

**Pengaruh Pemberian Sinbiotik *Lactobacillus acidophilus*  
dan *Spirulina platensis* terhadap Jumlah Relatif TNF- $\alpha$   
Limpa dan Gambaran Histopatologi Duodenum  
Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinfeksi  
*Salmonella sp.***

**SKRIPSI**

Oleh :  
**BESTARI EBHI KURNIANING RAMADHANIS**  
**155130107111022**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN**  
**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN**  
**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**  
**MALANG**  
**2020**

**Pengaruh Pemberian Sinbiotik *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* terhadap Jumlah Relatif TNF- $\alpha$  Limpa dan Gambaran Histopatologi Duodenum Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinfeksi *Salmonella sp.***

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :  
**BESTARI EBHI KURNIANING RAMADHANIS**  
**155130107111022**



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



**LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**

**Pengaruh Pemberian Sinbiotik *Lactobacillus acidophilus*  
dan *Spirulina platensis* terhadap Jumlah Relatif TNF- $\alpha$   
Limpa dan Gambaran Histopatologi Duodenum  
Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinfeksi  
*Salmonella sp.***

Oleh :

**BESTARI EBHI KURNIANING RAMADHANIS**  
NIM. 155130107111022

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
pada tanggal 10 Januari 2020  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

**Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc.**  
NIP. 19580711 199203 2 002

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

Mengetahui,

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya

**Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc**  
NIP. 19631216 198803 1 002

**LEMBAR PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Bestari Ebhi Kurnianing Ramadhani

NIM : 155130107111022

Program Studi : Pendidikan Kedokteran Hewan

Penulis Skripsi Berjudul : **“Pengaruh Pemberian Sinbiotik *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* terhadap**

**Jumlah Relatif TNF- $\alpha$  Limpa dan**

**Histopatologi Duodenum Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinfeksi *Salmonella sp.*”**

Dengan ini menyatakan bahwa :

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

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 10 Januari 2020

Yang Menyatakan,

(Bestari Ebhi Kurnianing R.)

NIM. 155130107111022

**Pengaruh Pemberian Sinbiotik *Lactobacillus acidophilus*  
dan *Spirulina platensis* terhadap Jumlah Relatif TNF- $\alpha$   
Limpa dan Gambaran Histopatologi Duodenum  
Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinfeksi  
*Salmonella sp.***

**ABSTRAK**

*Salmonellosis* merupakan penyakit yang banyak menyerang unggas terutama unggas yang masih muda. *Salmonellosis* dapat menyebabkan diare pada unggas. Penyakit ini dapat ditularkan dari unggas ke manusia melalui makanan (*Foodborne disease*). Tingginya kasus *salmonellosis* menyebabkan tingginya penggunaan antibiotik sebagai upaya pencegahan. Penggunaan antibiotik dapat menyebabkan resistensi antibiotik. Maka dari itu dibuat alternatif pengganti antibiotik yaitu sinbiotik. Pada penelitian ini campuran sinbiotik yang digunakan yaitu *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian sinbiotik *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* terhadap histopatologi duodenum dan kadar relatif TNF- $\alpha$  limpa. Penelitian ini menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) sebagai hewan coba. Metode penelitian yang digunakan yaitu *Experimentaldengan* Rancangan Acak Lengkap (RAL). Penelitian ini terdiri dari 5 perlakuan dengan 4 kali ulangan. Dosis sinbiotik, yaitu P1 0.2%/10g pakan, P2 0.4%/10g pakan, dan P3 0.6%/10g pakan (*Lactobacillus acidophilus* konsentrasi  $1.5 \times 10^8$  CFU/ml), kemudian diinfeksi dengan *Salmonella sp.* konsentrasi  $1.5 \times 10^8$  CFU/ml sebanyak 0.5 mL secara per oral. Kontrol positif (+) hanya diberikan *Salmonella sp.* dan kontrol negatif (-) tanpa diberikan perlakuan. Kadar relatif TNF- $\alpha$  diuji menggunakan *flowcytometry* dan diolah secara kuantitatif menggunakan *One Way ANOVA* dengan program SPSS. Histopatologi duodenum dianalisa secara deskriptif berupa erosi epitel vili. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian sinbiotik tidak berpengaruh secara nyata terhadap jumlah relatif TNF- $\alpha$  pada setiap kelompok ( $P > 0.05$ ) namun dapat meminimalisir kerusakan berupa erosi yang terjadi pada epitel vili duodenum tikus putih yang diinfeksi *Salmonella sp.* Kesimpulan dari penelitian ini, yaitu penggunaan sinbiotik pada dosis 0.6%/10g pakan dapat mencegah terjadinya kerusakan pada epitel vili duodenum dan sel-sel radang.

**Kata Kunci:** Bakteri asam laktat, *foodborne disease*, sinbiotik.

**The Effect of Synbiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Spirulina platensis* on TNF- $\alpha$  Levels of Spleen and Duodenum Histopathology of White Rat (*Rattus norvegicus*) Infected by *Salmonella sp.***

**ABSTRACT**

*Salmonellosis* is a gastrointestinal disease that common in poultry, especially in younger age. *Salmonellosis* can cause diarrhea in poultry. The disease can be transmitted through food (*foodborne disease*). The high cases of *salmonellosis* causes high use of antibiotics as a prevention. However, the use of antibiotics can cause resistance to antibiotics. Therefore, an alternative antibiotic might be substitute by synbiotics. In this study the synbiotic was *Lactobacillus acidophilus* and *Spirulina platensis* mixture. The purpose of this study was to determine the effect of synbiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Spirulina platensis* administration on duodenal histopathology and relative levels of TNF- $\alpha$  on spleen. This study used white rats (*Rattus norvegicus*) as experimental animals. The study used *Experimental* with Completely Randomized Design. This study consisted of 5 treatments with 4 replications. Synbiotics dose, P1 0.2% /10g of feed, P2 0.4% /10g of feed, and P3 0.6% /10g of feed (The concentration of *Lactobacillus acidophilus*  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL), then infected with 0.5 mL of *Salmonella sp.*  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL per oral. Positive control (+) infected with *Salmonella sp.* and negative control (-) without treatment. Relative levels of spleen TNF- $\alpha$  were tested using *flow cytometry* and processed quantitatively using one way ANOVA and continued with *Tukey test* ( $\alpha = 5\%$ ) with the SPSS program. Duodenal histopathology was analyzed descriptively in the form of villous epithelial erosion. The results of this study indicate that synbiotic administration did not significantly affect the relative levels of TNF- $\alpha$  ( $P > 0.05$ ) but can minimize damage of erosion to the duodenal villous epithelium in rats infected *Salmonella sp.* The conclusion of this study is synbiotics at a dose of 0.6%/10g of feed can prevent damage to the duodenal villous epithelium.

**Keywords:** *Foodborne disease*, lactic acid bacteria, synbiotic.

DAFTAR ISI

Halaman

**HALAMAN JUDUL ..... i**

**HALAMAN PENGESAHAN ..... ii**

**LEMBAR PERNYATAAN ..... iii**

**ABSTRAK ..... iv**

**KATA PENGANTAR ..... vi**

**DAFTAR ISI ..... viii**

**DAFTAR TABEL ..... X**

**DAFTAR GAMBAR ..... xi**

**DAFTAR LAMPIRAN ..... xii**

**DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG ..... xiii**

**BAB 1. PENDAHULUAN**

    1.1 Latar Belakang ..... 1

    1.2 Rumusan Masalah ..... 4

    1.3 Batasan Masalah ..... 4

    1.4 Tujuan Penelitian ..... 5

    1.5 Manfaat Penelitian ..... 5

**BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA**

    2.1 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) ..... 6

    2.2 Bakteri *Salmonella sp* ..... 7

        2.2.1 Patogenesitas ..... 7

        2.2.2 Cara Penularan ..... 8

        2.2.3 Gejala Klinis ..... 9

    2.3 Sinbiotik ..... 9

        2.3.1 Bakteri *Lactobacillus acidophilus* ..... 10

        2.3.2 Alga *Spirulina platensis* ..... 11

    2.4 Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ..... 12

    2.5 Limpa ..... 12

    2.6 Duodenum Tikus Putih ..... 13

**BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESA PENELITIAN**

    3.1 Kerangka Konseptual ..... 15

    3.2 Hipotesis Penelitian ..... 18

**BAB 4. METODE PENELITIAN**

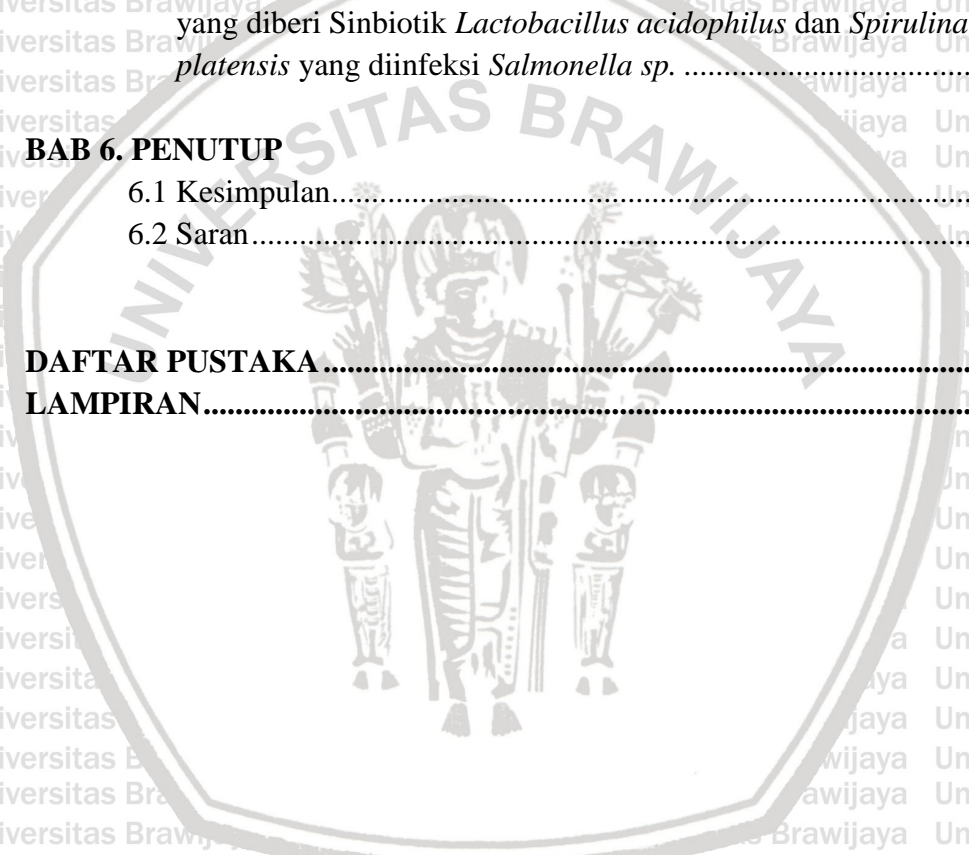
    4.1 Tempat dan Waktu Penelitian ..... 20







|   |           |
|---|-----------|
| 4.2 Rancangan Penelitian.....   | 20        |
| 4.3 Variabel Penelitian.....  | 21        |
| 4.4 Alat dan Bahan.....   | 22        |
| 4.4.1 Alat.....   | 22        |
| 4.4.2 Bahan.....  | 22        |
| 4.5 Tahapan Penelitian.....   | 23        |
| 4.6 Analisis Data.....  | 28        |
| <b>BAB 5.HASIL DAN PEMBAHASAN</b>   |           |
| 5.1 Jumlah Relatif TNF- $\alpha$ Limpa pada Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> )<br>yang diberi Sinbiotik <i>Lactobacillus acidophilus</i> dan <i>Spirulina</i><br><i>platensis</i> yang Diinfeksi <i>Salmonella sp.</i> .... | 29        |
| 5.2 Gambaran Histopatologi Duodenum Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> )<br>yang diberi Sinbiotik <i>Lactobacillus acidophilus</i> dan <i>Spirulina</i><br><i>platensis</i> yang diinfeksi <i>Salmonella sp.</i> ....         | 33        |
| <b>BAB 6. PENUTUP</b>   |           |
| 6.1 Kesimpulan.....   | 41        |
| 6.2 Saran.....  | 41        |
| <b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>  | <b>42</b> |
| <b>LAMPIRAN.....</b>  | <b>47</b> |



DAFTAR TABEL

| Tabel   | Halaman |
|---|---------|
| 4.1 Tabel Perlakuan.....                                  | 21      |
| 5.1 Tabel Rata-rata Jumlah Relatif TNF- $\alpha$ (%)..... | 29      |



DAFTAR GAMBAR

| <b>Gambar</b>  | <b>Halaman</b> |
|--|----------------|
| 2.1 Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ).....          | 6              |
| 2.2 <i>Salmonella sp</i> dengan Flagel Peritrik.....       | 7              |
| 2.3 <i>Spirulina platensis</i> .....                       | 12             |
| 2.4 Lapisan Duodenum .....                                 | 13             |
| 5.1 Gambaran Histologi Duodenum pada Kelompok K-.....      | 34             |
| 5.2 Gambaran Histopatologi Duodenum pada Kelompok K+ ..... | 34             |
| 5.3 Gambaran Histopatologi Duodenum pada Kelompok P1 ..... | 35             |
| 5.4 Gambaran Histopatologi Duodenum pada Kelompok P2 ..... | 36             |
| 5.5 Gambaran Histopatologi Duodenum pada Kelompok P3.....  | 37             |



DAFTAR LAMPIRAN

| Lampiran   | Halaman |
|--|---------|
| 1. Kerangka Operasional.....                           | 47      |
| 2. Keterangan Laik Etik.....                           | 48      |
| 3. Surat Keterangan Tikus Sehat.....                   | 49      |
| 4. Hasil Reidentifikasi <i>Salmonella sp.</i> .....    | 50      |
| 5. Perhitungan Dosis.....                              | 51      |
| 6. Perhitungan Hasil Mikroenkapsulasi Sinbiotik.....   | 52      |
| 7. Hasil Uji <i>Flowcytometry</i> .....                | 53      |
| 8. Analisa Statistik Kadar Relatif TNF- $\alpha$ ..... | 56      |



### DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

- % : Persen
- mm : milimeter
- TNF- $\alpha$  : *Tumor Necrotic Factor  $\alpha$*
- CFU : *Colony Forming Unit*
- ml : mililiter
- MOS : *Mannan oligosakarida*
- gr : gram
- $^{\circ}\text{C}$  : Derajat celcius
- $\mu\text{m}$  : mikrometer
- < : kurang dari
- / : per
- Sel NK : *Sel Natural Killer*
- cm : Centimeter
- HE : Hematoxiline Eosin
- rpm : Revolutions Per Minute
- $\mu\text{L}$  : Mikroliter
- PBS : Phospat Buffered Saline
- $\mu\text{m}$  : Mikrometer
- LPS : Lipopolisakarida
- BAL : Bakteri Asam Laktat
- APC : *Antigen Presenting Cell*
- NB : Nutrient Broth
- MRSB : deMann Rogosa Sharpe Broth
- SD : Standart Deviasi
- Anova : *Analysis of Variance*
- RAL : Rancangan Acak Lengka





**Pengaruh Pemberian Sinbiotik *Lactobacillus acidophilus*  
dan *Spirulina platensis* terhadap Jumlah Relatif TNF- $\alpha$   
Limpa dan Gambaran Histopatologi Duodenum  
Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinfeksi  
*Salmonella sp.***

**ABSTRAK**

*Salmonellosis* merupakan penyakit yang banyak menyerang unggas terutama unggas yang masih muda. *Salmonellosis* dapat menyebabkan diare pada unggas. Penyakit ini dapat ditularkan dari unggas ke manusia melalui makanan (*Foodborne disease*). Tingginya kasus *salmonellosis* menyebabkan tingginya penggunaan antibiotik sebagai upaya pencegahan. Penggunaan antibiotik dapat menyebabkan resistensi antibiotik. Maka dari itu dibuat alternatif pengganti antibiotik yaitu sinbiotik. Pada penelitian ini campuran sinbiotik yang digunakan yaitu *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian sinbiotik *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* terhadap histopatologi duodenum dan kadar relatif TNF- $\alpha$  limpa. Penelitian ini menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) sebagai hewan coba. Metode penelitian yang digunakan yaitu *Experimentaldengan Rancangan Acak Lengkap (RAL)*. Penelitian ini terdiri dari 5 perlakuan dengan 4 kali ulangan. Dosis sinbiotik, yaitu P1 0.2%/10g pakan, P2 0.4%/10g pakan, dan P3 0.6%/10g pakan (*Lactobacillus acidophilus* konsentrasi  $1.5 \times 10^8$ CFU/ml), kemudian diinfeksi dengan *Salmonella sp.* konsentrasi  $1.5 \times 10^8$ CFU/ml sebanyak 0.5 mL secara per oral. Kontrol positif (+) hanya diberikan *Salmonella sp.* dan kontrol negatif (-) tanpa diberikan perlakuan. Kadar relatif TNF- $\alpha$  diuji menggunakan *flowcytometry* dan diolah secara kuantitatif menggunakan *One Way ANOVA* dengan program SPSS. Histopatologi duodenum dianalisa secara deskriptif berupa erosi epitel vili. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian sinbiotik tidak berpengaruh secara nyata terhadap jumlah relatif TNF- $\alpha$  pada setiap kelompok ( $P > 0.05$ ) namun dapat meminimalisir kerusakan berupa erosi yang terjadi pada epitel vili duodenum tikus putih yang diinfeksi *Salmonella sp.* Kesimpulan dari penelitian ini, yaitu penggunaan sinbiotik pada dosis 0.6%/10g pakan dapat mencegah terjadinya kerusakan pada epitel vili duodenum dan sel-sel radang.

**Kata Kunci:** Bakteri asam laktat, *foodborne disease*, sinbiotik.

**The Effect of Synbiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Spirulina platensis* on TNF- $\alpha$  Levels of Spleen and Duodenum Histopathology of White Rat (*Rattus norvegicus*) Infected by *Salmonella sp.***

**ABSTRACT**

*Salmonellosis* is a gastrointestinal disease that common in poultry, especially in younger age. *Salmonellosis* can cause diarrhea in poultry. The disease can be transmitted through food (*foodborne disease*). The high cases of *salmonellosis* causes high use of antibiotics as a prevention. However, the use of antibiotics can cause resistance to antibiotics. Therefore, an alternative antibiotic might be substitute by synbiotics. In this study the synbiotic was *Lactobacillus acidophilus* and *Spirulina platensis* mixture. The purpose of this study was to determine the effect of synbiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Spirulina platensis* administration on duodenal histopathology and relative levels of TNF- $\alpha$  on spleen. This study used white rats (*Rattus norvegicus*) as experimental animals. The study used *Experimental* with Completely Randomized Design. This study consisted of 5 treatments with 4 replications. Synbiotics dose, P1 0.2% /10g of feed, P2 0.4% /10g of feed, and P3 0.6% /10g of feed (The concentration of *Lactobacillus acidophilus*  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL), then infected with 0.5 mL of *Salmonella sp.*  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL per oral. Positive control (+) infected with *Salmonella sp.* and negative control (-) without treatment. Relative levels of spleen TNF- $\alpha$  were tested using *flowcytometry* and processed quantitatively using one way ANOVA and continued with *Tukey test* ( $\alpha = 5\%$ ) with the SPSS program. Duodenal histopathology was analyzed descriptively in the form of villous epithelial erosion. The results of this study indicate that synbiotic administration did not significantly affect the relative levels of TNF- $\alpha$  ( $P > 0.05$ ) but can minimize damage of erosion to the duodenal villous epithelium in rats infected *Salmonella sp.* The conclusion of this study is synbiotics at a dose of 0.6%/10g of feed can prevent damage to the duodenal villous epithelium.

**Keywords:** *Foodborne disease*, lactic acid bacteria, synbiotic.



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Industri peternakan di Indonesia berpotensi tinggi dalam meningkatkan pertumbuhan ekonomi, dan salah satu industri yang mengalami pertumbuhan pesat, yaitu industri peternakan unggas. Produk unggas memberi kontribusi terhadap konsumsi protein sebesar 11% dan terhadap konsumsi protein hewani sebesar 60.73% (Bahri dkk., 2008).

Industri peternakan unggas banyak dijumpai kasus-kasus penyakit yang menyerang unggas. Salah satu penyakit yang sering menyerang unggas adalah *salmonellosis*.

Menurut Quin *et al.* (2002) *salmonellosis* dapat menyerang unggas yang masih muda dan dapat menyebabkan diare. *Salmonellosis* dapat ditularkan melalui makanan (*foodborne disease*) dan dapat menyebabkan diare pada manusia (Kerr *et al.*, 2010).

*Salmonellosis* bersifat endemis hampir di seluruh daerah di Indonesia. Kasus *salmonellosis* pada unggas diperkirakan sekitar 60.000-1.300.000 kasus dengan 20.000 kematian per tahun. Kontaminasi *salmonellosis* merupakan masalah yang serius karena dapat mencapai telur dan menyebabkan anak ayam tersebut akan menjadi *carrier* (Suwandono dkk., 2005).

Infeksi *Salmonella* dimulai ketika bakteri tertelan melalui pakan. Selanjutnya masuk ke saluran pencernaan salah satunya duodenum. Bakteri akan masuk sampai pada sel epitel duodenum dan akan menghasilkan toxin berupa *enterotoxin* yang dapat menyebabkan radang pada duodenum (Murwani, 2015; Kilhamn *et al.*, 2003).

Bakteri ini kemudian akan mencapai sistem pertahanan limfatik sampai aliran darah dan menuju organ tubuh salah satunya, yaitu organ limpa. Limpa merupakan tempat utama dalam pengaturan sistem imun serta salah satu organ yang bertanggung jawab terhadap pemenuhan kebutuhan limfosit. Ketika *Salmonella* berada pada organ limpa maka limpa akan bereaksi dengan membentuk antibodi. *Salmonella* akan ditangkap oleh

sel APC yang kemudian disajikan pada sel T helper. Sel-sel fagosit akan diaktivasi oleh sel T helper, kemudian makrofag akan mensekresi sitokin proinflamasi, yaitu TNF- $\alpha$  (Monack *et al.*, 2004; Arimbi dkk., 2015).

Salah satu upaya peternak dalam melakukan pencegahan terhadap penyakit *salmonellosis*, yaitu dengan menggunakan antibiotik. Antibiotik juga digunakan sebagai *growth promotor* untuk memacu pertumbuhan ayam broiler. Namun penggunaan antibiotik dapat menyebabkan resistensi mikroorganisme patogen dan dapat berdampak buruk bagi kesehatan manusia sebagai konsumen. Sehingga diperlukan adanya bahan alternatif yang dapat menggantikan fungsi dari antibiotik pada ternak. Alternatif untuk pencegahan *salmonellosis* dapat menggunakan sinbiotik *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* (Haryati, 2011).

Sinbiotik merupakan gabungan antara probiotik dan prebiotik. Probiotik merupakan mikroorganisme hidup berupa bakteri asam laktat (BAL) yang dapat menguntungkan bagi inangnya. Salah satu bakteri asam laktat yang banyak dijumpai pada gastrointestinal adalah *Lactobacillus acidophilus*. Sedangkan prebiotik yang digunakan yaitu *Spirulina platensis* yang dapat menstimulasi pertumbuhan bakteri nonpatogen seperti *Lactobacillus acidophilus* (Haryati, 2011). *Spirulina platensis* memiliki kandungan *Mannanooligosakarida* (MOS) yang berfungsi dalam meningkatkan aktivitas makrofag serta dapat meningkatkan panjang vili-vili usus halus sehingga penyerapan nutrisi dapat meningkat (Indariyah, 2013).

Kandungan MOS dari *Spirulina platensis* akan menjadi sumber makanan bagi *Lactobacillus acidophilus*. Selama proses fermentasi karbohidrat, bakteri *Lactobacillus acidophilus* memproduksi asam laktat yang merupakan produk akhir metabolik utama dan berguna dalam menurunkan pH sehingga akan menghambat pertumbuhan bakteri patogen. *Spirulina platensis* juga mengandung pigmen berupa fikosianin yang berfungsi

sebagai antiinflamasi dengan meningkatkan aktivitas antibodi dan antioksidan dengan memecah radikal bebas (Pato, 2003; Moat *et.al.*, 2002).

Dalam proses fermentasinya, *Lactobacillus acidophilus* juga dapat menghasilkan peptida yang dapat berperan sebagai antimikroba, antioksidan, dan antiinflamasi. Sebagai antimikroba, *Lactobacillus acidophilus* menghasilkan *Acidocin* yang bersifat bakterisidal. Sebagai antioksidan peptida dapat menghambat reaksi oksidasi dengan mengikat radikal bebas yang menghambat terjadinya kerusakan sel. Sebagai antiinflamasi peptida menghambat jalur sinyal transduksi dari sitokin proinflamasi sehingga sitokin proinflamasi dapat berkurang (Rolfe, 2000).

Dengan demikian pemberian sinbiotik tersebut diharapkan dapat berperan baik dalam penyerapan nutrisi dalam saluran pencernaan dan dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen sehingga produktivitas lebih optimal.

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini antara lain :

1. Apakah pemberian sinbiotik *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* dapat mencegah kenaikan jumlah relatif TNF- $\alpha$  limpa tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinfeksi *Salmonella sp.*?
2. Apakah pemberian sinbiotik *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* dapat mencegah kerusakan duodenum tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinfeksi *Salmonella sp.*?

## 1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dari penelitian ini antara lain :

1. Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) berjenis kelamin jantan dengan berat 100 gram dan berusia 4 sampai 6

minggu. Hewan coba diperoleh dari Laboratorium Fisiologi UIN Malang. Hewan coba ini telah mendapat persetujuan laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya No.944-KEP-UB.

2. *Salmonella sp.* dibuat mengikuti standart Mc Farland 0.5 dengan konsentrasi  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL dan diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
3. Suspensi *Lactobacillus acidophilus* dibuat mengikuti standart Mc Farland 0.5 dengan konsentrasi  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL dan berasal dari Laboratorium Pangan dan Gizi UGM.
4. Alga *Spirulina platensis* 100% didapatkan dari toko HPAI Malang.
5. Variabel terikat yang diamati yaitu kadar relatif TNF- $\alpha$  pada organ limpa yang diukur menggunakan *flowcytometry* dan histopatologi duodenum dari tikus putih (*Rattus norvegicus*).
6. Pembuatan sinbiotik dilakukan dengan metode *freeze dryer*.

#### 1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini, yaitu :

1. Mengetahui perubahan jumlah relatif TNF- $\alpha$  limpa tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang telah diinfeksi *Salmonella sp.* dengan pemberian sinbiotik *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis*.
2. Mengetahui perubahan histopatologi duodenum tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang telah diinfeksi *Salmonella sp.* dengan pemberian sinbiotik *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis*.

#### 1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini, yaitu :

1. Mendapatkan informasi mengenai pengaruh pemberian *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* terhadap jumlah TNF- $\alpha$  dan histopatologi duodenum tikus putih yang diinfeksi *Salmonella sp.*
2. Mendapat informasi mengenai sinbiotik sebagai alternatif pengganti antibiotik.



## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

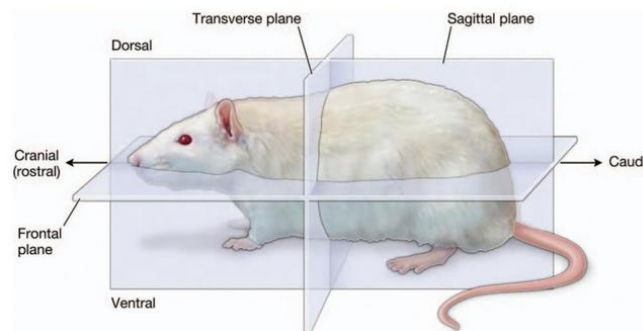
### 2.1 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Tikus putih merupakan hewan yang paling umum digunakan untuk melakukan suatu penelitian. Tikus putih memiliki ukuran tubuh yang lebih besar dari mencit sehingga memudahkan untuk membuat manipulasi fisiologis tertentu. Klasifikasi Tikus putih adalah sebagai berikut (Krinke, 2000) :

Kingdom : Animalia  
Phyllum : Chordata  
Class : Mammalia  
Order : Rodentia  
Family : Muridae  
Genus : *Rattus*  
Species : *Rattus norvegicus*

Tikus putih memiliki ciri-ciri morfologis, yaitu bulu berwarna kusam dan kasar, memiliki ekor yang panjang, telinga yang relatif besar, hidung runcing, dan memiliki gigi seri yang kuat (Krinke, 2000). Gambar tikus putih (*Rattus norvegicus*) dapat dilihat pada

**Gambar 2.1.**



**Gambar 2.1** Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) (Maynard and Downes, 2019).

## 2.2 Bakteri *Salmonella sp.*

*Salmonella sp.* merupakan bakteri gram negatif, berbentuk batang, dan memiliki flagel peritrik. Bakteri ini memiliki panjang 1.0 – 3.0  $\mu\text{m}$  dan lebar 0.8 – 1.0  $\mu\text{m}$ .

*Salmonella sp.* tumbuh pada suasana fakultatif anaerob. Suhu optimal pertumbuhannya yaitu 37.5°C dan pH optimal antara 6.6 – 7.5. *Salmonella sp.* tidak dapat memfermentasikan laktosa dan sukrosa namun dapat memfermentasikan glukosa dan memproduksi gas (Brands, 2006). Gambar bakteri *Salmonella sp.* dapat dilihat pada

### Gambar 2.2.



**Gambar 2.2** *Salmonella sp.* dengan Flagel Peritrik (Brands, 2006).

*Salmonella* memiliki struktur antigen utama, yaitu antigen somatik (O), antigen kapsul (Vi), dan antigen flagela (H) (Parry, 2006). Bakteri ini memiliki membran sel yang tersusun atas lipopolisakarida (LPS) atau endotoksin. Endotoksin tersebut terdiri dari 3 lapisan, yaitu pada bagian luar terdapat *O-specific polysaccharide*, pada bagian tengah terdapat *core-polysaccharide*, dan pada bagian dalam terdapat *lipid A* (Lehner, 2001; Parslow *et al.*, 2003).

### 2.2.1 Patogenesitas

Mekanisme patogenesis *Salmonella* umumnya dengan proses infeksi sistemik.

*Salmonella* masuk melalui makanan ke lambung sampai usus halus dan usus besar.

*Salmonella* akan berkembang baik pada saluran pencernaan penderita sehingga dapat menyebabkan radang usus (*enteritis*). *Salmonella* akan melakukan penetrasi

pada mukosa usus halus dan usus besar dan akan tinggal secara intraseluler (Dzen, 2003). Bakteri ini akan menghasilkan racun *enterotoxin* dan *endotoxin* yang menyebabkan radang usus dan penderita menjadi diare (Dharmojo, 2001).

Bakteri akan menembus dinding usus dan masuk dalam sistem pertahanan limfatik, bakteri akan mengikuti aliran limfe kemudian akan menyebar ke kelenjar getah bening, pembuluh darah dan organ tubuh seperti hati, jantung, limpa, dan ovarium sampai dapat ditemukan pada feses dan urin penderita (Paola *et al.*, 2010).

Menurut Wilson (2002), *Salmonella* dapat bertahan hidup di dalam makrofag dan dapat bermultiplikasi. Bakteri ini dapat mencapai sirkulasi darah karena terbawa oleh makrofag yang terinfeksi. *Salmonella* juga dapat bersifat toksik terhadap makrofag sehingga dapat menyebabkan kematian pada sel makrofag yang terinfeksi (Irmawati dan Tjahjono, 2004).

### 2.2.2 Cara Penularan

Penularan dapat terjadi secara vertikal dari induk ke anak ayam melalui telur.

*Salmonella* akan melakukan penetrasi melalui kerabang telur dan dapat memperbanyak diri di dalam *yolk* (kuning telur) sehingga embrio akan terinfeksi.

Embrio yang terinfeksi oleh *Salmonella* dapat mati atau menetas dimana anak ayam tersebut akan menjadi *carrier* dan dapat mengkontaminasi telur selanjutnya. Ayam *carrier* juga merupakan sumber penularan bagi ayam yang lain dimana penularan dapat bersifat horizontal, yaitu dengan kontak langsung antara ayam penderita dan ayam sehat (Direktur Kesehatan Hewan, 2014).

Pada manusia penularan *Salmonella* disebabkan karena mengkonsumsi bahan pangan asal hewan secara mentah atau kurang matang. Pangan juga dapat terkontaminasi melalui orang yang terinfeksi, hewan peliharaan atau bahkan melalui



kontaminasi silang dikarenakan higiene yang buruk. Penularan juga dapat terjadi dari satu orang penderita ke orang lain selama masa infeksi (Bhunia, 2008).

### 2.2.3 Gejala Klinis

Infeksi *Salmonella* pada ayam dapat menyerang semua umur dengan gejala klinis secara umum, yaitu demam, lesu, kurang nafsu makan, dan diare. Biasanya gejala ini dapat berlangsung selama 3-5 minggu. Pada ayam pedaging dapat mengakibatkan penurunan berat badan antara 16-24% dalam waktu 3 minggu. Pada ayam petelur, dapat menyebabkan penurunan produksi telur, penurunan daya tetas telur, dan kenaikan kematian embrio (Alisantosa *et al.*, 2000). Infeksi pada anak ayam dapat ditemukan pada umur <2 minggu. Pada infeksi akut dapat ditemukan pada ayam berumur 7-21 hari. Puncak kematian sekitar umur 7-14 hari. Masa inkubasi selama 4-5 hari (Direktur Kesehatan Hewan, 2014).

## 2.3 Sinbiotik

Sinbiotik adalah kombinasi antara probiotik dan prebiotik. Probiotik merupakan mikroorganisme hidup yang apabila diberikan dalam jumlah yang cukup akan memberikan keuntungan bagi inangnya. Sedangkan prebiotik berfungsi untuk meningkatkan daya tahan probiotik karena adanya substrat yang cukup untuk difermentasi sehingga kombinasi ini akan lebih sempurna (Ashraf dan Shah, 2011).

Prebiotik seperti oligosakarida akan difermentasi oleh bakteri probiotik di usus sehingga akan menghasilkan asam laktat. Hasil ini akan menyebabkan suasana yang asam sehingga dapat menekan pertumbuhan bakteri patogen dalam usus dan dapat menjadi sumber energi pada jaringan epitel (Roller *et al.*, 2003).

### 2.3.1 Bakteri *Lactobacillus acidophilus*

Probiotik adalah kultur tunggal maupun campuran suatu mikroorganisme yang apabila diberikan kepada hewan dalam jumlah yang cukup akan membantu dalam menekan pertumbuhan bakteri patogen dalam usus (Hamilton-Miller, 2003).

Mekanisme probiotik dalam menekan pertumbuhan bakteri patogen, yaitu dengan cara mengadakan kompetisi perlekatan pada sel epitel mukosa dan kemudian akan memproduksi substansi antimikroba. Sel epitel mukosa yang telah berlekatan dengan probiotik tidak dapat berlekatan dengan bakteri lain sehingga dapat mencegah kolonisasi dari bakteri patogen (Sudarmo, 2003).

Bakteri *Lactobacillus acidophilus* merupakan salah satu bakteri asam laktat yang dapat digunakan sebagai probiotik. *Lactobacillus acidophilus* banyak dijumpai pada saluran gastrointestinal. Pada usus halus, jumlah bakteri ini yaitu  $10^6 - 10^7$  sel/g. Sedangkan pada usus besar jumlahnya dapat mencapai  $10^{10} - 10^{11}$  sel/g (Hassan, 2006). Menurut Rostini (2007), bakteri ini mampu mengubah karbohidrat (glukosa) menjadi asam laktat. Efek bakterisidal dari asam laktat yaitu untuk menurunkan pH lingkungan menjadi 3 sampai 4.5 sehingga pertumbuhan bakteri patogen seperti *Salmonella* akan terhambat. *Lactobacillus acidophilus* dapat tumbuh optimal pada suhu 20-40°C.

### 2.3.2 Alga *Spirulina platensis*

Prebiotik merupakan bahan pangan yang tidak tercerna oleh tubuh, namun dapat dicerna oleh bakteri menguntungkan dalam tubuh sehingga dapat memberikan keuntungan di dalam usus dengan menstimulasi pertumbuhan atau aktivitas satu atau beberapa bakteri di dalam usus (Suskovic *et al.*, 2001). Salah satu bahan pangan yang memiliki protein tinggi, yaitu *Spirulina platensis*.

*Spirulina platensis* adalah mikroalga yang merupakan sumber mikronutrien dan memiliki protein tinggi yaitu 55 – 70%. *Spirulina platensis* memiliki kandungan

oligosakarida berupa mannososa dan rhamnosa. Kandungan ini dapat menstimulasi pertumbuhan bakteri asam laktat (BAL) dan menghambat pertumbuhan bakteri patogen (Gupta *et al.*, 2017). Menurut Smirnov *et al.*, (2005) *Mannanoligosakarida* (MOS) dari *Spirulina platensis* dapat meningkatkan jumlah sel goblet pada usus halus. Sel goblet merupakan sel yang berfungsi memproduksi mukus yang berperan sebagai lapisan pelindung vili dan mukosa usus. MOS juga dapat meningkatkan panjang lipatan usus dan kepadatan mikrovili usus sehingga penyerapan lebih optimal dengan meningkatnya area penyerapan dan kemampuan penyerapan nutrisi pada usus (Dimitroglou *et al.*, 2009).



**Gambar 2.3** *Spirulina platensis* (Henrikson, 2009).

#### 2.4 Tumor Necrosis Factor $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

TNF- $\alpha$  atau tumor necrosis factor  $\alpha$  berfungsi dalam pertahanan infeksi bakteri, virus maupun parasit. TNF- $\alpha$  diproduksi oleh makrofag dan diaktifkan oleh sel T limfosit, antigen, sel NK, dan sel mast. Saat terjadi inflamasi sitokin akan mengaktifkan makrofag untuk membentuk sitokin pro inflamasi, yaitu salah satunya TNF- $\alpha$ . Pada kadar yang tepat TNF- $\alpha$  akan memberikan perlindungan dan penyembuhan. Namun jika kadarnya berlebih maka akan menyebabkan kerusakan jaringan yang sangat berat (Plebanski and proudfoot, 2002).

## 2.5 Limpa

Limpa merupakan organ limfoid terbesar di dalam tubuh. Limpa tikus terletak pada kuadran hipokondrium sinistra berdekatan dengan lambung dan diafragma. Limpa memiliki warna kemerahan dan berbentuk lonjong. Tepi limpa yang normal berbentuk pipih. Berat limpa berkisar 0.2% dari berat tubuh yaitu, antara 100-200 mg pada tikus yang berusia 2-4 bulan (Cesta, 2006). Limpa menjadi pertahanan penting terhadap mikroorganisme yang memasuki peredaran darah. Organ ini merupakan tempat penghancuran eritrosit tua yang dilakukan oleh makrofag. Limpa adalah tempat akumulasi bagi limfosit aktif yang masuk ke dalam darah. Limpa akan segera bereaksi ketika terdapat antigen yang terbawa darah (Hestianah dkk., 2013).

## 2.6 Duodenum Tikus Putih

Duodenum merupakan salah satu bagian dari usus halus yang berfungsi dalam absorpsi nutrisi dan menetralkan asam lambung. Duodenum memiliki bentuk seperti huruf C dimana ujung distalnya menyatu dengan jejunum. Duodenum tikus memiliki panjang sekitar 9.5-10 cm dengan diameter 0.25-0.3 cm. Dindingnya terdiri dari empat lapisan, yaitu mukosa, submukosa, muskularis, dan serosa (**Gambar 2.4**) (Gartner, 2007; Nzalak, 2010). Lapisan muskularis mukosa memiliki fungsi menimbulkan pergerakan pada vili untuk proses pencernaan. Terdapat kelenjar Brunner pada lapisan submukosa yang berfungsi menghasilkan produk basa untuk menetralkan hasil pencernaan makanan yang berasal dari lambung. Lapisan muskularis terdiri atas muskularis sirkular pada bagian luar dan lapisan longitudinal pada bagian dalam. Lapisan serosa merupakan lapisan yang tipis yang disertai dengan mesotel (Janqueira, 2013).

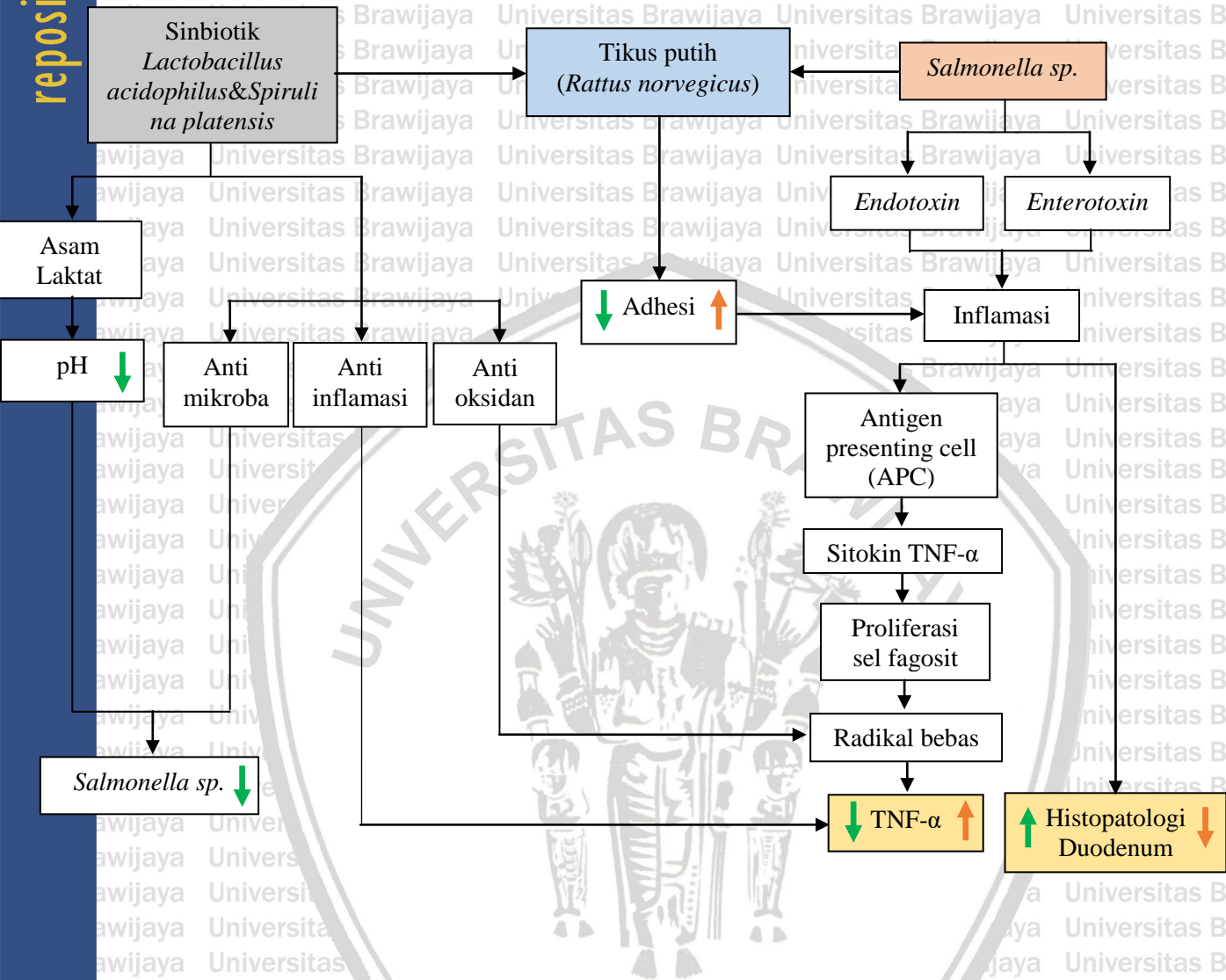


**Gambar 2.4** Lapisan Duodenum (Janqueira, 2013).

Penonjolan yang terdapat di mukosa disebut vili dimana panjangnya, yaitu antara 0.5 – 1.5 mm (Gartner, 2007). Duodenum memiliki vili berbentuk daun. Vili-vili ini dilapisi oleh selapis sel epitel kolumnar, sel absorbtif atau enterosit, dan sel goblet (Junqueira, 2013). sel absorbtif berperan menyerap molekul nutrisi yang berasal dari proses pencernaan. Sedangkan sel goblet memiliki peran untuk menghasilkan mukus yang berfungsi melumasi dan melindungi lapisan usus. Duodenum memiliki vili yang lebih lebar dan tinggi dibandingkan dengan jejunum dan ileum serta jumlah vili per unit area lebih banyak. Sel goblet yang terdapat pada duodenum lebih sedikit (Mescher, 2012).

## BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

### 3.1 Kerangka Konseptual



#### Keterangan :

↑ : Kenaikan akibat sinbiotik

↓ : Penurunan akibat sinbiotik

↑ : Kenaikan akibat *Salmonella*

↓ : Penurunan akibat *Salmonella*



label terkontrol

: Variabel terikat

Ketika *Salmonella* masuk ke dalam jaringan tubuh, maka akan ditangkap oleh sel antigen presenting cell (APC) untuk disajikan pada sel T helper. Kemudian sel T helper akan mensekresi sitokin TNF- $\alpha$  dan akan menyebabkan proliferasi dan aktivasi sel T sitotoksik, *natural killer (NK cell)*, dan makrofag. Selanjutnya makrofag akan teraktivasi dan akan mensekresikan sitokin proinflamasi, yaitu TNF- $\alpha$ .

*Salmonella* yang masuk ke dalam saluran pencernaan akan melakukan adhesi (perlekatan) pada permukaan sel hospes. Perlekatan ini merupakan tahap awal patogenesis dan terjadinya penyakit. Kemudian bakteri ini akan melakukan invasi (penetrasi) ke dalam mukosa duodenum sampai pada sel epitel duodenum. Invasi berfungsi sebagai infeksi pertama pada sel hospes dan untuk penyebaran dengan cara merusak jaringan sel hospes. Pada sel epitel, bakteri ini akan melakukan multiplikasi.

*Salmonella* akan menghasilkan *enterotoxin* yang dapat merusak sel epitel duodenum sehingga terjadi radang. Sedangkan *endotoxin* atau LPS berasal dari dinding sel bakteri.

Ketika bakteri lisis, LPS ini akan keluar dan menuju saluran limfe. Kemudian LPS akan masuk ke dalam sirkulasi darah dan berikatan dengan reseptor sel-sel fagosit. Selanjutnya, akan menginduksi dan mengaktivasi produksi sitokin proinflamasi, salah satunya, yaitu TNF- $\alpha$ .

*Salmonella* juga dapat memasuki sirkulasi darah melalui sistem pertahanan limfatik atau terbawa oleh makrofag, bakteri ini kemudian akan menuju organ seperti limpa dan akan menyebabkan perubahan histopatologik pada organ tersebut. Ketika *Salmonella* berada pada organ limpa maka akan menyebabkan pembengkakan akibat proliferasi limfosit serta infiltrasi neutrofil dan makrofag ke dalam limpa.

Sinbiotik *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* akan mempengaruhi jumlah mikroflora di dalam saluran pencernaan dengan cara meningkatkan jumlah substrat sehingga akan memicu pertumbuhan bakteri probiotik. *Spirulina platensis* yang

memiliki kandungan oligosakarida berupa *mannosayang* akan menstimulasi pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus* sehingga pertumbuhan meningkat. *Spirulina platensis* mengandung fikosianin yang dapat meningkatkan aktivitas antibodi dalam melawan infeksi bakteri *Salmonella*. Fikosianin dari *Spirulina platensis* juga dapat bersifat sebagai antioksidan dimana dapat memecah radikal bebas dan menghambat oksidasi.

Mekanisme *Lactobacillus acidophilus* dalam melawan *Salmonella* di dalam tubuh, yaitu *Lactobacillus acidophilus* akan berkompetisi dengan *Salmonella* dengan cara menempel dan berkolonisasi pada sel epitel duodenum. Sel epitel yang telah berlekatan dengan *Lactobacillus acidophilus* tidak dapat berlekatan lagi dengan *Salmonella* sehingga dapat mencegah pertumbuhan dan kolonisasi dari bakteri *Salmonella* tersebut.

*Lactobacillus acidophilus* akan memfermentasi *Mannan oligosakarida* (MOS) dari *Spirulina platensis* dan akan menghasilkan asam laktat. Suasana akan menjadi asam akibat dari fermentasi tersebut sehingga akan menekan pertumbuhan *Salmonella* dan akan memberikan sumber energi pada jaringan epitel di saluran pencernaan. Penurunan pH yang terjadi pada saluran pencernaan dapat menjadi sinyal untuk pembentukan mukus yang berfungsi melindungi permukaan saluran pencernaan sehingga *Salmonella* tidak dapat masuk ke dalam sel epitel.

*Lactobacillus acidophilus* dapat memecah protein menjadi peptida dan akan menghasilkan asam amino. Peptida hasil pemecahan tersebut memiliki sifat sebagai antimikroba, antioksidan, dan antiinflamasi. Aktivitas antimikroba, yaitu berkaitan dengan pembentukan zat patogen alami berupa bakteriosin. *Lactobacillus acidophilus* dapat menghasilkan *Acidocin* yang bersifat bakterisidal terhadap *Salmonella*, yaitu dengan cara merusak permeabilitas membran bakteri dan menghilangkan proton motive force (PMF) sehingga dapat menghambat produksi energi dan sintesis protein *Salmonella*



dan menyebabkan kematian. Aktivitas antioksidan berupa penghambatan reaksi oksidasi dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang reaktif, sehingga akan menghambat terjadinya kerusakan sel. Aktivitas antiinflamasi peptida, yaitu mengurangi pembentukan sitokin proinflamasi dengan menghambat jalur sinyal transduksi sitokin proinflamasi.

Bakteri *Salmonella* yang termakan oleh *Lactobacillus acidophilus* akan menstimulasi aktivitas makrofag sehingga *Lactobacillus acidophilus* akan dapat meningkatkan daya fagosit terhadap *Salmonella*. Hal ini berkaitan dengan adanya absorpsi antigen atau translokasi *Lactobacillus acidophilus* melalui dinding usus langsung ke peredaran darah.

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah ada, maka hipotesis dari penelitian ini, yaitu sebagai berikut :

1. Pemberian sinbiotik *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang telah diinfeksi *Salmonella sp.* dapat mencegah peningkatan jumlah relatif TNF- $\alpha$ .
2. Pemberian sinbiotik *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang telah diinfeksi *Salmonella sp.* dapat mencegah kerusakan pada duodenum.

## BAB 4. METODE PENELITIAN

### 4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan mulai bulan Mei 2018 sampai Juli 2018. Kegiatan dilakukan di beberapa laboratorium, yaitu :

1. Pemeliharaan tikus dilakukan di Laboratorium Epidemiologi Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya.
2. Pembuatan sinbiotik dilakukan di Laboratorium Nutrisi dan Makanan Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya.
3. Pengujian kadar TNF- $\alpha$  dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya.
4. Pembuatan preparat histopatologi duodenum dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya.
5. Pemeriksaan histopatologi duodenum dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya.

### 4.2 Rancangan Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah *Experimental* dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Perlakuan yang dilakukan sebanyak 5 perlakuan dengan 4 kali ulangan dimana 2 perlakuan sebagai kontrol dan 3 perlakuan uji. Tikus yang digunakan sebanyak 20 ekor tikus (*Rattus Norvegicus*) yang berusia 4-6 minggu dengan berat badan 100 gram. Penggunaan hewan coba telah dihitung menggunakan rumus Federer dalam Kusriyung (2008), yaitu :

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

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

Keterangan :

t = Jumlah kelompok perlakuan



$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

n = Jumlah ulangan yang diperlukan

Tabel 4.1 Tabel Perlakuan

| No | Kelompok Perlakuan | Perlakuan   |
|----|--------------------|---|
| 1. | K-                 | Tanpa perlakuan   |
| 2. | K+                 | Tikus diinfeksi <i>Salmonella sp</i> konsentrasi $1.5 \times 10^8$ CFU/ml sebanyak 0.5 ml per oral  |
| 3. | P1                 | Tikus diberi sinbiotik sebanyak 0.2%/10g pakan dan diinfeksi <i>Salmonella sp</i> konsentrasi $1.5 \times 10^8$ CFU/ml sebanyak 0.5 ml per oral |
| 4. | P2                 | Tikus diberi sinbiotik sebanyak 0.4%/10g pakan dan diinfeksi <i>Salmonella sp</i> konsentrasi $1.5 \times 10^8$ CFU/ml sebanyak 0.5 ml per oral |
| 5. | P3                 | Tikus diberi sinbiotik sebanyak 0.6%/10g pakan dan diinfeksi <i>Salmonella sp</i> konsentrasi $1.5 \times 10^8$ CFU/ml sebanyak 0.5 ml per oral |

### 4.3 Variabel Penelitian

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

Variabel terikat : Histopatologi duodenum tikus putih dan kadar relatif TNF- $\alpha$ .

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

### 4.4 Alat dan Bahan

#### 4.4.1 Alat

Pada penelitian ini dibutuhkan alat-alat antara lain : autoklaf, cawan petri, tabung reaksi, inkubator, labu ukur, gelas beaker, mikroskop, *object glass*, *cover glass*, mikropipet, *yellow tip*, *blue tip*, *white tip*, ose, spuit, *needle*, mortar,

pengaduk kaca, tabung darah, scalpel blade, gunting, pinset, sentrifugator, pipet tetes, rak tabung reaksi, *microtube*, *freeze dryer*, timbangan digital, vortex, bunsen, ice box, penangas air, tempat minum tikus (*dot*), tempat pakan tikus, kandang tikus berukuran 10 cm x 10 cm sebanyak 20 buah masing-masing berisi 1 ekor tikus putih.

#### 4.4.2 Bahan

Adapun bahan yang dibutuhkan pada penelitian ini antara lain : 20 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dengan berat badan 100 gram, alga *Spirulina platensis* 100%, suspensi bakteri *Lactobacillus acidophilus* dengan standart Mc Farland 0.5 konsentrasi  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL, *Salmonella sp.* dengan standart Mc Farland 0.5 konsentrasi  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL, media pertumbuhan bakteri meliputi Nutrien Broth, MRSA, MRSB, SSA, aquades, maltodextrin, formalin 10%, etanol, air, desinfektan, larutan PBS, alkohol bertingkat, ethanol bertingkat 70%, 80%, 90%, xylol, paraffin, pewarna HE, larutan NaCl 0.9%, organ duodenum tikus putih, limpa tikus putih, sekam, pakan tikus.

#### 4.5 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan antara lain :

##### A. Persiapan hewan uji

Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan umur 4-6 minggu dengan berat 100g sebanyak 20 ekor. Tikus yang digunakan diadaptasi terlebih dahulu selama 1 minggu agar dapat menyesuaikan diri dengan lingkungan yang baru pada box plastik dengan ukuran 50 x 30 cm. Setelah diadaptasi setiap ekor tikus dipindahkan pada satu kandang berukuran 10 x 10 cm. Dasar kandang dilapisi oleh serbuk kayu setebal 1 cm dan

bagian atasnya ditutup dengan kawat ram (Mas'ud dan Parakkasi, 2009). Pakan tikus diberikan secara terpisah dengan minuman dan diganti setiap hari.

## B. Persiapan sinbiotik

Sinbiotik yang digunakan, yaitu campuran antara *Lactobacillus acidophilus* konsentrasi  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL dan *Spirulina platensis* 100%. *Lactobacillus acidophilus* yang diperbanyak pada media MRSB, lalu dibuat mengikuti standart Mc Farland 0.5 ( $1.5 \times 10^8$  CFU/mL) pada media NB.

Dibuat campuran 194 mL aquades dan 58 g maltodextrin. Lalu dihomogenkan dan didiamkan selama 12 jam. Kemudian dimasukkan sinbiotik ke dalam campuran yang telah dibuat dengan perbandingan 1:2, yaitu *Lactobacillus acidophilus* sebanyak 28 mL dan *Spirulina platensis* sebanyak 56 g, lalu dihomogenkan. Campuran tersebut kemudian dikeringkan menggunakan *freeze dryer* selama 4-5 hari pada suhu  $-52^\circ\text{C}$ . Metode *freeze dryer* memungkinkan pembentukan partikel bulat berukuran mikron yang menyelubungi sel sehingga akan terbentuk sinbiotik mikroenkapsulasi (Serna and Vallejo, 2013). Tujuan dilakukannya mikroenkapsulasi, yaitu untuk mempertahankan viabilitas (daya hidup) dari *Lactobacillus acidophilus* serta melindungi bakteri tersebut dari asam lambung (Puspawati dkk., 2010).

## C. Persiapan isolat *Salmonella sp.*

Bakteri *Salmonella sp.* yang digunakan diidentifikasi di Laboratorium Bakteriologi Balai Besar Veteriner Water Yogyakarta. *Salmonella sp.* yang diperoleh diperbanyak pada media SSA, lalu dibuat mengikuti standart Mc Farland 0.5 ( $1.5 \times 10^8$  CFU/mL) pada media NB lalu diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 24 jam (Ghofar *et al.*, 2005).

#### D. Perlakuan pada tikus

Setiap tikus diberikan perlakuan satu kali sehari dengan mencampurkan sinbiotik dan pakan sesuai dengan perlakuan selama 3 minggu. Kontrol positif (+) merupakan kelompok tanpa perlakuan. Kontrol negatif (-) merupakan kelompok yang diinduksi *Salmonella sp.* sebanyak 0.5 mL. Perlakuan 1 (P1) merupakan kelompok yang diberi sinbiotik sebanyak 0.2%/10g pakan. Perlakuan 2 (P2) merupakan kelompok yang diberi sinbiotik sebanyak 0.4%/10g pakan dan perlakuan 3 (P3) merupakan kelompok yang diberi sinbiotik sebanyak 0.6%/10g pakan. Pemberian sinbiotik ini dilakukan selama 2 minggu, lalu tikus diinduksi *Salmonella sp.* sebanyak 0.5 mL secara per oral, kemudian dilakukan pemberian sinbiotik lagi selama 1 minggu. Acuan dosis yang digunakan berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Baderuddin (2017).

#### E. Preparasi organ limpa dan duodenum

Setelah pemeliharaan dan pemberian perlakuan selama 4 minggu, dilakukan pembedahan pada tikus untuk diambil organ limpa dan duodenum. Tikus dieuthanasi dengan metode dislokasi servikal, lalu hewan uji diletakkan pada papan nekropsi dengan posisi rebah dorsal. Kulit tikus diangkat dan dibuat irisan sepanjang ventral midline dengan menggunakan gunting. Setelah organ terlihat, diambil bagian duodenum dan dimasukkan ke dalam pot berisi larutan formalin 10% untuk dibuat preparat histologi. Sedangkan organ limpa diambil untuk dilakukan pemeriksaan *flowcytometry*.

#### F. Pengukuran jumlah relatif TNF- $\alpha$ dengan *Flowcytometry*

*Flowcytometry* merupakan teknik yang digunakan untuk menghitung dan menganalisa partikel mikroskopis yang tersuspensi dalam aliran fluida. Inti sel yang berisi kromosom akan diidentifikasi dengan menembakkan sinar laser. Organ limpa

yang telah didapatkan dicuci menggunakan PBS lalu dihancurkan dengan larutan PBS sebanyak 5 mL. Kemudian suspensi diletakkan dalam mikrotube dan disentrifuge pada kecepatan 2500 rpm pada suhu 10°C selama 5 menit, supernatan dibuang. Pelet dicampur kembali dengan PBS sebanyak 1 mL. Dibagi suspensi ke beberapa microtube yang telah berisi 0.5 mL PBS sebanyak 0.5 µl. Sentrifuge kembali pada kecepatan 2500 rpm pada suhu 10°C selama 5 menit, supernatan dibuang. Pelet yang tersisa diberi pewarnaan intraseluler dengan cara ditambahkan larutan fiksatif (*fixation buffer*) sebanyak 50 µl. Kemudian diinkubasi selama 20 menit pada suhu 4°C di ruang gelap. Ditambahkan larutan permeabilitas (*Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer*) sebanyak 500 µl, lalu dihomogenkan. Sentrifuge pada kecepatan 2500 rpm pada suhu 10°C selama 5 menit, supernatan dibuang. Dilakukan penambahan antibodi *Fluorescein-Conjugated Monoklonal* sebanyak 50 µl pada pelet. Diinkubasi selama 20 menit pada suhu 4°C di ruang gelap. Kemudian ditambahkan 400 µl PBS dan dipindahkan pada kuvet *flowcytometry* (Winson and Davey, 2000).

### G. Pembuatan preparat histopatologi duodenum

Pembuatan preparat histopatologi duodenum tikus putih dilakukan dengan beberapa tahapan, yaitu (Jusuf, 2009) :

#### 1. Pengambilan duodenum tikus putih

Duodenum dipotong dengan ukuran 1x1 cm lalu diletakkan pada pot sampel yang berisi formalin 10%.

#### 2. Proses Dehidrasi

Dehidrasi bertujuan untuk menghilangkan kandungan air dari jaringan dengan cara dimasukkan ke dalam alkohol bertingkat mulai 80%, 90%, 95%, dan 100% masing-masing selama 1 jam.

### 3. Proses Clearing

Proses clearing dilakukan dengan cara memasukkan organ ke dalam xylol :

alkohol (3:1), xylol : alkohol 2 (1:1), xylol : alkohol 3 (1:3) dan xylol murni

sebanyak 2 kali masing-masing tahapan 30 menit.

### 4. Proses Embedding

Organ dimasukkan ke dalam xylol : parafin (3:1), xylol : parafin (1:1), xylol :

parafin (1:3) dan parafin murni selama 30 menit kemudian diletakkan dalam

oven. Kemudian organ diembedding menggunakan parafin hingga mengeras, lalu

blok parafin dimasukkan ke dalam lemari es.

### 5. Pengirisan Blok

Blok parafin yang telah mengeras dan berisi organ diletakkan pada mikrotom,

lalu dilakukan proses pengirisan blok dengan ketebalan 5-8  $\mu\text{m}$ . Potongan

jaringan diambil dan ditempelkan pada gelas objek yang telah diberi perekat.

### 6. Deparafinasi

Jaringan yang telah didapatkan dimasukkan ke dalam larutan xylol 1, xylol 2,

dan xylol 3 masing-masing selama 1 menit.

### 7. Dehidrasi

Jaringan dimasukkan ke dalam alkohol absolut sebanyak 3 kali, lalu jaringan

dimasukkan ke dalam alkohol 95%, 70%, 50%, dan akuades masing-masing

tahapan selama 1 menit.

### 8. Proses Pewarnaan



Jaringan yang didapatkan diwarnai menggunakan hematoxylyn sebagai pewarna inti sel selama 5 menit, lalu dicuci dengan aquades. Kemudian jaringan dimasukkan ke dalam eosin untuk mewarnai sitoplasma selama 5 menit. Jaringan dimasukkan ke dalam alkohol bertingkat dan alkohol absolut sebanyak 3 kali.

#### 9. Proses Clearing

Jaringan dimasukkan ke dalam xylol 1, xylol 2, xylol 3 masing-masing selama 5 menit.

#### 10. Proses Mounting

Jaringan yang telah terwarnai ditutup menggunakan cover glass yang diberi perekat dan dibiarkan kering.

#### 11. Proses Labelling

Preparat diberi label atau keterangan sesuai dengan perlakuan.

### 4.6 Analisis Data

Hasil percobaan TNF- $\alpha$  menggunakan *flowcytometry* yang diperoleh diolah secara kuantitatif menggunakan *One Way ANOVA* dengan menggunakan program pengolahan data statistik SPSS. Sedangkan preparat histopatologi duodenum yang didapatkan dianalisa secara deskriptif berupa erosi epitel vili dan sel-sel radang.

## BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Jumlah Relatif TNF- $\alpha$ Limpa pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diberi Sinbiotik *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* yang Diinfeksi *Salmonella sp.*

Pada penelitian ini, jumlah relatif TNF- $\alpha$  limpa tikus putih diukur menggunakan metode uji *flowcytometry* dan dilabel menggunakan antibodi intraseluler TNF- $\alpha$ . Hasil dari uji *flowcytometry* tersebut diolah menggunakan One Way Anova dan menunjukkan bahwa sinbiotik *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* tidak berpengaruh secara nyata pada jumlah relatif TNF- $\alpha$  limpa tikus putih yang diinfeksi *Salmonella sp.* Namun secara rata-rata dapat terlihat penurunan. Penurunan jumlah relatif TNF- $\alpha$  limpa tikus putih yang diinfeksi *Salmonella sp.* dapat dilihat pada **Tabel 5.1**.

**Tabel 5.1** Tabel Rata-Rata Jumlah Relatif TNF- $\alpha$  (%)

| Perlakuan   | Rata-rata $\pm$ SD |
|---|--------------------|
| K- (tanpa perlakuan)  | 3.7 $\pm$ 0.42     |
| K+ ( <i>Salmonella sp.</i> sebanyak 0.5 mL)                           | 4.1 $\pm$ 0.67     |
| P1 (sinbiotik sebanyak 0.2%/10g pakan + <i>Salmonella sp.</i> 0.5 mL) | 3.5 $\pm$ 0.81     |
| P2 (sinbiotik sebanyak 0.4%/10g pakan + <i>Salmonella sp.</i> 0.5 mL) | 3.3 $\pm$ 1.28     |
| P3 (sinbiotik sebanyak 0.6%/10g pakan + <i>Salmonella sp.</i> 0.5 mL) | 3.0 $\pm$ 0.48     |

Pada penelitian ini rata-rata jumlah relatif TNF- $\alpha$  pada setiap kelompok perlakuan memiliki perbedaan, namun perbedaan antar kelompok perlakuan tersebut tidak signifikan ( $P > 0.05$ ). Menurut (Kusumaningsih, 2011) bakteri *Salmonella sp.* dengan dosis 0.2 mL dan dengan konsentrasi  $1 \times 10^8$  CFU/mL sudah dapat menyebabkan terjadinya infeksi pada tikus. Dosis *Salmonella sp.* yang digunakan pada penelitian ini dapat dikatakan tinggi, yaitu 0.5 mL dengan konsentrasi  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL, sehingga sudah dapat menyebabkan

infeksi. Namun jumlah bakteri *Salmonella* dapat berkurang karena bakteri *Salmonella* yang masuk melalui saluran pencernaan dapat hancur oleh asam klorida dan enzim-enzim yang ada di lambung, sehingga ketika memasuki limpa jumlah *Salmonella* hanya sedikit yang menyebabkan patogenisitas yang menurun (Ramadhan, 2008).

Organ yang digunakan untuk menentukan jumlah relatif TNF- $\alpha$  adalah organ limpa. Bakteri *Salmonella* yang terdapat di dalam usus akan menembus epitel usus kemudian dapat masuk ke dalam sirkulasi darah melalui sistem pertahanan limfatik dan menuju berbagai organ salah satunya, yaitu limpa (Monack *et al.*, 2004). Limpa merupakan tempat utama dalam pengaturan sistem imun serta salah satu organ yang bertanggung jawab terhadap pemenuhan kebutuhan limfosit. Ketika salmonella berada pada organ limpa maka akan menyebabkan pembengkakan akibat proliferasi limfosit (Prasetyo dkk., 2005). Bakteri yang lisis di dalam limpa akan melepaskan suatu *endotoksin* atau LPS, yang akan merangsang pelepasan pirogen endogen dari sel-sel limpa yang menyebabkan terjadinya demam. LPS dapat menempel pada reseptor sel endotel yang mengakibatkan berbagai komplikasi seperti gangguan kardiovaskular dan pernapasan (Darlina dkk., 2012).

Pada penelitian ini data yang didapatkan normal dan homogen, namun setelah dilanjutkan ke uji anova ternyata tidak menunjukkan pengaruh atau perbedaan pada kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan. Menurut (Purwaningtyas, 2009) tikus putih yang terinfeksi oleh *Salmonella sp.* menunjukkan gejala klinis, yaitu nafsu makan menurun, cenderung tidak aktif, lemas, demam, diare, bulu terlihat kusam. Hasil dari pengamatan tikus pada penelitian ini, yaitu tidak menunjukkan adanya diare hanya terlihat sedikit penurunan nafsu makan pada kelompok kontrol positif (+), kelompok P1, P2, dan P3.

Jumlah relatif TNF- $\alpha$  pada kelompok kontrol negatif (K-) (tikus tanpa perlakuan) memiliki rata-rata jumlah relatif TNF- $\alpha$  yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok

perlakuan, yaitu 3.7%. Dalam keadaan tubuh yang normal, TNF- $\alpha$  memiliki fungsi sebagai pengatur utama respon kekebalan dan mampu menimbulkan efek peradangan, proliferasi, hematopoietik, hemostasis, serta menginduksi pertumbuhan (Perry, *et al.*, 2002).

Kelompok kontrol positif (K+) (tikus yang diinfeksi *Salmonella sp.*) memiliki rata-rata jumlah relatif TNF- $\alpha$ , yaitu 4.1%. Kelompok K+ memiliki rata-rata jumlah relatif TNF- $\alpha$  yang paling tinggi jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (K-) maupun kelompok perlakuan. Kelompok K+ hanya diinfeksi oleh *Salmonella sp.* sebanyak 0.5 mL dengan konsentrasi  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL. Infeksi *Salmonella sp.* dapat menyebabkan TNF- $\alpha$  diproduksi secara berlebih oleh makrofag (Arimbi dkk., 2015). TNF- $\alpha$  dapat disimpan dalam sel dalam bentuk proaktif, ketika terjadi inflamasi TNF- $\alpha$  akan diaktifkan dan mulai terjadi peningkatan secara cepat. Meningkatnya jumlah TNF- $\alpha$  dapat terjadi dalam keadaan inflamasi akut maupun kronik (Popa, *et al.*, 2007).

Kelompok perlakuan terlihat adanya penurunan pada rata-rata jumlah relatif TNF- $\alpha$  jika dibanding dengan kelompok kontrol, dimana rata-rata jumlah relatif TNF- $\alpha$  pada kelompok perlakuan 1 (P1) (tikus yang diberi sinbiotik 0.2%/10g pakan), yaitu 3.5%. Kelompok perlakuan 2 (P2) (tikus yang diberi sinbiotik 0.4%/10g pakan) memiliki rata-rata jumlah relatif TNF- $\alpha$ , yaitu 3.3%. Sedangkan pada kelompok perlakuan 3 (P3) (tikus yang diberi sinbiotik 0.6%/10g pakan) memiliki rata-rata jumlah relatif TNF- $\alpha$  yang paling rendah, yaitu 3.0%. Penurunan jumlah relatif TNF- $\alpha$  dapat terjadi karena adanya peningkatan aktivitas dan jumlah dari *Lactobacillus acidophilus*. Kandungan *Mannanligosakarida* (MOS) dari *Spirulina platensis* akan menjadi sumber nutrisi bagi *Lactobacillus acidophilus* sehingga jumlahnya dapat meningkat (Gupta, *et al.*, 2017).

Penurunan jumlah relatif TNF- $\alpha$  juga dapat terjadi oleh adanya aktivitas antimikroba dan antiinflamasi dari *Lactobacillus acidophilus*. *Lactobacillus acidophilus* yang dapat menghasilkan bakteriosin berupa acidocin yang bersifat bakterisidal terhadap *Salmonella*

dengan cara merubah permeabilitas membran sehingga mengganggu transpor membran atau menghilangkan tenaga gerak proton yang mengakibatkan terhambatnya produksi energi dan biosintesis protein atau asam nukleat bakteri. Acidocin juga dapat menghambat aktivitas phosphoenolpyruvate : phospo-transferase system (PEP:PTS) pada bakteri dengan menginduksi keluarnya metabolit intraseluler dari dalam sel (Kusumawati, 2000).

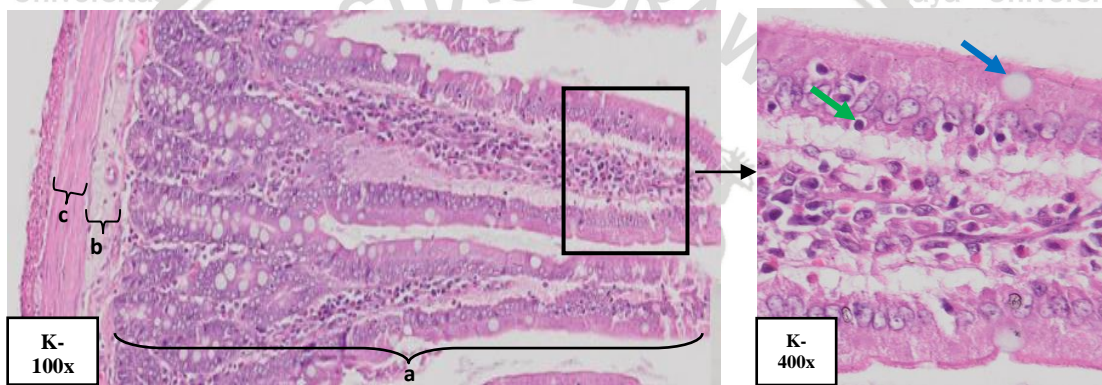
Selain itu, *Lactobacillus acidophilus* memiliki aktivitas antiinflamasi berupa peningkatan produksi sitokin antiinflamasi dan mencegah pembentukan sitokin pro inflamasi dengan cara menghambat jalur sinyal transduksi sitokin pro inflamasi (Fooks and Gibson, 2002).

*Spirulina platensis* juga memiliki senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Senyawa antimikroba yang dapat ditemukan pada *Spirulina platensis* tersebut meliputi polifenol, asam lemak, glikolipid, terpenoid, dan alkaloid. Mekanisme kerja senyawa polifenol sebagai antibakteri, yaitu dengan cara merusak dinding sel sehingga mengakibatkan pertumbuhan sel terhambat. Mekanisme kerja asam lemak dan glikolipid dengan cara mengganggu sistesis asam lemak dari bakteri. Mekanisme terpenoid sebagai antibakteri, yaitu dengan bereaksi dengan protein transmembran pada membran luar dinding sel bakteri dan membentuk ikatan polimer yang kuat sehingga menyebabkan rusaknya porin. Sedangkan mekanisme alkaloid adalah dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri yang menyebabkan lapisan dinding sel bakteri tidak terbetuk secara utuh (Sudha, *et al.*, 2011).

Berdasarkan hasil penelitian ini, bahwa pemberian sinbiotik dan infeksi *Salmonella* tidak menunjukkan pengaruh atau perbedaan terhadap TNF- $\alpha$  baik pada kelompok kontrol negatif, positif maupun kelompok perlakuan.

## 5.2 Gambaran Histopatologi Duodenum Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diberi Sinbiotik *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* yang Diinfeksi *Salmonella sp.*

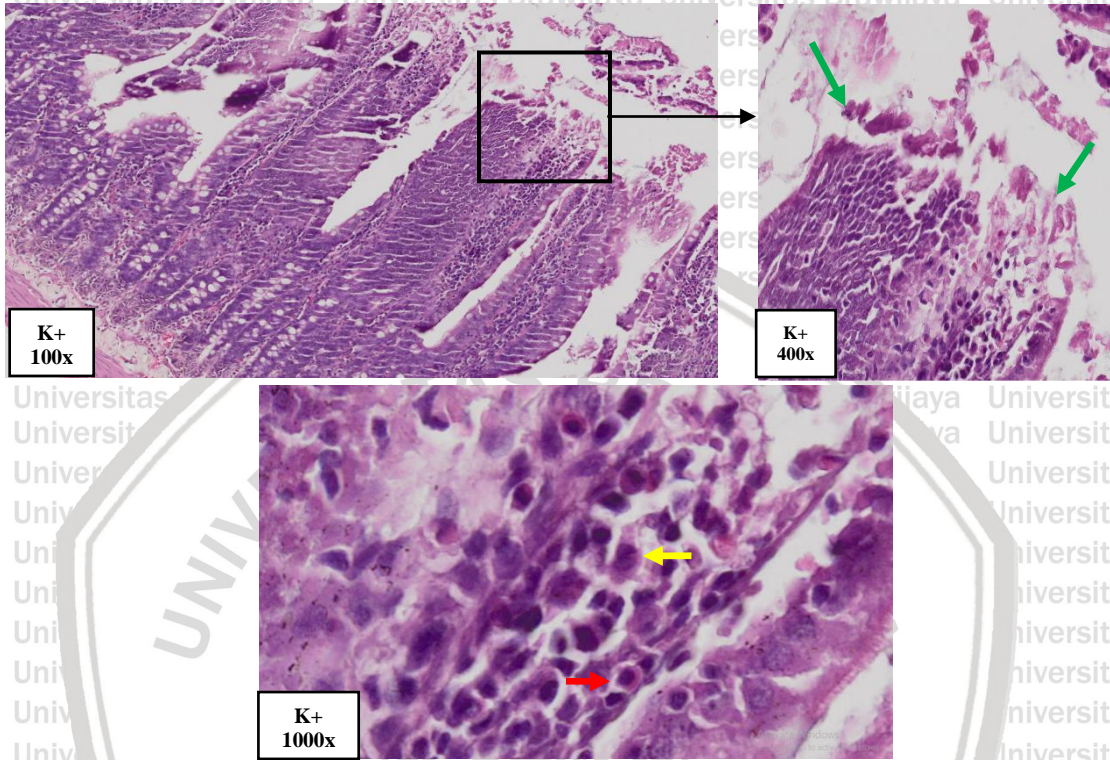
Pada penelitian ini, hasil dari pemberian sinbiotik *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinfeksi *Salmonella sp.* pada gambaran histopatologi duodenum dilakukan dengan pewarnaan *Hematoksilin-Eosin* (HE), kemudian histopatologi duodenum tersebut diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100x, 400x, dan 1000x. Pengaruh pemberian sinbiotik ditunjukkan dengan berkurangnya erosi pada lapisan epitel duodenum.



**Gambar 5.1** Gambaran Histologi Duodenum pada Kelompok K-  
**Keterangan**  
 → Sel epitel kolumer simpleks  
 → Sel goblet  
 a : Mukosa  
 b : Submukosa  
 c : Muskularis

Pada kelompok K- (tikus tanpa perlakuan) menunjukkan histologi duodenum dalam keadaan normal (**Gambar 5.2**). Struktur duodenum pada tikus putih terdiri dari empat lapisan, yaitu mukosa, submukosa, muskularis, dan serosa. Pada duodenum terdapat penonjolan pada mukosa yang disebut vili. Vili-vili ini dilapisi oleh epitel kolumer simplex yang terdiri dari 2 jenis sel, yaitu enterosit dan sel goblet. Enterosit pada duodenum memiliki fungsi untuk menyerap nutrisi dari proses pencernaan. Sedangkan sel

goblet dapat menghasilkan mukus. Mukus ini berperan untuk melumasi dan melindungi lapisan usus (Janqueira, 2013).

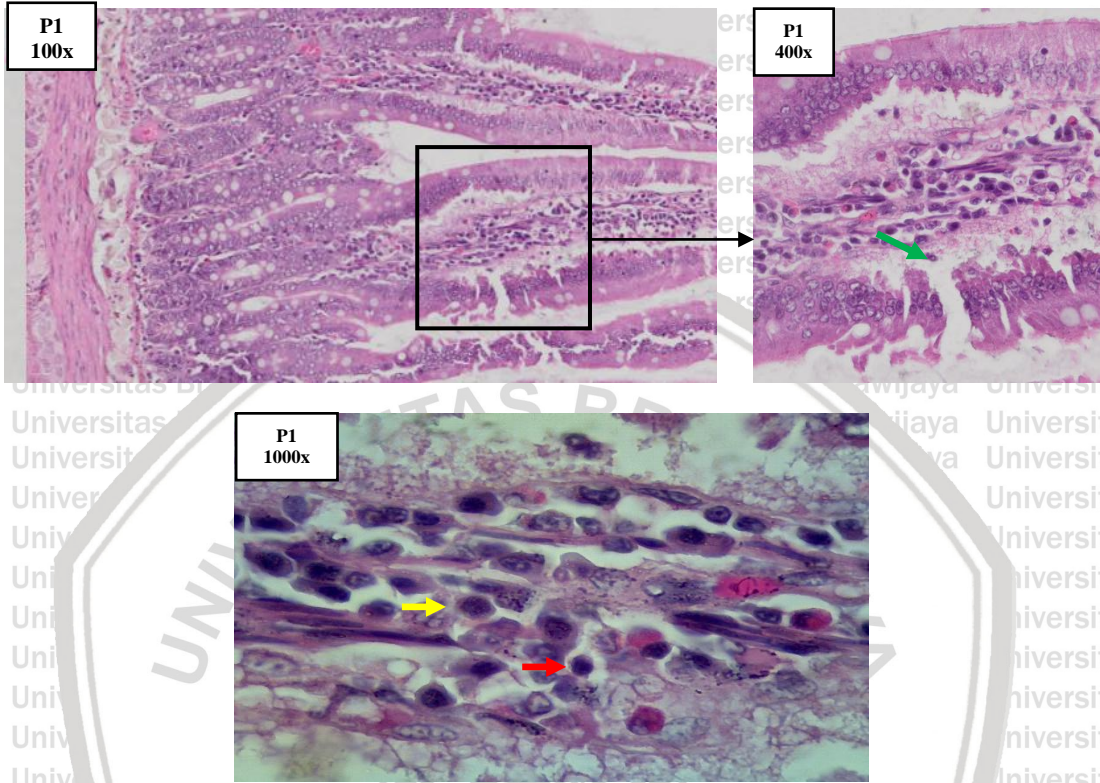


**Gambar 5.2** Gambaran Histopatologi Duodenum pada Kelompok K+

- : Ruptur pada epitel vili
- ➡ : Limfosit
- ➡ : Monosit

Pada kelompok K+ (tikus yang diinfeksi *Salmonella sp.*), gambaran histopatologi menunjukkan adanya kerusakan pada struktur vili duodenum (**Gambar 5.3**). Pada mukosa, terlihat vili mengalami ruptur. Sel-sel epitel kolumner simpleks sudah tidak tersusun dengan rapi. Perubahan struktur duodenum tersebut menunjukkan bahwa infeksi *Salmonella* dapat menyebabkan kerusakan pada epitel duodenum. Menurut Djunaedi (2007), *Salmonella sp.* yang menempel pada mukosa akan menyebabkan erosi pada sel-sel epitel dan menyebabkan peradangan usus. Selain itu, terlihat pula sel-sel radang, yaitu

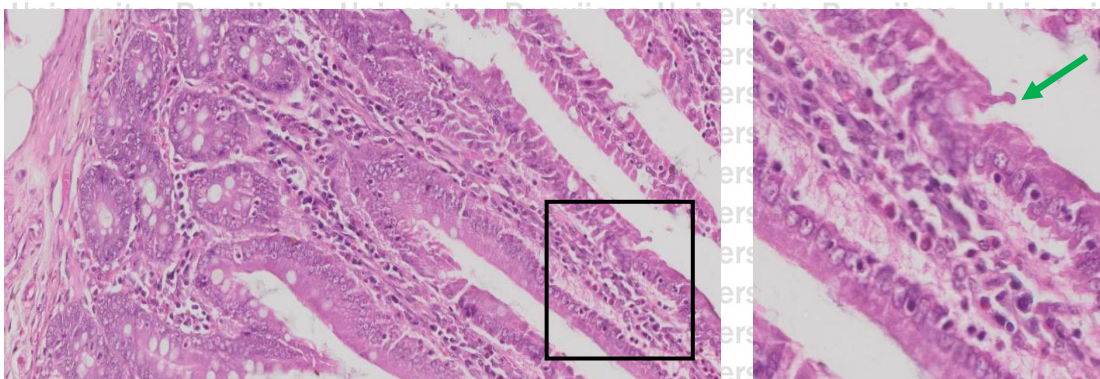
berupa limfosit dan monosit. Sel-sel ini akan pindah menuju jaringan yang mengalami peradangan dengan cara menembus dinding kapiler (Kiswari, 2014).



**Gambar 5.3** Gambaran Histopatologi Duodenum pada Kelompok P1

- ➔ : Erosi pada epitel vili
- ➔ : Limfosit
- ➔ : Monosit

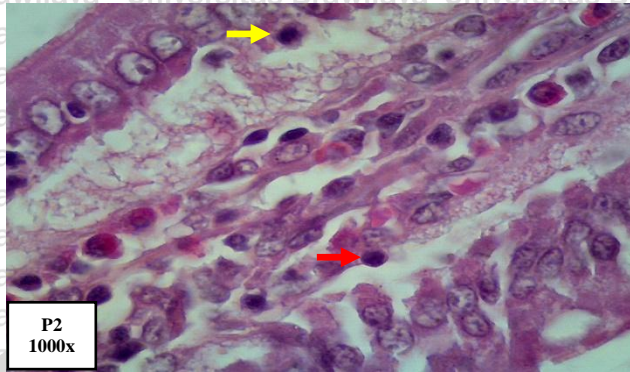
Gambaran histopatologi duodenum pada kelompok P1 yang diberi sinbiotik sebanyak 0.2%/10g pakan, terlihat adanya kerusakan pada struktur jika dibandingkan dengan kelompok K- (**Gambar 5.4**). Hal ini terlihat adanya erosi pada epitel vili. Namun kerusakan pada kelompok P1 tidak sampai mengalami ruptur seperti yang terlihat pada kelompok K+. Terlihat pula sel-sel radang.





P2  
100x

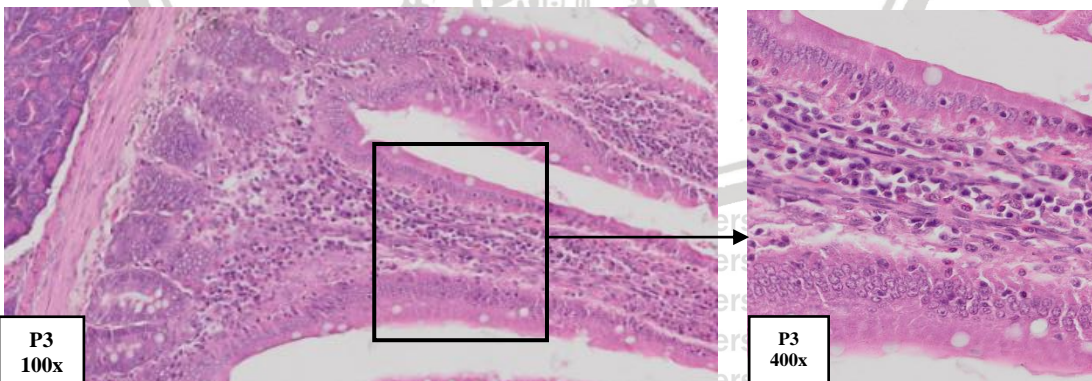
P2  
400x



**Gambar 5.4** Gambaran Histopatologi Duodenum pada Kelompok P2

- : Erosi pada epitel vili
- : Limfosit
- : Monosit

Gambaran histopatologi duodenum pada kelompok P2 yang diberi sinbiotik sebanyak 0.4%/10g pakan, terlihat kerusakan struktur duodenum jika dibandingkan dengan kelompok K-. Hal ini ditunjukkan dengan berkurangnya erosi pada epitel vili (**Gambar 5.5**). Namun, kerusakan yang terlihat jauh lebih berkurang jika dibandingkan dengan kelompok K+ dan P1. Sel-sel radang juga masih dapat terlihat pada jaringan.



**Gambar 5.5** Gambaran Histopatologi Duodenum pada Kelompok P3

Gambaran histopatologi duodenum pada kelompok P3 yang diberi sinbiotik sebanyak 0.6%/10g pakan, struktur lebih baik jika dibandingkan dengan kelompok K+ dan

kelompok perlakuan lainnya (**Gambar 5.6**). Hal ini dapat terlihat dengan tidak adanya erosi maupun ruptur yang terjadi pada epitel vili dan sel-sel pada vili juga terlihat tersusun rapi.

*Salmonella sp.* merupakan bakteri patogen yang memiliki kemampuan berkembang biak di dalam usus salah satunya, yaitu duodenum. Bakteri ini dapat melekat pada sel mukosa sehingga tidak mudah hilang bersama cairan. Selain itu, bakteri ini menghasilkan *enterotoxin* yang dapat merusak permeabilitas membran duodenum dan merusak sel epitel vili duodenum (Robbins, *et al.*, 2007).

Sel epitel atau Enterosit pada vili memiliki fungsi ketika terjadi proses pencernaan, yaitu dengan menyerap nutrisi dari makanan yang sedang dicerna. Kerusakan pada vili usus dapat berpengaruh pada penyerapan makanan. Vili yang rusak tidak akan bisa menyerap makanan dengan baik, akibatnya asupan nutrisi bagi individu akan berkurang dan kondisi kesehatan juga akan menurun. Sel goblet pada vili dapat menghasilkan mukus yang sangat berperan dalam membantu melindungi lapisan luar dari usus. Mukus mengandung beberapa substansi seperti imunoglobulin dan lisozym yang sangat penting untuk pertahanan penyakit (Schiller *and* Sellin, 2006).

Fermentasi MOS oleh *Lactobacillus acidophilus* di dalam usus akan menghasilkan asam lemak rantai pendek khususnya butirir yang dapat meningkatkan proliferasi vili usus, dengan meningkatnya asam lemak rantai pendek yang diinduksi oleh *Lactobacillus acidophilus* maka terjadi stimulasi perbanyak sel epitel usus dan akan terjadi peningkatan tinggi vili. Semakin tinggi vili maka permukaan absorpsi semakin luas sehingga proses penyerapan nutrisi akan semakin baik (Kusuma, dkk., 2012). Hasil pengamatan pada gambaran histopatologi duodenum menunjukkan bahwa kelompok perlakuan 3 yang diberi sinbiotik *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* dengan dosis 0.6%/10g pakan menunjukkan gambaran epitel duodenum yang paling baik

dan menyerupai normal ditandai dengan pengurangan erosi epitel vili jika dibandingkan dengan kelompok K+. Kemudian pada kelompok P2, yang diberi sinbiotik *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* dengan dosis 0.4%/10g pakan dan kelompok P1 yang diberi sinbiotik *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* dengan dosis 0.2%/10g pakan juga mengalami pengurangan erosi jika dibandingkan dengan kelompok K+.

Pengamatan histopatologi duodenum tikus yang telah dilakukan pemberian sinbiotik *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* pada kelompok perlakuan menunjukkan adanya pengurangan kerusakan pada epitel vili jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Kandungan MOS dari *Spirulina platensis* berfungsi sebagai makanan bagi *Lactobacillus acidophilus* sehingga terjadi peningkatan jumlah dari *Lactobacillus acidophilus*. *Lactobacillus acidophilus* yang meningkat akan mampu menghambat *Salmonella* berlekatan pada sel epitel duodenum dengan cara berkompetisi dengan *Salmonella*. *Lactobacillus acidophilus* akan menjadi kompetitor bagi *Salmonella* untuk melekatkan diri pada sel epitel duodenum sehingga *Salmonella* tidak mampu membentuk koloni pada duodenum dan akan mencegah terjadinya kerusakan (Djunaedi, 2007).

*Lactobacillus acidophilus* dapat menghasilkan berbagai substansi yang dapat menghambat pertumbuhan *Salmonella* di dalam saluran pencernaan. *Lactobacillus acidophilus* memfermentasi MOS dari *Spirulina platensis* dan menghasilkan asam laktat sehingga akan menyebabkan suasana duodenum menjadi asam, maka secara tidak langsung *Spirulina* tersebut dapat mencegah berkembangnya bakteri *Salmonella* melalui stimulasi *Lactobacillus acidophilus*. *Lactobacillus acidophilus* mempunyai efek pada ekskresi gen mucin yang akan menstimulasi produksi mukus dari mukosa duodenum sehingga fungsi barrier mukosa duodenum semakin meningkat (Gunawan, 2007).

Jadi, hasil pemberian sinbiotik *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* yang terbaik adalah pada kelompok P3 dengan dosis 0.6%/10g pakan pada gambaran epitel vili duodenum tikus putih yang diinfeksi *Salmonella sp.*



## BAB 6. PENUTUP

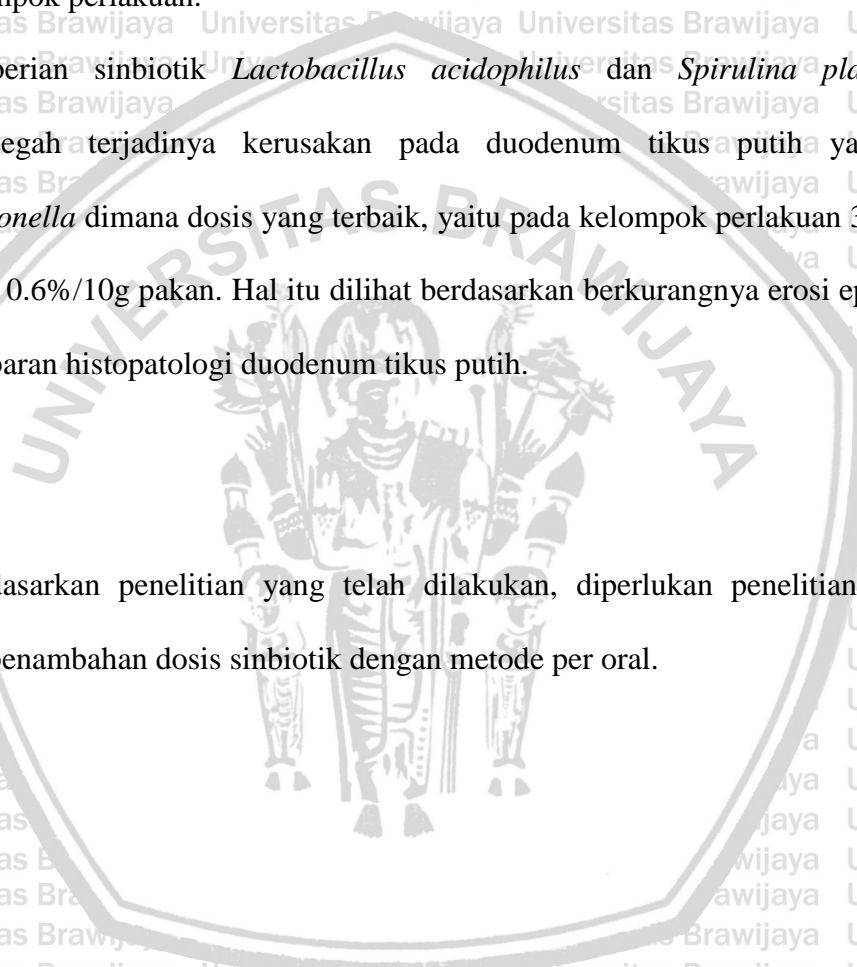
### 1.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa :

1. Pemberian sinbiotik *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* tidak menunjukkan adanya perubahan terhadap jumlah relatif TNF- $\alpha$  limpa tikus putih yang diinfeksi *Salmonella sp.*, baik pada kelompok kontrol negatif, positif maupun kelompok perlakuan.
2. Pemberian sinbiotik *Lactobacillus acidophilus* dan *Spirulina platensis* dapat mencegah terjadinya kerusakan pada duodenum tikus putih yang diinfeksi *Salmonella* dimana dosis yang terbaik, yaitu pada kelompok perlakuan 3 (P3) dengan dosis 0.6%/10g pakan. Hal itu dilihat berdasarkan berkurangnya erosi epitel vili pada gambaran histopatologi duodenum tikus putih.

### 1.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, diperlukan penelitian lebih lanjut tentang penambahan dosis sinbiotik dengan metode per oral.



## DAFTAR PUSTAKA

- Alisantoso, B., Shivaprasad, H.L., Dillon, A., Jack, O., Schaberg, D., and Bandhli, D. 2000. *Pathogenicity of Salmonella enteritidis Phage type 4, 8, and 23 in Specific Pathogen Free Chicken*. Avian Pathology 29:583-592.
- Arimbi, Ajik, A., Roesno, D., Hani, P., Thomas, V.W., dan Djoko, L., 2015. *Patologi Umum Veteriner*. Ed. 2. Airlangga University Press. Surabaya : 49-55.
- Ashaf, R., and Shah, N.P. 2011. Selective and Differential Enumerations of *Lactobacillus delbryeckii subsp. Bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium spp.* In Yogurt – A review. *Internasional Journal of Food Microbiology*. 149, 194-208.
- Baderuddin, 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.
- Bahri, D.I., Fanani, Z., dan Nugroho, B.A. 2008. Analisis Struktur Biaya dan Perbedaan Pendapatan Usaha Ternak Ayam Ras Pedaging pada Pola dan Skala Usaha Ternak yang Berbeda di Kota Kendari Provinsi Sulawesi Tenggara. *Jurnal Ternak Tropika*. Vol. 13, No. 1:35-46.
- Bhunia, A. 2008. *Foodborne Microbial Pathogens*. Springer. USA : 55-56.
- Brands, D. 2006. *Salmonella*. Chelsea House Publishers. United States of America: 356-357.
- Cesta, M.F. 2006. *Normal Structure, Function, and Histology of The Spleen*. Toxicol Pathol. 34:455-465.
- Darlina, Teja, K., dan Wiwin, M. 2012. *Proliferasi Limfosit Mencit yang Diimunisasi dengan Plasmodium berghei Radiasi 175 Gy*. Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi Radiasi-BATAN. Jakarta.
- Dharmojo. 2001. *Lima Belas Penyakit Menular dari Binatang ke Manusia*. Milenia Populer. Jakarta.
- Dimitroglou, A., Merrifield, D.L., Moate, R., Davies, S.J., Spring, P., Sweetman, J., Bradley, G. 2009. Dietary Manan Oligosaccharide Supplementation Modulates Intestinal Microbial Ecology and Improves gut Morphology of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Anim Sci*. 87(10): 3226-3234.
- Direktur Kesehatan Hewan. 2014. *Manual Penyakit Unggas*. Direktorat Kesehatan Hewan. Direktorat Bina Produksi Peternakan. Departemen Pertanian RI. Jakarta.
- Djunaedi, D. 2007. Pengaruh Probiotik pada Respon Imun. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, Vol. XXIII, No. 1. Malang.
- Dzen, S.M. 2003. *Bakteriologi Medical. Edisi I*. Bayumedia Publishing. Malang : 111-112
- Fooks, L.J., and Gibson, G.R. 2002. Probiotics as Modulators of the Gut Flora. *Br J. Nutr*, 88(1): 39-49.
- Gartner, L.P., and James, L. 2007. *Histology*. Elsevier Saunders. Singapore.
- Ghofar, A., Ogawa, S., and Kokugan, T. 2005. Production of L-lactic acid from fresh cassava roots slurried with tofu liquid waste by *Streptococcus bovis*. *J. Biosci Bioeng*. 100(6): 606-612.

- Gunawan, S. 2007. *Peran Probiotik pada Diare Akut*. Pediatric. Ebers Papyrus. 13(3): 113-23.
- Gupta, S., Garg, A.P., and Prakash, D. 2017. Prebiotic Efficiency of Blue Green Algae on Probiotics Microorganisms. *Journal of Microbiology and Experimentation*. 4(4): 1-4.
- Hamilton-Miller, J.M. 2003. The Role of Probiotics in the Treatment and Prevention of *Helicobacter pylori* Infection. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Vol. 22.
- Haryati, T. 2011. Probiotik dan prebiotik sebagai pakan imbuhan nonruminansia. *Wartazoa*, 2(3), 125 – 132.
- Hassan, Z.H. 2006. *Isolasi Lactobacillus, Bakteri Asam Laktat sebagai Probiotik Ruminansia Muda*. Fakultas Peternakan-Perikanan. Universitas Muhammadiyah, Malang.
- Henrikson, R. 2009. *Earth Food Spirulina*. Ronore Enterprises, Inc. Hawaii. 112-113.
- Hestianah, E.P., Anwar, C., Kuncorojakti, S., Yustinasari, L.R. 2013. *Histologi Veteriner*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. Vol. 1 : 133.
- Indariyah, E. 2013. Efek Penggunaan Sinbiotik terhadap Kondisi Mikroflora dan Histologi Usus Ayam Sentul Jantan. *Agripet*. Vol. 16, No. 2.
- Irmawati, I., dan Tjahjono, D.E. 2004. Pengaruh Jus Aloe Vera terhadap Proliferasi Limfosit, Produksi Reactive Oxygen Intermediate dan Koloni Kuman Organ Hepar Mencit Balb/C yang Diinfeksi Salmonella typhimurium. *Med Indonesia*. Jakarta.
- Janqueira, L.C., Carneiro, J., and Kalley, R.O. 2013. *Basic Histology Text Atlas, Ed. 13*. EGC. Jakarta.
- Jusuf, A.A. 2009. *Histoteknik Dasar*. Bagian Histologi Fakultas Kedokteran. Universitas Indonesia. Jakarta.
- Kerr, M.C., Wang, J.T.H., Castro, N.A., Hamilton, N.A., Town, L., Brown, D.L., Meunier, F.A., Brown, N.F. 2010. Inhibition of the PtdIns(5) kinase disrupts intracellular replication of *Salmonella*. *The EMBO Journal*, 29(8): 1331-1347
- Kilhamn, J., Lundin, S.B., Brevinge, H., Svennerholm, A.M., and Jertborn, M. 2003. *T- and B- Cell Immune Responses of Patients Who had Undergone Colectomies to Oral Administration of Salmonella enterica Serovar thypi Ty21a vaccine*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 10: 426-430.
- Kiswan. 2014. The Study of *Spirulina*. Effects on the AIDS Virus. Cancer and the Immune System. *Healthy & Natural Journal*. 2.
- Krinke, G.J. 2000. *The Laboratory Rat*. Academic Press. San Diego. 150-152.
- Kusriningrum, R.S. 2008. *Buku Ajar Perancangan Percobaan*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Kusuma, I. G. E., Arjana, A. A. G., dan Berata, I. K. 2012. Pemberian Effective Mikroorganism terhadap Gambaran Histopatologi Hati Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Betina. *Indonesia Medicus Veterinus*. 1(5): 582-595.
- Kusumaningsih, Ani. 2011. *Patogenitas Salmonella enterica Serotipe enteritidis Isolat Lokal pada Anak Ayam dan Mencit*. Balai Besar Penelitian Veteriner.
- Kusumawati, Netty. 2000. Peranan Bakteri Asam Laktat dalam Menghambat *Listeria monocytogenes* pada Bahan Pangan. *Jurnal Teknologi Pangan dan Gizi*, Vol. 1. No. 1.

Lehner, M.D. 2001. *Immunomodulation by Endotoxin Tolerance in Murine Models of Inflammation and Bacterial Infection (disertation)*. University of Konstanz.

Mas'ud, M.S., dan Parrakkasi, A. 2009. Performa Pertumbuhan Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diberi Ransum Berbagai Taraf Limbah Udang. *Agripet*, Vol 9. No. 2: 21-27.

Maynard, R.L., and Downes, N. 2019. *Anatomy and Histology of the Laboratory Rat in Toxicology and Biomedical Research*. Academic Press. USA.

Mescher, A.L. 2012. *Janqueira's Basic Histology 12<sup>th</sup> Edition*. McGraw-Hill Medical. New York.

Moat, G.A., and Richer, A.C. 2011. *Understanding the Antioxidant Controversy: Scrutinizing the 'Fountain of Youth'*. Greenwood Publishing Group. USA.

Monack, D.M., Bouley, D.M., Falkow, S. 2004. *Salmonella typhimurium* Persist within Macrophages in the Mesenteric Lymph Nodes of Chronically Infected Nramp1<sup>+/-</sup> Mice and Can be Reactivated by IFN $\gamma$  Neutralization. *JEM*, 199: 231-241.

Murwani, S. 2015. *Dasar-Dasar Mikrobiologi Veteriner*. UB Press. Malang.

Nzalak, J.O. 2010. *Anatomical and Histochemical Studies of the Digestive System of the African Giant Rat (Cricetomys-Waterhouse)*. Department of Veterinary Anatomy. Faculty of Veterinary Medicine, Ahmadu Bello University, Zaria.

Paola, A., Jones, J.L., Woods, J., Buukhardt, W., Calci, K.R., Krantz, J.A., Bowers, J.C., Kasturi, K., Byars, R.H., Jacobs, E., Williams H.D., and Nabe, K. 2010. Bacterial and Viral Pathogens in Live Oysters. *United States Market Survey. Appl Environ Microbiology*. 76 (9): 2754-2768.

Parry, C.M. 2006. *Epidemiological and Clinical Aspects of Human Typhoid Fever*. In : *Pietro Mastroeni, ed. Salmonella Infection : Clinical, Immunological, and Molecular Aspects*. Cambridge University Press. UK and New York.

Parslow, T.G., Stites, D.P., Terr, A.I., and Imboden, J.B. 2003. *Medical Immunology*. 10<sup>th</sup> ed. McGraw-Hill. Singapore.

Pato, U. 2003. Potensi Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi dari Dadih untuk Menurunkan Resiko Penyakit Kanker. *Jurnal Natur Indonesia*. 5 (2): 162-166.

Perry, R.T., Collins, J.S., Wiener, H., Acton, R., Go, R.C. 2002. The Role of TNF and its receptors. *Neurobiol Aging*. 22: 873-883.

Plebanski, M., and Proudfoot, O. 2002. Immunogenetics and the Design of *Plasmodium falciparum* Vaccines for Use in Malaria-Endemic Populations. *J. Clin Invest*, 110: 295-300.

Popa, B., Andrade, D. 2007. *Probiotics of Lactid Acid Bacteria : Current Advance in Metabolism*. CRC Press. Boca Raton. New York.

Prasetyo, A., Gelu, M.F.D., Yosefeta, R., Nugroho, D.A., dan Kurniasari, T. 2005. Pengaruh Pemberian Ekstrak *Pheretima aspergillum* Terhadap Perubahan Histopatologik Ileum, Hepar, Vesika Fellea, dan Lien pada Tikus Balb yang Diinfeksi *Salmonella typhimurium*. *M Med Indonesia*, 40: 36-44.

Purwaningtyas, D. 2009. Identifikasi Cemaran *Salmonella sp.* pada Ayam Potong dengan Metode Kuantifikasi di Tiga Pasar Tradisional dan Dua Pasar Modern di Kota Bandar



Lampung. *Jurnal Teknologi Industri & Hasil Pertanian*. Vol. 21, No.2. Bandar Lampung.

Puspawati, N.N., Lilis, N., dan Dede, R.A. 2010. Penggunaan Berbagai Jenis Bahan Pelindung untuk Mempertahankan Viabilitas Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi dari Air Susu Ibu pada Proses Pengeringan Baku. *J. Teknologi dan Industri Pangan*, Vol. XXI No. 1. Udayana.

Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J.C., and Maghire, D. 2002. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Blackwell Science Ltd. Australia.

Ramadhan, Prasetyo. 2008. *Mikroorganisme Patogen*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.

Robbins, S.L., Kumar, V., and Cotran, R.S. 2007. *Buku Ajar Patologi. Edisi 7*. Edior Bahasa Indonesia, Huriawati Hartanto, Nurwany Darmaniah, Nanda Wulandari. EGC. Jakarta.

Rolfe. 2000. The Role of Probiotic Cultures in the Control of Gastrointestinal Health. *Journal of Nutrition*. 130: 396-402.

Roller, M., Rechkemmer, G., and Watzl, B. 2003. Prebiotic Inulin Enriched with oligofructose in Combination with the Probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactics* Modulates Intestinal Immune Function in Rats. *Journal of Nutrition*. 154-156.

Rostini, I. 2007. *Peranan Bakteri Asam Laktat (Lactobacillus plantarum) Terhadap Masa Simpan Filet Nila Merah pada Suhu Rendah*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Padjajaran.

Schiller, R.L., and Sellin, H.J. 2006. Chronic Diarrhea: Definition, Classification, Diagnosis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 29:6-25. Shanghai.

Serna, C.L., and Vallejo, C.V. 2013. Probiotics Encapsulation. *Afr. J. Microbial*, 7: 4743-4753.

Smirnov, A., Perez, R. Amit-Romach, E., Sklan, D., Uni, Z. 2005. Mucin Dynamics and Microbial Populations in Chicken Small Intestine are Changed by Dietary Probiotic and Antibiotic Growth Promoter Supplementation. *J. Nutr*. 135:187-192.

Sudarmo, S.M. 2003. Peranan Probiotik dan Prebiotik dalam Upaya Pencegahan dan Pengobatan Diare pada Anak. Kongres Nasional II BKGAI. Bandung.

Suskovic, J. B., Kos, J., Goreta, and S. Matosic. 2001. Ruole of Lactic Acid Bacteria and *Bifidobacteria* in Synbiotic Effect. *Annu Rev Nutr*, 39, 227-235.

Sudha, S.S., Karthic, J. Rengaramanujam, and Athulya. 2011. Antimicrobial activity of *Spirulina Platensis* and *Aphanothece sp.* on Selected Clinical Bacteria Isolates and its Antioxidant activity. *South As. J. Bio. Sci.* 1 (2) : 87-98.

Suskovic, M., and Pokrotnieks, J. 2001. *Probiotics as Functional Food : Microbiological and Medical Aspects*. Acta Universitatis Latviensis, Vol. 710 : 117-129.

Suwandono, A.M., Destri, dan Simanjutak, C. 2005. *Salmonellosis dan Surveillans Demam Tifoid yang Disebabkan Salmonella di Jakarta Utara*. Lokakarya Jejaring Intelijen Pangan - BPOM RI. Jakarta.

Wilson, J.W. 2002. *Microarray Identifies Salmonella Genes Belonging to the Low-Shear Modeled Microgravity Regulon*. PNAS, 99: 13807-12.

Winson, M.K., and Davey, H.M. 2000. *Flow Cytometric Analysis of Microorganisms*.  
Institute of Biological Sciences. University of Wales, Aberystwyth, United Kingdom.

