.*, 2015). Produk ternak yang tidak ditangani dengan baik dapat membahayakan kesehatan. Bahaya atau *hazard* yang berkaitan dengan keamanan pangan asal ternak diantaranya adalah penyakit ternak, penyakit yang ditularkan melalui pangan (*Food Borne Diseases*) khususnya *salmonellosis*, serta cemaran atau kontaminan bahan kimia dan bahan toksik termasuk cemaran antibiotik (Winarno, 2002).

Bakteri *Salmonella sp* dikenal sebagai bakteri patogen penyebab *salmonellosis* yang menyerang saluran pencernaan pada berbagai jenis hewan berdarah panas maupun berdarah dingin. *Salmonellosis* adalah salah satu penyakit *zoonosis* yang disebut *foodborne diarrheal disease* dan terdapat di seluruh dunia (Poeloengan, dkk., 2004). Kontaminasi *Salmonella sp* di temukan pada daging ayam dan telur pada tahun 1991 di Belanda. Demikian pula pada tahun 1994, dari 87% ternak kalkun di Kanada, ditemukan banyak yang positif tercemar *Salmonella sp* (Myint, 2004). Di Indonesia, khususnya di Malang diketahui bahwa 3 dari 36 sampel hasil penelitian sampel karkas ayam segar terdeteksi positif tercemar *Salmonella sp*. (Primajati, 2011). Menurut Dharmojono (2001), anak ayam yang baru menetas dapat tertular induknya dan terjadi dalam minggu

ke 2-3 dengan angka kematian yang tinggi yaitu sampai 85%. Pada ayam dewasa angka kematian kurang dari 10%.

Salmonellosis sendiri merupakan Penyakit Hewan Menular Strategis (PHMS) Nomor 5 di Indonesia karena menyebabkan kerugian pada ekonomi yang tinggi, keadaan sosial, dan kesehatan masyarakat (Wiryawan, *et al.*, 2005). *Salmonellosis* menimbulkan berbagai dampak seperti penurunan produktivitas ayam, biaya pencegahan, kematian, serta menimbulkan penyakit pada manusia. Untuk menghilangkan ancaman penyakit dan memacu pertumbuhan unggas, banyak peternak bergantung pada penggunaan antibiotik (Bray, 2008).

Penggunaan antibiotik sebagai pemacu pertumbuhan dan pengobatan penyakit ternak diketahui memiliki beberapa efek negatif terhadap kesehatan hewan dan hasil produksinya seperti, residu pada jaringan, waktu eliminasi yang lama, perkembangan resistensi mikroorganisme, alergi, toksisitas, serta mempengaruhi flora usus dan respon imun (Soeharsono, 2010).

Adanya kesadaran masyarakat akan bahaya antibiotik, pelarangan penggunaan antibiotik khususnya di Uni Eropa, Amerika, dan beberapa negara lain, serta meningkatnya perhatian masyarakat terhadap daging unggas organik tanpa *antibiotik*, mendorong adanya penelitian untuk mencari alternatif pengganti antibiotik dalam industri perunggasan (Bray, 2008). Salah satunya yaitu sinbiotik yaitu kombinasi probiotik dan prebiotik dimana merupakan substrat yang dapat mengubah mikroekologi usus sehingga mikroba yang menguntungkan dapat berkembang secara baik.

Probiotik merupakan mikrobia menguntungkan yang dapat hidup di dalam usus dan saling menguntungkan untuk inangnya (Kompiang, 2009). Pada

penelitian ini digunakan *Lactobacillus acidophilus* yang merupakan bakteri asam laktat yang paling banyak terdapat di usus halus ayam dimana memiliki aktivitas antibakteri yaitu memproduksi asam laktat, bakteriosin dan kompetisi adhesi serta nutrisi (Prescott dan Harley, 2002). Prebiotik merupakan sumber nutrisi bagi mikroba untuk meningkatkan keseimbangan mikroba dalam saluran pencernaan (Haryati, 2011). Pada penelitian ini digunakan *Mannan oligosakarida* (MOS) dari *Spirulina platensis* sebagai energi untuk bakteri baik (*Lactobacillus acidophilus*) dan dapat membantu mencegah kolonisasi bakteri patogen serta memberi kondisi asam pada saluran cerna (Medzhitov dan Janeway, 2000). Inovasi sinbiotik dari *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* yang diharapkan mampu meningkatkan dan memperbaiki performa ayam broiler belum pernah dilakukan. Oleh karena itu, penulis tertarik untuk melakukan penelitian pemberian sinbiotik tersebut untuk pencegahan *salmonellosis* pada ayam broiler dengan tikus putih sebagai hewan uji untuk meningkatkan kesejahteraan peternak di Indonesia.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan beberapa masalah sebagai berikut:

1. Apakah pemberian sinbiotik *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* dapat mencegah kerusakan jejunum tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinfeksi *Salmonella sp*?
2. Apakah pemberian sinbiotik *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* dapat menurunkan jumlah relatif IFN- γ tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinfeksi *Salmonella sp*?

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dari penelitian ini yaitu:

1. Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) sehat berjenis kelamin jantan dengan berat 100 gram berusia 4-6 minggu. Hewan coba diperoleh dari Laboratorium Fisiologi UIN Malang dengan surat keterangan sehat (Lampiran 1). Penggunaan hewan coba penelitian ini sudah mendapat persetujuan laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya No.944-KEP-UB (Lampiran 2).
2. Pembuatan tikus kondisi *salmonellosis* dilakukan dengan menginfeksi tikus menggunakan *Salmonella sp* konsentrasi 1.5×10^8 CFU/ml sebanyak 0.5 ml .
3. Suspensi bakteri *Lactobacillus acidophilus* konsentrasi 1.5×10^8 CFU/ml yang digunakan berasal dari Laboratorium Pangan dan Gizi UGM.
4. Mannan Oligosakarida (MOS) yang digunakan yaitu berasal dari alga *Spirulina platensis* 100% yang didapatkan dari toko HPAI Malang.
5. Variabel terkontrol yang diamati pada penelitian ini adalah histopatologi jejunum dan jumlah relatif IFN- γ tikus (*Rattus norvegicus*).

1.4 Tujuan Penelitian

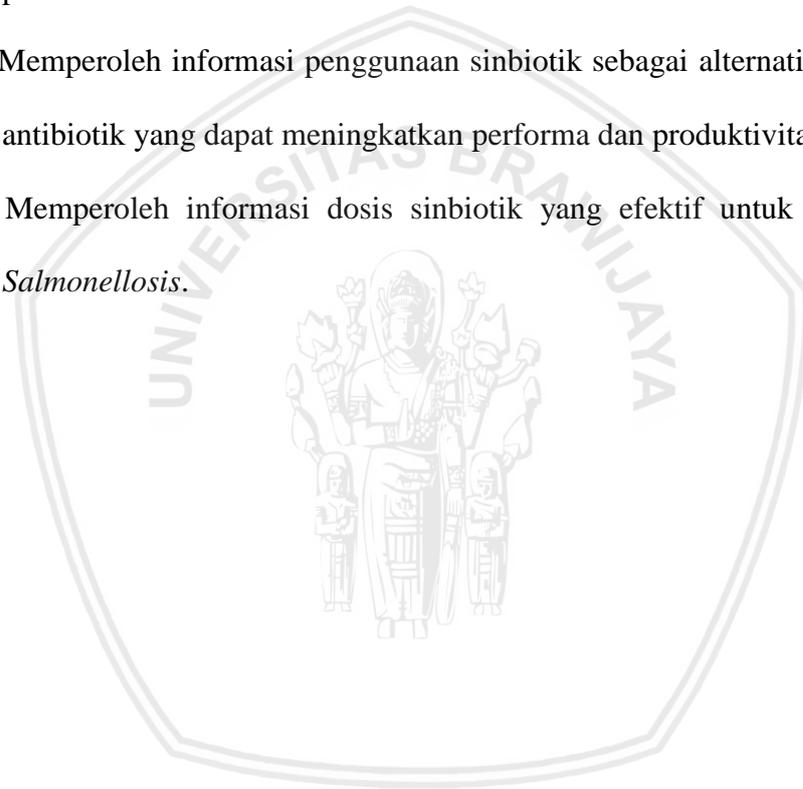
Berdasarkan rumusan masalah yang telah diuraikan, maka tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui perubahan histopatologi jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) model *Salmonellosis* yang diberikan sinbiotik *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis*.

2. Mengetahui perubahan jumlah relatif IFN- γ tikus (*Rattus norvegicus*) model *Salmonellosis* yang diberikan sinbiotik *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis*.

1.5 Manfaat Penelitian

1. Memperoleh informasi mengenai penanganan *Salmonellosis* pada penderita.
2. Memperoleh informasi penggunaan sinbiotik sebagai alternatif pengganti antibiotik yang dapat meningkatkan performa dan produktivitas hewan.
3. Memperoleh informasi dosis sinbiotik yang efektif untuk menangani *Salmonellosis*.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tikus (*Rattus norvegicus*)

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) adalah salah satu hewan yang umum digunakan dalam eksperimental laboratorium. Taksonomi tikus putih (*Rattus norvegicus*) adalah sebagai berikut (Sharp and Villano, 2013) :

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Subordo	: Myomorpha
Famili	: Muridae
Genus	: Rattus
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>

Tikus putih memiliki keuntungan sebagai hewan model yang mencerminkan karakter fungsional dari sistem tubuh mamalia termasuk manusia. Tikus putih memiliki beberapa sifat yang menguntungkan sebagai hewan uji penelitian di antaranya perkembangbiakan cepat, siklus hidup yang relatif pendek, jumlah anak per kelahiran banyak, variasi sifat-sifatnya tinggi, mudah dalam penanganan, temperamen baik, kemampuan laktasi tinggi, dan cukup tahan terhadap perlakuan. Biasanya pada umur empat minggu tikus putih mencapai berat 35-40 gram, dan berat dewasa rata-rata 200-250 gram (Akbar, 2010). **Gambar 2.1** di bawah ini merupakan gambaran morfologi tikus putih (*Rattus norvegicus*).



Gambar 2.1 Tikus putih (*Rattus norvegicus*) (Janvier, 2013).

2.2 *Salmonellosis*

2.2.1 *Salmonella sp*

Salmonellosis merupakan penyakit saluran pencernaan yang disebabkan oleh bakteri *Salmonella sp*. Jenis spesies *Salmonella enterica* merupakan tipe *Salmonella* yang sering dilaporkan sebagai penyebab penyakit *Salmonellosis*. *Salmonella* merupakan bakteri dari famili *Enterobacteriaceae*, gram negatif, berbentuk batang dan tidak berspora, motil dengan flagella peritrikus, bersifat fakultatif anaerobik, dan intraselluler fakultatif yang dapat hidup bahkan berkembang biak dalam makrofag (Kresno, 2001). *Salmonella sp* dapat tumbuh pada suhu dengan kisaran 5–45 °C dengan suhu optimum 35–37 °C dan akan mati pada pH di bawah 4,1. Panjang rata-rata *Salmonella* 2-5 µm dengan lebar 0.8 – 1.5 µm (Serbeniuk, 2002). Habitat utama *Salmonella sp* berada dalam saluran pencernaan sapi, domba, kambing, babi, anjing, kucing, kelinci, tikus, manusia (Dharmojono, 2001)

2.2.2 Gejala Klinis

Ayam semua umur dapat terserang *Salmonellosis* namun yang paling rentan adalah DOC. Anak ayam umur 1 hari lebih rentan terhadap infeksi *Salmonella* dibandingkan anak ayam umur >2 minggu. Infeksi *Salmonella*

biasanya ditemukan pada anak ayam berusia <2 minggu dan jarang pada usia 4 minggu. Infeksi akut dapat ditemukan pada ayam berumur 7-21 hari, dengan puncak kematian sekitar umur 7-14 hari. Masa inkubasi sekitar 4-5 hari dan biasanya gejala penyakit ini berlangsung selama 3-5 minggu. (Alisantosa, *et al.*, 2000).

Infeksi *Salmonella* pada ternak atau pada ayam umur lebih dari 2 minggu biasanya tidak menimbulkan gejala klinis dan tidak mematikan, tetapi ayam yang sembuh dari infeksi dapat menjadi *carrier* menahun yang sewaktu-waktu dapat mengekskresikan bakteri *Salmonella sp* pada fesesnya. Gejala klinis khusus pada penderita *salmonellosis* antara lain (Dharmojono, 2001) :

1. Gastroenteritis

Gastroenteritis yang disebabkan oleh *Salmonella sp* merupakan infeksi pada usus dan terjadi lebih dari 18 jam setelah bakteri patogen itu masuk ke dalam *host*. Ciri-cirinya adalah demam, sakit kepala, muntah, diare, sakit pada abdomen (*abdominal pain*) yang terjadi selama 2 - 5 hari.

2. Septisemia

Septisemia oleh *Salmonella sp* menunjukkan ciri-ciri demam, *anoreksia* dan *anemia*. Infeksi ini terjadi dalam jangka waktu yang panjang. Lesi-lesi dapat menyebabkan *osteomyelitis*, *pneumonia*, abses pulmonari, *meningitis* dan *endokarditis*.

3. Demam-demam enterik

Demam *enterik* yang paling serius adalah demam tifoid. Ciri-cirinya antara lain lesu, *anoreksia*, sakit kepala, kemudian diikuti oleh demam.

2.2.3 Antigen *Salmonella sp*

Salmonella terdiri dari tiga jenis antigen utama, yaitu antigen somatik (O), antigen kapsul (Vi) dan antigen flagella (H). Struktur antigen O sangat beragam terdiri dari berbagai jenis lipopolisakarida (LPS). Polisakarida merupakan antigen pada *Salmonella sp* paling luar yang berhubungan atau kontak langsung dengan lingkungan luar dan berinteraksi langsung dengan habitatnya. LPS merupakan komponen antigen imunogenik yang dominan dari kebanyakan dinding sel bakteri Gram-negatif yaitu berupa lipid A–Core-oligosakarida dan O-rantai samping oligosakarida. Aktivitas lipid A endotoksin berperan pada patogenitas atau toksisitas *Salmonella* dimana respon dari endotoksin ini yaitu berupa enteritis dan gangguan gastrointertinal. Antigen Vi (Kapsul) berupa polisakarida pada *Salmonella spp* (Aryanti dan Supar, 2008).

Ada dua strategi bakteri untuk mengadakan perlekatan pada permukaan hospes, yaitu melalui pili atau *fimbrae* dan *afimbrial adhesin* (AFA). Pada *Salmonella sp*, perlekatan pada epitel usus host dilakukan menggunakan *fimbrae* (Antigen H). Ada 5 tipe *fimbrae* utama *Salmonella* yaitu : *thin aggregative fimbriae*, *long polar fimbriae*, *plasmid encoded fimbriae*, *Type I fimbriae*, dan π -*fimbriae*. Tiap tipe *fimbrae* memiliki reseptor host masing-masing (Aryanti dan Supar, 2008).

2.2.4 Patogenesis

Habitat bakteri *Salmonella* adalah di dalam saluran pencernaan. Oleh karena itu cara penularannya adalah melalui oral karena bahan makanan atau minuman yang tercemar oleh hasil ekskresi penderita. Infeksi *Salmonella* terjadi

dalam beberapa tahap yaitu adhesi, perasukan (invasi), kolonisasi, dan eksudasi (pengeluaran cairan). *Salmonella* mempunyai *fimbriae* untuk melekat pada mukosa usus. *Fimbriae Salmonella sp* akan berikatan dengan masing-masing reseptor host. Setelah adhesi, *Salmonella* akan menembus sel-sel epitel (terutama sel-M) dan selanjutnya ke lamina propia. Interaksi antara *Salmonella* dengan sel M atau epitel akan menggerakkan sel pertahanan terutama neutrofil dan makrofag (Desai, 2011).

Salmonella berkembang biak di lamina propia dan difagosit oleh sel-sel fagosit terutama oleh makrofag. *Salmonella* bersifat fakultatif intraselluler yang dapat hidup bahkan berkembang biak di dalam makrofag. Setelah itu, *Salmonella* akan menyebar melalui peredaran darah sehingga terjadi bakteremia pertama yang asimtomatis, lalu masuk ke organ-organ terutama hepar dan sumsum tulang yang dilanjutkan dengan pelepasan *Salmonella* dan endotoksin ke peredaran darah sehingga menyebabkan bakteremia kedua. Efek endotoksin yang pertama yaitu akan meningkatkan permeabilitas sistem vaskular dan nervus yang termanifestasi serta menurunkan tekanan darah, gangguan regulasi termal, muntah, dan diare. Kemudian tahap pengaktifan pengeluaran cairan terjadi akibat aktivitas adenil siklase oleh infeksi *Salmonella* yang dapat menginduksi respon sekretori, sehingga terjadi akumulasi cairan dalam lumen usus (Giannella, 2004).

2.2.5 Rute Penularan

Penularan *Salmonella* biasanya terjadi secara vertikal maupun horizontal. Penularan vertikal terjadi akibat kuning telur atau albumin telur yang tertular *Salmonella* di dalam saluran reproduksi induk yang terinfeksi, sehingga telur ayam yang menetas akan menjadi *carrier Salmonella*. Penularan horizontal

terjadi akibat penetrasi *Salmonella sp* pada kerabang telur. Feses dari ayam yang terinfeksi dapat menempel pada permukaan kerabang telur. Hal ini menyebabkan bakteri akan mengadakan penetrasi ke dalam telur dan mencemari bagian dalam telur (kuning telur dan albumin) melalui pori-pori kerabang telur yang tidak tertutup oleh *cuticle* (kulit ari atau selaput luar kerabang telur) (Gast, 2003).

Pertumbuhan *Salmonella* pada daging ayam diduga juga dapat terjadi pada saat disimpan, saat transportasi, serta pemanasan saat memasak yang kurang sempurna sehingga bakteri tersebut masih dapat hidup (WHO, 2002). Daging ayam yang tercemar *Salmonella sp* selain sebagai penyebab *foodborne disease* karena dikonsumsi, juga berpotensi sebagai sumber kontaminasi silang terhadap makanan lain. Pada umumnya, faktor utama kontaminasi silang terjadi pada saat menyiapkan, mengolah dan memasak makanan di dapur. Kontaminasi *Salmonella sp* pada makanan secara tidak langsung dapat diperantarai oleh vektor mekanik dan biologik seperti rodensia, burung-burung liar, lalat, kecoa, kumbang, kutu, parasit maupun manusia (Schlundt, *et al.*, 2004).

2.2.6 Patologi Anatomi

Pada anak ayam yang mati, bagian mukosa intestinalnya terlihat lesi foki nekrotik, eksudat pengejuan pada sekum, septikemia, *enteritis*. Pada limpa, hati dan ginjal terjadi pembengkakan, kemerahan, terdapat lesi foki nekrotik, kongesti, perikarditis, *hepatitis* dan *perihepatitis fibropurulen*. Perubahan lain yang dapat diamati antara lain *air sacculitis*, *omphalitis*, *arthritis*, dan gangguan penyerapan kuning telur (Gast, 2003).

2.3 Sinbiotik

Sinbiotik merupakan kombinasi antara probiotik dan prebiotik yang dapat mengubah mikroekologi usus sehingga mikroba yang menguntungkan dapat berkembang secara baik (Kompiang, 2009). Sinbiotik merupakan istilah baru dalam dunia peternakan. Sinbiotik mempunyai efek sinergis yang dapat meningkatkan status kesehatan saluran pencernaan, pencernaan bahan pakan, aktifitas antibakterial, kekebalan terhadap infeksi, dan performa ayam broiler (Yang, *et al.*, 2005). Sifatnya yang sinergis, kombinasi probiotik dan prebiotik pada sinbiotik lebih efisien daripada efek masing-masing bahan.

Probiotik merupakan sekumpulan mikrobia yang menguntungkan yang dapat hidup didalam usus dan saling menguntungkan untuk inangnya baik secara langsung maupun tidak langsung dari metabolitnya (Kompiang, 2009). Prinsip kerja probiotik yaitu dengan memanfaatkan kemampuan mikroorganisme tersebut dalam menguraikan rantai panjang karbohidrat, protein dan lemak. Kemampuan ini diperoleh karena adanya enzim-enzim khusus yang dimiliki oleh mikroorganisme untuk memecah ikatan. Pemecahan molekul kompleks menjadi molekul sederhana mempermudah penyerapan oleh saluran pencernaan. Di sisi lain, mikroorganisme pemecah ini mendapat keuntungan berupa energi yang diperoleh dari hasil perombakan molekul kompleks (Widiyaningsih, 2011).

Prebiotik merupakan sumber energi atau nutrien bagi mikroba untuk meningkatkan keseimbangan mikroba dalam saluran pencernaan (Haryati, 2011). Prebiotik sendiri merupakan karbohidrat yang tidak dicerna tubuh, namun dapat dicerna oleh mikroba yang menguntungkan dalam tubuh, sehingga dapat

meningkatkan populasi mikroba baik untuk menunjang kesehatan (Widiyaningsih, 2011).

2.3.1 *Lactobacillus acidophilus*

Lactobacillus acidophilus adalah bakteri golongan gram positif, tidak membentuk spora, non-motil, berbentuk batang panjang, bersifat anaerob fakultatif dan berukuran 2-10 μm . Bakteri ini dapat bertahan hidup pada pH 4-5 atau lebih rendah dengan suhu optimum berkisar 35 - 38°C. *Lactobacillus acidophilus* merupakan bakteri asam laktat yang bersifat homofermentatif dimana menghasilkan asam laktat sebagai satu-satunya produk akhir fermentasi karbohidrat. Terdapat beberapa mekanisme aktimikroba *Lactobacillus acidophilus* yaitu menghasilkan asam laktat, hidrogen peroksida, bakteriosin, peptida bioaktif, dan melakukan kompetisi nutrisi dan adhesi (Prescott dan Harley, 2002).

Produksi asam laktat yang berlebihan akan menyebabkan asam laktat memasuki sitoplasma sel yang menyebabkan peningkatan keasaman sel mikroba yang menyebabkan kematian pada mikroba yang tidak tahan pada suasana asam (Chu, *et al.*, 2005). *Lactobacillus acidophilus* mengekskresikan H_2O_2 sebagai alat pelindung diri yang mampu bersifat bakteriostatik maupun bakterisidal (Ray and Bhunia, 2008).

Lactobacillus acidophilus dapat menghasilkan *bacteriocin lactacin B*, *acidolin*, *lactocidin* dan *acidophilin*. Bakteriosin yang diproduksi akan memasuki bakteri sitoplasma sel menyebabkan perubahan permeabilitas membran sel, dengan demikian mengganggu transportasi nutrisi dan mengganggu produksi energi serta mengganggu biosintesis protein atau asam nukleat. Selain itu,

Lactobacillus acidophilus dapat menghambat pertumbuhan *salmonella* dengan melakukan kompetisi adhesi pada dinding usus (Prescott dan Harley, 2002).

Lactobacillus acidophilus juga mampu memproduksi peptida. *Lactobacillus acidophilus* akan memecah protein menjadi peptida bioaktif. Tidona, dkk (2009) menyatakan bahwa bakteri asam laktat yang digunakan sebagai starter akan menghasilkan peptida selama fermentasi. Peptida bioaktif adalah komponen pangan yang mempunyai aktifitas biologis seperti antioksidan, antiinflamasi dan antimikroba (Nirmagustina, 2014). Aktifitas antioksidan dari peptida yaitu meminimalkan kerusakan sel akibat adanya stress oksidasi dan radikal bebas.

2.3.2 *Spirulina platensis*

Spirulina platensis merupakan cyanobakter (alga hijau-biru) yang digolongkan sebagai *protista* yang dapat melakukan fotosintesis sendiri. Kandungan gizi *Spirulina platensis* yaitu protein 60-71 %, karbohidrat 19-20 %, pigmen 6 %, lemak 4-5 %, serat 3 %, abu 3 %, dan mineral 7 % (Arlyza, 2005). Oliveira, *et al.*, (2008) menyatakan bahwa *Spirulina platensis* mengandung karbohidrat (*rhamnosa*, fruktosa, ribosa, *mannosa*) dan mineral (tembaga, magnesium, seng, potasium dan zat besi). Karbohidrat yang terkandung dalam *Spirulina platensis* dengan cepat merangsang sistem imun pada tubuh, karena itu mikroalga ini disebut sebagai *imunostimulator*.

Mannose adalah komponen utama MOS. *Mannose* mendominasi monosakarida sebagai penyusun mannan yang terkandung dalam MOS (Mannan oligosakarida). *Mannan oligosakarida* (MOS) merupakan agen antimikrobal yang bersifat alami sehingga tidak menimbulkan residu (Ferket, *et al.*, 2002).

MOS ini dapat difermentasi dan menyediakan substrat untuk bakteri asam laktat sebagai sumber energi. Selain itu, hasil fermentasi MOS misalnya asam lemak rantai pendek dapat menurunkan pH di dalam kolon sehingga menciptakan kondisi yang tidak cocok untuk pertumbuhan bakteri patogen (Medzhitov dan Janeway, 2000).

Spearman (2004) menyatakan bahwa pemberian MOS dapat mengaglutinasi patogen yang memiliki fimbriae tipe 1 yang spesifik untuk mannanosa. Manan membantu perlawanan terhadap kolonisasi patogen dengan berperan sebagai reseptor analog untuk *fimbriae* tipe 1 *Salmonella sp.* MOS menempel pada lektin mikroorganisme patogen sehingga mencegah bakteri menempel pada sel epitel usus. Bakteri merugikan yang menempel pada dinding usus dengan lektin diikat oleh MOS karena mannan mempunyai afinitas atau daya ikat lebih tinggi untuk mengikat lektin. Setelah terikat, bakteri tersebut akan dikeluarkan.

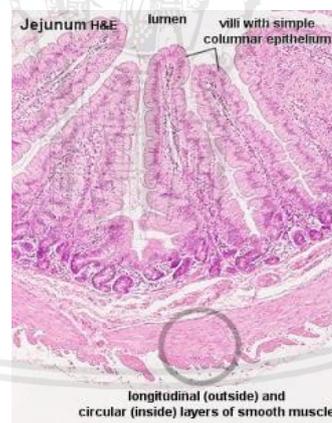
Pemberian MOS dapat meningkatkan panjang vili pada kalkun. Peningkatan panjang dan lebar vili usus dapat terjadi karena adanya fermentasi MOS oleh bakteri dalam sekum dan kolon yang menghasilkan asam lemak rantai pendek khususnya butirir yang dapat meningkatkan proliferasi enterosit. MOS juga mampu meningkatkan perlindungan mukosa yang non spesifik dengan jalan peningkatan jumlah relatif sel goblet dan sekresi mucus (Ferket, *et al.*, 2002).

2.4 Jejunum Tikus

Struktur usus tikus jantan terletak antara bagian posterior lambung, anterior kolon ascendend, media-posterior hati dan ventral ginjal. Usus tikus terdiri dari tiga bagian yaitu duodenum, jejunum dan ileum (Eroschenko, 2008).

1. Duodenum merupakan bagian terpendek dari usus halus. Vili di bagian ini tampak lebar, tinggi, dan banyak, dengan sedikit sel goblet pada lapisan epitel.
2. Jejunum memiliki vili yang lebih pendek, lebih sempit, dan lebih sedikit daripada duodenum, sedangkan sel goblet pada epitel jumlahnya lebih banyak.
3. Ileum mengandung sedikit vili yang sempit dan pendek, selain itu epitel pada ileum mengandung lebih banyak sel goblet dibandingkan dengan duodenum dan jejunum.

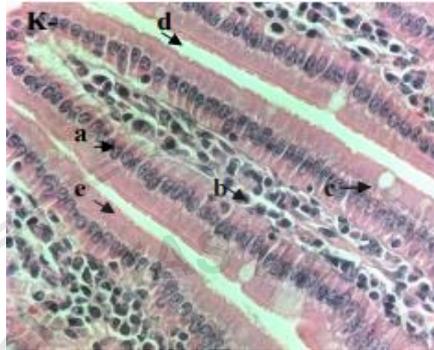
Vili berfungsi untuk memperluas permukaan usus halus yang berpengaruh terhadap proses penyerapan makanan. Semakin lebar dan tinggi vili semakin banyak zat-zat makanan yang akan diserap pada akhirnya dapat berdampak baik pada pertumbuhan organ-organ tubuh dan karkas yang meningkat (Asmawati, 2013). Berikut ini merupakan gambaran histologi vili jejunum tikus.



Gambar 2.3 Histologi vili jejunum tikus (Subowo, 2002).

Jejunum terdiri dari tunika mukosa yang dilapisi epitel kolumnar selapis dengan *brush border*, vili terlihat berlekuk-lekuk pada bagian tepinya, lamina propria terdapat kelenjar *Lieberkuhn*, tunika submukosa terdiri dari jaringan ikat longgar, kapiler dan saraf, dan tunika muskularis terdiri dari otot polos sirkular di dalam dan otot polos longitudinal yang terletak di luar. Pada lapisan epitel jejunum

terdapat sel goblet untuk melindungi sel epitel usus dari benda asing dengan menghasilkan mukus yang banyak (Kim dan Khan, 2013). Di bawah ini merupakan gambaran histologi sel epitel kolumner simpleks, sel goblet, lumen, dan mikrovili dari jejunum.



Gambar 2.4 Histologi jejunum (a) Sel epitel kolumner simpleks (b) Lamina propia (c) Sel goblet (d) Lumen (e) Mikrovili (Siagian, 2016).

2.5 Sistem Imun

Sistem imun merupakan mekanisme pertahanan tubuh sebagai perlindungan dari bahaya yang dianggap asing bagi tubuh seperti bakteri, virus, jamur, parasit dan protozoa. Kekebalan tubuh ada dua yaitu imunitas alamiah atau *natural/innate* dan imunitas dapanan atau adaptif/*acquired*. Kekebalan *innate* diturunkan dan ada sejak lahir, tidak ada pengaruh secara intrinsik oleh kontak dengan agen infeksi sebelumnya, dan melakukan respon imun non-spesifik dalam waktu yang cepat. Sedangkan kekebalan adaptif yaitu kekebalan yang didapatkan dari pengenalan tubuh terhadap antigen dan melakukan respon imun spesifik dalam waktu yang lambat (Abbas, *et al.*, 2014).

Respon imun terbagi menjadi respon imun non-spesifik (*innate*) yang tidak membedakan antigen yang diserang dan respon imun spesifik (adaptif) yang menyerang antigen tertentu dan dapat mengenali kembali jika sewaktu-waktu antigen yang sama menyerang kembali (Benjamini, *et al.*, 2000). Respon imun diperantarai oleh berbagai sel dan molekul larut yang disekresi oleh sel-sel tersebut. Sel-sel utama yang terlibat dalam reaksi imun adalah limfosit (sel B, sel T, dan sel NK), fagosit (neutrofil, eosinofil, monosit, dan makrofag), sel asesori (basofil, sel mast, dan trombosit), sel-sel jaringan, dan lain-lain. Bahan larut yang disekresi dapat berupa antibodi, komplemen, mediator radang, dan sitokin (Abbas, *et al.*, 2014).

Lapisan pertama dari kekebalan *innate* antara lain kulit, membran mukosa, bakteri alami apatogen. Lapisan kedua kekebalan *innate* yaitu berupa kekebalan humoral seperti komplemen, protein fase akut, mediator asal fosfolipid, sitokin IL-1, IL-6, TNF- α dan kekebalan selluler seperti sel fagosit, sel NK, sel mast, dan eosinofil . Lapisan ketiga yaitu dari kekebalan adaptif seperti kekebalan humoral (Sel B), kekebalan selluler (Sel T), dan APC (makrofag dan sel dendritik) (Benjamini, *et al.*, 2000). Respon imun seluler diperlukan untuk melawan mikroba yang berada di dalam sel (intraseluler) seperti virus dan bakteri. Agen infeksi yang berada di luar sel dapat dilawan dengan respon imun humoral (Abbas *et al.*, 2014).

Organ pertahanan terdiri dari 2 yaitu primer dan sekunder. Organ pertahanan primer terdiri dari sumsum tulang yang menghasilkan limfosit dan timus sebagai tempat pematangan limfosit dari sumsum tulang. Organ pertahanan sekunder terdiri dari nodus limfa yang mengandung limfosit dan makrofag,

limpa/spleen yang berfungsi membuang antigen dalam darah dan menghancurkan eritrosit yang sudah tua, dan tonsil yang memerangi infeksi pada saluran pernapasan bagian atas dan faring (Abbas, *et al.*, 2014). Limpa merupakan tempat utama dalam merespon imun terhadap antigen yang berasal dari darah yang memproduksi sel B dan sel T.

2.6 IFN- γ

Salah satu upaya dari sistem imunitas tubuh untuk menghadapi invasi patogen yaitu peranan mediator-mediator yang disebut sitokin. Sitokin mempunyai berbagai macam fungsi, namun pada umumnya sitokin bertindak sebagai pengatur pertahanan tubuh untuk melawan hal-hal yang bersifat patogen dan menimbulkan respons inflamasi. Salah satu contoh sitokin tersebut adalah *interferon- γ* (IFN- γ) yang diproduksi oleh limfosit Th1 setelah mendapat rangsangan dari antigen spesifik (Roitt, 2004).

IFN- γ adalah sitokin pro-inflamasi yang disekresi oleh limfosit Th1, sel NK, dan limfosit Tc, dengan sumber utama adalah limfosit Th1. Sitokin pro-inflamasi bekerja membantu sel untuk menghancurkan mikroorganisme yang menginfeksi. IFN- γ merupakan sistem imun yang spesifik terhadap sel inang namun tidak spesifik terhadap virus. IFN- γ juga merupakan sistem imun seluler dimana dapat melakukan pertahanan terhadap bakteri yang hidup intraseluler dan merupakan aktivator utama makrofag (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009).

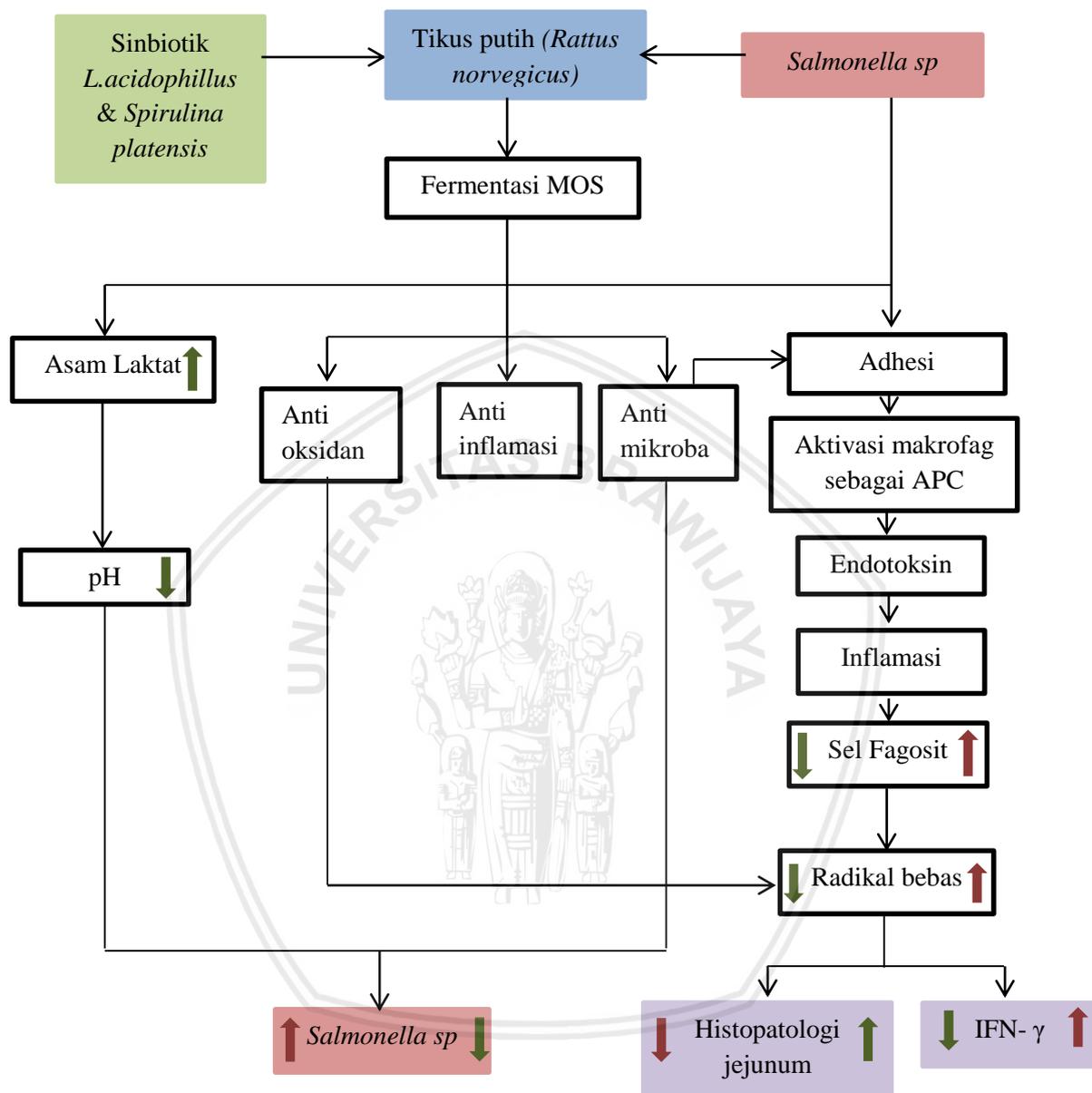
Salmonella mampu mengaktifkan sistem imun seluler *host* yang diperankan oleh makrofag dan sel NK sebagai eksekutor imun non spesifik dan sel T sebagai mediator imun spesifik. Makrofag yang diaktivasi oleh produk mikrobial berperan

sebagai fagosit profesional dan *Antigen Presenting Cell* (APC). Makrofag sebagai APC menelan mikrobia lalu mempresentasikan antigen mikrobia tersebut ke sel T. Sel Th1 kemudian akan menghasilkan IFN- γ yang kemudian IFN- γ akan mengaktifasi makrofag untuk memfagositosis mikroba tersebut (Roitt, 2004). Peningkatan fagositosis akan menyebabkan produksi IFN- γ dan peningkatan fungsi APC (*Antigen Presenting cells*) yang berpotensi untuk mengaktifasi sel T lebih lanjut serta mengaktifkan makrofag (Guarner dan Malagelada, 2003).



BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Teori



Keterangan :

↑ : Kenaikan akibat terapi



: Penurunan akibat terapi

↑ : Kenaikan akibat *salmonella*



: Variabel bebas

↓ : Penurunan akibat *salmonella*



: Variabel tergantung

■ : Variabel terkontrol



: Menstimulasi

Pemberian sinbiotik *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* selama 14 hari akan meningkatkan populasi *L.acidophilus*. *Spirulina platensis* akan menghasilkan MOS yang akan difermentasi oleh *L.acidophilus* menjadi asam lemak rantai pendek dan asam laktat. Asam laktat ini akan membuat suasana usus menjadi asam, adapun asam lemak rantai pendek yang tidak bisa dicerna oleh tubuh akan menjadi energi bagi *L.acidophilus* (Medzhitov dan Janeway, 2000). Selain itu, Spearman (2004) menyatakan bahwa MOS dapat mengaglutinasi patogen yang memiliki fimbriae tipe 1 yang spesifik untuk mannososa. MOS dari *spirulina platensis* menempel pada lektin mikroorganisme patogen sehingga mencegah bakteri menempel pada sel epitel usus. Setelah terikat, bakteri tersebut akan dikeluarkan.

MOS pada *spirulina platensis* juga dapat meningkatkan panjang dan lebar vili usus karena adanya fermentasi MOS oleh bakteri saluran pencernaan (sekum dan kolon) yang menghasilkan asam lemak rantai pendek khususnya butirir yang dapat meningkatkan proliferasi enterosit. MOS juga mampu meningkatkan perlindungan mukosa yang non spesifik dengan jalan peningkatan jumlah relatif sel goblet dan sekresi mucus (Ferket, *et al.*, 2002).

Lactobacillus acidophilus memiliki beberapa aktivitas antimikroba yaitu memproduksi asam laktat, hidrogen peroksida, bakteriosin (peptida), serta melakukan kompetisi nutrisi dan mencegah kolonisasi *Salmonella sp.* Produksi asam laktat akan menurunkan pH usus sehingga akan membunuh bakteri yang tidak tahan terhadap suasana asam khususnya *Salmonella sp.* Peningkatan asam laktat juga dapat meningkatkan aktivitas antioksidan (Bisson, 2001).

Lactobacillus acidophilus mengekskresikan H₂O₂ sebagai alat pelindung diri yang mampu bersifat bakteriostatik maupun bakterisidal (Ray and Bhunia, 2008).

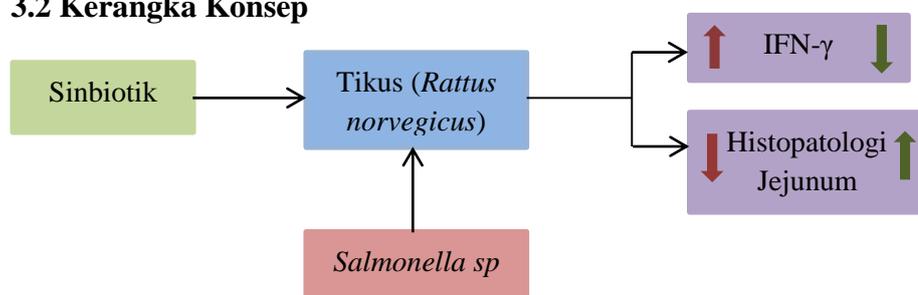
Lactobacillus acidophilus akan memecah protein menjadi peptida bioaktif. Tidona, dkk (2009) menyatakan bahwa bakteri asam laktat yang digunakan sebagai starter akan menghasilkan peptida selama fermentasi. *Lactobacillus acidophilus* juga memiliki aktivitas antioksidan yaitu menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan stress oksidatif (Wen, *et al.*, 2016). Adapun aktivitas antiinflamasi *Lactobacillus acidophilus* yaitu meningkatkan produksi sitokin anti inflamasi dan mencegah pembentukan sitokin pro inflamasi dengan menghambat jalur sinyal transduksi sitokin pro inflamasi (Weiner, *et al.*, 2000).

Aktivitas antibakteri *Lactobacillus acidophilus* lainnya seperti, menghasilkan *lactacin B*. *Lactacin B* adalah senyawa bakteriosin yang dapat bersifat bakterisidal terhadap bakteri patogen dengan memasuki sitoplasma sel bakteri menyebabkan perubahan permeabilitas membran sel, sehingga mengganggu transportasi nutrisi, produksi energi serta, biosintesis protein atau asam nukleat yang akan menghambat pertumbuhan *Salmonella sp* (Prescott dan Harley, 2002). *Lactobacillus acidophilus* juga mampu mencegah kolonisasi *Salmonella sp*. *Lactobacillus acidophilus* akan memenuhi mukosa usus melalui pengikatan dengan mannan epitel mukosa usus sehingga dapat mencegah adhesi *Salmonella sp* (Papoff, *et al.*, 2012).

Tikus diinduksi *Salmonella sp* setelah 14 hari perlakuan. *Salmonella sp* melakukan adhesi menggunakan *fimbriae* yang berikatan dengan masing-masing

reseptor host yang sesuai dengan tiap tipe *fimbriae Salmonella sp* (Aryanti dan Supar, 2008). Adanya infeksi *Salmonella sp* akan mengaktifkan makrofag untuk menelan antigen tersebut lalu mempresentasikannya ke sel T (Roitt, 2004). *Salmonella sp* akan melepaskan endotoksin yang akan menyebabkan adanya inflamasi seperti enteritis yang ditandai dengan muntah dan diare (Giannela, 2004). Adanya inflamasi akan merangsang sel fagosit untuk melakukan fagositosis. Peningkatan fagositosis akan menginisiasi pembentukan radikal bebas. Radikal bebas akan bereaksi dengan molekul sel di sekitarnya untuk memperoleh pasangan elektron sehingga menjadi lebih stabil, tetapi molekul sel tubuh yang diambil elektronnya akan berubah menjadi radikal bebas. Reaksi ini akan berlangsung terus menerus dalam tubuh dan bila tidak dihentikan akan menimbulkan stress oksidatif yang menyebabkan peradangan pada jejunum. Radikal bebas juga akan memediasi pengeluaran sitokin pro inflamasi diantaranya Interferon Gamma (IFN- γ) (Roitt, 2004). Pemberian terapi sinbiotik dilanjutkan setelah induksi *Salmonella sp* yang bertujuan untuk menurunkan populasi *Salmonella sp* sehingga kadar relatif IFN- γ akan menurun dan mencegah kerusakan jejunum .

3.2 Kerangka Konsep



3.3 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah ada, maka hipotesa yang dapat diajukan adalah sebagai berikut :

1. Pemberian sinbiotik *Lactobacillus acidophillus* dan *Spirulina platensis* mampu mencegah kerusakan jejunum tikus putih yang diinfeksi *Salmonella sp.*
2. Pemberian sinbiotik *Lactobacillus acidophillus* dan *Spirulina platensis* mampu menurunkan jumlah relatif IFN- γ tikus putih yang diinfeksi *Salmonella sp.*



BAB 4. METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan mulai dari bulan Mei 2018 hingga Juli 2018 dan dilakukan di beberapa laboratorium, yaitu :

1. Pemeliharaan tikus dilakukan di Laboratorium Epidemiologi Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya, Malang.
2. Pembuatan sinbiotik dilakukan di Laboratorium Nutrisi dan Makanan Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya, Malang.
3. Pembuatan preparat histopatologi jejunum dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang.
4. Pemeriksaan histopatologi jejunum dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya Malang.
5. Pengujian kadar relatif IFN- γ dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler FMIPA, Universitas Brawijaya, Malang.

4.2 Rancangan Penelitian

Metode penelitian yang akan digunakan adalah *True Experimental Post Test Control Only Design* dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Perlakuan yang dilakukan berupa 2 perlakuan kontrol + 3 perlakuan uji dengan 4 kali ulangan. Tikus yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 20 ekor tikus (*Rattus norvegicus*) berusia 4-6 minggu dengan berat badan 100 gram. Penggunaan hewan coba telah dihitung menggunakan rumus Frederer dalam Kusringrum (2008) yaitu sebagai berikut :

$$t(n-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

t = Jumlah kelompok perlakuan

n = Jumlah ulangan yang diperlukan

Tabel 4.1 Tabel Perlakuan

No	Kelompok Perlakuan	Perlakuan
1	K-	Tikus yang diberi pakan kontrol
2	K+	Tikus diinfeksi <i>Salmonella sp</i> konsentrasi 1.5×10^8 CFU/ml sebanyak 0.5 ml per oral
3	P1	Tikus diberi sinbiotik sebanyak 0.2%/10 gr pakan dan diinfeksi 0.5 ml <i>Salmonella sp</i> konsentrasi 1.5×10^8 CFU/ml per oral
4	P2	Tikus diberi sinbiotik sebanyak 0.4%/10 gr pakan dan diinfeksi 0.5 ml <i>Salmonella sp</i> konsentrasi 1.5×10^8 CFU/ml per oral
5	P3	Tikus diberi sinbiotik sebanyak 0.6%/10 gr pakan dan diinfeksi 0.5 ml <i>Salmonella sp</i> konsentrasi 1.5×10^8 CFU/ml per oral

Tabel 4.2 Rancangan Penelitian

Perlakuan	Ulangan				Total	Rata-Rata
	1	2	3	4		
K-						
K+						
P1						
P2						
P3						

Tabel 4.3 ANOVA (*Analysis of Variance*)

S.V.	df ^x	SS	MS ^{xx}	F ^{xxx} Calc	F5%	F1%
<i>Treatment</i>	4				3.06	4.89
<i>Error</i>	15					
Total	19					

Keterangan :

$$x). \text{ d.f. varietas (treatment) } = t - 1 = 5 - 1 = 4$$

$$\text{d.f. total} = nt - 1 = 20 - 1 = 19$$

$$\text{d.f. error} = \text{df total} - \text{df varietas} = 19 - 4 = 15$$

$$xx). \text{ MS Varietas} = \frac{\text{SS Varietas}}{\text{df Varietas}}$$

$$\text{MS error} = \frac{\text{SS error}}{\text{df error}}$$

$$xxx). \text{ F Calculated} = \frac{\text{MS Varietas}}{\text{MS error}}$$

4.3 Variabel Penelitian

Adapun variabel dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

Variabel bebas : Konsentrasi bakteri *Salmonella sp* dan dosis sinbiotik

Variabel terikat : Histopatologi jejunum tikus dan kadar relatif IFN- γ

Variabel terkontrol : Tikus (strain, umur, berat badan, jenis kelamin, pakan, kandang)

4.4 Alat dan Bahan

Dalam pelaksanaan penelitian dibutuhkan alat-alat antara lain : cawan petri, tabung reaksi, ose, autoklaf, spuit, *needle*, tabung darah, sentrifugator, pinset, *scalpel blade*, gunting, pipet tetes, labu ukur, rak tabung reaksi, *microtube*, gelas

beaker, mikropipet, inkubator, mikroskop, *freez dryer*, *object glass*, *cover glass*, mortar, pengaduk kaca, tempat minum tikus (*dot*), tempat minum, timbangan digital, Biosafety Cabinet, vortex, bunsen, *yellow tip*, *blue tip*, *white tip*, *ice box*, penangas air, dan kandang tikus berukuran 10 cm x 10 cm sebanyak 20 buah masing-masing berisi 1 ekor tikus.

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah 20 ekor tikus (*Rattus Novergicus*) jantan dengan berat badan 100 gram, MOS dari alga *Spirullina platensis* 100%, suspensi bakteri *Lactobacillus acidophilus* konsentrasi 1.5×10^8 CFU/ml, bakteri *Salmonella sp* konsentrasi 1.5×10^8 CFU/ml, etanol, aquades, media pertumbuhan bakteri (Nutrien Brorth, MRSA, MRSB, SSA), formalin 10%, desinfektan, air, larutan PBS, alkohol 70%, ethanol bertingkat 70%, 80%, 90%, xylol, entelan, paraffin, pewarna HE, *cytofix/cytoperm*, larutan NaCl 0,9%, organ jejunum tikus, limpa tikus, sekam, pakan tikus, maltodextrin.

4.5 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan antara lain :

1. Persiapan hewan coba
2. Persiapan sinbiotik
3. Persiapan *Salmonella sp*
4. Perlakuan pada tikus
5. Preparasi organ limpa dan jejunum
6. Pengukuran jumlah relatif IFN- γ Limpa (*Flowcytometry*)
7. Pembuatan preparat histopatologi

4.5.1 Persiapan hewan coba

1. Tikus yang digunakan untuk penelitian diadaptasi terhadap lingkungan di box plastik berukuran 50 x 30 cm selama 7 hari dengan diberi pakan dan minum secara ad libitum. Pakan diberi sebanyak 10% dari berat badan tikus yakni 10 gram berupa pellet standar BR-2 yang mengandung karbohidrat, protein, lemak, vitamin, dan air (Pramesti dan Widyastuti, 2014). Tikus dibagi dalam 5 kelompok perlakuan dengan setiap perlakuan terdiri dari 4 ekor tikus.
2. Tikus dipelihara dalam kandang yang berukuran 10 cm x 10 cm sebanyak 20 buah masing-masing berisi 1 ekor tikus.

4.5.2 Persiapan Mikroenkapsulasi Sinbiotik

Sinbiotik yang digunakan merupakan kombinasi dari probiotik *Lactobacillus acidophilus* konsentrasi 1.5×10^8 CFU/ml dan prebiotik dari *Spirullina platensis* 100%. Mula-mula dilakukan perbanyakan bakteri *Lactobacillus acidophilus* di media MRSB. Kemudian *Lactobacillus acidophilus* dibuat dengan mengikuti standard kekeruhan Mc Farland 0.5 (1.5×10^8 CFU/ml) (Zen, dkk., 2015). Selanjutnya dibuat larutan campuran I yaitu 194 ml aquades dan 58 gr *maltodextrin*. Campuran dihomogenkan dengan diaduk menggunakan pengaduk kaca dan didiamkan selama 12 jam. Kemudian dibuat larutan II yaitu larutan sinbiotik dengan perbandingan 1:2 yaitu 28 ml *Lactobacillus acidophilus* dan 56 gr *Spirullina platensis*. Kedua larutan dicampurkan lalu dikeringkan menggunakan *freeze dryer* selama 4-5 hari (-52°C) sehingga terbentuk sinbiotik mikroenkapsulasi (Permatasari dkk, 2013).

Mikroenkapsulasi merupakan metode yang bertujuan untuk melindungi bahan inti dari kehilangan nilai gizi, menstabilkan bahan aktif dan melindungi komponen aktif. *Lactobacillus acidophilus* memiliki waktu fase stasioner yang cepat dan lebih cepat kehilangan viabilitas dibandingkan *L.plantarum*, *L.fermentum*, dan *L.reuteri* (Firdaus, 2014). Oleh karena itu, metode ini diterapkan dengan tujuan untuk melindungi probiotik tetap hidup dari kondisi ekstrim akibat pengeringan, penyimpanan, maupun cairan saluran pencernaan.

Pembuatan mikroenkapsulasi ini menggunakan metode *freeze dryer* yaitu suatu metode pengeringan beku. *Freeze dryer* dipilih karena kultur kering bakteri asam laktat yang disimpan pada suhu dingin (4°C) mempunyai viabilitas yang lebih tinggi daripada penyimpanan pada suhu kamar (Zamora, *et al.*, 2006).

4.5.3 Persiapan Bakteri *Salmonella sp*

Bakteri *Salmonella sp* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah diidentifikasi di Laboratorium Bakteriologi Balai Besar Veteriner Wates Yogyakarta. Bakteri kemudian ditanam pada media SSA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Bakteri *Salmonella sp* yang tumbuh lalu diperbanyak di media NB dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya dibuat dengan standar Mc Farland 0.5 (1.5×10^8 CFU/ml) (Larasati, 2016).

4.5.4 Perlakuan Pada Tikus

Tikus diberikan perlakuan dengan mencampur sinbiotik dan pakan sesuai dengan perlakuan kontrol dan perlakuan uji selama 3 minggu setelah diadaptasi

selama 1 minggu. Kontrol positif (+) adalah kelompok tikus tanpa perlakuan apapun. Kontrol negatif (-) adalah tikus yang diinfeksi *Salmonella sp* konsentrasi 1.5×10^8 CFU/ml sebanyak 0.5 ml. Perlakuan 1, 2, dan 3 adalah kelompok tikus yang diberi perlakuan pemberian sinbiotik bertingkat yaitu sebanyak 0.2% / 10 gr pakan, 0.4% / 10 gr pakan, dan 0.6% / 10 gr pakan selama 2 minggu lalu diinfeksi 0.5 ml *Salmonella sp* konsentrasi 1.5×10^8 CFU/ml per oral, kemudian dilakukan pemberian sinbiotik kembali selama 1 minggu. Pemberian perlakuan sinbiotik tersebut berdasarkan penelitian Baderuddin (2016). Setelah 4 minggu pemeliharaan, dilakukan nekropsi tikus lalu diambil organ jejunum untuk pemeriksaan histopatologi dan limpa untuk mengukur kadar relatif IFN- γ .

4.5.5 Preparasi Organ Limpa dan Jejunum

Pengambilan organ jejunum dan limpa tikus dilakukan setelah 28 hari pemeliharaan. Sebelum dieuthanasi, tikus ditimbang untuk mengetahui pertambahan berat badannya. Setelah euthanasi, tikus dinekropsi dengan cara dislokasi servikalis. Kemudian tikus diletakkan dalam posisi terlentang dan dilakukan pembedahan dengan melakukan insisi pada linea abdominalis lalu diambil limpa dan jejunum. Organ jejunum dimasukkan ke dalam larutan formalin 10% kemudian dilakukan pembuatan preparat histopatologi (Fernando, dkk., 2016). Sementara organ limpa diambil dan dilakukan pemeriksaan *flowcytometry* untuk mengukur jumlah relatif IFN- γ .

4.5.6 Uji *Flowcytometry*

Flowcytometry digunakan untuk menghitung jumlah relatif IFN- γ . Metode ini dilakukan dengan cara mengamati bagaimana sel tersebut mengalir di dalam cairan. Molekul yang menjadi target tersebut biasanya diikat dengan antibodi monoklonal yang berlabel *fluorokrom* tertentu. Kemudian sel dilewatkan celah sempit dan ditembak sinar. Adapun prosedur kerjanya yaitu pertama dilakukan preparasi organ limpa lalu dibilas menggunakan larutan PBS. Limpa diletakkan di cawan petri berisi PBS sebanyak 5 ml dan digerus hingga halus dengan pangkal spuit lalu diambil ekstraknya kemudian dimasukkan ke tabung propilen 15 ml hingga volume tertetu. Ekstrak tersebut disentrifus dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit pada suhu 10⁰C. Kemudian dibuang cairan supernatan dan diambil endapannya lalu ditambahkan 1 ml PBS kemudian diresuspensi. Larutan dibagi ke beberapa *micro tube* 1.5 ml yang telah berisi \pm 0.5 ml PBS lalu disentrifus kembali dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit dengan suhu 10⁰C. Supernatan dibuang lalu diambil peletnya untuk diwarnai dengan pewarna intraselluler (Setia, 2015).

Adapun prosedur pewarnaannya yaitu ditambahkan larutan fiksatif sebanyak 50 μ l kemudian diinkubasi selama 20 menit dalam ruang gelap dengan suhu 4⁰C. Setelah diinkubasi, ditambahkan larutan permeabilitas (*Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer*) yaitu *cytofix/cytoperm* yang akan memfiksasi sel untuk pewarnaan sitokin intraseluler (IFN- γ). Disentrifus kembali larutan tersebut menggunakan 2500 rpm selama 5 menit pada suhu 10⁰C. Kemudian dilakukan penambahan larutan antibodi spesifik sebanyak 50 μ l pada sel (pelet) lalu

dinkubasi selama 20 menit pada suhu 4°C di ruang gelap. Tambahkan $\pm 400 \mu\text{l}$ PBS lalu dipindahkan ke kuvet *flowcytometry* untuk dihitung (Setia, 2015).

4.5.7 Pembuatan Preparat Histopatologi Jejunum

Tahapan pertama pembuatan preparat histopatologi yaitu fiksasi yang bertujuan untuk mempertahankan susunan jaringan agar mendekati kondisi seperti sewaktu hidup serta mengawetkan organ. Ukuran jaringan yang diambil sekitar 1 cm. Jaringan direndam dalam larutan formalin 10% selama 24 jam (Jusuf, 2009). Tahapan selanjutnya yaitu dehidrasi yang bertujuan untuk mengeluarkan seluruh cairan yang terdapat dalam jaringan yang telah difiksasi. Jaringan yang sudah difiksasi direndam ke dalam larutan alkohol bertingkat yaitu 70 % , 80% , 90% , 95% masing-masing selama 1 jam dan etanol absolut I,II,III masing-masing 1 jam (Pratomo, dkk., 2011).

Tahapan berikutnya yaitu *clearing* yang bertujuan mengeluarkan alkohol dari jaringan dan menggantinya dengan suatu larutan yang dapat berikatan dengan parafin. Rendam jaringan ke dalam cairan xylol I,II,III yang diletakkan dalam wadah kaca masing-masing selama 40 menit (Pratomo, dkk., 2011). Kemudian dilakukan *embedding* yang merupakan proses untuk mengeluarkan cairan *clearing* dari jaringan. Proses ini dilakukan dengan merendam jaringan dalam paraffin cair I, II, III yang dicairkan pada suhu 58-60 °C masing-masing selama 1 jam dalam inkubator (Jusuf, 2009).

Tahapan selanjutnya yaitu *blocking* yang merupakan proses pembuatan blok preparat. Paraffin IV dicairkan lalu dimasukkan ke dalam cetakan paraffin. Kemudian sampel organ dikeluarkan dari paraffin cair I,II,III dan dimasukkan

segera ke dalam cetakan yang berisi paraffin IV tersebut (Jusuf, 2009). Selanjutnya dilakukan *sectioning* (pemotongan). Blok paraffin dipotong dengan ketebalan 3-8 μm . Potongan kemudian dimasukkan ke waterbath berisi air dengan suhu 46°C agar terkembang dengan baik. Setelah itu, tempelkan potongan ke kaca objek yang telah terlebih dahulu diolesi dengan albumin, dengan cara mencelupkan kaca objek tegak lurus ke dalam waterbath (Paulsen, 2000).

Tahapan terakhir yaitu *staining* (Pewarnaan) dengan pewarnaan HE. Pertama dilakukan deparafinisasi dengan xylol I,II masing-masing selama 2 menit. Kemudian dilakukan rehidrasi dengan alkohol 100% (2x2 menit), 95% , 90%, 80%, 70% masing-masing selama 2 menit. Rendam dalam larutan hematoxylin selama 5-10 menit kemudian bilas dalam air mengalir selama 15-20 menit. Selanjutnya kaca objek diberi larutan eosin dan dibiarkan 3 menit lalu diberi larutan alkohol bertingkat dari 70%,80%, 90%, 95% masing-masing selama 2 menit. Kaca objek lalu diberi Xylol I,II masing-masing 2 menit. Kemudian dilanjutkan dengan *Mounting* (Perekatan) menggunakan 1 tetes balsam kanada yang ditetaskan di atas kaca objek lalu ditutup dengan penutup kaca (Jusuf, 2009).

4.6 Analisa Statistik

Kadar relatif IFN- γ diuji menggunakan *flowcytometry* lalu dianalisa secara kuantitatif menggunakan *one way* menggunakan *software SPSS*. Pewarnaan HE digunakan untuk pemeriksaan histopatologi jejunum lalu data dianalisa secara deskriptif berupa erosi vili jejunum dan hiperplasia sel goblet.

BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Jumlah Relatif IFN- γ Tikus Putih yang Diberi Sinbiotik *Lactobacillus acidophillus* dan *Spirulina platensis* dan Diinfeksi Bakteri *Salmonella sp*

Pada penelitian ini, jumlah relatif IFN- γ diukur menggunakan metode *flowcytometry* dengan sampel berupa limpa. Hasil Uji *Flowcytometry* dianalisis dengan Uji *One Way Anova* yang menunjukkan bahwa sinbiotik *Lactobacillus acidophillus* dan *Spirulina platensis* tidak berpengaruh secara nyata dalam menurunkan jumlah relatif IFN- γ . Tabel dan grafik penurunan jumlah relatif IFN- γ dapat dilihat pada **Tabel 5.1** dan **Tabel 5.2** serta **Gambar 5.1** di bawah ini.

Tabel 5.1 Tabel Rata-Rata Jumlah Relatif IFN- γ Limpa (%)

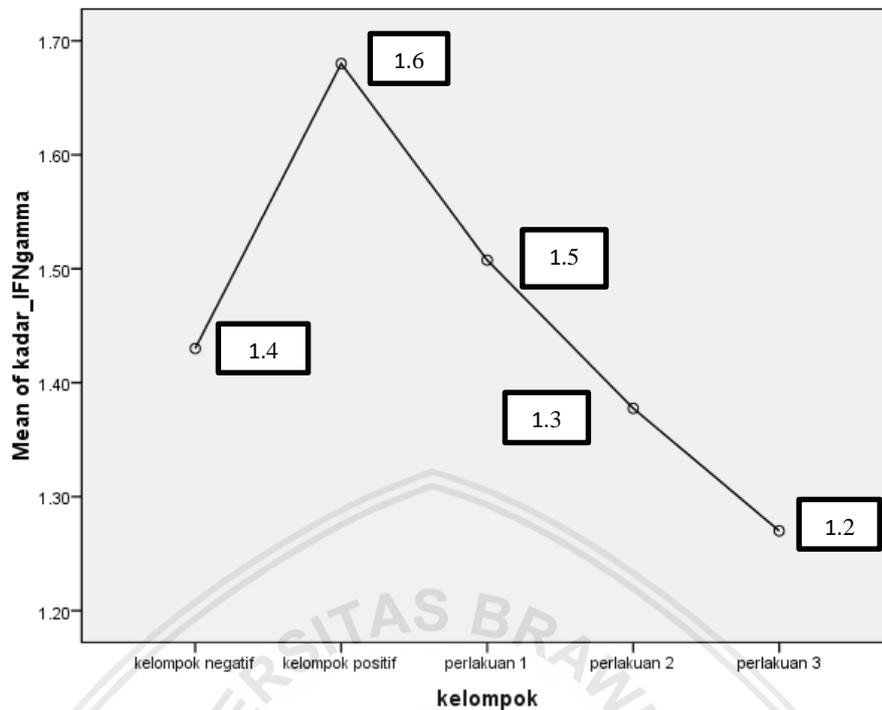
Perlakuan	Total	Mean \pm Standar Deviasi
K-	5.72	1.4 \pm 0.45
K+	6.72	1.6 \pm 0.16
P1	6.03	1.5 \pm 0.83
P2	5.51	1.3 \pm 0.49
P3	5.08	1.2 \pm 0.73

Tabel 5.2 Tabel ANOVA Jumlah Relatif IFN- γ Limpa

S.V.	df ^x	SS	MS ^{xx}	F ^{xxx} Calc	F5%	F1%	P-value
Treatment	4	0.377	0.094	0.275	3.06	4.89	0.889
Error	15	5.136	0.342				
Total	19	5.513					

Keterangan : Fhitung < Ftabel maka ditetapkan tidak terdapat perbedaan nyata antar

perlakuan (P-value (0.889) > 0.05) dengan $\alpha = 5\%$.



Gambar 5.1 Grafik Rata-Rata Jumlah Relatif IFN- γ Limpa

Pada penelitian ini, jumlah relatif IFN- γ limpa antar perlakuan terlihat tidak terdapat perbedaan secara nyata yang dibuktikan dengan nilai P-value (0.889) lebih dari $\alpha=5\%$. Hal ini dikarenakan IFN- γ yang kita gunakan berasal dari limpa sedangkan target utama sinbiotik adalah *Salmonella sp* yang berada pada saluran pencernaan, dimana *Lactobacillus acidophilus* akan bekerja memfermentasi MOS di saluran pencernaan khususnya di sekum dan kolon menghasilkan asam laktat yang nantinya akan membunuh *Salmonella sp* yang mana predileksi *Salmonella sp* sendiri adalah di usus. Hasil fermentasi lain seperti asam lemak rantai pendek akan menjadi makanan bagi *Lactobacillus acidophilus* sehingga yang akan meningkatkan pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus*. *Lactobacillus acidophilus* yang semakin meningkat jumlahnya di usus akan memenuhi mukosa saluran pencernaan sehingga mencegah adhesi *Salmonella sp*. Jumlah relatif IFN- γ

limpa menunjukkan hasil yang tidak berbeda signifikan antar perlakuan karena IFN- γ bukan merupakan target utama dari sinbiotik dan limpa bukan merupakan predileksi dari *Salmonella sp.*

Pemberian dosis sinbiotik yang kurang efektif baik akibat kurangnya dosis maupun jumlah infeksi *Salmonella sp* yang terlalu banyak juga bisa menjadi penyebab IFN- γ tidak berbeda secara signifikan. Pada penelitian ini, dilakukan infeksi pada tikus dengan 0.5 ml *Salmonella sp* konsentrasi 1.5×10^8 CFU/ml, dimana jumlah tersebut termasuk tinggi karena berdasarkan SNI7388-2009, jumlah *salmonella* yang dapat menyebabkan infeksi yaitu $10^7 - 10^9$ sel/gram. Infeksi *Salmonella sp* yang terlalu banyak dapat menyebabkan efek sinbiotik kurang efektif karena perkembangbiakan *salmonella* yang sangat cepat membuat jumlah interferon yang diproduksi tidak sebanding untuk melawan bakteri tersebut (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009).

Perbedaan IFN- γ yang tidak signifikan antar perlakuan bisa juga disebabkan karena adanya pertahanan utama dari limpa yang melawan *salmonella sp* terlebih dahulu yaitu kekebalan *innate*/alami seperti komplemen, sitokin IL-1, TNF- α , sel NK, sel mast, dan sebagainya (Benjamini, *et al.*, 2000). Adapun IFN- γ baru akan diproduksi setelah sel T aktif dan akan bekerja setelah sistem imun alami (Abbas, *et al.*, 2014).

Hasil penelitian menunjukkan jumlah relatif IFN- γ limpa tertinggi yaitu pada kelompok tikus kontrol positif (K+) yaitu dengan rata-rata sebesar 1.6. Hal ini dikarenakan adanya infeksi *Salmonella sp* menyebabkan terjadinya sekresi IFN- γ oleh sel Th1 dan sel NK (Roitt, 2004). Pada perlakuan 1 (P1) rata-rata jumlah relatif IFN- γ yaitu sebesar 1.5 dimana lebih tinggi dari K-, P2, dan P3.

Jumlah relatif IFN- γ P1 lebih tinggi daripada K- karena pada P1 terjadi infeksi *Salmonella sp* sedangkan K- tidak terinfeksi *Salmonella sp*. Adanya infeksi *Salmonella sp* akan mengaktifkan makrofag sebagai APC untuk menelan *Salmonella sp* lalu mempresentasikan antigen tersebut ke sel T. Sel Th1 kemudian akan menghasilkan IFN- γ yang kemudian IFN- γ akan mengaktifkan makrofag untuk memfagositosis mikroba tersebut (Roitt, 2004).

Setelah P1, kemudian diikuti K- dengan rata-rata jumlah relatif IFN- γ yaitu sebesar 1.4 dimana jumlah ini lebih tinggi daripada P2 dan P3. Hal ini menunjukkan bahwa P1 dengan terapi sinbiotik sebanyak 0.2%/10 gr pakan masih kurang efektif dalam menurunkan jumlah relatif IFN- γ dibandingkan dengan P2 dengan terapi sinbiotik 0.4%/10 gr pakan dan P3 dengan pemberian 0.6%/10 gr pakan yang sudah dapat menurunkan jumlah relatif IFN- γ . Selain itu, adanya IFN- γ pada kelompok tikus sehat (K-) dikarenakan, IFN- γ merupakan sistem imun *innate* (alami) dimana sudah ada sejak lahir namun gen regulator untuk produksi IFN- γ berada dalam keadaan inaktif (Roitt, 2004). IFN- γ pada tubuh sehat berfungsi untuk mengatur proliferasi dan apoptosis sel epitel usus melalui *serinethreonine protein kinase AKT-b-catenin* dan jalur sinyal *Wingless-Int (Wnt)-b-catenin* (Nava, et al., 2010).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa P3 dipilih sebagai jumlah pemberian sinbiotik terbaik karena memiliki rata-rata jumlah relatif IFN- γ terendah yaitu 1.2 yang diikuti P2 yaitu 1.3. Penurunan IFN- γ terjadi karena adanya aktivitas antimikroba, antiinflamasi, dan antioksidan dari *Lactobacillus acidophilus*. Dimana aktivitas antimikroba *Lactobacillus acidophilus* yaitu memproduksi

asam laktat yang menurunkan pH usus sehingga akan membunuh bakteri yang tidak tahan terhadap suasana asam khususnya *Salmonella sp* (Bisson, 2001).

Lactobacillus acidophilus akan memecah protein menjadi peptida bioaktif. Tidona, dkk (2009) menyatakan bahwa bakteri asam laktat yang digunakan sebagai starter akan menghasilkan peptida selama fermentasi. Aktivitas antibakteri dari peptida yaitu menghasilkan *lactacin B* yang bersifat bakterisidal terhadap bakteri patogen dengan memasuki sitoplasma sel bakteri menyebabkan perubahan permeabilitas membran sel, sehingga mengganggu transportasi nutrisi, produksi energi serta, biosintesis protein atau asam nukleat yang akan menghambat pertumbuhan *Salmonella sp* (Prescott dan Harley, 2002).

Aktivitas antiinflamasi peptida *Lactobacillus acidophilus* yaitu meningkatkan produksi sitokin anti inflamasi dan mencegah pembentukan sitokin pro inflamasi dengan menghambat jalur sinyal transduksi sitokin pro inflamasi (Weiner, *et al.*, 2000). Sedangkan aktivitas antioksidan peptida yaitu menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron radikal bebas dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas yang dapat menyebabkan stress oksidatif yang berpengaruh pada kerusakan jaringan (Wen, *et al.*, 2016).

Peningkatan jumlah dan aktivitas *Lactobacillus acidophilus* tentunya dipengaruhi oleh suplai nutrisi dalam hal ini yaitu *Mannan Oligosakarida* (MOS) pada *Spirulina platensis*. Adanya MOS merupakan makanan bagi *Lactobacillus acidophilus*, dimana *Spirulina platensis* akan menghasilkan MOS yang akan difermentasi oleh *Lactobacillus acidophilus* menjadi asam lemak rantai pendek dan asam laktat. Asam lemak rantai pendek merupakan produk fermentasi

karbohidrat yang tidak dapat diserap oleh usus sehingga akan digunakan oleh bakteri di usus, akibatnya *Lactobacillus acidophilus* akan meningkat sehingga suasana usus menjadi asam (Medzhitov dan Janeway, 2000). Selain itu, Spearman (2004) menyatakan bahwa pemberian MOS dapat mengaglutinasi patogen yang memiliki fimbriae tipe 1 yang spesifik untuk mannosida. MOS dari *spirulina platensis* menempel pada lektin mikroorganisme patogen sehingga mencegah bakteri menempel pada sel epitel usus.

Adanya infeksi *Salmonella sp* dapat diamati dengan melihat gejala klinis yang muncul serta melakukan identifikasi *Salmonella sp*. Menurut Ariyanti (2005), infeksi *Salmonella enteritidis* pada ayam umur lebih dari 2 minggu biasanya tidak menimbulkan gejala klinis dan tidak mematikan. Gejala klinis khusus pada penderita *salmonellosis* antara lain demam, muntah, diare, sakit pada abdomen, *anoreksia*, dan lesu (Dharmojojo, 2001). Pada penelitian ini tidak dilakukan dokumentasi pada gejala klinis yang muncul.

Uji *salmonella* juga dilakukan untuk membuktikan keberadaan *Salmonella sp*. Identifikasi *Salmonella sp* dilakukan dengan Pewarnaan Gram dimana hasilnya tampak bakteri gram negatif yang berwarna merah dan berbentuk batang (Wiley, *et al.*, 2008). Selain itu, dilakukan uji TPC pada kotoran tikus menggunakan media SSA. Media SSA merupakan media selektif yang mengandung besi (Fe) untuk bakteri *Salmonella sp* sehingga pertumbuhan bakteri non *salmonella* dapat dihambat. *Salmonella sp* akan memecah asam-asam amino yang mengandung sulfur, dengan demikian jika sulfur dilepaskan dari asam-asam amino tersebut maka akan bereaksi dengan air membentuk H₂S, dengan adanya logam Fe maka H₂S akan bereaksi membentuk garam FeS yang mengendap dan

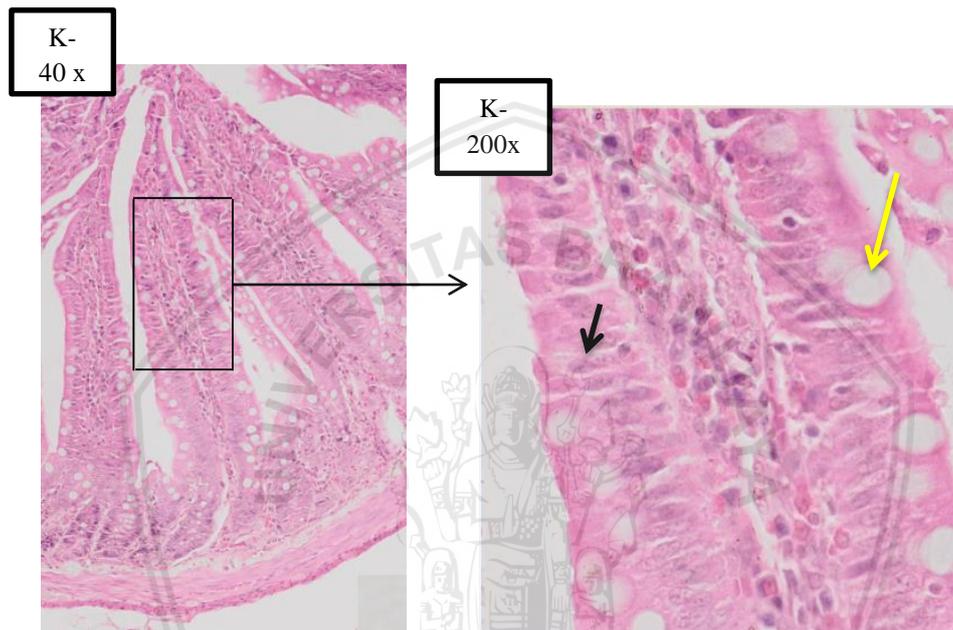
berwarna hitam (Yunus, dkk., 2017). *Salmonella sp* terlihat pada kelompok tikus sakit (K+) yang ditandai dengan adanya koloni berwarna hitam dimana menunjukkan adanya infeksi *salmonella*.

5.2 Gambaran Histopatologi Jejunum Tikus Putih yang Diberi Sinbiotik *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* dan Diinfeksi *Salmonella sp*.

Hasil penelitian pengaruh pemberian sinbiotik kombinasi *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinfeksi *Salmonella sp* yaitu berupa gambaran histopatologi jejunum yang dilakukan dengan pewarnaan *Hematoxiline-Eosine* (HE), kemudian dianalisa secara deskriptif menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran total 40x dan 200x. Adapun pengaruh pemberian sinbiotik tersebut ditunjukkan dengan mengamati erosi pada epitel vili jejunum dan hiperplasia sel goblet.

Kelompok tikus kontrol negatif (K-) menunjukkan gambaran histologi jejunum normal tikus. Jejunum terdiri dari tunika mukosa yang dilapisi epitel kolumnar selapis dengan mikrovili yang dapat meningkatkan penyerapan nutrisi, lamina propria yang terdapat kelenjar *Lieberkuhn*, tunika submukosa yang terdiri dari jaringan ikat longgar, kapiler dan saraf, tunika muskularis terdiri dari otot polos sirkular dan longitudinal, dan tunika serosa. Jejunum memiliki vili yang berlekuk-lekuk berfungsi untuk memperluas permukaan usus yang berpengaruh terhadap proses penyerapan makanan. Pada lapisan epitel jejunum terdapat sel goblet untuk melindungi sel epitel usus dengan menghasilkan mukus glikoprotein

(Kim dan Khan, 2013). Pada kelompok K-, susunan epitel kolumnar selapis terlihat sangat rapi dengan adanya sel goblet di antara epitel dan tidak terjadi erosi. Selain itu, vili juga terlihat panjang dan utuh. Di bawah ini (**Gambar 5.3**) merupakan gambaran histopatologi jejunum kelompok tikus kontrol negatif (K -).

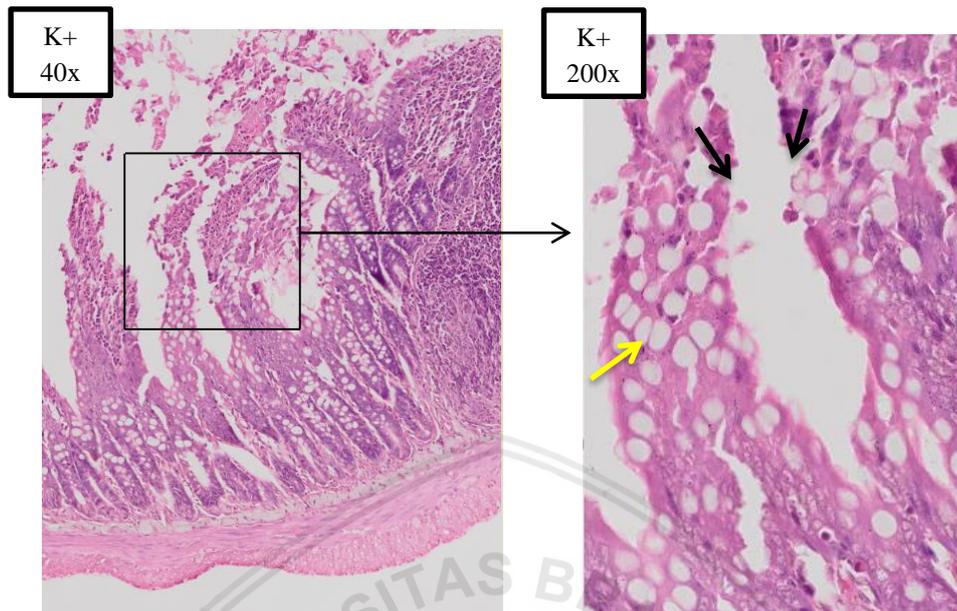


Gambar 5.3 Gambaran Histopatologi Jejunum Kontrol Negatif dengan Perbesaran 40x dan 200x.

→ : Sel Goblet

→ : Epitel Kolumnar Simpleks

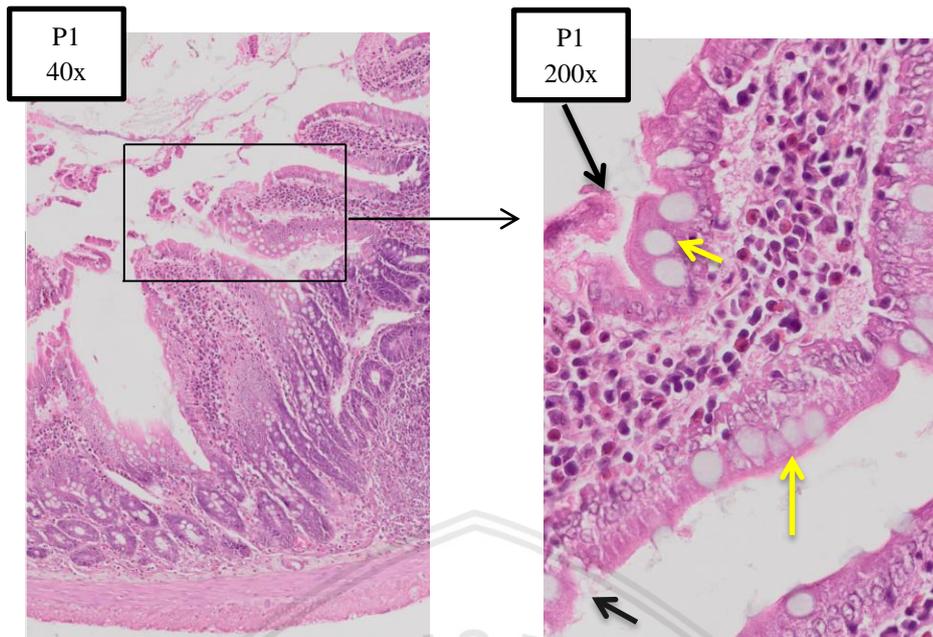
Gambaran histopatologi jejunum pada kelompok tikus kontrol positif (K+) yang diinfeksi bakteri *Salmonella sp* tanpa pemberian sinbiotik terlihat pada **Gambar 5.4** di bawah ini. Gambaran histopatologi tersebut menunjukkan adanya kerusakan pada vili jejunum berupa erosi epitel vili jejunum dan hiperplasia sel goblet. Epitel tampak tidak rapi dan bahkan menghilang karena erosi. Sel goblet juga mengalami hiperplasia dibandingkan dengan kontrol negatif.



Gambar 5.4 Gambaran Histopatologi Jejunum Kontrol Positif dengan Perbesaran 40x dan 200x.

- : Erosi Epitel Vili
- : Hiperplasia Sel Goblet

Gambaran histopatologi jejunum pada kelompok perlakuan 1 (P1) yang diberi perlakuan dengan pemberian sinbiotik kombinasi *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* 0.2%/10 gr pakan terlihat pada **Gambar 5.5** di bawah ini. Pada gambaran histopatologi tersebut terlihat terjadi erosi epitel vili jejunum jika dibandingkan dengan kontrol negatif namun erosi tidak separah kontrol positif. Selain itu terlihat adanya hiperplasia sel goblet namun tidak sebanyak kontrol positif.

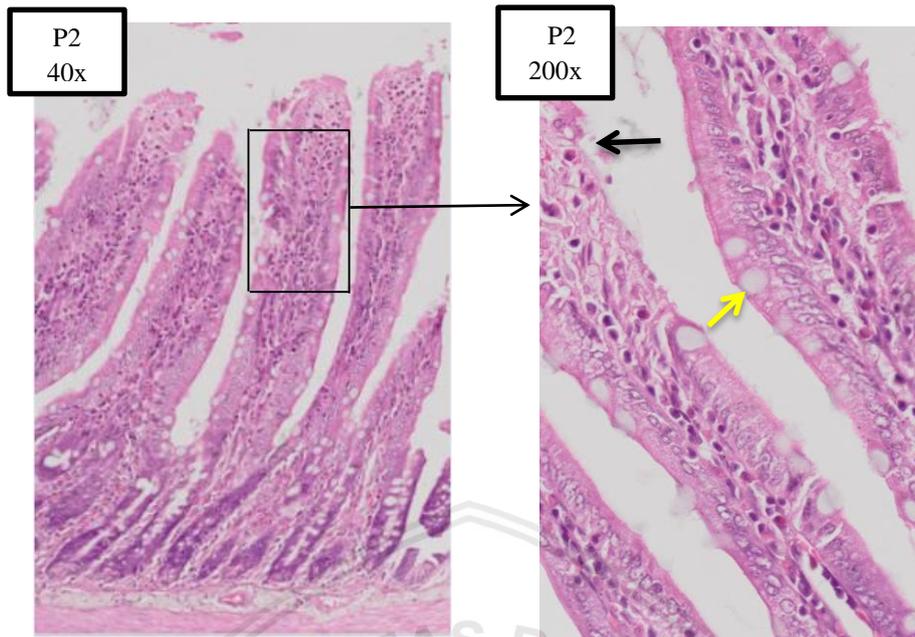


Gambar 5.5 Gambaran Histopatologi Jejunum Perlakuan 1 (P1) dengan Perbesaran 40x dan 200x.

→ : Erosi Epitel Vili

→ : Hiperplasia Sel Goblet

Gambaran histopatologi jejunum pada kelompok perlakuan 2 (P2) yang diberi perlakuan dengan pemberian sinbiotik kombinasi *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* 0.4%/10 gr pakan terlihat pada **Gambar 5.6** di bawah ini. Kerusakan epitel vili jejunum terlihat tidak separah kelompok kontrol positif dan perlakuan 1. Deretan sel epitel sudah terlihat lebih rapi dan hiperplasia sel goblet berkurang dibandingkan kontrol positif dan perlakuan 1.



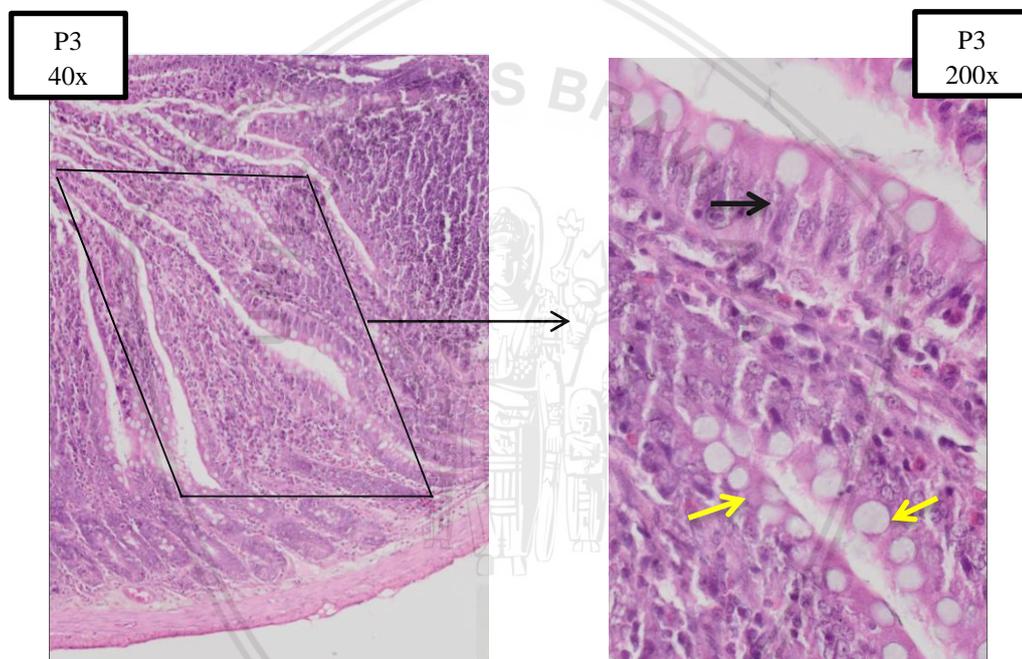
Gambar 5.6 Gambaran Histopatologi Jejunum Perlakuan 2 (P2) dengan Perbesaran 40x dan 200x.

→ : Erosi Epitel Vili

→ : Sel Goblet

Gambaran histopatologi jejunum pada kelompok perlakuan 3 (P3) yang diberi perlakuan dengan pemberian sinbiotik kombinasi *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* 0.6%/10 gr pakan pada **Gambar 5.7** di bawah ini terlihat kerusakan struktur vili jejunum tidak separah kontrol positif dan perlakuan lainnya. Terjadi hiperplasia sel goblet lebih dari P1, P2 dan K- namun tidak sebanyak K+. Struktur epitel terlihat rapi serta vili terlihat lebih panjang dan lebar. Perpanjangan vili diduga dikarenakan efek dari *Mannan Oligosakarida* (MOS) *Spirulina platensis* dimana Ferket *et al* (2002) menyatakan bahwa pemberian MOS dapat meningkatkan panjang vili pada kalkun. Peningkatan panjang dan lebar vili usus dapat terjadi karena adanya fermentasi MOS oleh bakteri dalam sekum dan kolon yang menghasilkan asam lemak rantai pendek khususnya butirir yang dapat meningkatkan proliferasi enterosit. Butirir

merupakan sumber energi untuk sel-sel kolonosit sehingga menstimulir proliferasi sel epitel dan terjadinya pembebasan sitokin. Butirat berperan dalam perbaikan mukosa usus dan proses inflamasi. Selain itu, sel goblet terlihat mengalami perbanyakan dibandingkan kelompok perlakuan 2 (P2), hal ini bisa disebabkan karena MOS juga mampu meningkatkan perlindungan mukosa yang non spesifik dengan jalan peningkatan jumlah relatif sel goblet dan sekresi mucus (Ferket, *et al.*, 2002).



Gambar 5.7 Gambaran Histopatologi Jejunum Perlakuan 3 (P3) dengan Perbesaran 40x, 100x dan 200x.

→ : Epitel Kolumnar Simpleks

→ : Hiperplasia Sel Goblet

Pada penelitian ini, kerusakan epitel vili jejunum paling parah yaitu pada kelompok kontrol positif yang diinfeksi *Salmonella sp* tanpa pemberian sinbiotik. Infeksi *Salmonella* terjadi dalam beberapa tahap yaitu adhesi, perasukan (invasi), kolonisasi, dan eksudasi (pengeluaran cairan). *Salmonella* mempunyai *fimbriae*

untuk melekat pada mukosa usus. *Fimbriae Salmonella sp* akan berikatan dengan masing-masing reseptor host pada mukosa usus. Penempelan inilah yang menyebabkan infeksi dan merusak sel-sel epitel jejunum. Setelah adhesi, *Salmonella* akan menembus sel-sel epitel (terutama sel-M) dan selanjutnya ke lamina propia. Interaksi antara *Salmonella* dengan sel M atau epitel akan menggerakkan sel pertahanan terutama neutrofil dan makrofag (Desai, 2011).

Pencegahan kerusakan struktur vili jejunum paling efektif yaitu pada perlakuan 3 kemudian perlakuan 2 dan terakhir yaitu perlakuan 1. Hal ini menunjukkan efektivitas dari sinbiotik dosis 0.04% / 10 gr pakan dan 0.06% / 10 gr pakan. Adanya aktivitas antibakteri, antiinflamasi dan antioksidan dari *Lactobacillus acidophilus* menyebabkan penurunan produksi dan aktivitas dari sel radang. Aktivitas antioksidan *Lactobacillus acidophilus* yaitu menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan stress oksidatif sehingga menimbulkan kerusakan jaringan (Wen, *et al.*, 2016). Adapun aktivitas antiinflamasi *Lactobacillus acidophilus* yaitu meningkatkan produksi sitokin anti inflamasi dan mencegah pembentukan sitokin pro inflamasi dengan menghambat jalur sinyal transduksi sitokin pro inflamasi (Weiner, *et al.*, 2000). Kemampuan antibakteri *Lactobacillus acidophilus* mencegah kolonisasi *Salmonella sp*. *Lactobacillus acidophilus* akan memenuhi mukosa usus melalui pengikatan dengan mannan epitel mukosa usus sehingga dapat mencegah adhesi *Salmonella sp* yang bisa menghindari kerusakan mukosa jejunum (Papoff, *et al.*, 2012).

Salmonella berkembang biak di lamina propria dan difagosit oleh sel-sel fagosit terutama oleh makrofag. *Salmonella* bersifat fakultatif intraselluler yang dapat hidup bahkan berkembang biak di dalam makrofag. Setelah itu, *Salmonella* akan menyebar melalui peredaran darah sehingga terjadi bakteremia pertama yang asimtomatis, lalu masuk ke organ-organ terutama hepar dan sumsum tulang yang dilanjutkan dengan pelepasan *Salmonella* dan endotoksin ke peredaran darah sehingga menyebabkan bakteremia kedua. Efek endotoksin yang pertama yaitu akan meningkatkan permeabilitas sistem vaskular dan nervus yang termanifestasi serta menurunkan tekanan darah, gangguan regulasi termal, muntah, dan diare. Kemudian tahap pengaktifan pengeluaran cairan terjadi akibat aktivitas adenil siklase oleh infeksi *Salmonella* yang dapat menginduksi respon sekretori, sehingga terjadi akumulasi cairan dalam lumen usus (Giannella, 2004). Hal inilah yang menyebabkan adanya hiperplasia sel goblet.

Sel goblet mensintesis dan mensekresi mukus glikoprotein berbentuk gel untuk melindungi sel-sel epitel intestinal dari serangan antigen membantu penyerapan makanan di usus sehingga lebih maksimal. Aktivasi sitokin yang dilepaskan oleh sel Th-2 merangsang proliferasi sel goblet. Mukus sel goblet dapat menjadi barrier penting dalam mempertahankan mikroflora dan ekologi usus halus dengan menjebak serta menghilangkan mikroorganisme dan menghasilkan IgA sebagai sistem kekebalan (Balqis, *et al.*, 2007).

Pada penelitian ini, sel goblet terbanyak terdapat pada kontrol positif yaitu kelompok tikus yang diinfeksi *Salmonella sp* tanpa pemberian sinbiotik. Kelompok tikus perlakuan 3 memiliki jumlah sel goblet terbanyak setelah kontrol positif yang diikuti perlakuan 1 lalu perlakuan 2 yang memiliki jumlah sel goblet

paling sedikit. Jumlah sel goblet pada kelompok perlakuan 3 lebih banyak daripada perlakuan 1 dan 2 dikarenakan pemberian dosis sinbiotik terbanyak yaitu 0.06% / 10 gr pakan. Pengaruh dosis tersebut dikarenakan *Mannan oligosakarida* (MOS) dari *Spirulina platensis* mampu meningkatkan perlindungan mukosa yang non spesifik dengan jalan peningkatan jumlah relatif sel goblet dan sekresi mucus (Ferket, *et al.*, 2002). Sel goblet pada perlakuan 2 lebih sedikit dibandingkan perlakuan 1 dikarenakan dosis sinbiotik pada perlakuan 1 kurang efektif dalam membunuh *Salmonella sp* sehingga kurang dalam meningkatkan produksi sel goblet untuk perlindungan mukosa jejunum.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa dosis sinbiotik paling efektif yaitu pada perlakuan 3 dengan pemberian sinbiotik sebanyak 0.06% / 10 gr pakan yang ditunjukkan dengan kondisi struktur jejunum yang paling mendekati kontrol negatif serta adanya hiperplasia sel goblet yang dikarenakan pengaruh efektif dari MOS. Kemudian diikuti kelompok perlakuan 2 yang menunjukkan kerusakan epitel vili jejunum tidak separah kelompok perlakuan 1 dan kontrol positif, serta sel goblet menurun karena efektivitas *Lactobacillus acidophilus* dalam membunuh *Salmonella sp*. Pada perlakuan 1 sinbiotik memberikan efek pencegahan kerusakan vili lebih baik dibandingkan kontrol positif namun lebih parah dari perlakuan 2 dan 3, serta sel goblet mengalami perbanyakan dibandingkan perlakuan 2 namun tidak sebanyak kontrol positif dan perlakuan 3. Hal ini diduga karena dosis sinbiotik yang diberikan kurang efektif dalam membunuh *Salmonella sp* sehingga sel goblet yang diproduksi lebih banyak sebagai bentuk pertahanan tubuh terhadap perkembangan *Salmonella* yang meningkat.

BAB 6. PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa pemberian sinbiotik kombinasi *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* dapat mencegah terjadinya salmonellosis pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinfeksi *Salmonella sp* yang dibuktikan dengan minimalnya kerusakan epitel vili jejunum serta adanya penurunan jumlah relatif IFN- γ limpa pada setiap perlakuan.

6.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menentukan atau mengidentifikasi komponen kimia lain yang terkandung dalam *Spirulina platensis* dengan beberapa bakteri lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., & Pillai, S..2014. *Basic Immunology*. Fourth Edition. Philadelphia :Elsevier, Saunders.
- Adam, S. 1995. *Dasar – Dasar Patologi*. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Akbar B. 2010. *Tumbuhan Dengan Kandungan Senyawa Aktif Yang Berpotensi Sebagai Bahan Antifertilitas*. Jakarta: Adabia Press.
- Alisantosa B., H.L . Shivaprasad., A.S . Dhillon., O. Schaberg And D. Bandli. 2000. *Pathogenicity Of Salmonella Enteritidis Phage Types 4, 8 And 23 In Specific Pathogen Freen Chicks*. Avian path. 29 : 583-592.
- Ariyanti, T dan Supar. 2008. *Antigenisitas dan Immunogenisitas Salmonella Enteritidis: Implikasinya dalam Diagnosis dan Pengembangan Vaksin Isolat Lokal untuk Unggas*. Bogor : Balai Besar Penelitian Veteriner.
- Arlyza IS. 2005. *Isolasi Pigmen Biru Dari Mikroalga Spirulina Platensis. Oseanologi Dan Limnologi Indonesia*. No.38:79-92.
- Asmawati. 2013. *The Effect of In Ovo Feeding On Hatching Weight and Small Intestinal Tissue Development of Native Chicken*. (Disertasi) . Makassar : Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin.
- Baderuddin, H. Q., I.Ardiansyah., A.Y.Bachtiar., K. Sholiha dan E. Wulandari. 2016. *Syn-Molacto: Efektifitas Kolaborasi Mannan-Oligosakarida (MOS) dari Yeast Cell Wall dengan Lactobacillus sp Terenkapsulasi Ubi Jalar sebagai Sinbiotik Unggul dalam Penanganan Salmonellosis Ayam Broiler*. Malang : Universitas Brawijaya.
- Balqis, U., T.Risa ., B.P Pontjo, dan Darmawi. 2007. *Proliferasi Sel Goblet Duodenum, Jejunum, dan Ileum Ayam Petelur yang Diimunisasi dengan Protein Ekskretori Ascaridia galli*. Jurnal Kedokteran Hewan. 1 (2) : 70-75.
- Baratawidjaja, K.G dan I. Rengganis. 2009. *Imunologi Dasar*. Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Benjamini, E., P. Coico., G. Sunshine. 2000. *Immunology: A Short Course*. Edisi Keempat, Canada : 20-21, Willey-Liss, Inc.
- Bisson, L. 2001. *The Alcoholic Fermentation Section 3*. University of California at Davis. University Extention: 91- 92.
- Bray, J.L. 2008. *The Impacts On Broiler Performance And Yield By Removing Antibiotic Growth Promoters And An Evaluation Of Potential Alternatives*.Texas : A&M University.

- Desai, P.T. 2011. *Molecular Interactions of Salmonella with the Host Epithelium in Presence of Commensals*. Utah State University.
- Dharmojoono. 2001 . *Penyakit Tifus (Salmonellosis)* . Dalam Penyakit Menular Dari Binatang Ke Manusia . Edisi Pertama . Milenia Populer. hlm . 111-121
- Eroschenko, V.P.2008. *Atlas Histologi*. Fiore: Dengan Korelasi Fungsional (11th ed). Jakarta: EGC, 2008; p. 303-10.
- Ferket, P.R., C.W Parks and J.L Grimes. 2002. *Benefits Of Dietary Antibiotic And Mannanligosaccharide Supplementation For Poultry*. Multi-State Poultry Meeting. 14-16 Mei 2002.New York, USA.
- Fernando., M. T. Muhammad dan I. P. Miranti .2016. *Pengaruh Pemberian Ranitidine Terhadap Histopatologi Hipokampus Tikus Wistar Dengan Intoksikasi Metanol Akut* .Semarang : UNDIP.
- Firdaus, M., D. Setijawati dan Kartikaningsih. 2014. *The Effect of Lactobacillus acidophilus Microcapsule Which Encapsulated by Kappa Caragenan Toward In-Vivo Functional Test*. Malang : Brawijaya University.
- Gast, K.R. 2003. *S. Enteritidis*. Dalam: B.W. Calnek, W.B. Charles, R.N.D. Larry, D\ dan Y.M. Saif. (Editors). *Disease Of Poultry.10th Edition*. USA : IOWA State University Press.
- Giannella, R.A. 2004. *Salmonella in* : Baron S, ed. *online version of the Medical Microbiology textbook*. <<http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch021.html>> [Diakses Tanggal 19 Oktober 2018 Pukul 13.07].
- Guarner, F dan J.R Malagelada. 2003. *Gut Flora In Health and Disease*. Lancet 361 : 512-519. DOI : 10.1016/S0140-6736(03)12489-0.
- Haryati, T. 2011. *Probiotik Dan Prebiotik Sebagai Pakan Imbuhan Nonruminansia*. Wartazoa 21(3) : 125 – 132.
- Janvier, L 2013. *Research Model: Sprague Dawley Rat*.<<http://www.janvier-labs.com/rodent-research-models-services/research-models/perspecies/outbred-rats/product/sprague-dawley.html>> [Diakses Tanggal 19 Oktober 2018 Pukul 12.05].
- Jusuf, A.A. 2009. *Histoteknik Dasar*. Jakarta : FKUI.
- Kailasapathy, K ., K. Sultana and G. Godward. 2000. *Probiotic Bacteria : Improved Delivery by Bioencapsulation*. Probiotica. 9 : 2-7.

- Kompiang, I. P. 2009. *Pemanfaatan Mikroorganisme Sebagai Probiotik Untuk Meningkatkan Produksi Ternak Unggas Di Indonesia*. Pengembangan Inovasi Pertanian 2 (3) : 177 – 191.
- Kusriningrum, RS. 2008. *Buku Ajar Perancangan Percobaan*. Surabaya : Fakultas kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Manojlović V., V. A. Nedović, k. Kailasapathy and N.J. Zuidam. 2010. *Encapsulation Of Probiotics For Use In Food Products*. In *Encapsulation Technologies For Active Food Ingredients And Food Processing*. Pp. 269-302: Springer.
- Mansjoer, S. 2005. *Klasifikasi, Efek Farmakologi dan Indikasi Interferon*. Sumatera Utara : Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara.
- Medzhitov, R and C. Janeway. 2000. *Innate Immunity*. In. Mackay, I and F.S Rosen (Ed). *Advances in Immunology*. The New England J. O. Med (review article); 338-344.
- Myint, M.S. 2004. *Epidemiology Of Salmonella Contamination Of Poultry Meat Products: Knowledge GAPS In The Farm To Store Product*. Faculty of the Graduate School of the University of Maryland.
- Nava, P., S. Koch., M.G.Laukoetter., and W.Y.Lee. 2010. *Interferon- γ Regulates Intestinal Ephytelial Homeostasis through Converging β -Catenin Signaling Pathways*. USA : Emory University School of Medicine.
- Nirmagustina DE. dan Chandra UW. 2014. *Potensi susu kedelai asam (soygart) kaya bioaktif peptida sebagai antimikroba*. Jurnal Penelitian Pertanian Terapan. 14(3):158-166.
- Norciantri, K.A., I.N.Sujaya dan N.Y. Puspawati. 2014. *Pengembangan Probiotik Lactobacillus sp. SKG34 serta Formulasinya dalam Bentuk Pangan Fungsional*. Bali : Universitas Udayana.
- Oliveira, E.G., G.S Rosa, M.A Moraes., and L.A.A Pinto. 2008. *Phycocyanin Content Of Spirulina Platensis Dried In Spouted Bed And Thin Layer*. *Journal of Food Process Engineering*, 31(1): 34-50.
- Papoff, P. G., G. Ceccarelli., C. d’Ettorre., and E. Cerasaro. 2012. *Gut Microbial Translocation in Critically III Children and Effects of Supplementation wih Pre- and Pro Biotics*. *International Journal of Microbiology*. 2012:1-8.
- Paulsen, D.F. 2000. *Histology of Cell and Biology*. New York : Medical Publishing Division.

- Permatasari, A. K., K.A. Nocianitri, dan A.S. Duniaji. 2013. *Viabilitas Lactobacillus rhamnosus SKG 34 dalam Berbagai Jenis Enkapsulan dan Suhu Penyajian*. Bali : Universitas Udayana.
- Poeloengan, M., I, Komala Dan S.M Noor. 2004. *Bahaya Salmonella Terhadap Kesehatan*. Bogor : Balai Penelitian Veteriner.
- Pramesti, R dan N. Widyasari. 2014. *Pengaruh Pemberian Jus Daun Ubi Jalar (Ipomoea Batatas (L.) Lam) Terhadap Kadar Kolesterol LDL Tikus Wistar Jantan (Rattus Norvegicus) Yang Diberi Pakan Tinggi Lemak*. Semarang : UNDIP.
- Pratomo, H., I. Supriatna dan Winarto. 2011. *Perubahan Sebaran Sel-Sel Asidofil dan Basofil Hipofisa Pengaruh Pemberian Pasar Bumi (Eurycoma longifolia Jack)*. Jurnal Matematika Sains dan Teknologi. 12 (2), Pp : 80-91.
- Presscot and Harley. 2002. *Laboratory Exercise in Microbiology*. USA. McGrawHill Publisher, pp 116.
- Primajati, S.E. 2011. *Deteksi Bakteri Patogen Salmonella Spp Dan Listeria Monocytogenes Pada Karkas Ayam Broiler Segar Yang Beredar Di Kota Malang*. Malang : Universitas Brawijaya.
- Priyadarsini KI. 2005. *Molecular Mechanism Involving Free Radical Reaction of Antioxidant and Radioprotector*. Founder Day Special Issue. 115-119.
- Ray B & A Bhunia, 2008. *Fundamental of Food Microbiology Fourth ed*. CRC Press. London, New York.
- Roit, I. 2004. *Essensial immunology, 8th ed*. Jakarta : Widya Medika. Hal : 243-8.
- Saniwati., Nuraini., dan D. Agustina. 2015. *Studi Residu Antibiotik Daging Broiler Yang Beredar Di Pasar Tradisional Kota Kendari*. Fakultas Peternakan Halu Oleo. Jitro Vol. 1. No 3. Mei. 2015.
- Schlundt, J ., H . Toyofuku., J . Jansen And S .A. Herbst. 2004 . *Emerging Food-Borne Zoonoses* . Rev . Sci . Tech .Off. Int . Epiz. 2 3 (2) : 512-515 ; 522-527
- Serbeniuk, F. 2002. *Non-Typhoidal Salmonella*. <Http://Www.Wou.Edu/Las/Nat sci_Math/Biology/Boomer/Bio440/EmErging2002/Salmonella2>.[Diakses Tanggal 19 Oktober 2018 Pukul 09.14].
- Setia, Y.D. 2015 . *Laporan Praktikum Instrumen Dan Teknologi Analisis Flowcytometry Pemeriksaan Sel T Cd4 dan Cd8*. Malang : FK UB.
- Sharp, P and Villano J. 2013. *The Laboratory Rat*. Second edition. Boca Raton: CRC Press.

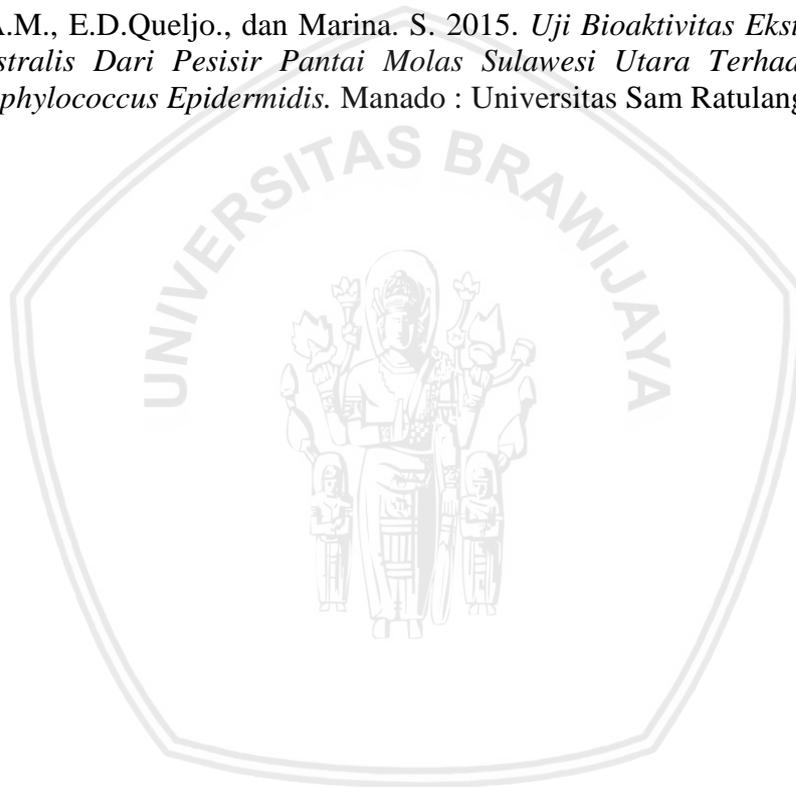
- Siagian, Y.A. 2016. *Gambaran Histologis Dan Tinggi Vili Usus Halus Bagian ileum Ayam Ras Pedaging Yang Di Beri Tepung Daun Kelor (Moringa Oleifera) Dalam Ransum*. Makassar : Universitas Hasanuddin.
- Standar Nasional Indonesia. 2009. *Batas Maksimum Cemaran Mikroba dalam Pakan*. Jakarta : Badan Standarisasi Nasional.
- Soeharsono. dan R. Safitri. 2010. *Interaksi Mikrobial Dalam Usus*. In. *Probiotik: Basis Ilmiah, Aplikasi dan Aspek Praktis*. Soeharsono (ed). Bandung : Widya Padjajaran. Hal. 73-91.
- Spearman, K. R. (2004) Effect of mannanoligosaccharide (MOS) supplementation on the immune status of mares and their foals. Thesis. University of Florida. Florida, USA.
- Subowo. 2002. *Histologi Umum*. Jakarta : Bumi Aksara.
- Tidona, F., A. Criscione., and A.M. Guastella. 2009. *Bioactive Peptides in Dairy Products*. Ital J Anim Sci. 8 : 315-340.
- Weiner, H.L, C.A Lemere., and R. Maron. 2000. *Nasal Administration Of Amyloid-B Peptide Decreases Cerebral Amyloid Burden In A Mouse Model Of Alzheimer's Disease*. Ann Neurol. 2000;48(4):567-579. doi: 10.1002/1531-8249(200010)48:4<567::AID-ANA3>3.0.CO;2-W
- Wen, L., K. Philip and N. Ajam . 2016. *Purification, characterization Science and Technology and mode of action of plantaricin K25 produced by Lactobacillus*. 60, 430-439.
- Widiyaningsih, E.N. 2011. *Peran Probiotik untuk Kesehatan*. Program Studi Gizi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah. Jurnal Kesehatan, ISSN 1979-7621, Vol. 4, No. 1, Juni 2011: 14-20.
- Willey, M.J., L.M. Sherwood and C.J. Wolverton. 2008. *Microbiology 7th Edition*. New York : Mc Graw Hill.
- Winarno, F. G. 2002. *Pangan Gizi Teknologi dan Konsumen*. Jakarta : PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Wiryanawan, K.G., S. Suharti dan M. Bintang. 2005. *Kajian Antibakteri Temulawak, Jahe dan Bawang Putih terhadap Salmonella typhimurium serta Pengaruh Bawang Putih terhadap Performans dan Respons Imun Ayam Pedaging*. Media Peternakan 28 (2):52-62.
- World Health Organization . 2002 . *Risk Assessments Of Salmonella In Eggs And Broiler Chickens* . In : *Microbiological Risk Assessment Series 1* . Food And Agriculture Organization Of The United Nation . Pp.1-41 .

Yang, S., J. Chen., H. Shang., T. Cheng., and S.C Tsou. (2005). *Effect Of Synbiotics On Intestinal Microflora And Digestive Enzyme Activities In Rats*. World J Gastroenterol. 11(47): 7413-7417.

Yunus, R., R.Mongan dan Rosnani. 2017. *Cemaran Bakkteri Gram Negatif Pada Jajanan Siomay Di Kota Kendari*. Kendari : Poltekkes Kemenkes Kendari.

Zamora, L.M., C. Carretero and D. Pares. 2006. *Comparative Survival Rates of Lactic Acid Bacteria Isolate Prem Blood, Following Spray Drying and Freeze Drying*. Food Science Technology International. 12 (1) : 77-84.

Zen, N.A.M., E.D.Queljo., dan Marina. S. 2015. *Uji Bioaktivitas Ekstrak Padina Australis Dari Pesisir Pantai Molas Sulawesi Utara Terhadap Bakteri Staphylococcus Epidermidis*. Manado : Universitas Sam Ratulangi.



Lampiran 1. Keterangan Laik Etik



**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARANCE"**

No: 944-KEP-UB

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:**

PENELITIAN BERJUDUL : FAFA (FEED ADDITIVE FOR ALTERNATIVE
ANTIMICROBIAL): SINBIOTIK MIKROENKAPSULASI
Spirulina plantesis DAN *Lactobacillus acidophilus*
TERHADAP SALMONELLOSIS

PENELITI : EKA WULANDARI

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 16 April 2018
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya



Prof.Dr.drh. Aulanni'am, DES.
NIP. 19600903 198802 2 001

Lampiran 2. Surat Keterangan Tikus Sehat



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
LABORATORIUM JURUSAN BIOLOGI
Jl. Gajayana 50 Malang, telp. (0341) 558933

SURAT KETERANGAN PEMBELIAN HEWAN COBA
NOMOR : 015/HC/5/2018

Dengan ini menerangkan bahwa:

Nama : Eka Wulandari
Status : Mahasiswa Universitas Brawijaya
Hp/ Telp. : 0812-3021-6946
telah membeli Tikus Wistar dengan kriteria sebagai berikut:
Jenis Kelamin : Jantan
Kondisi Hewan : Sehat
Jumlah Hewan : 25 ekor
Berat badan rata-rata : 100 gr
Digunakan untuk : Penelitian
Asal Hewan : Lab. Fisiologi Hewan UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
Demikian surat keterangan kami buat untuk dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Malang, 7 Mei 2018
Ttd.

M. Basyaruddin, M.Si

Lampiran 3. Hasil Reidentifikasi *Salmonella* sp



SNI ISO/IEC 17025 : 2008
LP-618/JDN



ILAC - MRA





SNI ISO 9001 : 2008
ID: 824 100 12211



No. Surat : **09028**
 Lampiran :
 Penhal : Hasil Uji Laboratorium
 Tgl Kirim / No : 03 Juli 2018
 Tgl Terima : 03 Juli 2018
 No EPI : 04181036
 Jenis Layanan : Perorangan
 Tgl Jawab : 10 Juli 2018

KEPADA YTH:
Eka Wulandari
Jl. Raya Dieng Atas, Kalisongo, Dau, Malang
Malang

Hasil Uji											
No	Kecamatan	Desa	Pemilik	Lab Uji	Jenis Uji	Jum	Pos	Neg	Sero+	Sero-	Lainnya
1.	Dau	Kalisongo	Lab mikrobiologi Bakteriologi dan Imunologi FKH UB		Salmonella sp isolasi	1	1	0	0	0	0

Kesimpulan / Diagnosa			
No	Kecamatan	Desa	Diagnosa
1.	Dau	Kalisongo	SALMONELLOSIS POSITIF (1)



MT/DWI Laboratorium,
 Drh. Suhardi
 NIP. 197407022008011007



PJ/Wakil PJ Laboratorium
 drh. Cicilia S.R., MSc
 NIP. 19791108 200501 2 003

Tembusan:

- Kepala Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan Kab. Malang
- Arsip

Lampiran 4. Perhitungan Dosis

Perhitungan pakan untuk tikus dengan berat 100 gram

$$\begin{aligned}\text{Jumlah pakan} &= 10\% \times \text{BB} \\ &= 10\% \times 100 \\ &= 10 \text{ gram/ekor/hari}\end{aligned}$$

1. Perhitungan dosis dan jumlah pemberian sinbiotik Perlakuan 1 (0.2%/10 gr pakan)

$$\begin{aligned}\text{Dosis P1} &= 0.2\% \times 10 \text{ gram} \\ &= 0.002 \times 10 \text{ gram} \\ &= 0.02 \text{ gram}\end{aligned}$$

Jadi, jumlah pemberian sinbiotik P1 adalah 0.02 gram /ekor/hari

2. Perhitungan dosis dan jumlah pemberian sinbiotik Perlakuan 2 (0.4%/10 gr pakan)

$$\begin{aligned}\text{Dosis P2} &= 0.4\% \times 10 \text{ gram} \\ &= 0.004 \times 10 \text{ gram} \\ &= 0.04 \text{ gram}\end{aligned}$$

Jadi, jumlah pemberian sinbiotik P2 adalah 0.04 gram/ekor/hari

3. Perhitungan dosis dan jumlah pemberian sinbiotik Perlakuan 3 (0.6%/10 gr pakan)

$$\begin{aligned}\text{Dosis P3} &= 0.6\% \times 10 \text{ gram} \\ &= 0.006 \times 10 \text{ gram} \\ &= 0.06 \text{ gram}\end{aligned}$$

Jadi, jumlah pemberian sinbiotik P3 adalah 0.06 gram/ekor/hari

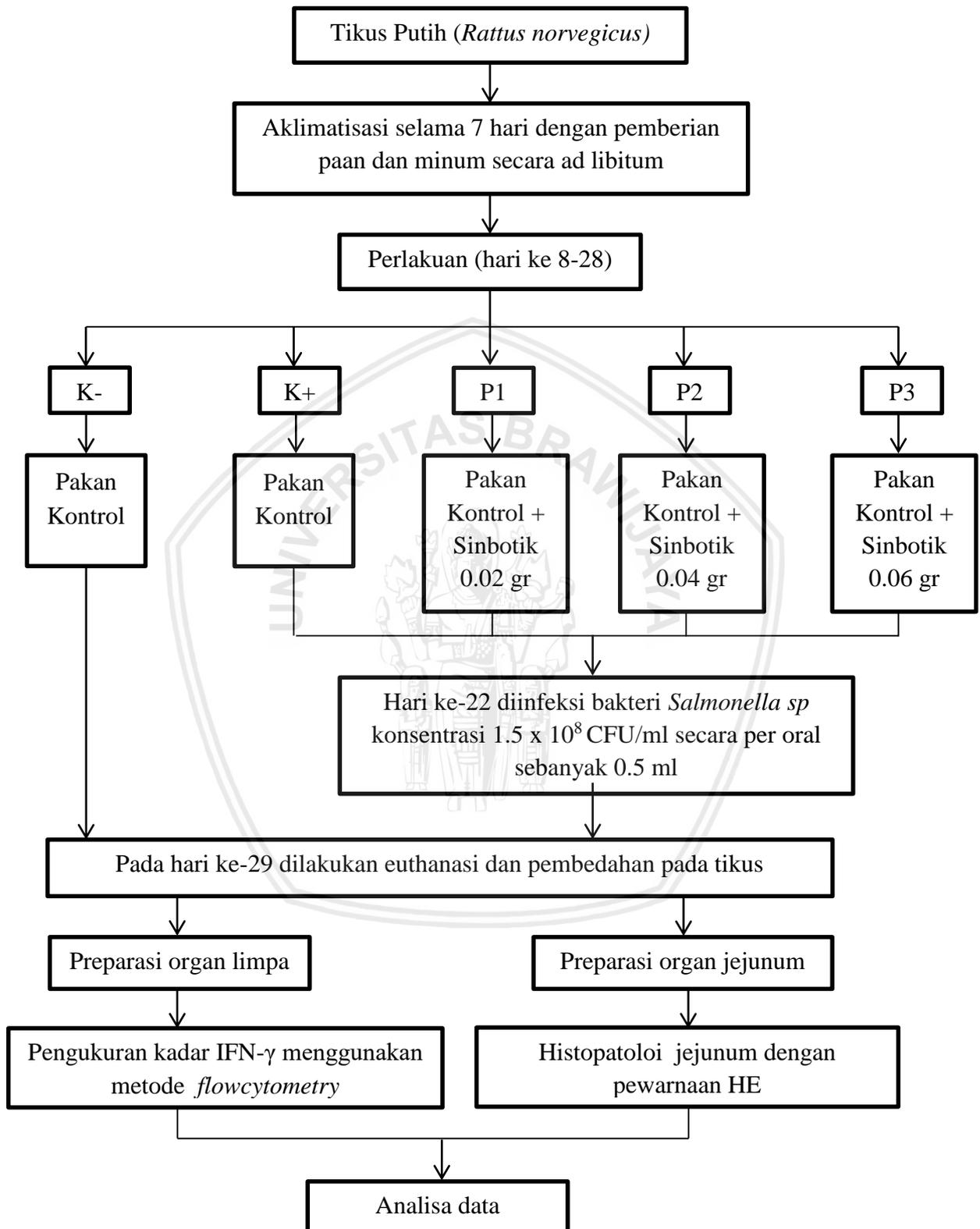
Lampiran 5. Pembuatan Mikroenkapsulasi Sinbiotik

Pembuatan mikroenkapsulasi sinbiotik



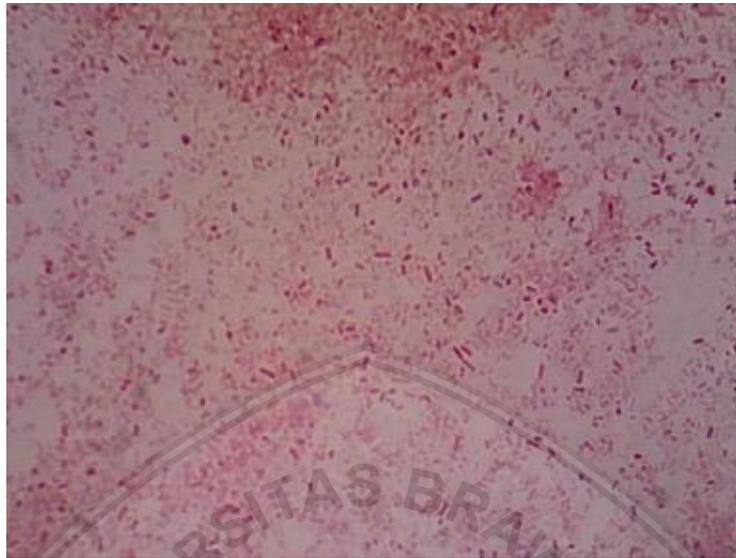
Serbuk mikroenkapsulasi sinbiotik

Lampiran 6. Kerangka Operasional



Lampiran 7. Identifikasi Bakteri *Salmonella sp*

7.1 Pewarnaan Gram



Bakteri *Salmonella sp* dengan pewarnaan gram tampak berwarna merah dan berbentuk batang.

7.2 Isolasi kotoran tikus pada media SSA



Bakteri *Salmonella sp* yang ditumbuhkan pada media SSA tampak membentuk koloni berwarna hitam.

Lampiran 8. Perhitungan Hasil Mikroenkapsulasi Sinbiotik

8.1 Hasil Mikroenkapsulasi Sinbiotik

Bahan yang digunakan :

1. Maltodextrin : 58 gram
2. Aquades : 194 ml
3. Sinbiotik : $\frac{1}{3}$ x enkapsulan

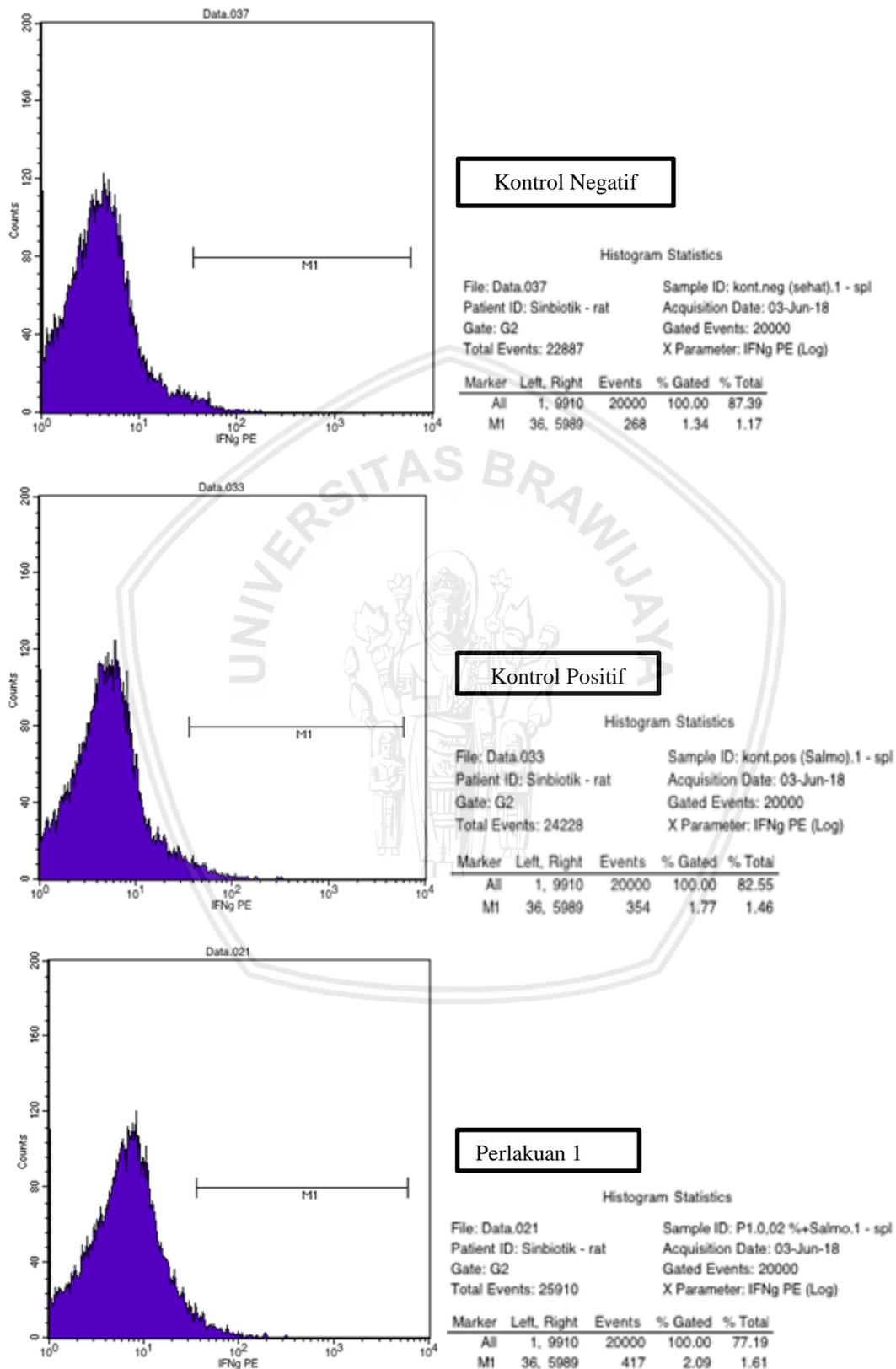
Perhitungan :

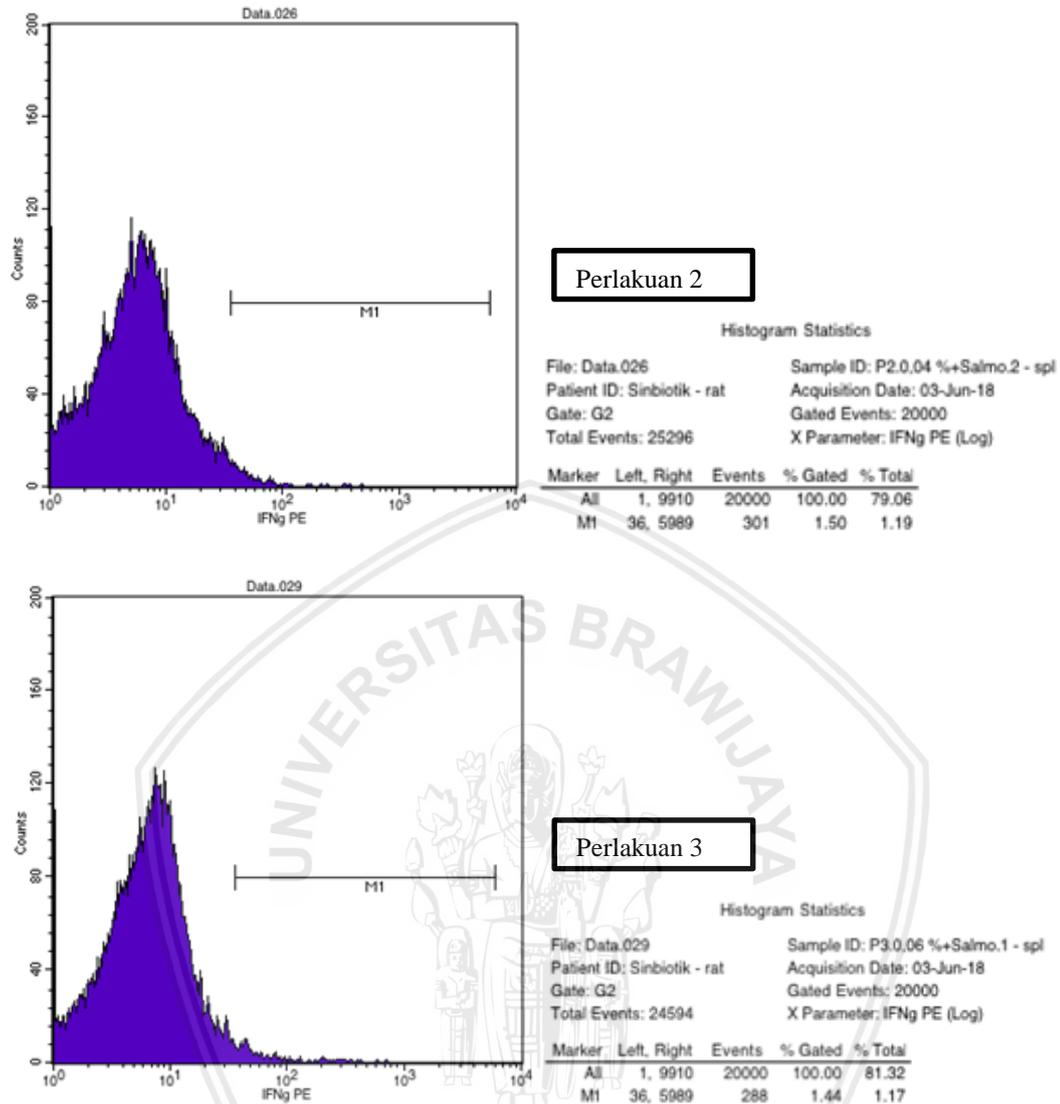
$$\begin{aligned}
 1. \text{ Enkapsulan} &= \text{Maltodextrin} + \text{Aquades} \\
 &= 58 + 194 \\
 &= 252 \\
 2. \text{ Sinbiotik} &= \frac{1}{3} \times \text{enkapsulan} \\
 &= \frac{1}{3} \times 252 \\
 &= 84 \\
 \text{Probiotik : Prebiotik} &= 1 : 2 \\
 (\text{Probiotik} + \text{Prebiotik}) \times &= 84 \\
 (1 + 2) \times &= 84 \\
 \times &= \frac{84}{3} \\
 \times &= 28 \\
 3. \text{ Hasil Mikroenkapsulasi} &= 20\% \times (252 + 84) \\
 &= 20\% \times 336 \\
 &= \pm 67.2 \text{ gram}
 \end{aligned}$$

8.2 Perhitungan jumlah bakteri probiotik dalam sinbiotik

$$\begin{aligned}
 \text{Probiotik} &= \frac{28 \times 1.5 \times 1.00.000.000}{67.2} \\
 &= 6.25 \times 10^7 \text{ CFU/gram}
 \end{aligned}$$

Lampiran 9. Hasil Uji *Flowcytometry*





Tabel 9.1 Hasil Uji *Flowcytometry* Jumlah Relatif IFN- γ Limpa (%)

Perlakuan	Ulangan				Total	Rata-Rata
	1	2	3	4		
K-	1.34	1.91	1.62	0.85	5.72	1.4
K+	1.77	1.85	1.49	1.61	6.72	1.6
P1	2.09	2.34	0.97	0.63	6.03	1.5
P2	1.98	1.50	0.79	1.24	5.51	1.3
P3	1.44	2.06	1.29	0.29	5.08	1.2

Lampiran 10. Analisis Statistik Jumlah Relatif IFN- γ menggunakan software SPSS

Descriptives

Jumlah_Relatif_
IFN- γ

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
kelompok negatif	4	1.4300	.45129	.22565	.7119	2.1481	.85	1.91
kelompok positif	4	1.6800	.16125	.08062	1.4234	1.9366	1.49	1.85
perlakuan 1	4	1.5075	.83492	.41746	.1790	2.8360	.63	2.34
perlakuan 2	4	1.3775	.49735	.24868	.5861	2.1689	.79	1.98
perlakuan 3	4	1.2700	.73344	.36672	.1029	2.4371	.29	2.06
Total	20	1.4530	.53866	.12045	1.2009	1.7051	.29	2.34

Tests of Normality

kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
kelompok negatif	.171	4	.	.983	4	.921
kelompok positif	.212	4	.	.963	4	.796
perlakuan 1	.257	4	.	.886	4	.367
perlakuan 2	.153	4	.	.999	4	.998
perlakuan 3	.261	4	.	.955	4	.747

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

kadar_IFNgamma

Levene Statistic	df1	df2	P-value.
2.401	4	15	.096

ANOVA

kadar_IFNgamma

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P-value
Between Groups	.377	4	.094	.275	.889
Within Groups	5.136	15	.342		
Total	5.513	19			

