

**Pengaruh Pemberian Sinbiotik Gabungan *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* terhadap Kadar Relatif CD68 Limpa dan Gambaran Histopatologi Kolon Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi *Salmonella enteritidis***

**SKRIPSI**

Oleh:

**RIFEN PRABAWAN KRIDA TARUNA WIYATA  
155130100111036**



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

**Pengaruh Pemberian Sinbiotik Gabungan *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* terhadap Kadar Relatif CD68 Limpa dan Gambaran Histopatologi Kolon Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi *Salmonella enteritidis***

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:  
**Rifen Prabawan Krida Taruna Wiyata**  
**155130100111036**



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

## LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Pengaruh Pemberian Sinbiotik Gabungan *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* terhadap Kadar Relatif CD68 Limpa dan Gambaran Histopatologi Kolon Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi *Salmonella enteritidis***

Oleh:

**RIFEN PRABAWAN KRIDA TARUNA WIYATA**  
**NIM. 155130100111036**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
pada tanggal 18 Februari 2019  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh  
gelar Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

**Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS**  
NIP. 19520412 198002 1 001

**drh. Indah Amalia Amri, M.Si**  
NIK. 20130487 0925 2 001

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 : Rifen Prabawan Krida Taruna Wiyata

NIM : 155130100111036

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulis Skripsi berjudul:

Pengaruh Pemberian Sinbiotik Gabungan *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* terhadap Kadar Relatif CD68 Limpa dan Gambaran Histopatologi Kolon Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi *Salmonella enteritidis*.

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 pustaka 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, 18 Februari 2019  
Yang menyatakan,

(Rifen Prabawan Krida)  
NIM. 155130100111036

**Pengaruh Pemberian Sinbiotik Gabungan *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* terhadap Kadar Relatif CD68 Limpa dan Gambaran Histopatologi Kolon Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi *Salmonella enteritidis***

**ABSTRAK**

Sinbiotik adalah gabungan dari probiotik dan prebiotik. Probiotik adalah mikroorganisme yang dapat menekan pertumbuhan bakteri patogen. Mikroorganisme yang digunakan sebagai probiotik salah satunya adalah *Lactobacillus Acidophilus*. Sedangkan prebiotik adalah bahan pangan yang dapat digunakan untuk menunjang kehidupan bakteri baik dalam tubuh. Salah satu bahan yang digunakan sebagai prebiotik adalah *Spirulina platensis*. Pemberian sinbiotik mampu menurunkan efek patogen yang diakibatkan oleh bakteri patogen, termasuk *Salmonella enteritidis*. *Salmonella enteritidis* adalah bakteri patogen penyebab salmonellosis. Salmonellosis adalah penyakit yang sering terjadi pada hewan dan tidak jarang menimbulkan kerugian bagi peternak dengan gejala klinis diare hingga kematian. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian sinbiotik gabungan dari *Lactobacillus Acidophilus* dan *Spirulina platensis* terhadap tikus yang diinduksi *Salmonella enteritidis*. Penelitian ini merupakan penelitian *experimental* menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 20 tikus putih yang dibagi ke dalam 5 perlakuan dengan masing-masing perlakuan terdapat 4 ulangan. P1, P2 dan P3 diberikan sinbiotik masing-masing 0,2%/KgPK 0,4%/KgPK dan 0,6%/KgPK dan diinduksi *Salmonella* 0,5 ml. K+ (Kontrol Positif) induksi *Salmonella* 0,5 ml. *Salmonella enteritidis* yang digunakan sesuai dengan standar *Mc Farland* 0,5. K- (Kontrol Negatif) tanpa perlakuan. Kadar relatif CD68 dihitung menggunakan metode *Flowcytometry* yang dianalisis dengan uji statistik *One Way ANOVA* menggunakan aplikasi MINITAB 18 dan histopatologi kolon menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100x dan 400x. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian Sinbiotik gabungan *L. acidophilus* dan *S. platensis* berpengaruh nyata ( $P<0,05$ ) terhadap penurunan kadar relatif CD68 pada kelompok P3 dan perbaikan gambaran histopatologi kolon pada kelompok P2 dan P3 yang diinduksi *S. enteritidis*.

Kata Kunci : *Sinbiotik, Salmonellosis, CD68, Histopatologi Kolon*

**The Effect of Synbiotic Combination of *Lactobacillus acidophilus* and  
*Spirulina platensis* on Relative Levels of Splenic CD68 and Colon  
Histopathology of the White Rat (*Rattus norvegicus*)  
Induced by *Salmonella enteritidis***

**ABSTRACT**

Sinbiotics are a combination of probiotics and prebiotics. Probiotics are microorganisms that can suppress the growth of pathogenic bacteria. One of the microorganisms used as probiotics is *Lactobacillus Acidophilus*. While prebiotics are foods that can be used to support the life of good bacteria in the body. One of the ingredients used as prebiotics is *Spirulina platensis*. Giving synbiotics can reduce the effects of pathogens caused by pathogenic bacteria, including *Salmonella enteritidis*. *Salmonella enteritidis* is a pathogenic bacterium that causes salmonellosis. Salmonellosis is a disease that often occurs in animals and often causes harm to farmers with clinical symptoms of diarrhea, fever to death. The purpose of this study was to determine the effect of the combined synbiotic administration of *Lactobacillus Acidophilus* and *Spirulina platensis* on rats induced by *Salmonella enteritidis*. This research is an experimental study using a completely randomized design method (CRD) with 20 white rats divided into 5 treatments with each treatment having 4 replications. P1, P2 and P3 are given synbiotics 0.2%/KgPK, 0.4%/KgPK and 0.6%/KgPK and induced *Salmonella* 0.5 ml. K + (Positive Control) induction of *Salmonella* 0.5 ml. *Salmonella enteritidis* which is used in accordance with *Mc Farland standard* 0.5. K- (Negative Control) without treatment. The relative level of CD68 was calculated using the Flowcytometry method which was analyzed by One Way ANOVA statistical test using the MINITAB 18 application and colon histopathology using a light microscope with 100x and 400x magnification. The results of this study showed a significant effect of the combined Sinbiotic administration of *L. acidophilus* and *S. platensis* on a decrease significantly ( $P<0,05$ ) in the relative levels of CD68 in the P3 group and improvement of colon histopathology in P2 and P3 groups induced by *S. enteritidis*.

Keyword : *Sinbiotics, Salmonellosis, CD68, Histopathology Colon*

## KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah penulis haturkan kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan proposal Skripsi yang berjudul “Pengaruh Pemberian Sinbiotik Gabungan *Lactobacillus Acidophilus* dan *Spirulina platensis* Terhadap Kadar Relatif CD68 pada Limpa dan Gambaran Histopatologi Kolon Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi *Salmonella enteritidis*”. Selanjutnya shalawat serta salam selalu ditujukan kepada Nabi Muhammad SAW yang telah mengantarkan umat-Nya dari jaman jahiliyah menuju jaman yang terang benderang dan telah memberikan syafaat-Nya di Akhirat kelak.

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada pihak-pihak yang telah membantu dalam kelancaran Skripsi, diantaranya adalah:

1. Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.app.Sc selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
2. Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS selaku dosen pembimbing 1 yang telah berperan dalam mengarahkan, menasehati, membimbing, memberi support kepada penulis.
3. drh. Indah Amalia Amri, M.Si selaku dosen pembimbing 2 yang telah berperan dalam mengarahkan, menasehati, membimbing, memberi support kepada penulis.
4. drh. Fidi Nur Aini EPD, M.Si selaku dosen penguji 1 yang telah memberi saran dan nasehat yang membangun kepada penulis.
5. drh. Galuh Chandra Agustina, M.Si selaku dosen penguji 2 yang telah memberi saran dan nasehat yang membangun kepada penulis.
6. Kepada Bapak, Ibu dan kakak yang selama ini memberi dukungan baik moril maupun materil dan doa yang tidak ada henti-hentinya.
7. Seluruh keluarga besar Soeparno dan Trimo yang turut mendukung.
8. Kepada Bu Sri Murwani dan Bu Dahliatul Qosimah yang memberi inspirasi dan motivasi penulis serta layaknya ibu kedua.

9. Kepada Eka Wulandari, Safira Zulfaya, Bestari Ebbi dan Syaiful Haq Baderuddin selaku teman seperjuangan Skripsi dan Penelitian.
10. Seluruh anggota Classy Class yang memberikan inspirasi, semangat dan kenyamanan kepada penulis selama kuliah.
11. Seluruh keluarga Kontrakkan yang selama ini telah menemani dalam suka dan duka.
12. Kepada keluarga besar laboratorium Mikro-Imun yang telah memberikan kesempatan penulis untuk belajar menjadi orang sibuk.
13. Civitas akademika FKH UB yang secara tidak langsung turut berperan selama kuliah.

Penulis berharap bahwa semua kebaikan yang diberikan kepada penulis akan dibalas berlipat oleh Allah SWT. Penulis sadar bahwa laporan ini masih jauh dari kata sempurna dan harapannya bahwa laporan ini dapat memberi ilmu dan menambah wawasan bagi penulis dan pembaca sehingga menjadi pembelajaran yang bermanfaat dikemudian hari, Aamiin Ya Rabbal Alamin.

Malang, 18 Februari 2019

Penulis

**DAFTAR ISI**

	<b>Halaman</b>
<b>HALAMAN JUDUL.....</b>	<b>i</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN .....</b>	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN .....</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRAK.....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>v</b>
<b>KATA PENGANTAR .....</b>	<b>vi</b>
<b>DAFTAR ISI .....</b>	<b>viii</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR GAMBAR .....</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN.....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG .....</b>	<b>xiii</b>
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
1.3 Batasan Masalah .....	5
1.4 Tujuan Penelitian.....	6
1.4.1 Tujuan Umum .....	6
1.4.2 Tujuan Khusus.....	6
1.5 Manfaat Penelitian.....	7
1.5.1 Manfaat Teoritis .....	7
1.5.2 Manfaat Produkstif .....	7
1.5.3 Manfaat Praktis .....	7
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>8</b>
2.1 Tikus Putih.....	8
2.1.1 Saluran Pencernaan Tikus Putih.....	9
2.1.2 Kolon .....	10
2.2 Sinbiotik .....	11
2.2.1 <i>Lactobacillus acidophilus</i> .....	12
2.2.2 <i>Spirulina platensis</i> .....	14
2.3 Salmonellosis.....	16
2.3.1 Etiologi.....	16
2.3.2 Patogenesis dan Penularan .....	17
2.3.3 Gejala Klinis Salmonellosis .....	18
2.3.4 Epidemiologi .....	19
2.3.5 Kerugian yang Ditimbulkan Akibat Salmonellosis.....	20
2.4 Respon Imun Terhadap <i>Salmonella</i> .....	20
2.4.1 CD68 .....	21
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN .....</b>	<b>23</b>
3.1 Kerangka Teori .....	23
3.2 Kerangka Konseptual .....	24
3.3 Hipotesis Penelitian .....	26
<b>BAB 4 METODE PENELITIAN .....</b>	<b>27</b>

4.1 Lokasi dan Waktu Penelitian .....	27
4.2 Alat dan Bahan Penelitian .....	27
4.2.1 Alat .....	27
4.2.2 Bahan.....	27
4.3 Variabel Penelitian .....	28
4.4 Rancangan Penelitian .....	28
4.5 Tahapan Penelitian .....	30
4.6 Prosedur Kerja .....	31
4.6.1 Persiapan Sinbiotik.....	31
4.6.2 Persiapan Hewan Coba.....	32
4.6.3 Persiapan <i>Salmonella enteritidis</i> .....	32
4.6.4 Perlakuan.....	32
4.6.5 Nekropsi Tikus .....	33
4.6.6 <i>Flowcytometry</i> .....	33
4.6.7 Pembuatan Preparat Histopatologi Kolon .....	34
4.6.8 Pewarnaan <i>Hematoxylin Eosin</i> (HE).....	35
4.7 Analisa Data .....	36
<b>BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>38</b>
5.1 Kadar Relatif CD68 pada Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) yang Diberi Sinbiotik Gabungan <i>Lactobacillus acidophilus</i> dan <i>Spirulina platensis</i> yang Diinduksi <i>Salmonella enteritidis</i> .....	38
5.2 Pengaruh Pemberian Sinbiotik ( <i>L. acidophilus</i> dan <i>S. platensis</i> ) Terhadap Histopatologi Kolon Tikus yang Diinduksi <i>Salmonella enteritidis</i> .....	42
<b>BAB VI PENUTUP .....</b>	<b>49</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>50</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>55</b>

**DAFTAR TABEL****Tabel**

	<b>Halaman</b>
2.1 Panjang dan Diameter Usus Tikus .....	9
4.1 Rancangan Penelitian (Hubungan antara perlakuan dan ulangan).....	29
4.2 ANOVA ( <i>Analysis of Variance</i> ) .....	30
5.1 Tabel Rata-rata Kadar Relatif CD68 (%).....	38
5.2 ANOVA .....	39



**DAFTAR GAMBAR**

<b>Gambar</b>	<b>Halaman</b>
<b>2.1</b> Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ).....	9
<b>2.2</b> Sistem Pencernaan Tikus .....	10
<b>2.3</b> Histologi Kolon.....	11
<b>2.4</b> <i>L. acidophilus</i> .....	13
<b>2.5</b> <i>Spirulina platensis</i> .....	15
<b>5.1</b> Grafik Rata-rata Kadar Relatif CD68 .....	39
<b>5.2</b> Gambaran Histopatologi Kolon kelompok K- .....	43
<b>5.3</b> Gambaran Histopatologi kolon perlakuan K+ .....	44
<b>5.4</b> Gambaran Histopatologi kolon perlakuan P1 .....	44
<b>5.5</b> Gambaran Histopatologi kolon perlakuan P2 .....	45
<b>5.6</b> Gambaran Histopatologi kolon perlakuan P3 .....	46

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1 Kerangka Operasional .....	55
2 Perhitungan Dosis Sinbiotik .....	56
3 Sertifikat Laik Etik .....	58
4 Surat Keterangan Tikus Sehat .....	59
5 Hasil Reidentifikasi <i>Salmonella sp.</i> .....	60
6 Prosedur Pembuatan Sinbiotik dengan Metode <i>Freeze Dryer</i> .....	61
7 Perhitungan Hasil Mikroenkapsulasi Sinbiotik .....	62
8 Identifikasi Bakteri <i>Salmonella enteritidis</i> .....	63
9 Langkah Kerja Penelitian .....	64
10 Hasil Uji <i>Flowcytometry</i> .....	67
11 Perhitungan Statistik Kadar Relatif CD68 .....	69



## DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

<b>Simbol/Singkatan</b>	<b>Keterangan</b>
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
BAL	Bakteri Asam Laktat
BSC	<i>Biosafety Cabinet</i>
CD68	<i>Cluster of differentiation 68</i>
CFU	<i>Coloni Forming Unit</i>
CM	Centi meter
CMI	<i>cell mediated immunity</i>
FCR	<i>Food Conversion Ratio</i>
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
HE	Hematoxilyn Eosin
IFN $\gamma$	Interferon gamma
IL	Interleukin
KgPK	kilo gram per pakan kontrol
LAMPs	<i>Lysosomal-Associated Membrane Proteins</i>
LPS	lipopolisakarida
MDA	Malondialdehide
MM	milli meter
MMOL	milli mol
MRSA	<i>De Mann Rogosa and Shape Agar</i>
MRSB	<i>De Mann Rogosa and Shape Broth</i>
NB	Nutrien Broth
NK	Natural Killer
OIE	<i>Office International des Epizooties</i>
PBS	<i>Posphat Buffer Saline</i>
PO	Per oral
pH	<i>Power of hidrogen</i>
RAL	Rancangan Acak Lengkap
SCFA	<i>Short Chain Fatty Acids</i>
SSA	Salmonella Shigella Agar
Th	T helper
UU	Undang-undang
%	Persen
°	Derajat

## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi berdampak terhadap kemajuan yang dicapai oleh manusia. Salah satunya dalam bidang kedokteran hewan. Berbagai penelitian dan penemuan terus dikembangkan dalam rangka meningkatkan kesejahteraan manusia. Meskipun demikian, masih ada penyakit-penyakit yang dijumpai pada hewan belum diatasi secara tuntas melalui penelitian-penelitian tersebut. Salah satunya adalah penyakit salmonellosis.

Salmonellosis merupakan penyakit yang sudah tidak asing lagi bagi dunia kedokteran. Penyakit ini disebabkan oleh genus *Salmonella* sp. Pada umumnya, bakteri ini menyerang sistem gastrointestinal hingga menyebabkan infeksi pada saluran pencernaan dan gastroenteritis. Salmonellosis merupakan salah satu dari 25 penyakit hewan menular strategis (PHMS) (BPPV, 2018). Salmonellosis adalah salah satu penyakit zoonosis yang disebut *foodborne disease* dan terdapat di seluruh dunia. Disebut *foodborne disease* karena penyakit ini ditularkan oleh ternak *carrier* yang sehat ke manusia melalui makanan yang terkontaminasi bakteri ini. Di Indonesia, penyakit ini merupakan penyakit yang sering terjadi sepanjang tahun dengan tingkat insidensi tinggi (Poeloengan, 2014). Kerugian yang terjadi akibat Salmonellosis pada hewan antara lain kematian, penurunan produksi ternak, abortus, kematian neonatal dan pengafkirhan bahan makanan yang tercemar bakteri (Pudjiatmoko, 2014). *Salmonella enteritidis* merupakan bakteri dari famili *Enterobacteriaceae* yang termasuk ke dalam bakteri gram negatif

(Pudjiatmoko, 2014). *Salmonella enteritidis* dapat ditularkan dari hewan ke manusia melalui cemaran produk hewan, dari hewan yang terinfeksi dan menimbulkan penyakit pada manusia (Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, 2016).

Pencegahan terhadap Salmonellosis salah satunya dapat dilakukan dengan pemberian probiotik BAL (Bakteri Asam Laktat). Asam laktat adalah agen penghancur membran bakteri Gram negatif yang dibuktikan dengan kemampuannya merusak Lipopolisakarida pada dinding sel *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* dan *Pseudomonas aeruginosa* (Alakomi *et al.* 2000). *Lactobacillus* adalah salah satu bakteri asam laktat yang banyak ditemukan pada saluran pencernaan makhluk hidup, baik hewan maupun manusia sehingga sering kali digunakan sebagai bahan probiotik.

Probiotik merupakan kultur mikroorganisme hidup yang dimasukkan pada hewan ternak dengan cara mencampurnya dengan pakan atau ransum yang mampu menjamin ketersediaan populasi organisme menguntungkan dalam usus. Probiotik akan efektif apabila mampu hidup dalam berbagai kondisi lingkungan. Tujuan pemberian probiotik antara lain untuk mempertahankan mikroorganisme flora normal dalam saluran pencernaan yang menguntungkan dan menghambat mikroorganisme yang merugikan atau yang memiliki sifat patogen. Selain itu manfaat probiotik lainnya yaitu meningkatkan aktivitas enzim pencernaan, menurunkan aktivitas enzim bacterial dan produksi ammonia, meningkatkan asupan dan pencernaan makanan serta menetralisir enterotoksin dan menstimulasi sistem kekebalan (Manin, 2010).

Prebiotik merupakan bahan pangan yang tidak dapat dicerna dalam saluran pencernaan namun dapat memicu pertumbuhan mikroorganisme flora normal pada usus besar. Salah satu bahan yang berpotensi sebagai prebiotik yaitu *Spirulina platensis*. *S. platensis* memiliki kandungan oligosakarida berupa mannosa dan rhamnosa yang diketahui dapat menstimulasi pertumbuhan mikroba nonpatogenik (Gupta *et al.*, 2017). *S. platensis* mampu meningkatkan pertumbuhan bakteri asam laktat (BAL) serta menghambat pertumbuhan bakteri patogen (Bhowmik *et al.* 2009).

Sinbiotik merupakan campuran antara probiotik dan prebiotik. Menurut Antarani (2011) pemberian probiotik akan meningkatkan aktivitas enzim pencernaan sehingga penyerapan nutrien menjadi lebih optimal dengan makin luasnya area absorpsi sebab probiotik dapat mempengaruhi anatomi usus yaitu vili usus menjadi lebih tinggi dan densitasnya lebih padat. Sedangkan pemberian prebiotik tidak dapat dicerna oleh sistem pencernaan namun mampu difermentasi oleh bakteri asam laktat sebagai nutrisi. Campuran dari probiotik dan prebiotik akan saling bersinergi karena daya tahan hidup bakteri probiotik akan meningkat dengan pemberian nutrisi yang tersedia untuk difermentasi sehingga memberi manfaat yang lebih sempurna.

Adanya infeksi akan berpengaruh pada respon imun non-spesifik (*innate immunity*) dimana akan terjadi peningkatan makrofag untuk proses fagositosis. Salah satu *marker* makrofag adalah CD68. CD68 adalah transmembran glikoprotein tipe I dimana erat kaitannya dengan endosomal/lisosomal. CD68 memiliki struktur yang sama dengan *Lysosomal-Associated Membrane Proteins*

(LAMPs). Fungsi CD68 belum terlalu diketahui, namun lokasi preferensial pada bagian akhir endosom memiliki peran dalam transportasi peptida atau *Antigen processing*. CD68 dikenal sebagai *marker* spesifik permukaan myeloid terutama makrofag, namun juga bisa diekspresikan oleh non-myeloid. Ekspresi CD68 dapat juga ditemukan pada granulosit seperti basofil dan neutrofil intestinal. CD68 digunakan sebagai *marker* atau penanda makrofag pada saat terjadi inflamasi (Chistiakov, 2017).

Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek preventif pemberian sinbiotik gabungan *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* terhadap kadar CD68 dan gambaran histopatologi Kolon tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi bakteri *Salmonella enteritidis*.

## 1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh pemberian Sinbiotik gabungan antara *Lactobacillus acidophlus* dan *Spirulina platensis* terhadap kadar relatif CD68 diinduksi *Salmonella enteritidis*.
2. Bagaimana pengaruh pemberian Sinbiotik gabungan antara *Lactobacillus acidophlus* dan *Spirulina platensis* terhadap gambaran histopatologi Kolon tikus putih yang diinduksi *Salmonella enteritidis*.

## 1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini antara lain :

1. Hewan coba yang digunakan yaitu tikus putih (*Rattus Novergicus*) sehat berjenis kelamin jantan umur 4-6 minggu dengan berat sekitar 100 gram.

Hewan coba diperoleh dari Laboratorium Fisiologi Hewan UIN Maliki Malang dengan surat keterangan sehat (**Lampiran 4**). Penggunaan hewan coba dalam penelitian ini sudah mendapat persetujuan laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya **No. 944-KEP-UB (Lampiran 3)**.

2. Sinbiotik yang digunakan pada penelitian ini adalah kombinasi antara *Lactobacillus acidophilus* (probiotik) dan *Spirulina platensis* (prebiotik) yang dicampur dengan perbandingan 28 ml *Lactobacillus acidophilus* dan 56 gram *Spirulina platensis*. Pada pembuatan mikroenkapsulasi metode *freeze dryer* menurut Permatasari (2013), sinbiotik yang digunakan sejumlah sepertiga dari jumlah enkapsulan. Perbandingan probiotik dan prebiotik yang digunakan dengan perbandingan 1 : 2 (Saputra, 2013).
3. Terdapat 5 perlakuan antara lain P1 (0,2% /kgPk sinbiotik + induksi *Salmonella enteritidis* 0,5 ml standar *Mc Farland 0,5*), P2 (0,4% /kgPk sinbiotik + induksi *Salmonella enteritidis* 0,5 ml standar *Mc Farland 0,5*), P3 (0,6% /kgPk sinbiotik + induksi *Salmonella enteritidis* 0,5 ml standar *Mc Farland 0,5*), Kontrol Positif (induksi *Salmonella enteritidis* 0,5 ml standar *Mc Farland 0,5*) dan Kontrol Negatif (tanpa perlakuan). Pemberian dilakukan secara peroral (PO) diberikan selama 3 minggu setelah penyesuaian selama 7 hari berdasarkan kelompok perlakuan. Pemberian jumlah *feed additive* mengacu pada penelitian Galik *et al* (2016), bahwa pemberian *feed additive* yang diberikan sebanyak 0,5% dan 0,75% per kilogram memiliki pengaruh positif yang signifikan.

4. *Salmonella enteritidis* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Dosis infeksi bakteri *Salmonella enteritidis* diberikan secara per oral (PO) pada tikus (*Rattus novergicus*) sebanyak 0,5 ml per ekor standar *Mc Farland* 0,5 ( $1,5 \times 10^8$  CFU/ml). Menurut Naughton *et al* (1997), pada hewan coba tikus dosis  $10^3$  CFU tidak menimbulkan gejala klinis dan pada dosis yang tinggi yaitu  $10^8$  CFU mampu menimbulkan gejala klinis.
5. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah penurunan kadar relatif CD68 yang diukur menggunakan *flowcytometry* dan gambaran histopatologi Kolon tikus putih (*Rattus novergicus*).

## 1.4 Tujuan Penelitian

### 1.4.1 Tujuan Umum

Tujuan Umum penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* terhadap tikus putih (*Rattus novergicus*) yang diinduksi *Salmonella enteritidis*.

### 1.4.2 Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui pengaruh pemberian Sinbiotik gabungan antara *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* terhadap kadar relatif CD68 diinduksi *Salmonella enteritidis*.
2. Untuk mengetahui pengaruh pemberian Sinbiotik gabungan antara *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* terhadap gambaran histopatologi Kolon tikus putih yang diinduksi bakteri *Salmonella enteritidis*.

## 1.5 Manfaat Penelitian

### 1.5.1 Manfaat Teoritis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai efek preventif pemberian sinbiotik kombinasi *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* terhadap kadar relatif CD68 dan perbaikan gambaran histopatologi kolon tikus putih yang diinduksi *Salmonella enteritidis*.

### 1.5.2 Manfaat Produktif

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menghasilkan solusi berupa produk di bidang medis veteriner sinbiotik kombinasi *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* untuk pencegahan terhadap penyakit Salmonellosis.

### 1.5.3 Manfaat Praktis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi di bidang medis veteriner bahwa sinbiotik kombinasi *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* dapat menjadi alternatif pencegahan terhadap Salmonellosis.

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tikus Putih

Menurut Basselsen (2004), klasifikasi tikus putih (*Rattus norvegicus*) adalah sebagai berikut :

Kingdom	:	Animalia
Filum	:	Chordata
Kelas	:	Mammalia
Ordo	:	Rodentia
Subordo	:	Odontoceti
Familia	:	Muridae
Genus	:	<i>Rattus</i>
Spesies	:	<i>Rattus norvegicus</i>

Tikus putih memiliki beberapa sifat yang menguntungkan sebagai hewan uji penelitian di antaranya perkembangbiakan cepat, mempunyai ukuran yang lebih besar dari mencit, mudah dipelihara dalam jumlah yang banyak. Tikus putih juga memiliki ciri-ciri morfologis seperti albino, kepala kecil dan ekor yang lebih panjang dibandingkan badannya (**Gambar 2.1**) (Sirois, 2005). Galur ini memiliki pertumbuhan yang cepat, tempramen yang baik dan kemampuan laktasi yang tinggi (Carere dan Maestripieri 2013).



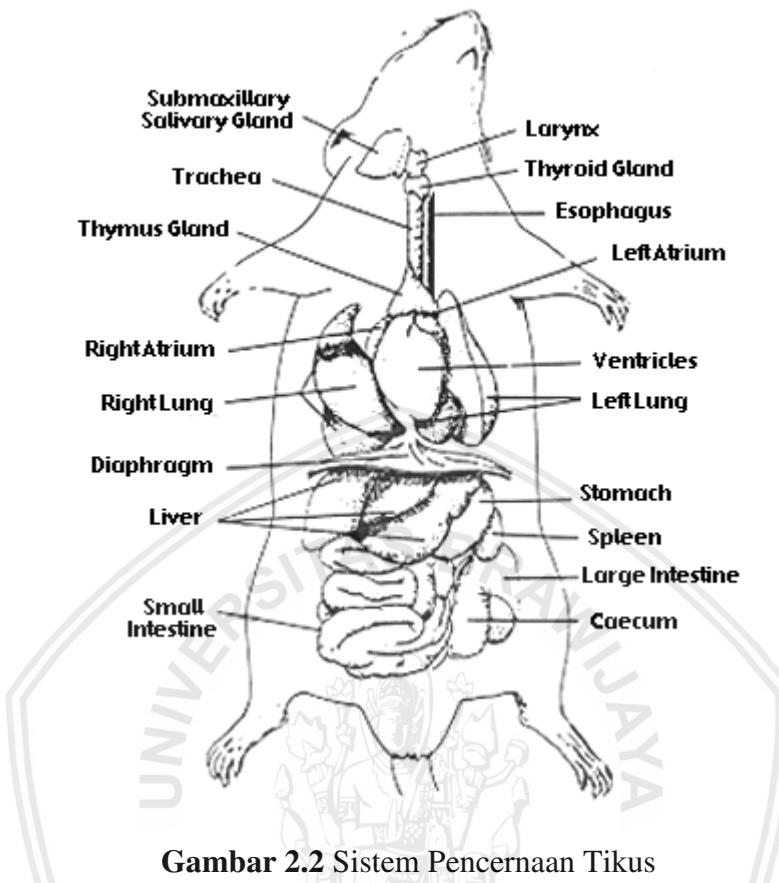
**Gambar 2.1** Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) (Fauziyah, 2016).

### 2.1.1 Saluran Pencernaan Tikus Putih

Sistem pencernaan berfungsi sebagai pemecah zat makanan dari molekul yang kompleks menjadi molekul yang sederhana sehingga mampu diserap oleh tubuh. Aktivitas sistem pencernaan dibantu dengan adanya enzim yang bekerja sebagai katalis zat makanan seperti karbohidrat, protein, dan lemak untuk mempermudah proses absorpsi (Suprijatna, 2008). Saluran pencernaan tikus terdiri atas mulut, esofagus, lambung, *intestinal tenue*, *intestinal crasum* dan anus (**Gambar 2.2**). Intestinal tenue atau usus halus terdiri atas duodenum, jejunum dan ileum. Sedangkan intestinal crasum atau usus besar terdiri atas *caecum*, *colon* dan rektum. Masing-masing bagian usus memiliki panjang dan diameter yang berbeda. Selengkapnya dapat dilihat pada **Tabel 2.1** berikut:

**Tabel 2.1** Panjang dan diameter usus (Vdoviakova *et al.*, 2016).

Bagian Usus	Panjang (mm)	Diameter (mm)
Duodenum	95 – 100	2,5 – 3
Jejunum	900 – 1350	4 – 5
Ileum	25 – 35	3 – 5
Cecum	50 – 70	10
Colon	90 – 110	1 – 3
Rectum	80	3 – 10



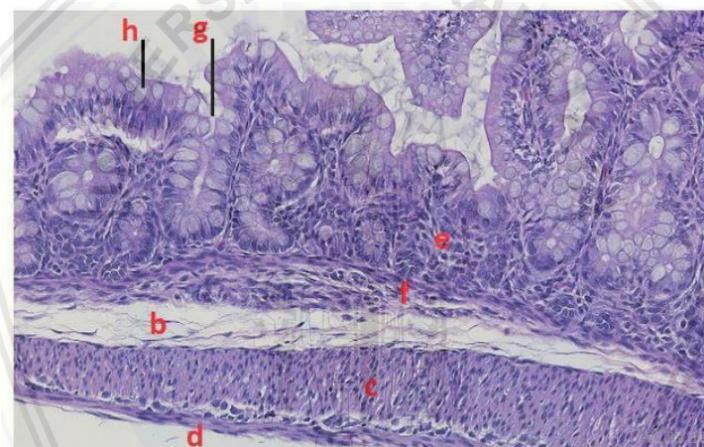
**Gambar 2.2 Sistem Pencernaan Tikus**

### 2.1.2 Kolon

Kolon merupakan struktur yang membentuk sebagian besar usus besar, berbentuk tabung muskular berongga yang memanjang dari sekum sampai rektum. Kolon berfungsi untuk penyerapan air, elektrolit dan mineral lain. Kolon mengabsorbsi air dan elektrolit hingga 90%, mengubah bahan makanan cair menjadi semipadat yang disebut feses. Bakteri yang terdapat pada kolon berfungsi untuk mencerna selulosa sehingga menghasilkan nutrisi bagi tubuh, menghasilkan vitamin K dan gas yang menyebabkan bau pada feses (Sherwood, 2013).

Struktur histologi kolon tikus terdiri atas 4 lapisan yaitu mukosa, submukosa, muskularis dan serosa. Lapisan mukosa terdiri atas sel epitel, lamina propria dan muskularis mukosa. Pada lapisan mukosa tidak terdapat vili, tersusun

atas sel epitel kolumnar dan memiliki kripte lieberkuhn yang terletak lebih dalam serta memiliki sel goblet yang lebih banyak daripada usus halus. Pada lamina propria terdapat terdapat banyak sel limfoid dan nodul limfoid yang tersebar sampai sub mukosa. Lapisan submukosa pada tikus lebih tipis dibanding manusia. Lapisan muskularis terdiri atas serabut otot longitudinal dan sirkular. Lapisan serosa merupakan lapisan intraperitoneal kolon yang terdiri atas pembuluh darah dan jaringan adiposa. Lebih jelas ditunjukkan pada **Gambar 2.3**.



**Gambar 2.3** Keterangan a. Mukosa, b. Submukosa, c. Muskularis, d. Serosa, e. Lamina Propria, f. Muskularis Mukosa, g. Kripte Lieberkuhn (Sherwood, 2013).

## 2.2 Sinbiotik

Sinbiotik adalah gabungan antara probiotik dan prebiotik (Antarini, 2011). Pemberian probiotik akan meningkatkan aktivitas enzim pencernaan sehingga penyerapan nutrien menjadi lebih optimal dengan makin luasnya area absorpsi sebab probiotik dapat mempengaruhi anatomi usus yaitu mukosa usus menjadi lebih tinggi dan densitasnya lebih padat. Sedangkan pemberian prebiotik tidak dapat dicerna oleh sistem pencernaan namun mampu difermentasi oleh bakteri

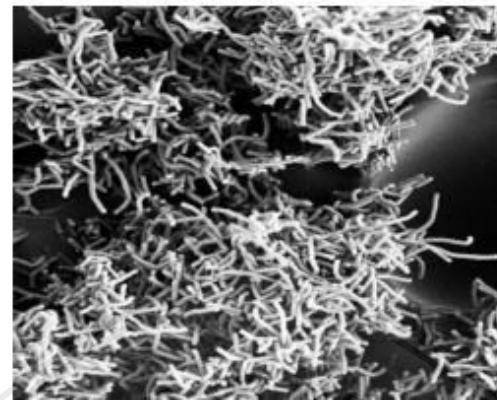
asam laktat sebagai nutrisi. Campuran dari probiotik dan prebiotik akan saling bersinergi karena daya tahan hidup bakteri probiotik akan meningkat dengan pemberian nutrisi yang tersedia untuk difermentasi sehingga memberi manfaat yang lebih sempurna.

### **2.2.1 *Lactobacillus acidophilus***

Pencegahan terhadap Salmonellosis salah satunya dapat dilakukan dengan pemberian probiotik BAL (Bakteri Asam Laktat). Metabolit yang dihasilkan seperti asam organik khususnya pada bakteri asam laktat yang dapat menurunkan pH atau juga peroksida dan bakteriosin diperkirakan bertanggung jawab atas sifat antagonis terhadap bakteri patogen gram negatif seperti *Salmonella* (Haryati, 2011). *Lactobacillus* merupakan salah satu genus bakteri asam laktat yang paling banyak dijumpai pada saluran gastro intestinal baik pada manusia maupun hewan. (Manin, 2010).

Genus *Lactobacillus* sp. secara umum merupakan bakteri gram positif (mengandung banyak peptidoglikan), tidak membentuk spora dan berbentuk batang (**Gambar 2.4**). Bakteri ini bersifat fakultatif *anaerob*, suhu optimum pertumbuhannya berkisar antara 30 – 40°C, dengan pH pertumbuhan optimum pada 5,5 – 5,8 , tapi pada umumnya dapat tumbuh pada pH di bawah 5. Genus *Lactobacillus* sp. dapat dibedakan atas kelompok homofermentatif (bakteri yang mampu memecah gula menjadi asam laktat sebagai produk utama), dan kelompok heterofermentatif (bakteri yang mampu memecah gula menjadi asam laktat dan

produk-produk lain seperti alkohol, asetat dan karbondioksida.) (Leolanggraini, 2011).



Gambar 2.4 *L. acidophilus* (Pyar, 2014)

Satu dari alasan penggunaan probiotik yaitu untuk menstabilkan mikroflora pencernaan dan berkompetisi dengan bakteri patogen, dengan demikian *strain* probiotik harus mencapai usus dalam keadaan hidup dalam jumlah yang cukup. Secara umum, ada beberapa karakteristik dan kriteria keamanan yang harus dimiliki oleh probiotik. Karakteristik dan kriteria bakteri yang dapat digunakan sebagai probiotik menurut Gaggia (2010):

- 1) Nontoksik dan nonpatogenik
- 2) Mempunyai identifikasi taksonomi yang jelas
- 3) Dapat hidup dalam spesies target
- 4) Dapat bertahan, berkolonisasi dan bermetabolisme secara aktif dalam target yang ditunjukkan dengan:
  - a) Tahan terhadap cairan pencernaan dan empedu
  - b) Persisten dalam saluran pencernaan
  - c) Menempel pada *ephitelium* atau *mucus*

- d) Berkompesi dengan bakteri patogen
- 5) Memproduksi senyawa antimikrobial
- 6) Antagonis terhadap bakteri patogen
- 7) Dapat meningkatkan respon imun
- 8) Tidak berubah dan stabil pada waktu proses penyimpanan dan lapangan
- 9) Bertahan hidup pada populasi yang tinggi

### 2.2.2 *Spirulina platensis*

Prebiotik bersifat menstimulasi pertumbuhan mikroba nonpatogenik pada saluran pencernaan sehingga diharapkan penyerapan nutrisi oleh saluran pencernaan menjadi lebih baik dan produktivitas menjadi optimal (Haryati, 2011). Salah satu bahan yang berpotensi sebagai prebiotik yaitu *Spirulina platensis*. *Spirulina platensis* memiliki kandungan oligosakarida berupa mannosa dan rhamnosa yang diketahui dapat menstimulasi pertumbuhan mikroba nonpatogenik (Gupta *et al.*, 2017). *S. platensis* mampu meningkatkan pertumbuhan bakteri asam laktat (BAL) serta menghambat pertumbuhan bakteri patogen (Bhowmik *et al.* 2009).

*Spirulina* tergolong *cyanobacteria* berbentuk spiral (**Gambar 2.5**), memiliki klorofil dan mengandung protein sekitar 50 - 70% berat kering, beberapa vitamin dan mineral. *Spirulina platensis* dapat dibudidayaakan pada media air tawar, air payau atau air laut. Untuk kebutuhan obat-obatan dan makanan manusia, *Spirulina platensis* dibudidayaakan di air tawar lebih baik karena memiliki kandungan protein yang tinggi dan kandungan sodium rendah. *Spirulina*

platensis dibudidayakan di media air laut memiliki fikosianin dan karbohidrat yang tinggi dan memiliki biaya produksi rendah. *Spirulina* yang dibudidayakan menggunakan media air laut cenderung memiliki kandungan natrium tinggi sehingga tidak baik bagi kesehatan. *S. platensis* adalah jenis mikroalga yang mempunyai peran aktif dalam biosintesis enzim metabolismik seperti *cytochromes* dan *glutathione reductase* sehingga terjadi peningkatan proses metabolisme di dalam tubuh ternak (Jamil *et al.*, 2015).



Gambar 2.5 *Spirulina platensis* (Sari, 2013).

Substrat seperti inulin, FOS dan mananoligosakarida (MOS) yang dapat dihidrolisis oleh enzim *endogenous* pencernaan juga bisa diabsorbsi oleh inang. Mekanisme yang mungkin terjadi yaitu penurunan pH karena dihasilkannya asam lemak rantai pendek, sekresi bakteriosin dan stimulasi imun. MOS sebagai prebiotik mempunyai mekanisme yang berbeda dimana secara selektif tidak hanya meningkatkan populasi bakteri yang menguntungkan, tetapi melalui kemampuannya yang dapat melekat pada lektin spesifik manosa dari patogen gram negatif tipe 1 yang memiliki flagella seperti *Salmonella* dan *E. coli* yang kemudian akan keluarkan dari saluran pencernaan (Baurhoo *et al.*, 2007).

## 2.3 Salmonellosis

Salmonellosis adalah penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Salmonella*. Pada umumnya, bakteri ini menyerang sistem gastrointestinal hingga menyebabkan peradangan. Salmonellosis merupakan salah satu dari 25 penyakit hewan menular strategis (PHMS) (BBPV, 2018). Salmonellosis adalah salah satu penyakit zoonosis yang disebut *foodborne disease* dan terdapat di seluruh dunia. *Foodborne disease* terjadi karena penyakit ini ditularkan oleh ternak *carrier* yang sehat ke manusia melalui makanan yang terkontaminasi *Salmonella* dan menyebabkan enteritis. Di Indonesia, penyakit ini merupakan penyakit yang sering terjadi sepanjang tahun dengan tingkat insidensi tinggi (Poeloengan, 2014).

### 2.3.1 Etiologi

*Salmonella* adalah bakteri gram negatif, anaerob fakultatif dan berbentuk batang yang berasal dari family *Enterobacteriaceae*. Anggota dari genus ini flagella peritrik, kecuali *S. Enterica serovar pullorum* dan *S. Enterica serovar gallinarum*. *Salmonella* memiliki ukuran  $2 - 3 \times 0,4 - 0,6 \mu\text{m}$  dan merupakan *chemoorganotrophs* yang mampu memetabolisme nutrisi baik dari jalur *respiratory* maupun *fermentative pathways* (Nwabor, 2015).

*Salmonella* adalah bakteri yang tergolong dalam famili *Enterobacteriaceae*. Pada umumnya bakteri *Salmonella* ini bersifat patogen karena dapat menyebabkan penyakit pada manusia, hewan piaraan atau ternak dan hewan air seperti ikan, udang dan kerang-kerangan (Kunarso, 1987). *Salmonella* dikenal sebagai agen zoonosis dan merupakan peringkat kelima dalam zoonosis

prioritas, sesuai Keputusan Menteri Pertanian nomor 4971/2012 tentang zoonosis prioritas (Kepmentan, 2013).

Menurut Jawetz (2010), Taksonomi *Salmonella* sp. adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Bacteria
Divisi	: Proteobacteria
Kelas	: Gamma Proteobacteria
Ordo	: Enterobacteriales
Famili	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Salmonella</i>
Species	: <i>S. typhi</i> , <i>S. paratyphi A</i> , <i>S. thyphimurium</i> , <i>S. choleraesuis</i> , <i>S. enteritidis</i> , <i>S. Pullorum</i>

### 2.3.2 Patogenesis dan Penularan

*Salmonella enteritidis* hidup di dalam saluran pencernaan manusia dan hewan. Sehingga penularannya biasanya terjadi melalui mulut. Infeksi *Salmonella enteritidis* dimulai dari tertelannya bakteri tersebut melalui pakan atau air minum yang terkontaminasi *Salmonella enteritidis*. Selanjutnya bakteri tersebut masuk ke dalam saluran pencernaan. Bakteri kemudian akan menembus dinding usus masuk ke dalam sistem pertahanan limfatik dan dapat mencapai sistem peredaran darah. Selanjutnya bakteri tersebut akan mencapai ke organ tubuh seperti hati, jantung, limpa dan ovarium (Alisantosa *et al*, 2000). Makanan yang terkontaminasi biasanya berasal dari hewan, seperti daging, susu, dan telur. Biasanya makanan

yang terkontaminasi terlihat normal dan tidak menimbulkan bau (Global Technical Services, 2013). Selain melalui makanan, menurut Akter *et al.* (2007) bahwa penyakit ini dapat ditularkan secara vertikal dari induk ke anaknya.

Habitat utama *Salmonella enteritidis* berada dalam saluran penceraaan, tetapi bakteri ini dapat juga ditemukan pada feses maupun lingkungan seperti air, tanah, tanaman, debu dan sebagainya (Supardi dan Sukamto, 2003). *Salmonella enteritidis* akan multiplikasi di dalam saluran pencernaan penderita, sehingga mengakibatkan radang usus (enteritis). Kerusakan pada lamina propria saluran pencernaan dapat terjadi karena bakteri *salmonella* menghasilkan racun yang disebut *cytotoxin* dan *enterotoxin*, sehingga berakibat munculnya diare (Poeloengan, 2005). *Salmonella* akan difagosit oleh makrofag dan mengakibatkan respon imun berupa peradangan. Dampak yang ditimbulkan akibat salmonellosis adalah mengurangi fertilitas, mengurangi daya tetas, mengurangi produksi telur dan kematian pada anak ayam (Thaha, 2016).

### **2.3.3 Gejala Klinis Salmonellosis**

Salmonellosis memperlihatkan tiga sindrom yaitu terjadinya septikemia, radang usus akut yang kemudian menjadi radang usus kronik. Pada kejadian akut penderita sangat depresif, demam dan diare (Thaha, 2016). *Salmonella* dapat menyerang ayam pada semua umur, namun pada ayam muda lebih rentan. Infeksi pada ayam berumur kurang dari 1 minggu dapat menimbulkan infeksi bahkan kematian.

Gastroenteritis merupakan gejala yang ditimbulkan akibat salmonellosis. Biasanya gejala ini ditandai dengan muntah, bersin, pusing, *myalgia* dan tidak ada darah pada feses (Hohmann, 2001). Bakteremia adalah kondisi dimana bakteri masuk ke aliran darah setelah menyerang intestinal barrier. Semua strain *Salmonella* dapat menyebabkan bakteremia (Woods *et al*, 2008). Mirip dengan demam enterik, demam tinggi juga terjadi pada gejala bakteremia, namun tanpa lesi kemerahan pada pasien demam enterik. Pada beberapa kasus, komplikasi ekstraseluler menyebabkan kerusakan pada paru-paru. Selain itu dapat juga menyebabkan selulitis, infeksi saluran *urinary*, pneumonia, endokarditis dan meningitis (Arii *et al*, 2002). Pada ayam dewasa, infeksi akut ditandai dengan adanya pembengkakan dan kongesti pada hati, limpa dan ginjal (Tabbu, 2000).

#### 2.3.4 Epidemiologi

Pada tahun 2000, insiden demam enterik diperkirakan mencapai 22 juta kasus dan 200.000 mengalami kematian di seluruh dunia, khususnya terjadi pada negara berkembang Crump *et al*, 2004). Demam enterik adalah penyakit endemik pada beberapa wilayah, diantaranya adalah benua Afrika dan Asia dibanding benua lain seperti Eropa, Amerika Tengah dan Selatan serta Timur Tengah. Insiden demam enterik di Amerika dan beberapa negara Eropa terjadi cukup rendah dengan kasus akibat *Salmonella* kurang dari 10 per 100.000 (Molbak *et al*, 2002).

Negara-negara di Asia seperti China, India, Vietnam, Pakistan dan Indonesia memiliki tingkat insidensi demam enterik yang tinggi mencapai lebih

dari 100 kasus per 100.000 populasi. Dibanding dengan negara Asia lainnya, Pakistan dan India memiliki tingkat insidensi tertinggi yaitu 451,7 dan 214,2 kasus per 100.000 populasi (Ochiai *et al.*, 2008).

### **2.1.5 Kerugian yang ditimbulkan akibat Salmonellosis**

*Salmonella enteritidis* adalah salah satu penyebab utama kerugian secara ekonomi pada industri perunggasan, khususnya pada negara-negara berkembang. Sifatnya yang patogen tidak hanya menyebabkan kematian yang tinggi pada anak ayam juga dalam jangka waktu yang panjang berada dalam limpa, saluran reproduksi, menginfeksi telur, dan keturunannya (Shivaprasad dan Barrow, 2008).

Infeksi *Salmonella enteritidis* pada ayam dapat menyerang semua umur dengan gejala klinis yang bervariasi. Pada ayam pedaging dapat menimbulkan gejala klinis yang jelas dan mengakibatkan penurunan bobot badan antara 16 – 24% dalam waktu 3 minggu (Alisantosa *et al.*, 2000). Infeksi pada ayam petelur mengakibatkan kerugian ekonomi yang cukup besar, berupa penurunan produksi telur, penurunan daya tetas telur (fertilitas), dan kenaikan kematian embrio (Hang'ombe *et al.*, 1999).

## **2.4 Respon Imun Terhadap *Salmonella***

Antigen dikenal sebagai molekul asing yang mampu bereaksi dengan antibodi yang diproduksi atas rangsangan imunogen tanpa mempertimbangkan apakah antigen tersebut bersifat imunogenik atau tidak. Imunogen sendiri didefinisikan sebagai antigen yang mampu mengakibatkan respon imun seluler,

humoral atau keduanya. Hampir semua molekul biologis seperti karbohidrat, lipid, hormon dan asam nukleat termasuk antigen. Untuk dapat menimbulkan respon sistem imun, maka setidaknya imunogen harus memiliki 2 buah epitop guna membentuk antibodi dan merangsang limfosit T (Antari, 2017).

Respon imun terhadap *Salmonella enteritidis* meliputi sistem imun natural dan adaptif. Sistem imun natural adalah sistem pertahanan pertama hospes untuk melawan *Salmonella enteritidis*. Invasi dan kolonisasi oleh *Salmonella enteritidis* akan memunculkan respon imun natural. Lipopolisakarida akan berikatan dengan makrofag. Setalah itu sel TCD4 akan teraktivasi dan akan menginisiasi sel Th1. Selanjutnya Th1 akan menghasilkan IFN $\gamma$  yang merupakan sitokin utama yang akan mengaktifasi makrofag dan monosit ke arah sumber infeksi untuk melakukan fagositosis. Hasil fagositosis tersebut akan berupa fragmen protein yang akan disajikan sel T untuk mengaktifasi sel B untuk pembentukan antibodi (Noss *et al*, 2001).

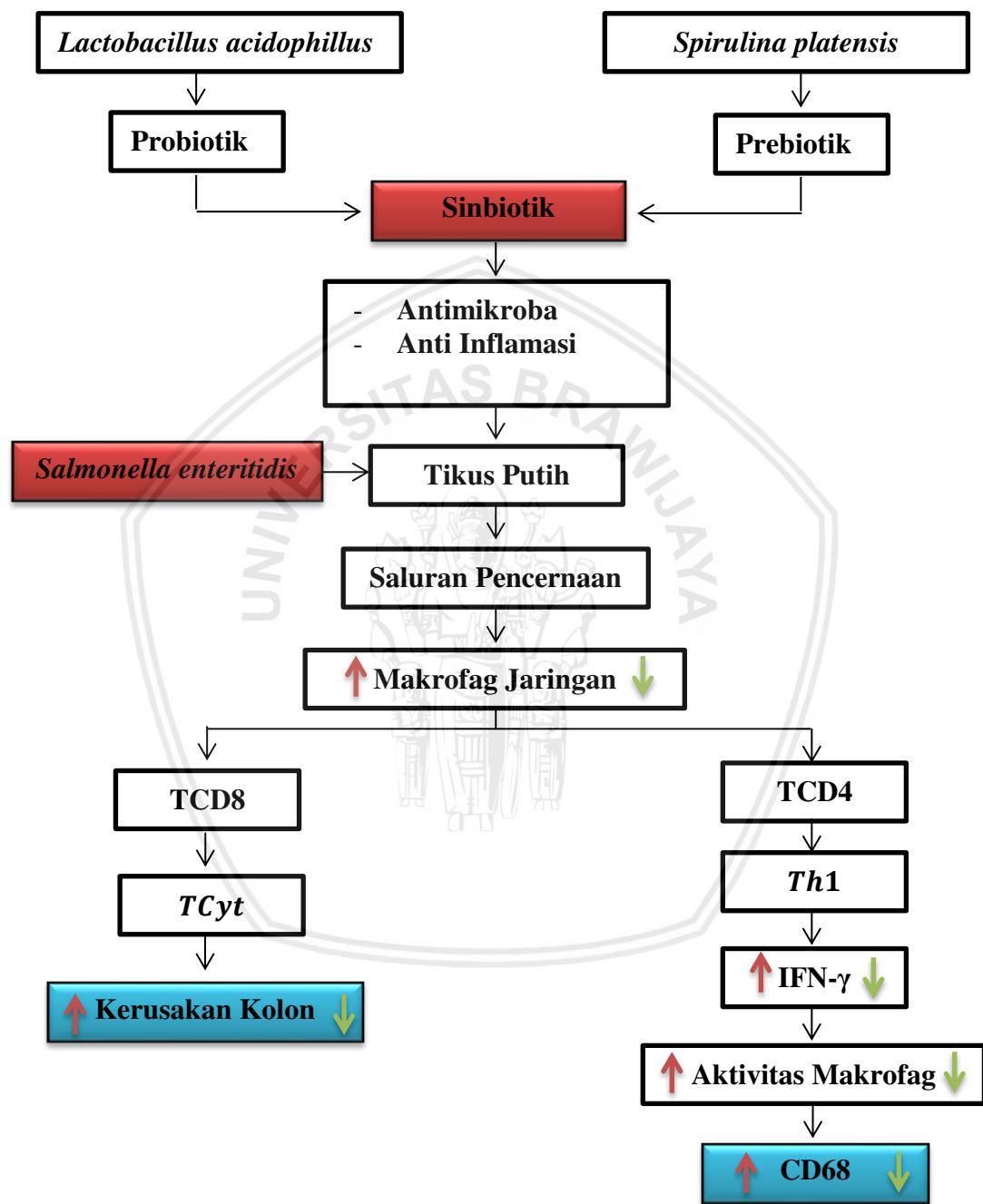
#### **2.4.1 CD68**

Makrofag merupakan sel yang berperan dalam sistem pertahanan tubuh alamiah. Kemampuan (daya) fagositosis makrofag sangat penting dalam menghadapi patogen mikroorganisme maupun sel dan jaringan sendiri yang telah rusak, sehingga makrofag dapat dikatakan sebagai *professional phagocytic cell* (Mustafia, 2011). Salah satu penanda keberadaan makrofag dan monosit adalah CD68.

CD68 adalah transmembran glikoprotein tipe I dimana erat kaitannya dengan endosomal/lisosomal. CD68 memiliki struktur yang sama dengan *lysosomal-associated membrane proteins* (LAMPs) dan merupakan keluarga LAMP glikoprotein. Fungsi CD68 belum terlalu diketahui, namun lokasi preferensial pada bagian akhir endosom memiliki peran dalam transportasi peptida atau *antigen processing*. CD68 dikenal sebagai marker spesifik permukaan myeloid terutama makrofag, namun juga bisa diekspresikan oleh non-myeloid. Ekspresi CD68 dapat juga ditemukan pada granulosit seperti basofil dan neutrofil intestinal. CD68 digunakan sebagai *marker* atau penanda makrofag pada saat terjadi inflamasi (Chistiakov, 2017). Selama infeksi bakteri, fagosit profesional tertarik ke tempat infeksi, di mana mereka merupakan lini pertama pertahanan sel inang. Fungsi mereka adalah untuk menelan dan menghancurkan patogen. Dengan demikian, bakteri harus tahan terhadap aktivitas bakterisida fagosit profesional, termasuk makrofag untuk melawan sistem kekebalan inang (Lovewell *et al.*, 2014).

## BAB 3 KERANGKA TEORI, KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

### 3.1 Kerangka Teori



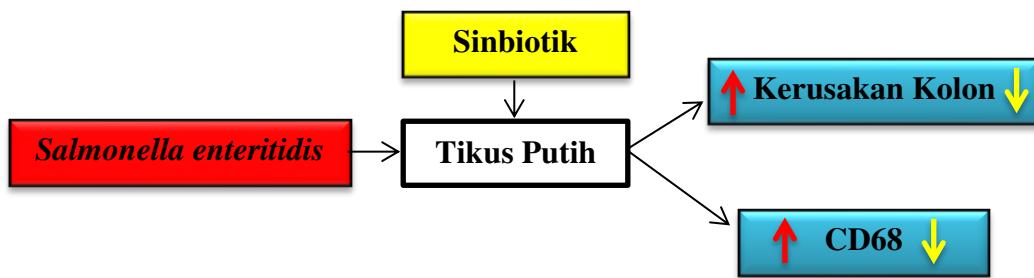
Keterangan :   = Variabel Bebas

↓ = Efek Sinbiotik

  = Variabel Terikat

↑ = Efek *Salmonella enteritidis*

### 3.2 Kerangka Konseptual



Sinbiotik merupakan gabungan antara probiotik dan prebiotik. Sinbiotik memiliki efek sebagai antimikroba dan antiinflamasi. Probiotik adalah mikroorganisme yang mampu menghambat mikroorganisme patogen dalam tubuh, terutama pada sistem pencernaan. Mekanisme penghambatan tersebut dilakukan dengan cara produksi asam laktat oleh bakteri asam laktat (BAL) yang mampu mematikan pertumbuhan bakteri patogen. Salah satu bakteri asam laktat yang biasa digunakan sebagai probiotik adalah *Lactobacillus acidophilus*. Sedangkan prebiotik adalah zat makanan yang tidak dapat dicerna oleh tubuh namun dapat difерментasikan oleh bakteri asam laktat. Tujuan pemberian prebiotik pada penelitian ini adalah sebagai nutrisi untuk menunjang kehidupan bakteri. Salah satu bahan yang dapat dijadikan sebagai prebiotik adalah *Spirulina platensis*. Gabungan antara probiotik dan prebiotik tersebut memungkinkan akan menghasilkan reaksi yang lebih efektif untuk menghambat bakteri patogen.

*Salmonella enteritidis* merupakan bakteri fakultatif intraseluler. Bakteri ini memiliki endotoksin berupa lipopolisakarida dan menginfeksi pada saluran pencernaan, termasuk kolon. Bakteri akan masuk kedalam intraseluler epitel saluran pencernaan dan akan merusak epitel-epitel saluran pencernaan sehingga menyebabkan sejumlah erosi epitel. Infeksi di dalam tubuh akan berakibat

munculnya berbagai respons imun yang diawali oleh meningkatnya sel fagosit berupa makrofag jaringan ke arah sumber infeksi yang diaktivasi oleh adanya mediator radang. Hasil dari proses fagositosis akan mengaktifasi sel CD4 bersama MHC kelas II yang selanjutnya akan menginisiasi sel T *helper* 1 (Th1) untuk menghasilkan IFN- $\gamma$ . IFN- $\gamma$  merupakan sitokin utama yang berperan dalam aktivasi makrofag dan memiliki fungsi yang sangat penting dalam *cell mediated immunity* terhadap mikroba intraseluler. Sedangkan sel CD8 bersama molekul MHC kelas I akan memediasi sel *T cytotoxic* (sel Tc) untuk mengikat sel yang terinfeksi melalui mekanisme nekrosis berupa erosi pada epitel epitel. Sel fagosit seperti neutrofil maupun makrofag akan bergerak ke arah sumber rangsangan, selanjutnya memfagosit sel yang dianggap asing tersebut. Keberadaan makrofag dapat diketahui dengan adanya marker makrofag CD68. Hasil fagositosis sel asing tersebut akan berupa fragmen protein yang selanjutnya disajikan ke sel T untuk mengaktifasi sel B untuk proses pembentukan antibodi. (Noss *et al.*, 2001).

Bakteri *Lactobacillus acidophilus* akan berkompetisi dengan *Salmonella enteritidis* dalam perlekatan pada epitel usus. Selain berkompetisi dalam perlekatan, *Lactobacillus acidophilus* juga dapat menghasilkan asam laktat. Asam laktat yang dihasilkan oleh bakteri *L. acidophilus* akan menghancurkan dinding sel bakteri *Salmonella enteritidis* sehingga akan bakteri akan mati. Kehidupan bakteri *L. acidophilus* akan ditunjang oleh *Spirulina platensis* sebagai nutrisi. Pertumbuhan bakteri *Salmonella enteritidis* yang dihambat oleh sinbiotik tersebut nantinya akan menurunkan efek inflamasi akibat Salmonellosis yang ditunjukkan oleh gambaran histopatologi kolon dan kadar CD68.

### 3.3 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang ada, maka hipotesis yang dapat diajukan antara lain :

1. Mengurangi efek inflamasi akibat infeksi *Salmonella enteritidis* yang ditandai dengan penurunan kadar relatif CD68.
2. Perbaikan epitel pada Kolon yang dapat diamati dengan berkurangnya erosi epitel.

## BAB 4 METODE PENELITIAN

### 4.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei 2018 – Juli 2018 di Laboratorium Epidemiologi Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, Laboratorium Nutrisi dan Makanan Ternak Universitas Brawijaya, Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya, Laboratorium Biologi Universitas Brawijaya, Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

### 4.2 Alat dan Bahan Penelitian

#### 4.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : *Freeze dryer*, kandang tikus, tempat pakan, tempat minum, timbangan digital, *autoclave*, inkubator, *glove*, masker, spuit, *Biosafety Cabinet (BSC)*, ose, gunting bedah, mortar, setrifugasi, gelas ukur, cawan petri, vortex, bunsen, tabung reaksi, tabung erlenmayer, *object glass*, *cover glass*, tabung falcon, tabung eppendorf, mikroskop cahaya, mikropipet, *yellow tip*, *blue tip*, *white tip*, *ice box*, *flowcytometer*, penangas air, rak tabung.

#### 4.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan, desinfektan, serbuk gergaji, pakan tikus, air, *Salmonella enteritidis. Mc. Farland 0,5*, *Lactobacillus acidophilus Mc. Farland 0,5*, *spirulina platensis 100%*, media

NB, media MRSA, media MRSB, PBS, media SSA, NaCl 0,9%, organ kolon tikus, formalin 10 %, alkohol 70%, xylol, ethanol 70%, ethanol 80%, ethanol 90%, ethanol absolut, entelan, parafin, pewarna HE, antibodi CD68.

### 4.3 Variabel Penelitian

Penelitian ini menggunakan tiga variabel, yaitu variabel bebas, variabel terikat dan variabel terkendali.

Variabel Bebas : - Konsentrasi *Salmonella enteritidis*.

- Konsentrasi sinbiotik

Variabel Terikat : - Histopatologi kolon

- Kadar Relatif CD68

Variabel Terkendali : - Tikus dengan berat badan 100 gram yang diinduksi dengan *Salmonella enteritidis*. untuk memperoleh kondisi penyakit Salmonellosis.

### 4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan metode *Experimental* menggunakan Rancangan acak lengkap (RAL). Penelitian ini menggunakan tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan strain wistar yang telah mendapat persetujuan laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya No : 944-KEP-UB (**Lampiran 1**). Penelitian ini menggunakan 20 ekor yang dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan dengan masing-masing perlakuan 4 ulangan. Penggunaan hewan coba sesuai dengan rumus Federer dalam Kusriningrum (2008) yaitu sebagai berikut :

Jumlah ulangan = $t(n - 1) \geq 15$	Keterangan :
$5(n - 1) \geq 15$	$t$ = jumlah kelompok perlakuan
$5n - 5 \geq 15$	$n$ = jumlah ulangan yang diperlukan
$5n \geq 20$	
$n \geq 4$	

**Tabel 4.1** Rancangan Penelitian (Hubungan antara perlakuan dan ulangan).

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

Keterangan :

- K- = Tanpa perlakuan
- K+ = Tikus diinduksi *Salmonella enteritidis* standar *Mc Farland* 0,5 ( $1,5 \times 10^8$  CFU/ml) sebanyak 0,5 ml pada setiap ulangan per oral
- P1 = Tikus diberi Sinbiotik sebanyak 0,2% /kgPk dan diinduksi *Salmonella enteritidis* standar *Mc Farland* 0,5 ( $1,5 \times 10^8$  CFU/ml) sebanyak 0,5 ml pada setiap ulangan per oral
- P2 = Tikus diberi Sinbiotik sebanyak 0,4% /kgPk dan diinduksi *Salmonella enteritidis* standar *Mc Farland* 0,5 ( $1,5 \times 10^8$  CFU/ml) sebanyak 0,5 ml pada setiap ulangan per oral
- P3 = Tikus diberi Sinbiotik sebanyak 0,6% /kgPk dan diinduksi *Salmonella enteritidis* standar *Mc Farland* 0,5 ( $1,5 \times 10^8$  CFU/ml) sebanyak 0,5 ml pada setiap ulangan per oral

**Tabel 4.2 ANOVA (*Analysis of Variance*)**

S.V.	df <sup>x</sup>	SS	MS <sup>xx</sup>	F <sup>xxx</sup> Calc	F5% F1%
<b>Treatment</b>	4				3,06
<b>Error</b>	15				4,89
<b>Total</b>	19				

Keterangan :

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

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

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

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

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

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

#### 4.5 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan antara lain :

1. Persiapan Sinbiotik
2. Persiapan Hewan coba
3. Perlakuan pada tikus dengan pemberian sinbiotik
4. Pemberian bakteri *Salmonella enteritidis* pada tikus
5. Preparasi organ kolon dan limpa
6. Pengukuran kadar relatif CD68
7. Pembuatan preparat histopatologi kolon

## 4.6 Prosedur kerja

### 4.6.1 Persiapan Sinbiotik

Sinbiotik adalah gabungan antara probiotik dan prebiotik. Probiotik merupakan mikroorganisme yang digunakan kompetitor bakteri patogen dalam usus. Probiotik pada penelitian ini menggunakan bakteri *Lactobacillus acidophilus* standar *Mc. Farland 0,5*. Sedangkan prebiotik adalah nutrisi yang berguna untuk menunjang kelangsungan hidup probiotik. Prebiotik pada penelitian ini menggunakan *Spirullina platensis*. Perbandingan antara probiotik dan prebiotik yaitu sebanyak 28 ml bakteri *Lactobacillus acidophilus* standart *Mc. Farland 0,5* dan 56 gram alga *Spirulina platensis*. Setelah itu dicampur dengan 194 ml aquades dan maltodextrin sebanyak 58 gram menggunakan kaca pengaduk. Selanjutnya campuran homogen dikeringkan dengan metode mikroenkapsulasi menggunakan *freeze dryer* selama 4 – 5 hari hingga terbentuk mikrokapsul. Prosedur pembuatan sinbiotik dengan metode *Freeze dryer* lebih lengkap dapat dilihat pada **Lampiran 6** (Permatasari, 2013).

### 4.6.2 Persiapan Hewan coba

Penelitian ini menggunakan 20 ekor tikus (*Rattus Novergicus*) berusia 4-6 minggu sebagai hewan coba dengan berat  $\pm 100$  gram. Tikus diperoleh dari Laboratorium Fisiologi Hewan Universitas Islam Negeri, Malang. Sebelum penelitian, tikus dibiarkan beradaptasi selama 7 hari pada kandang plastik berukuran 50 x 30 cm yang bertujuan agar tikus tidak stres. Alas kandang diberi litter berupa serutan kayu agar meminimalisir bau urea dari feses dan urin tikus.

Pemberian pakan BR-2 sebanyak 10% dari berat badan tikus dan minum dilakukan secara adlibitum. Penggunaan hewan coba dalam penelitian ini sudah mendapatkan persetujuan laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya No : 944-KEP-UB (**Lampiran 3**).

#### **4.6.3 Persiapan *Salmonella enteritidis***

*Salmonella enteritidis* diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Kemudian bakteri tersebut direidentifikasi di Laboratorium Bakteriologi Balai Besar Veteriner Wates Yogyakarta yang menunjukkan bahwa bakteri tersebut positif *Salmonella enteritidis* (**Lampiran 5**). Bakteri *Salmonella* yang di tumbuhkan pada media SSA yang ditandai dengan koloni berwarna hitam setelah diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Darmayanti, 2017). *Salmonella enteritidis* kemudian diperbanyak di media NB dan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya *Salmonella enteritidis* dibuat dengan mengikuti kekeruhan pada standar Mc Farland 0,5 (1,5 x  $10^8$  CFU/ml).

#### **4.6.4 Perlakuan**

Pemberian sinbiotik dilakukan setelah tikus beradaptasi selama 7 hari. Caranya adalah dengan mencampur sinbiotik dengan pakan sesuai dengan konsentrasi yang ada dalam penelitian Baderuddin (2017) yaitu sebesar 0,2%/kgPK, 0,4%/kbPK, 0,6%/kgPK. Pemberian sinbiotik dilakukan selama 2 minggu. Setelah itu dilakukan induksi *Salmonella enteritidis* 0,5 ml per ekor.

Selanjutnya dialakukan pemberian sinbiotik yang dicampur pakan selama 1 minggu sesuai dengan perlakuan.

#### **4.6.5 Nekropsi Tikus**

Pada hari ke 29 pemeliharaan, dilakukan proses nekropsi. Sebelum proses nekropsi, tikus ditimbang berat badannya terlebih dahulu dan dilanjutkan dengan proses eutanasi dengan cara *dislokasi servicalis*. Setelah tikus sudah benar-benar mati, incisi pada bagian abdomen hingga terlihat semua bagian organnya. Setelah itu, dikoleksi organ limpa untuk perhitungan kadar CD68 menggunakan *flowcytometry* dan kolon untuk dijadikan preparat histopatologi.

#### **4.6.6 Flowcytometry**

Perhitungan CD68 dilakukan dengan metode *flowcytometry*. Organ yang dikoleksi untuk perhitungan kadar relatif CD68 adalah limpa. Organ limpa diambil dari tikus yang telah dinekropsi kemudian dibilas menggunakan NaCl 0,9% , lalu diletakkan di cawan petri yang berisi 5 ml NaCl, digerus menggunakan pangkal sputit, diambil menggunakan sputit lalu dimasukkan ke dalam tabung eppendorf. Selanjutnya disentrifus dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit dengan suhu 4°C, kemudian dibuang cairan super natan dan diambil peletnya. Setalah didapat pelet, ditambahkan 50  $\mu$ l antibodi ekstrak seluler staining CD68 menggunakan FITC, kemudian dimasukkan dalam kuvet *flowcytometry* lalu di *running*.

#### 4.6.7 Pembuatan Preparat Histopatologi Kolon

Pembuatan preparat histologi atau histopatologi (Histoteknik) merupakan metoda atau cara untuk membuat gambaran histologi dari suatu spesimen melalui suatu rangkaian proses sehingga dapat diamati atau dianalisa. Tujuan pembuatan suatu preparat histologi atau histopatologi adalah sebagai bahan pembelajaran atau ilmu pengetahuan, penelitian atau riset dan untuk menentukan diagnosa suatu penyakit. Langkah-langkah pembuatan preparat histpatologi antara lain Fiksasi, *Dehidrasi*, *Clearing*, *Embedding* atau *Infiltrasi* parafin, *Blocking*, *Sectioning*, *Staining*, *Mounting* dan *Labeling* (Jusuf, 2009).

Sampel segar diambil sekitar  $1\text{ cm}^3$  dari hewan yang baru mati dan langsung difiksasi. Keterlambatan pengambilan jaringan akan mengakibatkan jaringan akan membusuk. Jaringan difiksasi menggunakan formalin 10% yang berfungsi untuk melindungi jaringan dari enzim-enzim atau bakteri dan melindungi struktur fisik sel. Proses fiksasi memerlukan waktu minimal 24 jam. Proses fiksasi bertujuan untuk mencegah perubahan post mortal, mempertahankan morfologi sel dan jaringan serta mengeraskan jaringan.

Setelah jaringan difiksasi, selanjutnya dipotong dengan ketebalan 0,3 – 0,5 mm dan disusun diatas *Tissue cassette* lalu dimasukkan ke dalam basker. Selanjutnya proses dehidrasi menggunakan ethanol 70%, ethanol 80%, ethanol 90%, ethanol absolut I dan ethanol absolut II masing-masing 2 jam. Proses dehidrasi dimaksudkan untuk menarik air dari jaringan dan mencegah terjadinya pengerasan sampel yang diuji.

Setelah dikeluarkan dari cairan dehidran, jaringan dimasukkan dalam cairan penjernih yang pada akhir proses ini dihasilkan suatu jaringan yang transparan menggunakan xylol I dan xylol II selama 2 jam (Miranti, 2010).

*Infiltrasi* atau *impregnasi* adalah proses pengisian parafin ke dalam pori-pori jaringan. Pengisian pori-pori ini dimaksudkan untuk mengeraskan jaringan agar mudah dipotong dengan pisau mikrotom. Proses infiltrasi parafin dapat menggunakan parafin cair I dan parafin cair II masing-masing 2 jam.

*Embedding* atau *blocking* adalah proses penanaman jaringan dalam blok parafin. Proses ini dilakukan menggunakan mesin dengan suhu 59 - 60 °C selama 30 menit. Setelah itu blok parafin dicetak dengan cara menuangkan parafin cair diatas cetakan blok parafin hingga jaringan terendam sempurna lalu dibekukan dan disimpan di dalam freezer.

*Sectioning* adalah proses pemotongan jaringan yaitu blok parafin dipotong dengan ketebalan 3 - 4  $\mu\text{m}$ . Potongan tersebut diletakkan di atas permukaan air dalam *waterbath* bersuhu 46 °C dengan tujuan agar bentuk potongan blok dapat dirapikan. Kemudian diletakkan diatas objek glass yang telah diolesi *Ewith* sebagai bahan perekat. Pemotongan dilakukan dengan alat *Rotary Microtome Spencer*. Sediaan kemudian di letakan pada gelas objek dan disimpan dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam (Jusuf, 2009).

#### **4.6.8 Pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE)**

Proses pewarnaan HE menurut Muntha (2001) dilakukan dengan pencelupan dengan urutan sebagai berikut:

- a. Proses *Deparafinasi* dilakukan menggunakan Xylol I selama 3 menit, Xylol II selama 3 menit yang bertujuan untuk menghilangkan parafin pada objek sehingga zat warna akan meresap pada objek.
- b. Proses selanjutnya adalah *Rehidrasi* menggunakan Ethanol absolut I selama 3 menit, Ethanol absolut II selama 3 menit, Ethanol 90% 3 menit, Ethanol 80% 3 menit.
- c. Dibilas dengan air mengalir selama 1 menit.
- d. Dicelupkan pada larutan Hematoksin 6-7 menit.
- e. Dilas dengan dengan air keran 1 menit.
- f. Dicelupkan pada larutan Asam Alkohol 1 menit.
- g. Selanjutnya dicelupkan pada larutan eosin 1 – 5 menit.
- h. Dehidrasi kembali dengan Ethanol 80% 10 celupan, Ethanol 90% 10 celupan, Ethanol absolut 10 celupan, Ethanol absolut 1 menit.
- i. Dicelupkan pada Xylol I selama, Xylol II dan Xylol III masing-masing 3 menit.
- j. Preparat yang telah diwarnai diberi 1 tetes entellan
- k. Ditutup dengan kaca penutup.
- l. Preparat yang sudah jadi dapat diamati dibawah mikroskop.

#### 4.7 Analisa Data

Analisa yang digunakan pada penelitian ini menggunakan 2 cara yaitu secara kuantitatif dan kualitatif. Analisa kuantitatif dilakukan dengan menghitung kadar relatif CD68 hasil dari metode *flowcytometry* menggunakan perhitungan

statistik *One Way Anova* dan dilanjutkan dengan uji *Tukey* menggunakan aplikasi statistik Minitab 18. Sedangkan analisa kualitatif dianalisa melalui gambaran histopatologi organ kolon tikus yang dilakukan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran mulai dari 100x, dan 400x untuk setiap ulangan.



## BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Kadar Relatif CD68 pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diberi Sinbiotik Gabungan *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* yang Diinduksi *Salmonella enteritidis*

Pada penelitian untuk mengukur kadar relatif CD68 menggunakan metode *Flowcytometry* dengan sampel berupa organ limpa yang dilabel ekstraseluler CD68. Hasil uji *Flowcytometry* organ limpa terhadap kadar CD68 yang dianalisis menggunakan analisis statistik *One Way ANOVA* yang dilanjutkan uji Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) menunjukkan bahwa Sinbiotik gabungan *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* dapat menurunkan kadar relatif CD68 pada tikus putih yang diinduksi *Salmonella enteritidis*. Hasil tersebut dapat dilihat pada

**Tabel 5.1** dan **Tabel 5.2** serta pada **Gambar 5.1**.

**Tabel 5.1** Tabel rata-rata kadar relatif CD68 (%)

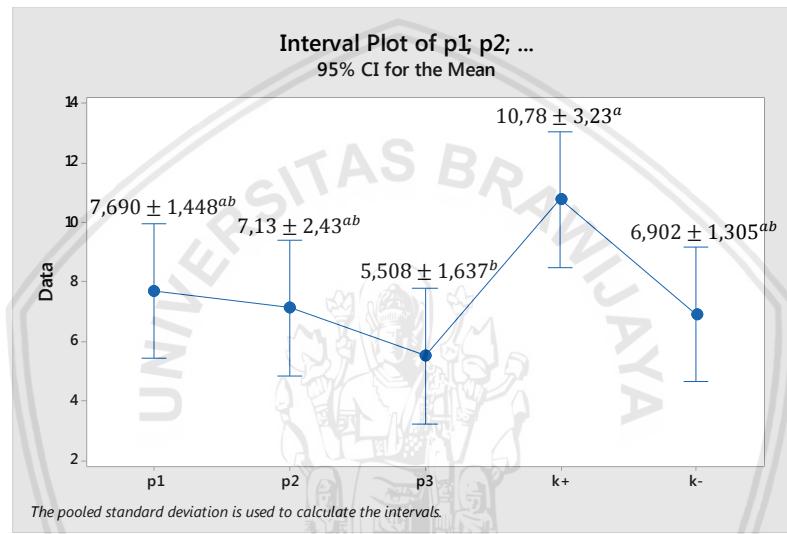
<b>Perlakuan</b>	<b>Ulangan</b>				<b>Rata-rata</b>
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	
K+	13,70	11,02	12,17	6,23	$10,78 \pm 3,23^a$
K-	6,10	7,66	8,32	5,53	$6,902 \pm 1,305^{ab}$
P1	9,53	6,01	7,80	7,42	$7,690 \pm 1,448^{ab}$
P2	10,41	5,63	7,47	4,99	$7,13 \pm 2,43^{ab}$
P3	4,45	3,98	6,01	7,59	$5,508 \pm 1,637^b$

Keterangan : notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ )

**Tabel 5.2** Tabel ANOVA

S.V.	$df^x$	SS	$MS^{xx}$	$F^{xxx}$	Calc	F5%	F1%
<b>Treatment</b>	4	60,84	15,211				
<b>Error</b>	15	68,37	4,558		3,34	3,06	4,89
<b>Total</b>	19	129,21					

Keterangan : Fhitung > Ftabel, maka pada perlakuan terdapat perbedaan nyata ( $p<0,05$ ) dengan  $\alpha = 5\%$

**Gambar 5.1** Grafik rata-rata kadar relatif CD68

Pada penelitian ini K- (kontrol negatif) secara statistika menunjukkan perbedaan namun tidak signifikan dibanding dengan K+ (kontrol positif). Hal ini disebabkan karena pada kondisi sehat sudah terdapat makrofag pada keadaan belum teraktivasi oleh antigen. Menurut Efendi (2003), makrofag berasal dari sel precursor sumsum tulang belakang. Promonosit berkembang menjadi monosit dan diedarkan melalui sistem peredaran darah. Selanjutnya monosit akan migrasi ke dalam jaringan dan matang yang kemudian disebut sebagai makrofag. Di dalam jaringan, makrofag akan berproliferasi menjadi jumlah yang banyak. Tingginya kadar CD68 pada K+ menunjukkan adanya respon imun tubuh

terhadap antigen. Antigen akan mengaktifasi makrofag, sel NK, dan neutrofil untuk melakukan fagositosis (Sunarno, 2007).

Hasil analisis kadar CD68 pada P1 (Tikus yang diberi 0,2% perKgPK), P2 (Tikus yang diberi 0,4% perKgPK) dan P3 (Tikus yang diberi 0,6% perKgPK) berturut-turut menunjukkan rata-rata sebesar 7,690%; 7,13% dan 5,508%. Hasil tersebut menunjukkan bahwa P1 dan P2 tidak berbeda nyata dibanding dengan K+. Sedangkan pada P3 menunjukkan hasil yang berbeda nyata dibanding dengan K+. Sinbiotik adalah gabungan antara probiotik dan prebiotik yang mendukung keberlangsungan hidup dan pertumbuhan bakteri yang menguntungkan di dalam saluran pencernaan makhluk hidup. Probiotik berupa *Lactobacillus acidophilus* dan prebiotik berupa *Spirulina platensis* mempunyai fungsi sebagai antibakteri dan antiinflamasi.

Penurunan kadar relatif CD68 pada kelompok perlakuan yang diberi sinbiotik dikarenakan bakteri *Lactobacillus acidophilus* mempunyai kemampuan menghasilkan asam laktat dapat merusak lipopolisakarida dinding sel bakteri gram negatif, termasuk *Salmonella enteritidis* (Alakomi *et al.* 2000). Sedangkan peran dari *Spirulina platensis* adalah sebagai nutrisi bagi keberadaan bakteri *Lactobacillus acidophilus*. *Spirulina platensis* memiliki kandungan oligosakarida berupa mannosa dan rhamnosa yang diketahui dapat menstimulasi pertumbuhan BAL (Gupta *et al.*, 2017)

*Salmonella* yang masuk ke dalam saluran cerna akan menembus epitel dinding usus dan masuk ke pertahanan limfatik, kemudian mengikuti aliran limfe memasuki sirkulasi darah menuju hepar, ovarium dan limpa sehingga akan

menyebabkan perubahan histopatologi organ-organ tersebut. Infeksi salmonella akan menyebabkan limpa mengalami hiperplasia dan hipertropi, lunak dan membengkak akibat proliferasi limfosit di pulpa merah serta infiltrasi neutrofil dan makrofag ke dalam limpa (Alisantosa, 2000). Menurut Erina dkk (2007), isolasi bakteri organ limpa menggunakan metode swab pada ayam layer jantan yang diinfeksi *Salmonella sp.* menunjukkan hasil positif pada media SIM, SCA, TSIA dan media gula (glukosa, laktosa, manitol dan maltose).

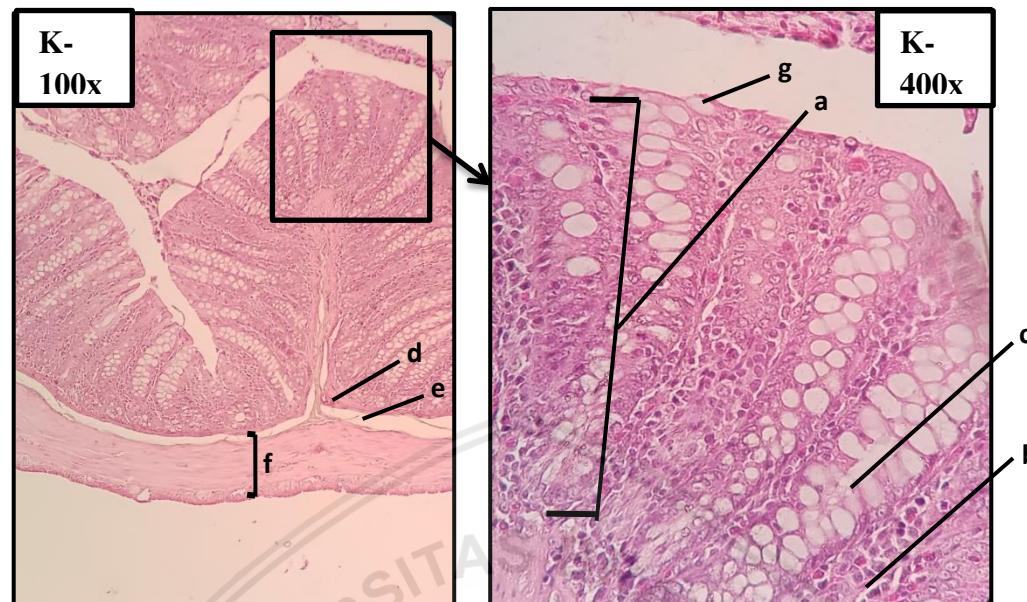
*Salmonella enteritidis* adalah bakteri fakultatif intraseluler yang memiliki endotoksin berupa lipopolisakarida (LPS). LPS merupakan komponen antigen imunogenik yang dominan dari kebanyakan dinding sel bakteri Gram-negatif. Respon imun dimulai dari pengenalan komponen bakteri seperti LPS dan DNA, diikuti pengambilan dan penghancuran bakteri oleh sel fagosit. Hasil dari proses fagositosis akan mengaktivasi sel TCD4<sup>+</sup> yang selanjutnya akan menginisiasi sel T helper 1 (Th1) untuk menghasilkan IFN- $\gamma$ . IFN- $\gamma$  merupakan sitokin utama yang berperan dalam aktivasi makrofag dan memiliki fungsi yang sangat penting dalam *cell mediated immunity* terhadap mikroba intraseluler. Sel fagosit seperti neutrofil maupun makrofag akan bergerak ke arah sumber rangsangan, selanjutnya memfagosit sel yang dianggap asing tersebut. Hasil fagositosis sel asing tersebut akan berupa fragmen protein yang selanjutnya disajikan ke sel T untuk mengaktivasi sel B untuk proses pembentukan antibodi (Noss *et al.*, 2001). CD68 adalah glikoprotein penanda permukaan sel dan diekspresikan oleh monosit dan makrofag (Cojocaru *et al.*, 2012; Gregorio *et al.*, 2005).

Faktor yang mempengaruhi efektifitas penggunaan sinbiotik salah satunya adalah dosis dari bakteri probiotik yang digunakan. Probiotik adalah mikroorganisme hidup yang dalam jumlah cukup akan memberikan manfaat bagi kesehatan bagi *host*, termasuk hewan dan manusia (FAO/WHO, 2002). Pada penelitian ini dosis probiotik yang terkandung dalam sinbiotik adalah sebesar  $6,25 \times 10^7$  CFU/gram. Agar memiliki efek kesehatan yang bermanfaat, produk makanan yang diperkaya dengan probiotik harus mengandung minimum yang diperlukan. Pada industri pangan jumlah minimum yang direkomendasikan probiotik harus  $10^6$  CFU/ml pada saat dikonsumsi (Boylston *et al*,2004).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kelompok P3 dengan pemberian sebesar 0,6%/KgPK sebagai *feed additive* mampu memberikan hasil terbaik dengan rataan kadar relatif CD68 sebesar 5,508% pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinfeksi *Salmonella enteritidis*.

## **5.2 Pengaruh Pemberian Sinbiotik (*L. acidophilus* dan *S. platensis*) Terhadap Histopatologi Kolon Tikus yang Diinduksi *Salmonella enteritidis***

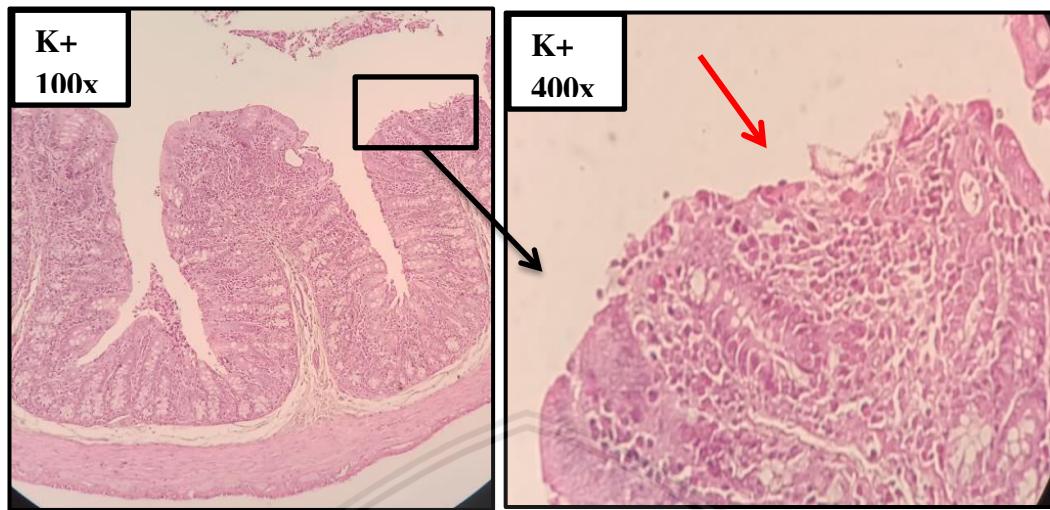
Pada penelitian untuk mengetahui pengaruh pemberian sinbiotik gabungan *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* terhadap gambaran organ kolon tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi *Salmonella enteritidis* dilakukan melalui gambaran histopatologis yang diwarnai dengan pewarnaan *Hematoxylin-Eosin* (HE) yang diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100x dan 400x. Pengaruh pemberian sinbiotik ditunjukkan dengan berkurangnya erosi epitel kolon.



**Gambar 5.2** Gambaran Histopatologi Kolon kelompok K-  
Keterangan:

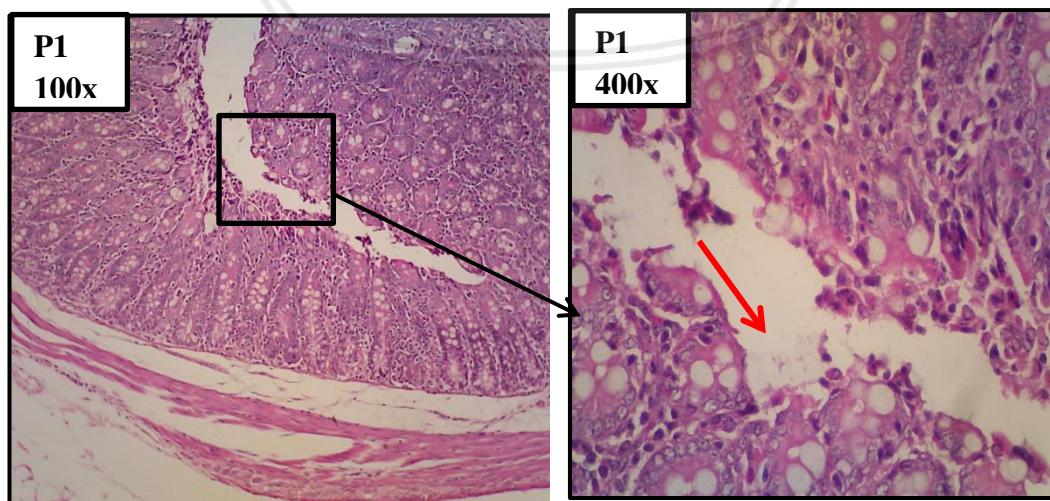
- a. Mukosa
- b. Lamina Propria
- c. Glandula Intestinal
- d. Muskularis Mukosa
- e. Submukosa
- f. Muskularis
- g. Sel Goblet

Histologi kolon dalam keadaan normal ditunjukkan oleh kelompok K- (Gambar 5.2). Struktur kolon secara histologi tikus terdiri atas 4 lapisan yaitu mukosa, submukosa, muskularis dan serosa. Lapisan mukosa terdiri atas sel epitel, lamina propria dan muskularis mukosa. Pada lapisan mukosa tidak terdapat vili, tersusun atas sel epitel kolumnar dan memiliki kripte lieberkuhn yang terletak lebih dalam serta memiliki sel goblet yang lebih banyak daripada usus halus. Pada lamina propria terdapat banyak sel limfoid dan nodul limfoid yang tersebar sampai sub mukosa (Sherwood, 2013).



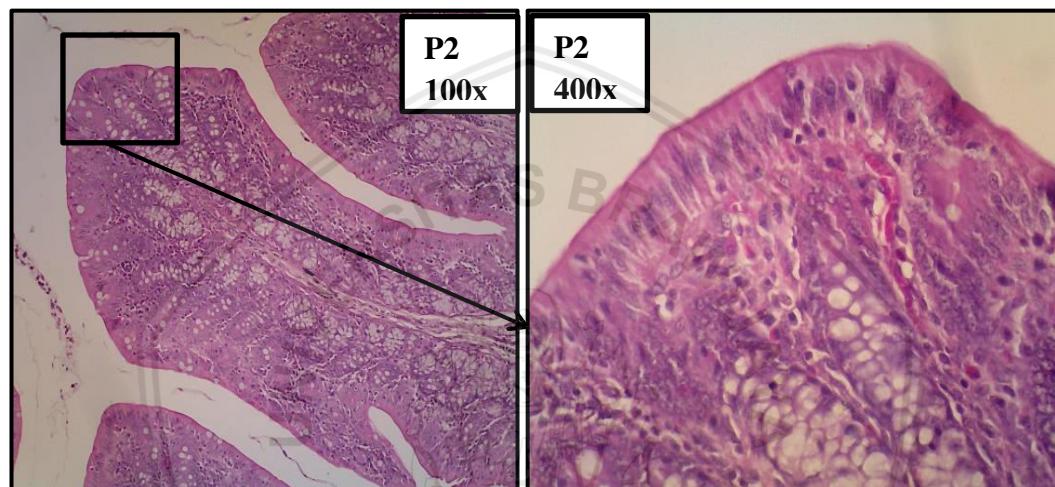
**Gambar 5.3** Gambaran Histopatologi kolon perlakuan K+ Lapisan epitel kolon mengalami erosi (panah merah)

Gambaran histopatologi kolon pada kelompok K+ (**Gambar 5.3**) menunjukkan kerusakan struktur pada lapisan epitel kolumnar. Hal itu ditunjukkan pada lapisan epitel kolumnar mengalami sejumlah erosi yang cukup parah. Perubahan pada struktur epitelial kolon tersebut menunjukkan bahwa induksi *Salmonella enteritidis* mengakibatkan kerusakan epitel kolon. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Rodenburg *et al* (2007), bahwa *Salmonella* memiliki *cytotoxins* yang menyebabkan erosi pada epitel ileum dan juga kolon.



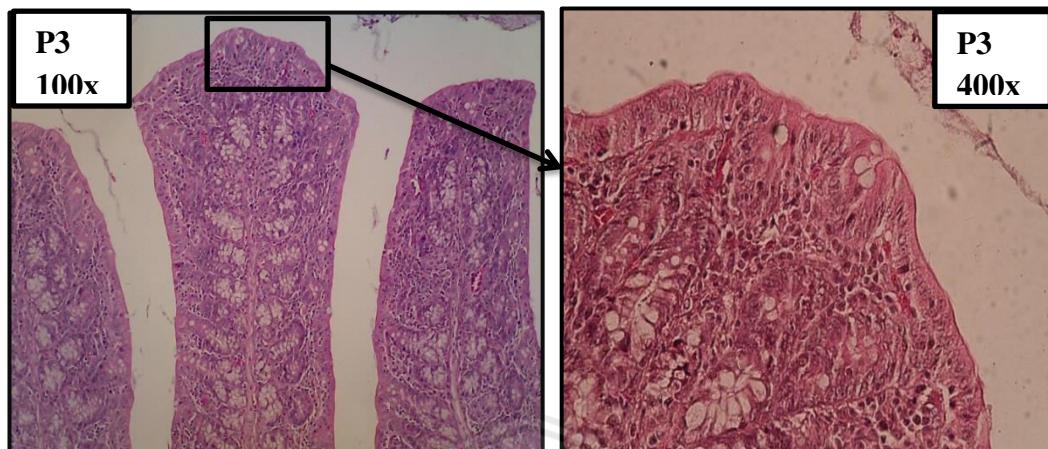
**Gambar 5.4** Gambaran Histopatologi Kolon kelompok P1 Lapisan epitel pada kolon mengalami erosi (panah merah)

Gambaran histopatologi kolon kelompok perlakuan P1 (**Gambar 5.4**) yang diberi perlakuan *feed additive* berupa 0,2%/KgPK sinbiotik dan diinduksi 0,5 mL *Salmonella enteritidis*, menunjukkan adanya erosi namun tidak lebih parah jika dibandingkan dengan K+.



**Gambar 5.5** Gambaran Histopatologi Kolon kelompok P2 Lapisan epitel kolon mengalami perbaikan yang ditunjukkan dengan berkurangnya erosi

Gambaran histopatologi kolon pada perlakuan P2 (**Gambar 5.5**) yang diberi *feed additive* 0,4%/KgPK sinbiotik dan induksi 0,5 mL *Salmonella enteritidis* menunjukkan adanya penghambatan kerusakan epitel. Hal itu ditunjukkan dengan berkurangnya erosi epitel dan tidak terjadi perubahan susunan epitel kolumnar. Gambaran histopatologi pada P2 terlihat normal dan mendekati kontrol negatif.



**Gambar 5.6** Gambaran Histopatologi Kolon kelompok P3 Lapisan epitel mengalami perbaikan yang ditunjukkan dengan tidak adanya erosi epitel

Gambaran histopatologi kolon pada perlakuan P3 (**Gambar 5.6**) yang diberi *feed additive* 0,6%/KgPK sinbiotik dan induksi 0,5 mL *Salmonella enteritidis* menunjukkan adanya penghambatan kerusakan epitel. Hal itu ditunjukkan dengan berkurangnya erosi epitel dan tidak terjadi perubahan susunan epitel kolumnar. Berdasarkan gambaran histopatologi kolon menunjukkan bahwa dosis pada kelompok P2 dan P3 memberikan gambaran histopatologi mendekati kontrol negatif.

Epitel merupakan salah satu *barrier* pertama yang melindungi saluran pencernaan dari bakteri, sehingga adanya kerusakan dapat dijadikan sebagai indikasi suatu infeksi bakteri (Jawetz *et al*, 2005). *Salmonella enteritidis* merupakan salah satu bakteri patogen pada saluran pencernaan. *Salmonella enteritidis* memiliki 3 mekanisme infeksi yaitu adhesi pada epitel usus, kolonisasi dan invasi ke dalam mukosa usus. Pada saat infeksi, *Salmonella enteritidis* mengeluarkan endotoksin yang mampu merusak struktur jaringan kolon sehingga mengakibatkan perubahan pada morfologi kolon (Finlay *et al*, 2003).

Pada pengamatan histopatologi kolon kelompok perlakuan dengan pemberian sinbiotik kombinasi *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* yakni P2, dan P3 menunjukkan adanya perbaikan yang ditandai dengan berkurangnya kerusakan pada epitel jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Menurut *Food and Agriculture Organization/World Health Organization* (FAO/WHO) (2002), probiotik yang ideal mampu bertahan melewati pada saluran pencernaan dan mempunyai kemampuan untuk berkembang biak yang baik di dalam saluran pencernaan, tahan terhadap cairan lambung dan cairan empedu. Selain itu probiotik juga harus mampu menempel pada sel epitel usus, membentuk kolonisasi pada saluran pencernaan dan menghasilkan zat anti mikroba (bakteriosin) serta memberikan pengaruh yang menguntungkan inangnya. Terbentuknya kolonisasi probiotik dalam saluran pencernaan, mengakibatkan kompetisi nutrisi dan lokasi adhesi (penempelan) antara probiotik dan bakteri lain, khususnya bakteri patogen. Pertumbuhan probiotik juga akan menghasilkan berbagai komponen anti bakteri (asam organik, hidrogen peroksida, dan bakteriosin yang mampu menekan pertumbuhan bakteri patogen) (Collado *et al.*, 2009).

*Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* merupakan mikroflora normal usus yang paling umum digunakan dan merupakan mikroba yang paling berperan menjaga keseimbangan saluran cerna. *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* merupakan probiotik yang tahan terhadap asam lambung, cairan empedu, mampu menempel pada dinding saluran cerna sehingga melindungi mukosa saluran cerna, dan mampu menghasilkan zat yang berpotensi sebagai antimikroba patogen.

Keduanya merupakan bakteri asam laktat (LAB – *lactic acid bacteria*) karena mampu melakukan proses *fermentasi* membentuk asam laktat pada usus besar (Simadibrata, 2010). Asam laktat yang dihasilkan oleh BAL berguna untuk merusak permeabilitas bakteri patogen sehingga bakteri patogen akan mati (Alakomi *et al.* 2000).

Kelompok P2 dan P3 dengan pemberian sinbiotik kombinasi *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* 0,4%/KgPK dan 0,6%/kgPK menunjukkan gambaran epitel kolon yang menyerupai normal ditandai dengan adanya penghambatan erosi epitel. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pemberian sinbiotik kombinasi *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* 0,4%/KgPK dan 0,6%/kgPK sebagai *feed additive* adalah pemberian terbaik dalam memperbaiki gambaran epitel kolon pada tikus putih yang diinduksi *Salmonella enteritidis*.

## BAB 6 PENUTUP

### 6.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa pemberian Sinbiotik gabungan *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* dapat mencegah terjadinya salmonellosis pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi *Salmonella enteritidis* dengan dosis efektif 0,6%/KgPK berdasarkan penurunan kadar CD68 organ limpa dan berkurangnya erosi epitelial pada gambaran histopatologi organ kolon tikus.

### 6.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, pemberian sinbiotik yang dicampur dengan pakan kurang efektif dikarenakan pada beberapa tikus masih terdapat sisa-sisa makanan yang diberikan dan memungkinkan dosis sinbiotik yang dimakan hewan coba tidak sesuai dengan dosis yang diharapkan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Akter, M. R., K.A. Choudhury, M.M. Rahman, and M.S. Islam. 2007. Seroprevalence Of Salmonellosis In Layer Chickens With Isolation, Identification And Antibiogram Study Of Their Causal Agents. *Bangl. J.Vet. Med.* 5 (1 & 2): 39–42
- Alakomi, H. L., Skytta, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K., and Helander, I. M. 2000. Lactic Acid Permeabilizes Gram-Negative Bacteria by Disrupting the Outer Membrane. *Applied and Environmental Microbiology* 6 (5) : 2001-2005.
- Alisantosa, B., H.L. Shivaprasad, A.S., Dhillon, O. Schaberg and D. Bandli. 2000. *Pathogenicity of Salmonella enteritidis Phage Thypes 4, 8, and 23 in specific pathogen free chicks*. Avian Path. 29: 583-592
- Antari, A. L.2017. *Imunologi Dasar*. DEEPUBLISH : Sleman.
- Antarini, A.A. N. 2011. Sinbotik Antara Prebiotik dan Probiotik. *Jurnal Gizi* 2(2.)
- Arii J, Tanabe Y, Miyake M, Mukai T, Matsuzaki M, Niinomi N, Watanabe H, Yokota Y, Kohno Y, and Noda M. 2002. Clinical and pathologic characteristics of nontyphoidal salmonella encephalopathy. *Neurology*. 58(11):1641–1645.
- Ariyanti, T., dan Supar. 2008. Antigenisitas dan Imunogenisitas *Salmonella enteritidis*: Implikasinya dalam Diagnosis dan Pengembangan Vaksin Isolat Lokal untuk Unggas. *WARTAZOA* 18(4):185 – 200.
- Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian [BPPP]. 2016. *Laporan Kinerja*. Badan Penelitian Dan Pengembangan Pertanian Kementerian Pertanian.
- Baderudin, S. H. 2017. *Effect of Synbiotic Meal on Salmonella sp., Escherichia coli and Lactic Acid Bacteria Population*. Program and Abstract Book of the Sixth SAADC Conference, Batu 16 – 19 Oktober 2017.
- Balai Pengujian dan Penyidikan Veteriner [BPPV]. 2018. *Informasi Dan Diskripsi Singkat Penyakit PHMS (Penyakit Hewan Menular Strategis)*. Seri Pengetahuan Uum.
- Baurhoo, B., A.Letellier, X. Zhao and C.A. Ruiz-Feria. 2007. Cecal population of Lactobacilli and Bifidobacteria and *Escherichia coli* after *in vivo* *Escherichia coli* challenge in birds fed diets with purified lignin or mannanoligosaccharides. *Poult. Sci.* 86: 2509 – 2516.
- Bhan MK, Bahl R, and Bhatnagar S. 2005. Typhoid and paratyphoid fever. *Lancet*. 366(2):749–762.
- Bhowmik, D., Dubey, J., and Mehra, S. 2009. Probiotic efficiency of *Spirulina platensis*-stimulating growth of Lactic Acid Bacteria (LAB). *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 4(2), 160 – 163.

- Boylston TD, Vinderola CG, Ghoddusi HB and Reinheimer JA. 2004. Incorporation of Bifidobacteria into cheeses: Challenges and rewards. *International Dairy Journal*, 14: 375–387.
- Carere, C. and Maestripieri D. 2013. *Animal Personalities: Behavior, Physiology, and Evolution*. Chicago (USA): University of Chicago Pr
- Cojocaru, Elena., M. Trandafirescu, M. Leon, C. Cotutiu and L. Foia. 2012. Immunohistochemical expression of anti-CD68 antibody in atherosclerotic plaque. *Rom J Morphol Embryol*, 53(1):61–66.
- Collado, M.C., L. Jalonen, J. Meriluoto, and S. Salminen. 2009. Protection mechanism of probiotic combination against human pathogens: in vitro adhesion to human intestinal mucus. *Asia Pac J. Clin. Nutr.*, 15: 570–575.
- Connor BA, and Schwartz E. 2005. Typhoid and paratyphoid fever in travellers. *The Lancet Infectious Diseases*. 5:623–628.
- Cristiakov, Dmitry A., M. C. Killingsworth., V. A. Myasoedova., A. N. Orekhov and Y. V. Bobryshev. 2017. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Laboratory Investigation* 97, 4–13.
- Crump JA, Kretsinger K, Gay K, Hoekstra RM, Vugia DJ, Hurd S, Segler SD, Megginson M, Luedeman LJ and Shiferaw B. 2008. Clinical response and outcome of infection with *Salmonella enterica* serotype Typhi with decreased susceptibility to fluoroquinolones: a United States foodnet multicenter retrospective cohort study. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:1278–1284.
- Crump JA, Luby SP and Mintz ED. 2004. The global burden of typhoid fever. *Bulletin of the World Health Organization*. 82:346–353
- Efendi, Z. 2003. *Daya Fagositosis Makrofag pada Jaringan Longgar Tubuh*. USU Dugital Library : Makassar.
- Fauziyah, K. R. 2016. *Profil Tekanan Darah Normal Tikus Putih (Rattus norvegicus) Galur Wistar dan Sprague-Dawley [SKRIPSI]*. Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor
- Finlay RB, Heffron F and Falkow S. 2003. Epithelial Cell Surfaces Induces *Salmonella* Proteins Required for Bacterial Adherence and Invasion. *Science* 243 : 940.
- Food and Agriculture Organization/World Health Organization [FAO/WHO]. 2002. *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food: London, Ontario.
- Gaggia, F., P. Mattarelli and B. Biavati. 2010. Probiotic and prebiotics in animal feeding for safe food production. *Intl. J. Food Microbiol.* 14: 515 – 528.

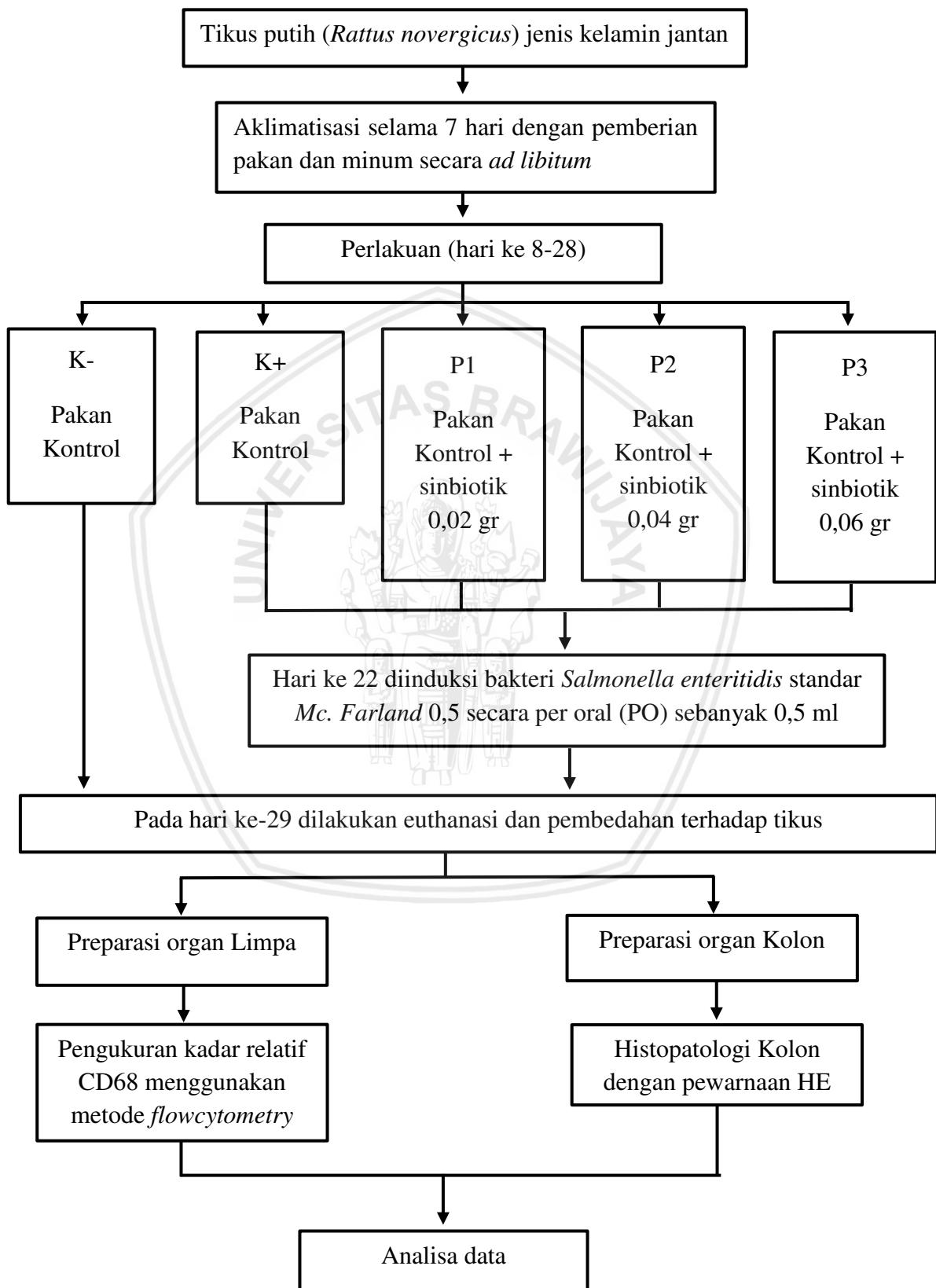
- Galik, Branislav, D. Biro, M. Simko, M. Juracek, M. Capcarova, A. Kolesarova, M. Rolinec, R. Toman and T. Kanka. 2016. The effect of dietary bee pollen intake on growth performance and biochemical indicators of rats. *ACTA VET. BRNO* 2016, 85: 099–104
- Global Technical Services, 2013. *Pathogenesis Of Salmonellosis In Humans* Lohmann Animal Health
- Gregorio, G. B., A. Y. Borengasser, N. Rasouli, V. Varma, T. Lu, L. M. Miles, G. Ranganathan, C. A. Peterson, R. E. McGehee and P. A. Kern. 2005. Expression of CD68 and Macrophage Chemoattractant Protein-1 Genes in Human Adipose and Muscle Tissues Association With Cytokine Expression, Insulin Resistance, and Reduction by Pioglitazone. *Diabetes* 54.
- Gupta, S., C. Gupta, A.P. Garg and D. Prakash. 2017. Prebiotic efficiency of Blue Green Algae on probiotics microorganisms. *Journal of Microbiology and Experimentation*. 4(4): 1 – 4.
- Hang'ombe BM, Sharma RN, Skjerve E and Tuchili LM. 1999. Occurance of *Salmonella Enteritidis* in Pooled table Eggs and Market-ready Chicken Carcasses in Zambia. *Reseach Note. Avian Diseases*. 43:597-599.
- Haryati, T. 2011. Probiotik Dan Prebiotik Sebagai Pakan Imbuhan Nonruminansia. *WARTAZOA Vol. 21 No. 3*
- Hohmann EL. 2001. Nontyphoidal salmonellosis. *Clinical Infectious Disease*. 15(32):263–269.
- Jamil, A.B.M., Akanda, R., Rahman, M., Hossain, A., and Islam. S. 2015. Prebiotic competence of spirulina on the production performance of broiler chickens. *J. Adv. Vet. Anim. Res*, 2(3), 304-309.
- Jawetz, Melnick, and Adelberg's. 2005. *Medical Microbiology 25th ed.* Acces Medicine: Mc-Graw Hill
- Keputusan Menteri Pertanian [KEPMENtan]. 2013. *Keputusan Menteri Pertanian nomor 4971/2012 tentang zoonosis prioritas*.
- Kunarso, D. H. 1987. Beberapa Catatan Tentang Bakteri *Salmonella*. *Oseana, Volume XII, Nomor 4 : 79 – 90.*
- Leoanggraini, U., dan B. I. Muhadi. 2011. Fermentasi Mikroaerofilik *Lactobacillus acidophilus* untuk Produksi Probiotik. *Industrial Research Workshop and National Seminar*
- Lovewell R. , Patankar Y. and Berwin B. 2014. Mechanisms of phagocytosis and host clearance of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 31: 591–603
- Manin, F. 2010. Potensi *Lactobacillus acidophilus* dan *Lactobacillus fermentum* dari Saluran Pencernaan Ayam Buras Asal Lahan Gambut

sebagai Sumber Probiotik. *Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Peternakan Februari, 2010, Vol. XIII, No. 5*

- Molbak K, Gerner-Smidt P, Wegener HC. 2002. Increasing quinolone resistance in *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. *Emerging Infectious Diseases*. 8:514–515.
- Mustafiah, S. E., D. Fatmawati dan I. Yusuf. 2011. Indeks Daya Fagosit Makrofag Peritonium Setelah Pemberian Propolis Pada Mencit (*Mus Musculus*). *Jurnal Vol. 3, No.2*.
- Naughton, P. J., G. Grant, R. J. Spencer, S. Bardocz and A. Pusztai. 1997. A rat model of infection by *Salmonella typhimurium* or Salm. Enteritidis. *The Journal of applied bacteriology* 81, 651 – 656.
- Noss, E.H., R.K. Pai, T.J. Sellati, J.D. Radolf, J. Belisle, D.T. Golenbock, W.H. Boom, and C.V. Harding. 2001. Toll-like receptor 2-dependent Inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of *M. tuberculosis*. *J. Immunol.* 167(2):910-918.
- Nwabor. 2015. Epidemiology of *Salmonella* and *Salmonellosis*. *International Letters of Natural Sciences Vol. 47 (2015) pp 54-73*
- Ochiai RL, Acosta CJ, Danovaro-Holliday MC, Baiqing D, Bhattacharya SK, Agtini MD, Bhutta ZA, Canh do G, Ali M, and Shin S. 2008. A study of typhoid fever in five Asian countries: disease burden and implications for controls. *Bulletin of the World Health Organization*. 86:260–268.
- Patel TA, Armstrong M, Morris-Jones SD, Wright SG, and Doherty T. 2010. Imported enteric fever: case series from the hospital for tropical diseases, London, United Kingdom. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 82:1121 – 1126.
- Permatasari, A.K., K.A. Noianitri, dan A.S. Duniaji. 2013. Viabilitas *Lactobacillus rhamnosus* SKG 34 Dalam Berbagai Jenis Enkapsulasi dan Suhu Penyajian. *JITV*. 9(2).
- Poeloengan, M., I. Komala dan S. M. Noor. 2014. Bahaya *Salmonella* Terhadap Kesehatan. *Lokakarya Nasional Penyakit Zoonosis*.
- Pudjiantmoko. 2014. *Manual Penyakit Mamalia*. Kementerian Pertanian Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan Direktorat Kesehatan Hewan.
- Pyar, H. and K.K Peh. 2014. Characterization and Identification Of *Lactobacillus Acidophilus* Using Biolog Rapid Identification System. *International Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences Vol. 6*.
- Rodenburg, Wendy., J. Keijer, E. Kramer, S. Roosing, C. Vink, M. B. Katan, R. V. D. Meer and I. M. J. Bovee-Oudenhoven. 2007. *Salmonella* induces prominent gene expression in the rat colon. *BMC Microbiology* 7:84.

- Saputra, D. A., Sukenda dan Widanarni. 2013. Aplikasi sinbiotik dengan dosis probiotik berbeda untuk pencegahan vibriosis pada ikan kerapu bebek. *Jurnal Akuakultur Indonesia* 12 (2), 169–177.
- Sari, O. F. 2013. *Formula Biskuit Kaya Protein Berbasis Spirulina dan Kerusakan Mikrobiologis Selama Penyimpanan* [SKRIPSI]. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor
- Sheorey H, and Darby J. 2008. Searching for *Salmonella*. *Australian Family Physician*. 37:806–810.
- Sherwood L. 2013. *Fisiologi dari sel ke sistem*. 6th ed. Jakarta: EGC.
- Shivaprasad HL, and Barrow PA. 2008. *Pullorum disease and fowl typhoid*, p620– 634. In Saif YM, Fadley AM (ed), Diseases of poultry, 12th ed. Iowa State University Press, Ames, IA.
- Singh, S. 2001. SYMPOSIUM : TYPHOID FEVER. *Journal, Indian Academy of Clinical Medicine – Vol. 2, No. 1 and 2*
- Sirois M. 2005. *Laboratory Animal Medicine : Principles and Procedures*. United States of America: Mosby Inc.
- Subowo. 2009. *Histologi Umum*. Jakarta: CV Sagung Seto.
- Sunarno. 2007. Efek Phyllanthus Niruri L Pada Prosentase Neutrofil, Koloni Bakteri Limpa, dan Histopatologi Hepar Mencit Balb/C yang Diinfeksi *Salmonella Typhimurium* [TESIS]. Magister Ilmu Biomedik. Universitas Diponegoro
- Supardi dan Sukamto. 2003. *Mikrobiologi dalam Pengolahan dan Keamanan Produk Pangan*. Bandung : Penerbit Alumni.
- Takaya A, Suzuki M, Matsui H, Tomoyasu T, Sashinami H, Nakane A, and Yamamoto T. 2003. Lon, a stress-induced ATPdependent protease, is critically important for systemic *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection of mice. *Infect Immun*. 71:690–696.
- Thaha, A. H. 2016. Gambaran Klinis Dan Prevalensi Salmonellosis Pada Ayam Ras Petelur Di Desa Tanete Kec. Maritenggae Kabupaten Sidrap. *JIP Jurnal Ilmu dan Industri Perternakan* 3(1).
- Vdoviaková, K., E. Petrovová., M. Maloveská., L. Krešáková., J. Teleky., M. Z. J. Elias., and Darina Petrášová. 2016. Research Article Surgical Anatomy of the Gastrointestinal Tract and Its Vasculature in the Laboratory Rat. *Hindawi Publishing Corporation Gastroenterology Research and Practice*
- Woods DF, Reen FJ, Gilroy D, Buckley J, Frye JG, and Boyd EF. 2008. Rapid multiplex PCR and real-time TaqMan PCR assays for detection of *Salmonella enterica* and the highly virulent serovars Choleraesuis and Paratyphi C. *J Clin Microbiol*. 46:4018–4022.

**Lampiran 1.** Bagan Kerangka Operasional Penelitian



## Lampiran 2. Perhitungan Dosis

Perhitungan Pakan untuk Tikus dengan berat 100 gram

$$\text{Jumlah Pakan} = 10\% \times \text{BB}$$

$$= 10\% \times 100$$

$$= 10 \text{ gram/ekor/hari}$$

### 1. Perhitungan Dosis dan jumlah pemberian Sinbiotik Perlakuan 1 (0,2% /kgPK)

$$\text{Dosis P1} = 0,2\% \times 1 \text{ kg}$$

$$= 0,2 \% \times 1000 \text{ gram}$$

$$= 2 \text{ gram/kgPK}$$

$$\text{Jumlah Pakan P1} = \text{Dosis P1} \times \text{Jumlah Pakan}$$

$$= \frac{2 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}} \times 10 \text{ gram}$$

$$= 0,02 \text{ gram}$$

Jadi jumlah pemberian sinbiotik P1 adalah 0,02 gram per hari

### 2. Perhitungan Dosis dan jumlah pemberian Sinbiotik Perlakuan 1 (0,4% /kgPK)

$$\text{Dosis P2} = 0,4\% \times 1 \text{ kg}$$

$$= 0,24 \% \times 1000 \text{ gram}$$

$$= 4 \text{ gram/kgPK}$$

$$\text{Jumlah Pakan P1} = \text{Dosis P1} \times \text{Jumlah Pakan}$$

$$= \frac{4 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}} \times 10 \text{ gram}$$

$$= 0,04 \text{ gram}$$

Jadi jumlah pemberian sinbiotik P2 adalah 0,04 gram per hari

### 3. Perhitungan Dosis dan jumlah pemberian Sinbiotik Perlakuan 1 (0,2% /kgPK)

$$\text{Dosis P3} = 0,6\% \times 1 \text{ kg}$$

$$= 0,6 \% \times 1000 \text{ gram}$$

$$= 6 \text{ gram/kgPK}$$

$$\text{Jumlah Pakan P1} = \text{Dosis P1} \times \text{Jumlah Pakan}$$

$$= \frac{6 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}} \times 10 \text{ gram}$$

$$= 0,06 \text{ gram}$$

Jadi jumlah pemberian sinbiotik P3 adalah 0,06 gram per hari

**Lampiran 3. Laik Etik**

 <b>KOMISI ETIK PENELITIAN</b> <b>UNIVERSITAS BRAWIJAYA</b>	
<b>KETERANGAN KELAIKAN ETIK</b> <b>"ETHICAL CLEARENCE"</b>	
No: 944-KEP-UB	
<b>KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)</b> <b>UNIVERSITAS BRAWIJAYA</b> <b>TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG</b> <b>DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:</b>	
<p>PENELITIAN BERJUDUL : FAFA (FEED ADDITIVE FOR ALTERNATIVE ANTIMICROBIAL): SINBIOTIK MIKROENKAPSULASI <i>Spirulina plantesis</i> DAN <i>Lactobacillus acidophilus</i> TERHADAP SALMONELLOSIS</p>	
<p>PENELITI : EKA WULANDARI</p>	
<p>UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA</p>	
<p>DINYATAKAN : LAIK ETIK</p>	
<p>Malang, 16 April 2018            Ketua Komisi Etik Penelitian            Universitas Brawijaya</p>	
 Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES. NIP. 19600903 198802 2 001	

**Lampiran 4.** 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

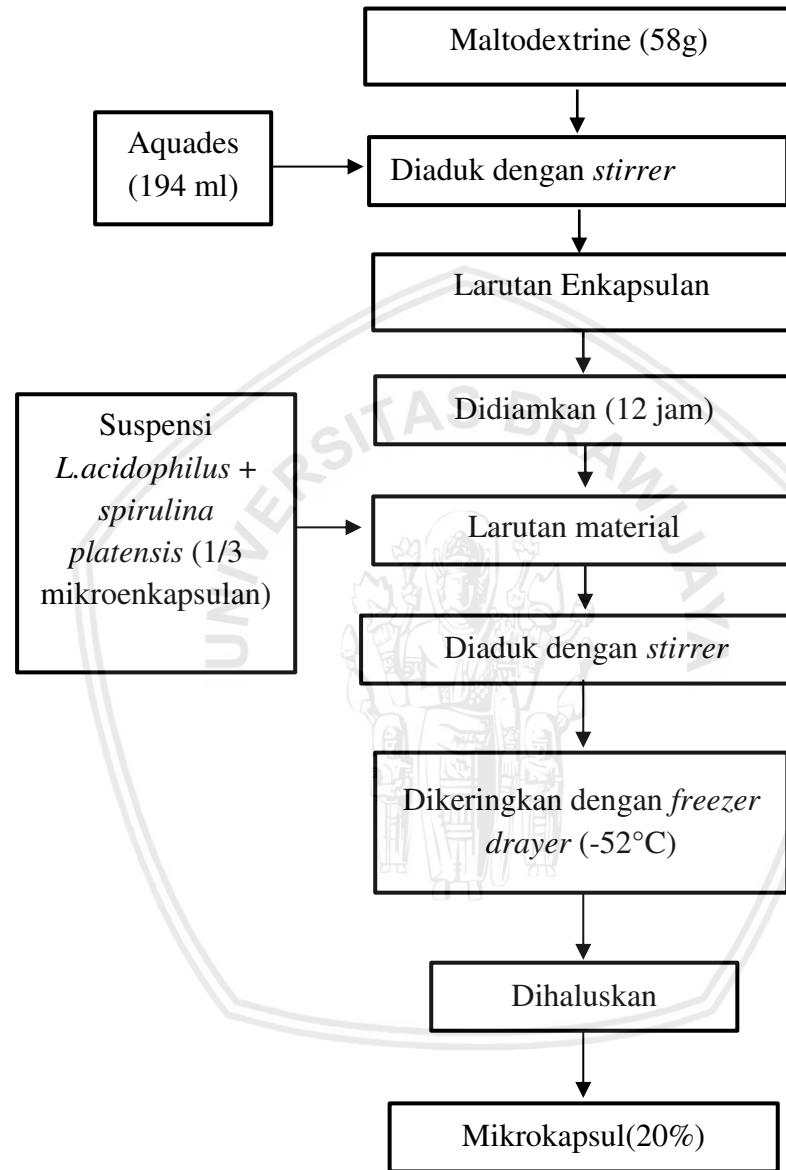
Ttd.

M. Basyaruddin, M.Si

## Lampiran 5 Hasil Reidentifikasi *Salmonella sp.*

SNI ISO/IEC 17025 : 2008 LP-618-DN No. Surat : 09038 Lampiran : Perihal : Hasil Uji Laboratorium Tgl Kirim / No : 03 Juli 2018 Tgl Terima : 03 Juli 2018 No EPI : 04181036 Jenis Layanan : Percangan Tgl Jawab : 10 Juli 2018		ILAC - MRA KEPADA YTH: Eka Wulandari Jl. Raya Dieng Atas, Kalisongo, Dau, Malang Malang																																				
<table border="1"> <thead> <tr> <th>No</th> <th>Kecamatan</th> <th>Desa</th> <th>Pemilik</th> <th>Lab Uji</th> <th>Jenis Uji</th> <th>Jum</th> <th>Pos</th> <th>Neg</th> <th>Sero+</th> <th>Sero-</th> <th>Lainnya</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1.</td> <td>Dau</td> <td>Kalisongo</td> <td>Lab mikrobiologi Bakteriologi dan Imunologi FKH UB</td> <td></td> <td>Salmonella sp isolasi</td> <td>1</td> <td>1</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table> <p><b>Kesimpulan / Diagnosa</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>No</th> <th>Kecamatan</th> <th>Desa</th> <th>Hewan</th> <th>Diagnosa</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1.</td> <td>Dau</td> <td>Kalisongo</td> <td>Lain-lain</td> <td>SALMONELLOSIS POSITIF (1)</td> </tr> </tbody> </table>					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	No	Kecamatan	Desa	Hewan	Diagnosa	1.	Dau	Kalisongo	Lain-lain	SALMONELLOSIS POSITIF (1)
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																											
No	Kecamatan	Desa	Hewan	Diagnosa																																		
1.	Dau	Kalisongo	Lain-lain	SALMONELLOSIS POSITIF (1)																																		
<p>Drh. Suhardi NIP. 197407022008011007</p> <p>Tembusan:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Kepala Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan Kab. Malang</li> <li>2. Asip</li> </ol>					<p>PJ/Wakil PJ Laboratorium</p> <p>drh. Cicilia S.R., MSc NIP. 19791108 200501 2 003</p>																																	

**Lampiran 6.** Prosedur Pembuatan Sinbiotik dengan Metode *Freeze Dryer*  
Menurut Permatasari (2013)



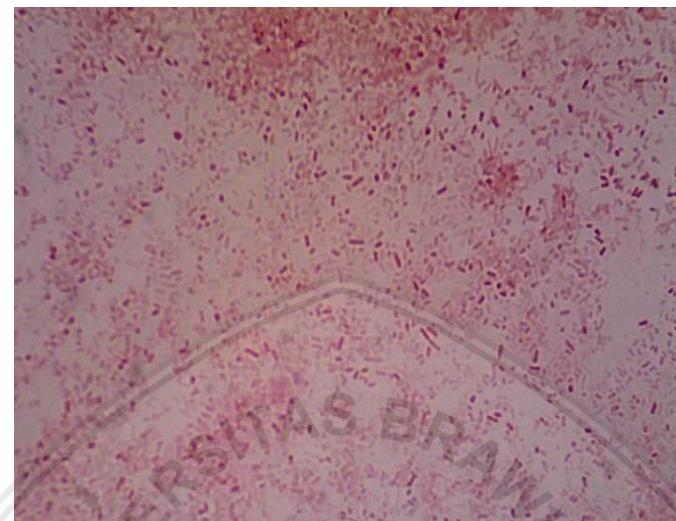
### Lampiran 7. Perhitungan Hasil Mikroenkapsulasi Sinbiotik

Bahan yang digunakan:

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

Perhitungan:

1. Enkapsulan = Maltodextrin + Aquades  
 $= 58 + 194$   
 $= 252$
2. Sinbiotik =  $\frac{1}{3} \times$  enkapsulan  
 $= \frac{1}{3} \times 252$   
 $= 84$
- Probiotik : Prebiotik = 1 : 2  
 $(\text{Probiotik} + \text{Prebiotik}) X = 84$   
 $(1 + 2) X = 84$   
 $X = \frac{84}{3}$   
 $X = 28$
3. Hasil Mikroenkapsulasi =  $20\% \times (252 + 84)$   
 $= 20\% \times 336$   
 $= \pm 67,2 \text{ gram}$
4. Jumlah *L. acidophilus* =  $\frac{28 \times 1,5 \times 10^8}{67,2}$   
 $= 0,625 \times 10^8$

**Lampiran 8 Identifikasi Bakteri *Salmonella* sp.****a. Pewarnaan Gram**

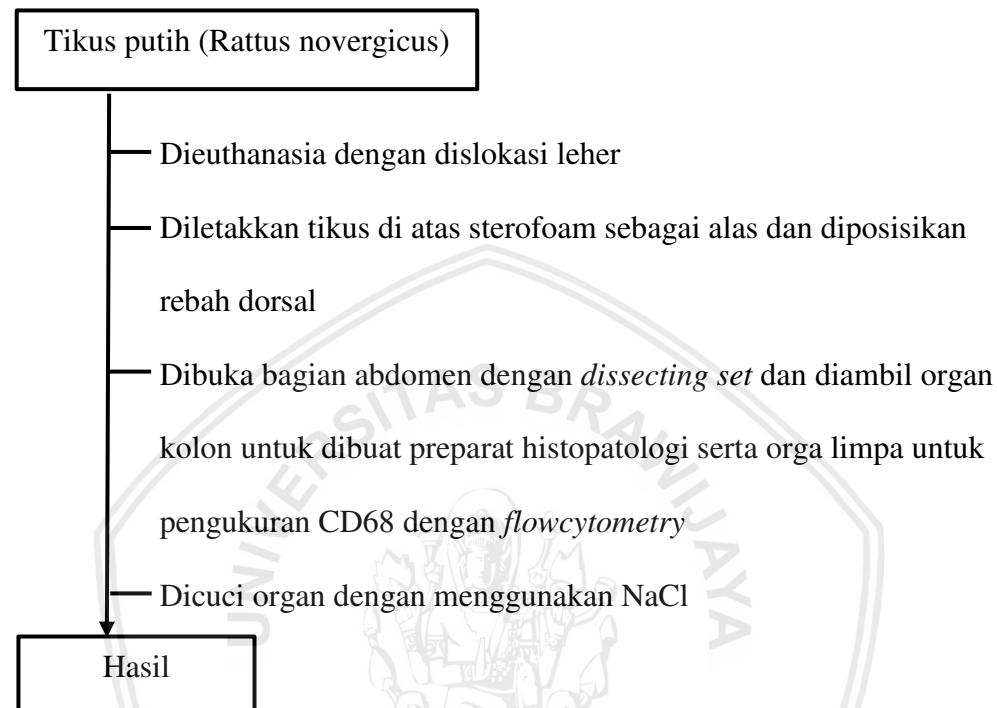
Bakteri *Salmonella* sp. dengan pewarnaan gram tampak berwarna merah dan berbentuk batang.

**b. Isolasi kotoran usus tikus pada media SSA**

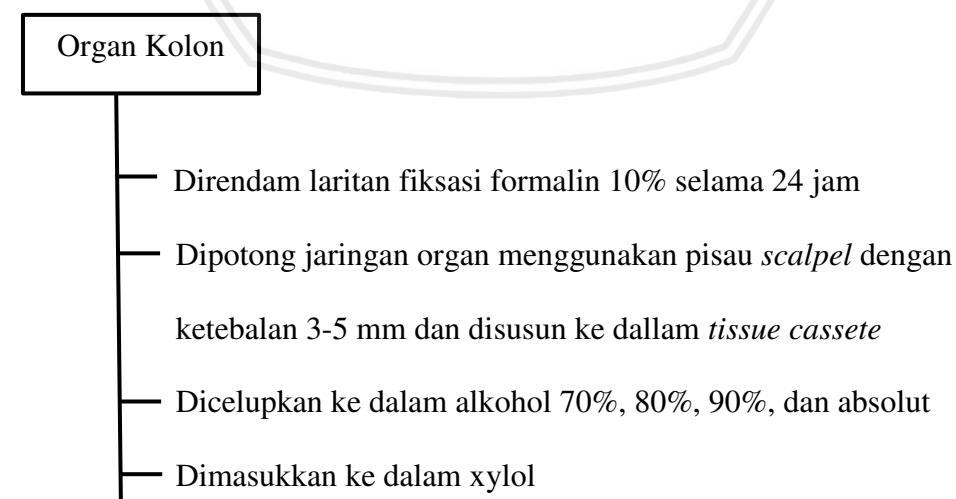
Bakteri *Salmonella* sp. yang ditumbuhkan pada media SSA tampak membentuk koloni berwarna hitam

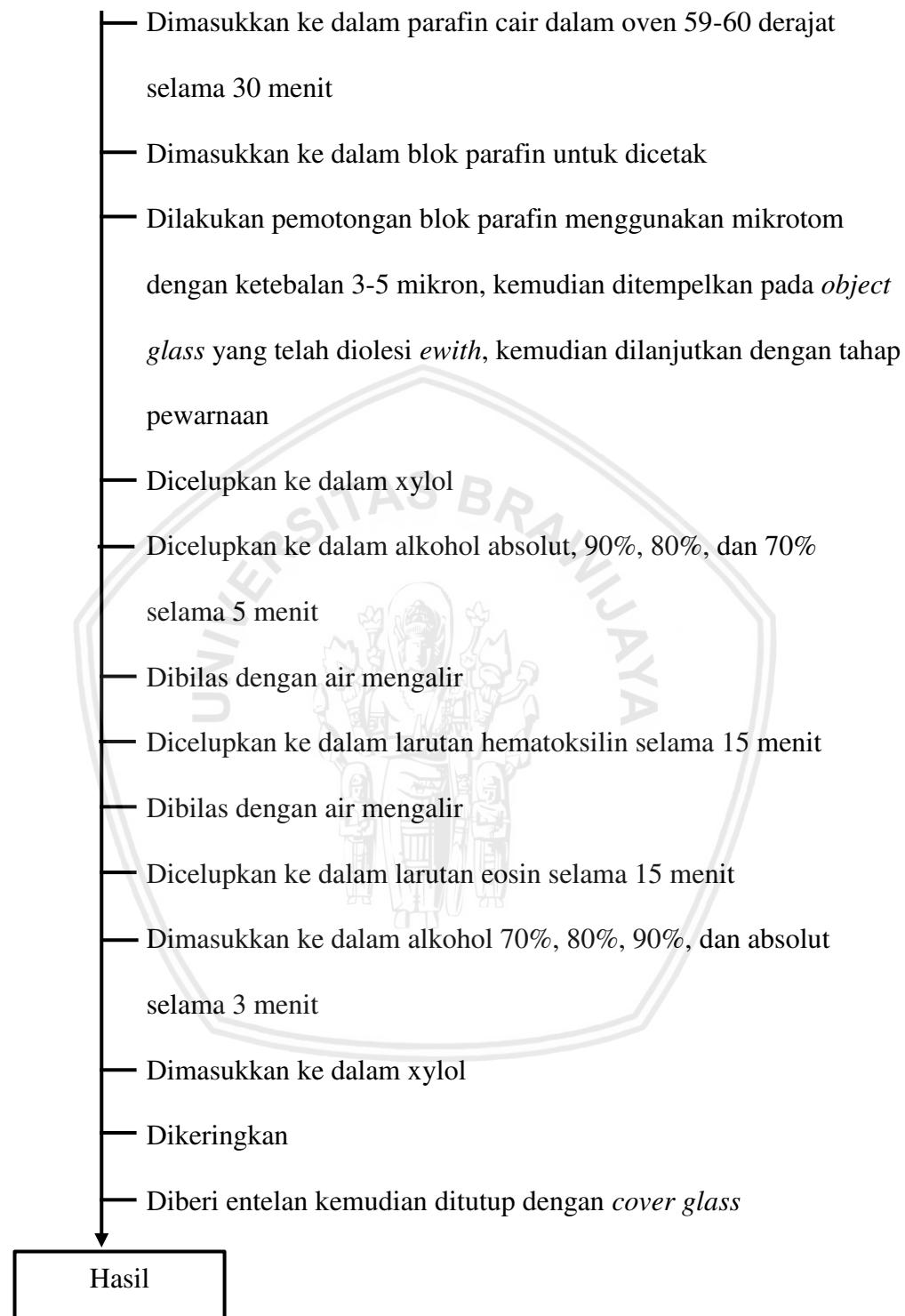
## Lampiran 9. Langkah Kerja Penelitian

### a. Pembedahan Hewan Coba

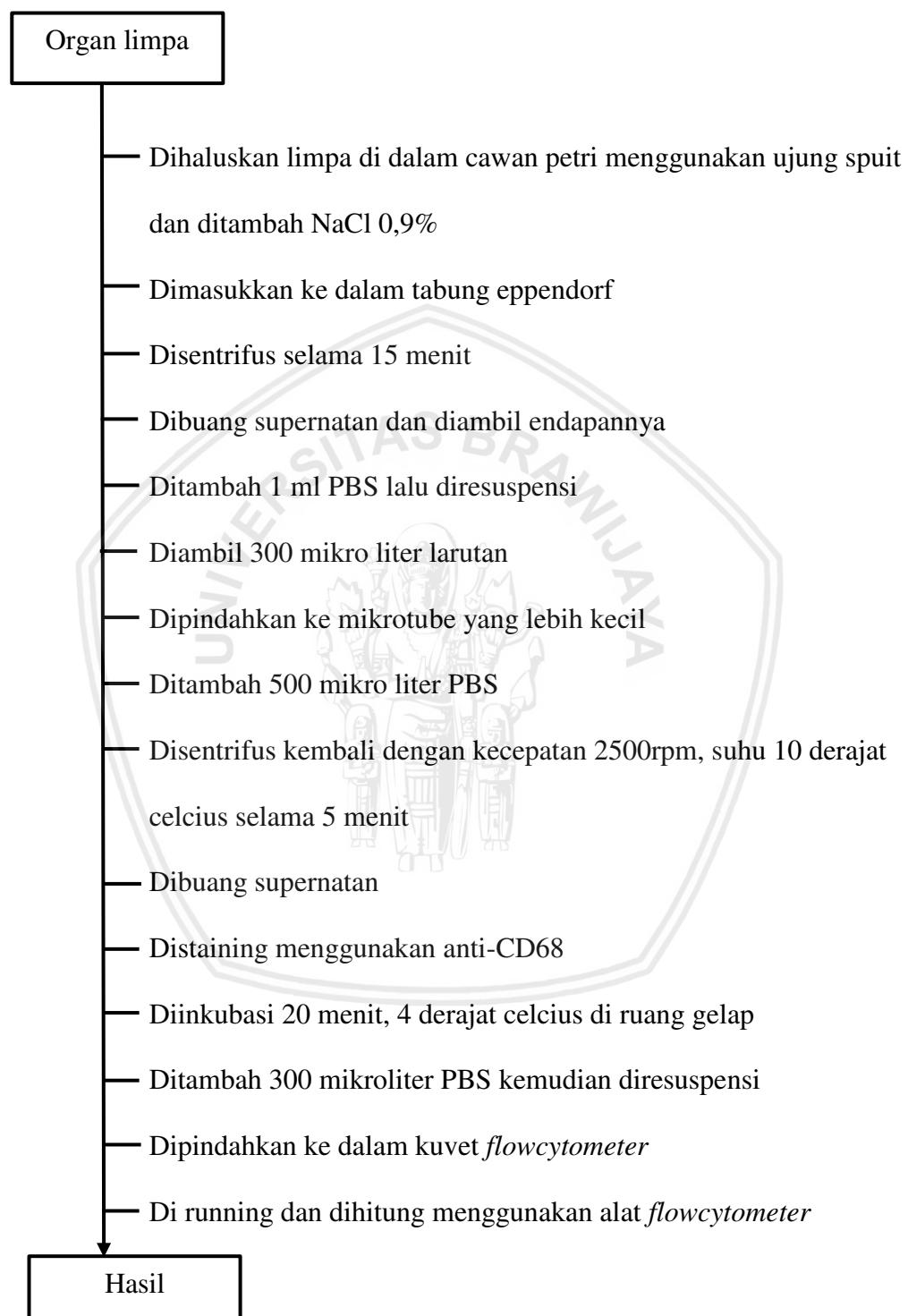


### b. Pembuatan Preparat Histopatologi Kolon



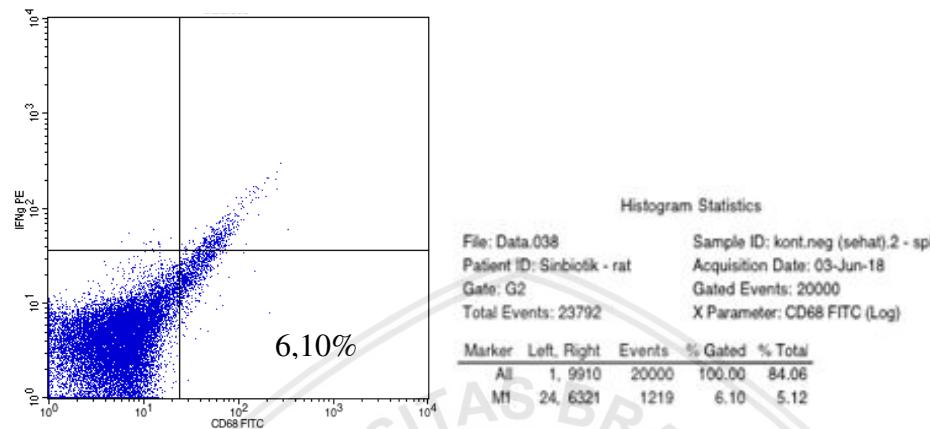


### c. Alur Metode Flowcytometri

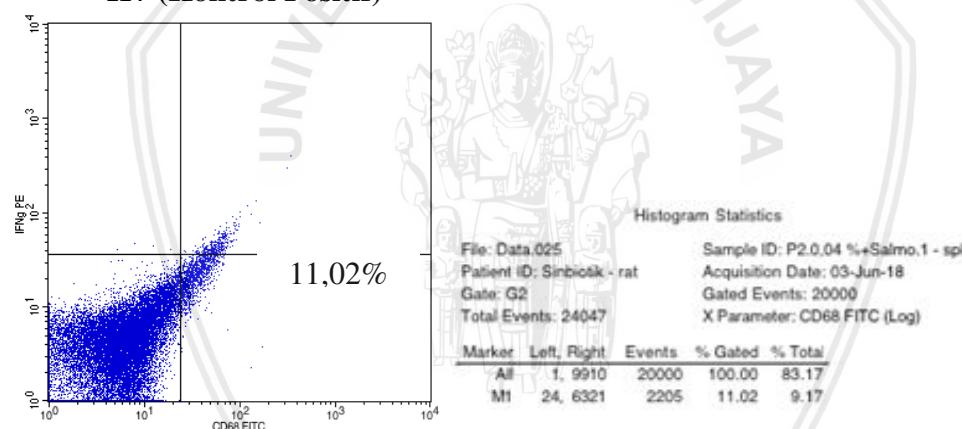


### Lampiran 10. Hasil Uji Flowcytometry

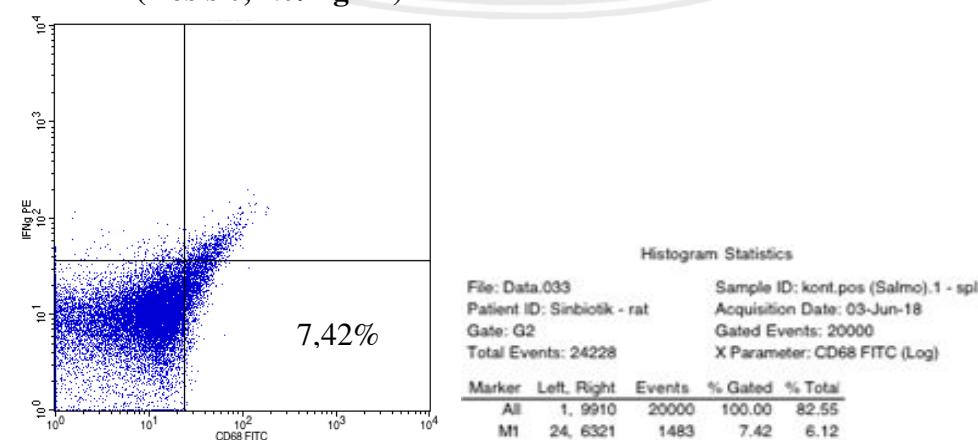
#### K- (Kontrol Negatif)

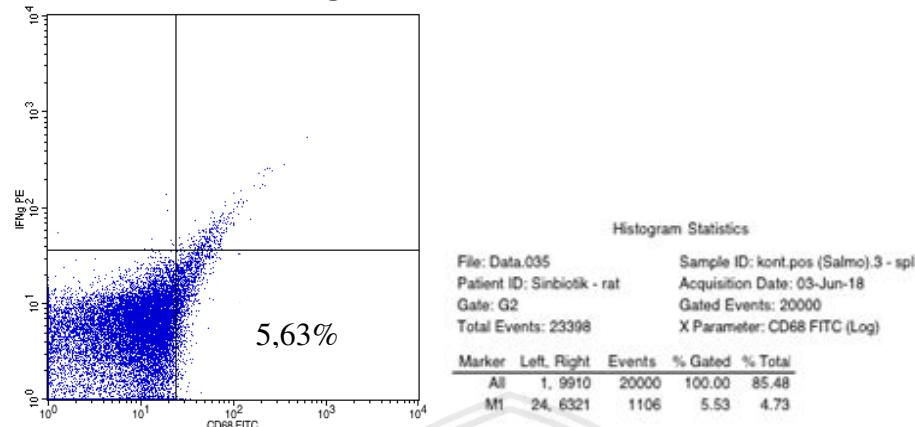
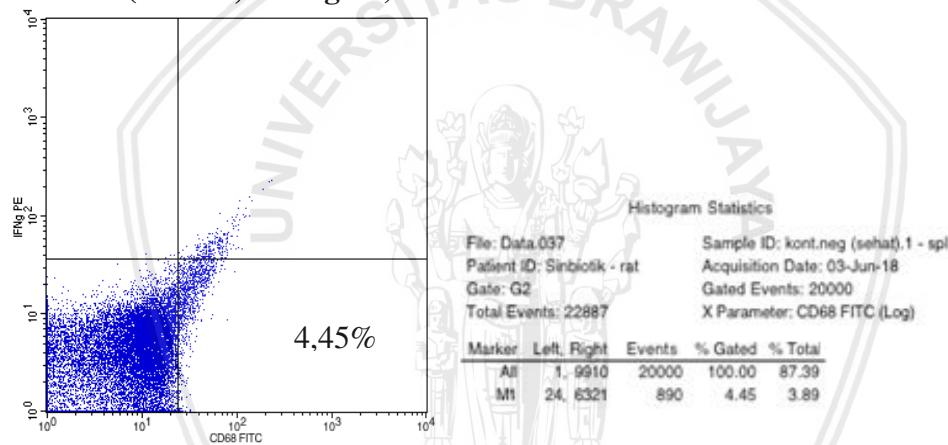


#### K+ (Kontrol Positif)



#### P1 (Dosis 0,2%/KgPK)



**P2 (Dosis 0,4%/KgPK)****P3 (Dosis 0,6%/KgPK)**

## Lampiran 11. Perhitungan Statistik Kadar Relatif CD68

### One-way ANOVA: p1; p2; p3; k+; k- Method

Null hypothesis All means are equal

Alternative hypothesis Not all means are equal

Significance level  $\alpha = 0,05$

*Equal variances were assumed for the analysis.*

#### Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	5	p1; p2; p3; k+; k-

#### Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	4	60,84	15,211	3,34	0,038
Error	15	68,37	4,558		
Total	19	129,21			

#### Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
2,13490	47,09%	32,98%	5,94%

#### Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
p1	4	7,690	1,448	(5,415; 9,965)
p2	4	7,13	2,43	(4,85; 9,40)
p3	4	5,508	1,637	(3,232; 7,783)
k+	4	10,78	3,23	(8,50; 13,06)
k-	4	6,902	1,305	(4,627; 9,178)

*Pooled StDev = 2,13490*

## Tukey Pairwise Comparisons

### Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
k+	4	10,78	A
p1	4	7,690	A B
p2	4	7,13	A B
k-	4	6,902	A B
p3	4	5,508	B

Grafik rata-rata kadar relatif CD68

