

PUTRI SALSABILA 16820022

by Yos Adi Prakoso

Submission date: 08-Aug-2020 07:13AM (UTC+0300)

Submission ID: 1366888883

File name: PUTRI_SALSABILA_16820022.docx (132.8K)

Word count: 6823

Character count: 43747

PEMERIKSAAN TITER MDA (*Malondialdehyde*) DAN TITER GPx (*Glutathione Peroxidase*) PADA AYAM WHITE LEGHORN JANTAN YANG DIBERIKAN PROBIOTIK *Bacillus subtilis* PERORAL

Putri Salsabila

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui titer Mda (*Malondialdehyde*) dan titer Gpx (*Glutathione Peroxidase*) pada ayam *white leghorn* jantan yang diberikan probiotik *Bacillus Subtilis* peroral. 24 sampel yang digunakan pada penelitian ini dan dibagi menjadi 6 ulangan dan 4 kelompok. 6 ekor ayam jantan *white leghorn* sebagai kelompok kontrol positif (P0) tanpa diberikan probiotik *Bacillus subtilis*, Kelompok Pertama (P1) terdiri dari 6 ekor ayam *white leghorn* jantan yang diberikan probiotik *Bacillus subtilis* 1×10^{-6} CFU secara per oral, Kelompok Kedua (P2) terdiri dari 6 ekor ayam *white leghorn* jantan yang diberikan probiotik *Bacillus subtilis* 1×10^{-7} CFU secara per oral, Kelompok Ketiga (P3) terdiri dari 6 ekor ayam *white leghorn* jantan yang diberikan probiotik *Bacillus subtilis* 1×10^{-8} CFU secara per oral.

Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah *Malondialdehyde* dan *Glutathione Peroxidase*. Hasil : Berdasarkan hasil analisis sidik ragam titer MDA kelompok P2 Berbeda nyata dengan kelompok P0,P1 dan P3 P0 ($P < 0,05$). Serta nilai optical density GPx pada kelompok P3, P2, P1 berbeda nyata dengan P0 ($P < 0,05$).

Kata Kunci : *Bacillus subtilis*, Malondialdehyde, Glutathione peroksidase.

**MDA (Malondialdehyde) And GPx (Glutathione Peroxidase) TITER
EXAMINATION IN CHILDREN WHITE LEGHORN CHILDREN
PROVIDED BY PROBIOTIC *Bacillus subtilis* PERORAL**

Putri Salsabila

ABSTRACT

This research aims to determine the Mda (Malondialdehyde) titer and Gpx (Glutathione Peroxidase) titer in male white leghorn chicken given probiotics *Bacillus Subtilis* peroral. The 24 samples were used in this study and divided into 6 replications and 4 groups. 6 white leghorn roosters as a positive control group (P0) without the *Bacillus subtilis* probiotic. The First Group (P1) consisted of 6 male white leghorn chickens given probiotics *Bacillus subtilis* 1×10^{-6} CFU on a per oral, Second Group (P2) consisted of 6 male white leghorn chickens given probiotics *Bacillus subtilis* 1×10^{-7} CFU orally, Third Group (P3) consisted of 6 male white leghorn chickens given probiotics *Bacillus subtilis* 1×10^{-8} CFU orally.

The parameters observed in this study were Malondialdehyde and Glutathione Peroxidase. Results: Based on the analysis of MDA titer variance in P2 group, it was significantly different from P0, P1 and P3 P0 groups ($P < 0.05$). And optical density GPx values in groups P3, P2, P1 were significantly different from P0 ($P < 0.05$).

Keywords: *Bacillus subtilis*, Malondialdehyde, Glutathione peroxidase.

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia termasuk negara yang mengonsumsi daging relatif tinggi, terutama pada ayam pedaging. Bahkan (Henchion *et al.*, 2017) menyatakan bahwa ayam akan menjadi hewan yang paling banyak dikonsumsi di dunia. Selain untuk dikonsumsi keluarga, makin banyaknya jajanan dan kuliner yang berbahan dasar daging ayam membuat permintaan ayam melonjak tinggi. Melonjaknya permintaan daging ayam ini juga akan menyebabkan kelangkaan bahan baku pakan yang terjadi secara terus menerus dengan begitu konsekuensinya kenaikan harga pakan ternak pasti terjadi.

Dengan kasus inilah yang akan membuat para peternak ayam meningkatkan produktifitasnya. Salah satunya dengan memodifikasi pakan ternak dengan dimasukkannya mikroba melalui pangan atau yang biasa kita kenal dengan probiotik. Dalam penambahan probiotik ini menjadi strategi layak yang akan berkontribusi pada pengurangan biaya pakan. Dengan adanya probiotik ini juga sekaligus menjawab masalah yang telah beredar di masyarakat berkaitan dengan tekanan peraturan dan konsumen terhadap peternak untuk mengurangi penggunaan antibiotik karena kekhawatiran resistensi antimikroba (Upadhaya *et al.*, 2019). Diproduksinya peptida antimikroba disintesis secara alami oleh tubuh, modulasi dari flora usus

untuk meningkatkan mikrobiota yang bermanfaat bagi saluran pencernaan, dan perubahan dari berbagai indeks imunologi dan morfologi usus adalah manfaat utama dari Probiotik (Grant *et al.*, 2018).

Anggota genus *Bacillus* diketahui menghasilkan sejumlah senyawa antimikroba termasuk lipopeptida, surfaktan, bakteriosin, dan penghambatan seperti zat bakteriosin. Agen antimikroba ini biasanya aktif melawan bakteri patogen Gram-positif, tetapi beberapa menunjukkan aktivitas melawan bakteri Gram-negatif patogen serta jamur patogen (Teo dan Tan, 2005; Khochamit *et al.*, 2015).

Bacillus subtilis telah ditandai sebagai probiotik yang mempunyai kemampuan membentuk spora yang kuat, pembentukan spora memungkinkan pertahanan tubuh bakteri untuk mentolerir berbagai kondisi lingkungan seperti bahan kimia, panas, dan radiasi UV. Hal ini membuatnya menarik dalam skala industri untuk meningkatkan daya simpan. Suplementasi *Bacillus subtilis* dalam diet pengurangan energi broiler telah terbukti memiliki kinerja pertumbuhan yang sebanding dengan diet standar kontrol (Harrington *et al.*, 2016). Telah disarankan bahwa penambahan pada pakan akan lebih efisien saat pakan mengandung titer gizi rendah (Dilworth and Day, 1978; Mikulec *et al.*, 1999; Upadhaya *et al.*, 2019).

Ayam rentan terhadap penyakit dalam kondisi lingkungan, asupan nutrisi tidak mencukupi untuk memenuhi kebutuhan metabolisme adalah salah satu penyebab stres paling umum dalam produksi unggas. Stres gizi

seperti stres lainnya seperti tekanan suhu, lingkungan yang tinggi, kelembaban relatif tinggi, dan imunologis menyebabkan stres oksidatif. Di samping dampak langsungnya pada aktivitas metabolisme tubuh, dapat menyebabkan gangguan pada mikroekologi usus, kekebalan usus, dan integritas penghalang. Gangguan ini, dilaporkan, menyebabkan *dysbiosis* dan gangguan pada pencernaan dan pemanfaatan nutrisi dalam usus (Song *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2016).

Probiotik dapat menimbulkan inflamasi (Remus *et al.*, 2014) dan stres oksidatif yang dapat merusak sel (Elgaml dan Hashish, 2014) Glutathione Peroxidase (GPx) sebagai antioksidan endogen yang berperan dalam banyak penyakit, diantaranya termasuk berbagai penyakit radang usus (Moreno and Trapero, 2012).

Disetiap hewan memiliki respon tubuh terhadap penyakit yang berbeda-beda. Dalam penelitian ini menggunakan bakteri baik *Bacillus subtilis* yang diberikan pada ayam *white leghorn* jantan secara peroral bertujuan untuk mengetahui *malondialdehyde* (tingkat stres oksidatif yang akan ditimbulkan) dan GPx (Aktivitas antioksidan Glutathione peroxidase) karena pemberian *Bacillus subtilis*.

26

1.2 Rumusan Masalah

Penelitian ini memiliki rumusan masalah sebagai berikut apakah terdapat peningkatan Titer Mda (*Malondialdehyde*) dan Titer GPx

(*Glutathione Peroxidase*) pada Ayam *White Leghorn* Jantan yang Diberikan Probiotik *Bacillus Subtilis* Peroral.

25

1.3 Tujuan Penelitian

Sesuai yang di atas rumusan masalah dan latar belakang , maka tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui Titer Mda (*Malondialdehyde*) dan Titer GPx (*Glutathione Peroxidase*) pada Ayam *White Leghorn* Jantan yang Diberikan Probiotik *Bacillus Subtilis* Peroral.

1.4 Hipotesis

H-0 : Pengaruh tidak terdapat pada pemberian Probiotik *Bacillus subtilis* terhadap Titer MDA (*Malondialdehyde*) dan Titer GPx (*Glutathione Peroxidase*) pada ayam *white leghorn* jantan.

H-1 : Terdapat pengaruh pemberian Probiotik *Bacillus subtilis* terhadap Titer MDA (*Malondialdehyde*) dan Titer GPx (*Glutathione Peroxidase*) pada ayam *white leghorn* jantan.

2

1.5 Manfaat Hasil Penelitian

Diharapkan dari penelitian ini dapat memberikan informasi kepada masyarakat tentang pemeriksaan Titer Mda (*Malondialdehyde*) dan Titer GPx (*Glutathione Peroxidase*) pada Ayam *White Leghorn* Jantan yang Diberikan Probiotik *Bacillus Subtilis* Peroral dan dapat memberikan informasi untuk penelitian selanjutnya.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis adalah bakteri bersifat gram +, yang berbentuk *basil* atau berbentuk batang (Amadi and Moneke, 2012) ditemukan berfilamen kadang juga tebal., biasanya berbentuk rantai atau terpisah. Bakteri memiliki motilitas kadang juga tidak, *Bacillus subtilis* dapat membentuk spora berbentuk bulat ataupun oval. Pada rentang suhu 45°C-55°C *bacillus subtilis* dapat tumbuh dan mempunyai pertumbuhan suhu optimum pada suhu 60°C-80°C (Atlas, 2004; Lestari, 2017).

Secara alami bakteri ini sering ditemukan di tanah dan udara. *Bacillus subtilis* juga telah berevolusi sehingga bisa hidup meskipun di bawah kondisi keras dan lebih cepat mendapatkan perlindungan terhadap stres, situasi seperti pH rendah (asam), panas atau etanol, alkali dan osmosa. Molekul DNA hanya satu yang dimiliki bakteri ini yang berisi seperangkat set kromosom (Kang, J. H, Y. Hwang and O.J. Yoo. 1991; Lestari, 2017).

Sekitar dari 4.100 gen dari jumlah itu terdapat 192 macam yang ditampilkan yang dimiliki *bacillus*. Pra pembentukan spora pada bakteri ini akan mendapatkan transfer DNA dari lingkungan (Radji dan M.Biomed, 2011).

2.1.1 Klasifikasi

Gambar 1. *Bacillus subtilis* (Putra dan Kosim, 2010).

Bacillus subtilis, klasifikasi menurut (Putra dan Kosim, 2010) sebagai berikut :

Memiliki ²⁸ Kingdom : Bacteria, Phylum : Firmicutes, masuk dalam Class : Bacilli dengan Ordo : Bacillales, dan juga Family : Bacillaceae, Genus : Bacillus, dan termasuk Spesies : *Bacillus subtilis*.

2.1.2 Morfologi

2.1.2.1 Koloni Bakteri

Dapat ditumbuhkannya bakteri didalam suatu medium agar berupa koloni. Koloni dari bakteri merupakan sekumpulan dari beberapa sel bakteri baik dari 1 jenis bakteri ataupun dari jenis bakteri lain, bisa dilihat dengan penginderaan mata. Koloni dalam sel adalah ⁵ sama dan mengatakan semua sel adalah keturunan dari satu mikroorganisme dan karena mereka mewakili sebagai kultur murni. Koloni bakteri dapat membulat menjadi pleomorphic dengan permukaan yang cekung, cembung atau rata dan ⁹ tepi koloni rata atau bergelombang, dll. Koloni bakteri pada media agar-agar mempunyai bentuk dan ukuran morfologi yang khas untuk setiap jenis bakteri, ⁵ dilihat dari bentuk penampakan, tepi dan permukaan koloni secara

keseluruhan. Ada bakteri yang mirip dengan benang (filamen), menyebar, seperti akar dan sedang miring ke dalam tumbukan (Lud Waluyo, 2007; Lestari, 2017).

2.1.2.2 Bentuk dan ukuran sel bakteri

Berbagai bentuk, ukuran berkisar dari 0,4 hingga 2,0 μm . Sel bakteri terlihat di bawah mikroskop cahaya, bisa berbentuk bulat (coccus) batang (bacillus) dan spiral. Bentuk sel coccus ada sebagai sel bulat tunggal, berpasangan yang biasanya disebut (diplococcus) dalam rantai (streptococcus) atau tergantung pada area pembelahan, seperti anggur (staphylococcus). Bentuk sel batang biasanya bervariasi, mulai dari tangkai hingga panjang batang yang melebihi beberapa kali diameternya.

Pada bagian ujung bisa terdapat bagian bakteri yang berbentuk seperti batang atau melingkar mirip *salmonella* atau mirip *B.anthraxis*. Berbentuk batang menyerupai engan untaian benang yang panjang tidak dapat menjadi sel tunggal diketahui sebagai filamen. Bentuk batang fusiform, meruncing di kedua ujungnya ditemukan pada beberapa bakteri di rongga mulut dan di lambung. Bakteri batang melengkung dapat berkisar dari kecil, berbentuk koma, atau sedikit berulir dengan satu kurva, contohnya seperti *Vibrio cholerae*, hingga bentuk spiroket yang panjang, seperti *Borrelia*, *Treponema* dan

Leptospira yang memiliki banyak benang. (Laleye *et al.*, 2007; Lestari, 2017).

2.1.2.3 ⁶ Struktur Sel Bakteri

Sel bakteri sebagian besar memiliki lapisan pembungkus sel, berupa membran plasma yang dinding selnya mengandung protein dan polisakarida. Beberapa dari bakteri bisa membentuk kapsul dan lendir, ada juga flagella dan vili. Dinding selnya merupakan struktur yang kaku berfungsi sebagai pembungkus dan melindungi protoplasma dari kerusakan akibat faktor fisik dan menjadi berpengaruh dilingkungan luar seperti kondisi tekanan osmotik yang rendah. Protoplasma terdiri dari membran sitoplasma beserta komponen-komponen seluler yang ada di dalamnya. Struktur dinding sel dapat digunakan untuk menentukan perbedaan tipe sel bakteri seperti gram ⁵ negatif dan ⁵ positif. Ada beberapa jenis bakteri yang dapat membentuk endospora sebagai pertahanan ketika lingkungan tidak cocok untuk pertumbuhan mereka. (Laleye *et al.*, 2007; Lestari, 2017).

2.1.3 Manfaat *Bacillus subtilis*

⁷ *Bacillus* genus memiliki sifat fisiologis yang menarik karena pada setiap jenis mempunyai kemampuan berbeda-beda, diantaranya adalah

: mampu mendegradasikan senyawa organik seperti protein, selulosa, pati, dan hidrokarbon agar dapat menghasilkan antibiotik, yang berperan dalam nitrifikasi dan denitrifikasi. Bersifat khemolitotrof, asidofilik, atau termofilik (Buckle, 1985; Afrotum, 2018).

Keunggulan dari Bakteri *Bacillus subtilis* ini yaitu dapat mensekresikan antibiotik dalam jumlah besar ke luar sel (Amadi and Moneke, 2012) bersifat bakteriasid (membunuh bakteri) contohnya seperti gentamisin, penisilin dan juga basitrasin. Bersifat bakteriostatik (menghambat perkembangan bakteri) contohnya seperti trimetrofin, sulfonamide, dan tetrasiklin (KangHwang and Yoo, 1991; Lestari, 2017).

Bacillus subtilis juga melemahkan peradangan pada usus (indeks enteritis) yang diukur dengan histopatologi dampak negatif dari stimulasi sistem kekebalan tubuh pada pencernaan dan pertumbuhan kinerja telah dibuktikan dalam beberapa penelitian (Sokale *et al.*, 2019). Selanjutnya, respons ini terhadap peradangan atau kekebalan tubuh aktivasi menghasilkan dampak yang signifikan pada asupan pakan (Remus *et al.*, 2014). BWG atau pertambahan berat badan (Rochell *et al.*, 2016). *Bacillus sp* memberikan dampak positif kepada ayam ialah pertumbuhan, produksi telur dan juga efisiensi penggunaan pakan (Farida dkk., 2015).

2.2 Probiotik

Bakteri probiotik adalah bakteri yang masih hidup dan dapat ¹ dikonsumsi oleh hewan dan manusia serta menimbulkan efek kesehatan bagi inangnya (Farida dkk., 2015). Probiotik dapat ¹ diartikan sebagai suplemen makanan yang mengandung mikroba hidup (direct feed microbial) baik bakteri, khamir dan kapang bertujuan keseimbangan dalam mikroba dalam usus (Sumarsih, 2012). Probiotik banyak digunakan sebagai alternatif penggunaan sebagai pengganti konsumsi yang berlebihan atau tidak mengurangi dosis yang digunakan. Penggunaan antibiotik secara terus menerus dalam pakan akan meninggalkan residu pada produk ternak dan meningkatkan daya tahan bakteri patogen terhadap antibiotik. Probiotik yang efektif dapat memiliki kriteria di antara kriteria antara lain: memberikan efek yang menguntungkan, tidak menimbulkan penyakit dan tidak menimbulkan racun, mengandung lebih dari 10⁶ sel hidup, dapat bertahan hidup dan dapat ¹ melakukan aktivitas metabolisme di saluran pencernaan, tetap hidup selama waktu penyimpanan dan tidak dapat terjadi dengan adanya probiotik baru. Memiliki efek menguntungkan antara lain mengurangi kemampuan mikroorganisme patogen dalam menghasilkan racun, merangsang enzim pencernaan dan dapat menghasilkan vitamin, zat antimikroba, juga ¹ dapat mengurangi tekanan negatif yang dapat terjadi akibat hambatan pakan berupa pakan anti gizi karena probiotik dapat merangsang peningkatan ketersediaan nutrisi dari inang..

Probiotik menurut Fuller (2001) dalam Sumarsih (2012) memiliki mekanisme yakni : 1. Dapat menempel dan melekat serta menjajah saluran

pencernaan. Probiotik mampu untuk bertahan hidup pada sel usus sesuatu yang diharapkan. Ini adalah hal ⁴ tahap pertama untuk berkolonisasi, dan selanjutnya dapat dimodifikasi untuk sistem kekebalan atau imun pada hewan. Kemampuan melekat yang kuat pada sel-sel usus ini dapat menyebabkan mikroba probiotik berkembang dengan baik dan pada mikroba patogen akan keluar ter-reduksi dari sel usus hewan inang, sehingga perkembangan organisme patogen yang menyebabkan penyakit contohnya seperti *Eshricia coli*, *Slmnlla thyphimurium* dalam saluran pencernaan akan mengalami hambatan. (McNaught dan MacFie, 2000; Sumarsih dkk., 2012).

2. Probiotik menghambat organisme patogen dengan bersaing memperebutkan bahan makanan dalam jumlah terbatas untuk fermentasi. Substrat adalah bahan makanan yang dibutuhkan ¹ mikroba probiotik untuk berkembang dengan baik. Substrat makanan yang mendukung perkembangan mikroba probiotik di saluran pencernaan disebut "prebiotik". Prebiotik ini terdiri dari bahan makanan pada umumnya yang banyak mengandung serat. Beberapa probiotik dapat menghasilkan senyawa atau zat yang dibutuhkan dalam proses pencernaan, substrat untuk makanan ini adalah enzim enzim. ⁴ Spesies *Lactobacillus* menghasilkan enzim selulase yang dapat membantu proses pencernaan. Enzim selulase dapat memecah beberapa komponen serat kasar yang merupakan komponen yang sulit dicerna di saluran pencernaan, termasuk pada unggas. Dan sebagian besar penggunaan pakan ternak (feed) unggas berasal dari limbah industri atau

limbah pertanian yang biasanya mengandung serat kasar yang tinggi. Keunggulan lainnya adalah dapat membantu proses pencernaan sehingga serat dapat memanfaatkan pertumbuhan jaringan dan menambah berat badan. (McNaught dan MacFie, 2000; Sumarsih dkk., 2012).

3. Meningkatkan sistem imun pada hewan inang.

Mikroorganisme probiotik ini dapat masuk ke dalam komponen aspek sistem imun inang. Kemampuan mikroba probiotik tersebut dapat mengeluarkan racun yang mengurangi atau menghambat perkembangan mikroba patogen di saluran pencernaan. Racun yang dihasilkan merupakan antibiotik untuk mikroba patogen, dapat meredakan penyakit yang disebabkan oleh mikroba patogen bahkan dapat sembuh dengan sendirinya sehingga inang mampu menahan serangan penyakit.. (Yeo dan Kim, 1997; Sumarsih dkk., 2012).

2.2.1 Manfaat Probiotik

Manfaat probiotik antara lain hipokolesterolemia, ialah menurunkan konsentrasi kolesterol serum darah hewan maupun manusia serta dapat mempengaruhi sistem kekebalan tubuh. Keunggulan lainnya ialah kemampuannya menghasilkan senyawa antimikroba yang dapat membunuh atau menghambat perkembangan bakteri patogen. Efektivitas antimikroba probiotik tergantung pada strainnya (Farida dkk., 2015).

Selain hal-hal di atas, probiotik dapat mengubah pergerakan populasi mikroba yang terjadi di usus halus ayam, sehingga dapat meningkatkan fungsi dan kesehatan usus, meningkatkan mikroflora di sekum, serta

meningkatkan penyerapan nutrisi (Mountzouris *et al.*, 2010). Di dalam usus atau saluran pencernaan probiotik dapat menekan bakteri patogen jadi adanya mereka membantu perkembangan bakteri baik yang dapat membantu penyerapan zat makanan. (KOMPIANG *et al.*, 2002; Kadir, 2016).

Bakteriosin diproduksi untuk melawan patogen. Probiotik dapat memproduksi asam laktat, asam asetat, hidrogen peroksida, laktoperoksidase, lipopolisakarida, dan beberapa antimikroba lainnya, menghasilkan sejumlah nutrisi penting dalam sistem kekebalan dan metabolisme tubuh, seperti vitamin B (asam pantotenat), piridoksin, niasin, asam folat, cobalamin, biotin, dan antioksidan penting seperti vitamin K (Kadir, 2016). Telah dilaporkan dapat meningkatkan selera makan dan memproduksi vitamin tubuh, enzim dalam sistem pencernaan. Dapat menambah berat badan serta bobot karkas pada ayam (Abrar dan Raudhati, 2006; Kadir, 2016). Pada unggas telah dilaporkan mampu menurunkan titer kolesterol (Depson, 2012) sebagai penambah pertumbuhan, meningkatkan konversi pakan, mengontrol kesehatan atau mencegah mikroba patogen pada unggas muda (Purwadaria *et al.*, 2003; Kadir, 2016).

2.2.2 Jenis-Jenis Probiotik

2.2.2.1 *Pediococcus*

Terlihat dari namanya mikroba ini berbentuk *Coccus*, bergram positif, tidak dapat membentuk spora, non motil (tdk bergerak) dan masuk dalam

golongan bakteri asam laktat, karena produk akhir dari metabolisemenya (Osmanagaoglu *et al.*, 2011). Sel bakteri ini dibagi menjadi dua bidang membentuk pasangan, yaitu tetrad 23, atau rumpun sel bola yang lebih besar. Genus bakteri ini termasuk dalam kelompok anaerob fakultatif dan untuk kehidupannya membutuhkan lingkungan yang mengandung zat hara dan mengandung faktor pertumbuhan seperti gula yang mampu difermentasi. Bakteri ini bersifat homofermentatif (Cuma membentuk asam laktat) & tidak bisa memakai pentosa (karbohidrat dengan berat C5) (Victoria *et al.*, 2008; Astuti, 2018).

2.2.2.2 *Lactobacillus sp*

Termasuk dalam kelompoknya, genus bakteri asam terbanyak ditemukan di saluran pencernaan, baik manusia maupun hewan. Dapat mencapai 10⁶-10⁷ sel / g dibandingkan dengan usus besar yang terlihat antara 10¹⁰-10¹¹ sel / g. Sebagian besar bakteri ini telah diisolasi dari saluran usus kecil manusia dan hewan. Beberapa contoh termasuk *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus casei* dan *Lactobacillus fermentum*. (Astuti, 2018).

Probiotik *Lactobacillus* bisa membagikan manfaat terhadap hewan inang yakni menumbuhkan selera makan, meningkatkan kesetimbangan mikroba dalam usus, mensintesis vitamin dan menstimulasi sistem kekebalan tubuh. Selainnya *Lactobacillus* dpt menghasilkan enzim-enzim pencernaan seperti laktase yang digunakan karbohidrat yang tidak tercerna,

menstimulasi produksi asam laktat dan juga asam lipid volatil serta menghasilkan senyawa antibakterial khusus yakni Hidrogen peroksida (Astuti, 2018).

Lactobacillus, memproduksi enzim selulase mendukung proses pencernaan. Selulase bisa memecah komponen yakni serat kasar melambangkan komponen yang sulit dicerna di saluran pencernaan unggas. Karena saat ini banyak yang memanfaatkan atau memanfaatkan pakan ternak yang diperoleh dari limbah industri dan juga limbah pertanian untuk dijadikan pakan yang mengandung serat tinggi. Contohnya adalah: *Lactobacillus acidophilus* dan menghasilkan dua komponen Bacteriocin yakni Bacteriocin lctacin B dan Acidolin. Bacteriocin lactacin B dan Acidolin bertugas menunda pertumbuhan mikroorganisme patogen (McNaught dan MacFie, 2000; Astuti, 2018).

2.2.2.3 ¹ *Bacillus sp*

Bakteri *Bacillus* salah satu mikrobial flora normal bertempat di saluran pencernaan ayam (Green *et al.*, 2006; Astuti, 2018). Memiliki ciri organisme antara lain saprofit, 25 batang, gram positif berupa spora non patogen terdapat di udara, debu, tanah dan sedimen. Beberapa bersifat saprofit pada tanah, udara, dan tumbuhan, misalnya seperti *Bacillus cereus* dan *Bacillus subtilis* (Jawetz dan Adelberg's 2005; Astuti, 2018). *Bacillus* dapat melepaskan bakteri lain dengan antibiotik yang disekresikan, persaingan nutrisi atau parasitisme langsung. ¹ Bakteri ini memiliki siklus

hidup yang kompleks yaitu sporulasi, dormansi, perkecambahan spora, sel induk $0,3-2,2 \times 1,2-7,0 \mu\text{m}$ dan memiliki flagela peritricus. (Pelczar dan Chan, 1998; Astuti, 2018).

2.3 ¹ Asam Laktat

Bakteri asam laktat biasa disebut (BAL) ialah Gram positif berbentuk batang atau bulat, tidak bisa membuat spora, fermentasi anaerob fakultatif, tidak memiliki sitokrom, tidak memiliki kemampuan mereduksi nitrat dan memanfaatkan laktat, oksidasi negatif, katalase negatif adalah, motilitas negatif dan kemahiran dalam memfermentasi gula menjadi asam laktat. Bersumber pd taksonomi, terdapat sekitar 20 genus bakteri tergolong bakteri asam laktat. Contoh beberapa bakteri asam laktat yang sering digunakan dalam pengolahan pangan adalah *Aerococcus*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, dan *Weissella* (Carr *et al.*, 2002; Astuti, 2018).

Keahlian bakteri asam laktat ialah memecah senyawa kompleks sebagai senyawa sederhana untuk menghasilkan asam laktat. Properti ini penting dalam pembuatan produk fermentasi salah satunya silase. Hasil asam berdampak pada perkembangan mikroba lain yang diharapkan akan dihambat (Sumarsih, 2012). *Salmonella* dan *Staphylococcus aureus* adalah bakteri termuat pada suatu bahan yang dihalangi jika terdapat bakteri asam laktat di dalam bahan tersebut (Rahayu *et al.*, 2004; Sumarsih, 2012).

Bakteri asam laktat tidak dapat disimpan dan bertahan selama proses dan disimpan, mempunyai ¹ efek antagonis pada bakteri patogen, tahan mengenai asam lambung, getah pankreas dan empedu serta dapat digunakan untuk melindungi epitel inang. Genus bakteri yang digolongkan dalam bakteri asam laktat contohnya ialah *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium* yang memiliki keunggulan untuk digunakan sebagai probiotik (Nettles dan Barefoot, 1993; Astuti, 2018).

2.4 Non Asam Laktat

Bakteri sedang digunakan sebagai suplemen probiotik untuk digunakan dalam pakan ternak, untuk suplemen makanan manusia dan juga dalam obat yang terdaftar. Stabilitas panas dan kemampuan mereka untuk bertahan dari penghalang lambung membuat mereka menarik sebagai makanan aditif dan penggunaan ini sekarang sedang dilakukan (D. Rashmi and Sharmila T, 2017). Probiotik ditambahkan dalam proses pembuatan keju (Steele *et al.*, 2006; Oberg *et al.*, 2011). Untuk pembuatan keju, Bakteri asam laktat ditambahkan ke susu pasteurisasi sebagai starter fermentasi laktat. Bakteri starter membentuk yang dominan spesies keju pada periode pematangan awal, tetapi bakteri non asam laktat secara bertahap meningkat selama pematangan keju (Settanni dan Moschetti, 2010). Telah disarankan bahwa bakteri non asam laktat berkaitan dengan pematangan keju (Lynch *et al.*, 1996; Solieri *et al.*, 2012).

Brevibacterium sp, *Lactobacillus sp*. dan *Leuconostoc sp*. dianggap sebagai bakteri non asam laktat potensial (Saiki *et al.*, 2017).

2.5 Saluran Imun Pencernaan

Ayam memiliki sistem ² pencernaan dan aksesoris organ. Saluran pencernaan merupakan organ yang menghubungkan antara bagian luar tubuh dan tubuh, yaitu proses metabolisme di dalam tubuh. Saluran pencernaan ayam yaitu mulut, esphaguuus, crop, proventiculus, gizzard, duodnum, usus halus, ceca, rectum, kloaka dan ven. Organ aksesoris adalah pankreas dan hati. Paruhnya berfungsi mematuk dan membawa makanan ke mulut. Lidah memiliki bentuk yang tajam, memiliki lidah yang dapat menjulur untuk mendorong makanan ke dalam kerongkongan yang membantunya kelenjar ludah (Suprijatna dkk., 2005; Nurillah, 2011).

Pharynx yaitu lanjutan dari rongga mulut, disini ada lubang dan saluran yang menghubungkan ke telinga. Ruang tersebut akan mempersempit istilah kerucut, yaitu laring. Bagian belakang pharynx ialah awal dari organ yang disebut esophagus, yang merupakan tabung yang mengalir di sepanjang saluran leher. Tembolok merupakan terminal selagi makanan untuk dihaluskan agar mudah masuk ke lambung, di dalam tembolok tidak ada proses pencernaan, selainnya pencampuran sekresi saliva dari mulut yang aktivitasnya berlanjut di tembolok (Murtidjo, 2006; Nurillah, 2011).

Proventikulus ialah perenggangan kerongkongan awal mula bersinggungan dengan ampela (gizzard), kemudian dibuat getah lambung

(gastric juice). Enzim pepsin membantu mencerna protein dan hydrochloriz acid yang disekresikan dari sel kelenjar. Sebuah ampela disebut jg otot perut (muscular stomach) dan ditempatkan di antara ventrikel dan dibagian atas usus kecil. Gizzard ¹³ memiliki dua pasang otot begitu kuat sehingga ayam dapat menggunakan energi yang kuat. Umumnya ampela bisa menggiling grid, kerikil, dan kerang sebagai membuat proses Systema digestorium (Suprijatna, 2005; Nurillah, 2011).

¹³ Usus halus merupakan organ utama pencernaan dan penyerapan produk pencernaan pada ayam. Sebagian enzim berada di saluran pencernaan bisa berperan memperlaju dan menginfeksi pengelolaan ² karbohidrat, protein, dan lemak untuk memperlancar proses penyerapan. Ceca atau usus buntu memiliki tempat diantara small intestine dan kolon ² terdapat 2 kantong yaitu ceca (usus buntu) normal panjangnya setiap ceca adalah 6 inci sampai 15 cm (Suprijatna, 2005; Nurillah, 2011).

Menurut Murtidjo (2006) dalam Nurillah (2011) menyebutkan jika kolon tempat memuat ² makanan yang telah dicerna dan diserap oleh usus kecil. Usus besar terbagi menjadi dua, yaitu kolon dan rektum. Kedua bagian usus ini memiliki panjang sekitar 12 cm, di kolon sisa proses pencernaan dibiarkan sementara sebagai feses sebelum masuk ke kloaka yaitu muara sebagian saluran yaitu kolon, saluran tuba dan saluran kemih. ² Sehingga feses, urine dan telur dari saluran masing-masing akan keluar dari tubuh ayam melalui kloaka melalui anus.

Keberadaan pankreas yakni ditengah lop duodenum di usus kecil. Pankreas adalah skelenjar endokrin atau eksokrin. Untuk pengganti endokrin, pankreas mengeluarkan hormon insulin dan glukagon. Sedangkan sebagai eksokrin, pankreas mengeluarkan cairan yang dibutuhkan untuk pencernaan di usus halus yaitu jus pankreas, cairan ini kemudian mengalir ke duodenum melalui saluran pankreas (pancreatic duct) dan enzim pendukung ialah lipid dan protein. (Suprijatna dkk., 2005; Nurillah, 2011).

Menurut Suprijatna (2005) dalam Nurillah (2011) mengungkapkan liver ialah merupakan kelenjar paling besar didalam tubuh yang terdiri dari dua lobi besar. Sebagian besar makanan di lambung dan usus kecil diserap ke dalam vena portal ke hati. Fungsi fisiologis hati adalah sebagai berikut: sekresi empedu, detoksifikasi, senyawa toksin bagi tubuh, metabolisme protein, karbohidrat, lipid, penyimpanan vitamin, penyimpanan karbohidrat, keluarnya sel darah merah, dan protein plasma serta inaktivasi hormon polipeptida.

2.6 MDA (*Malondialdehyde*)

ROS (*Reaktif Oxygen Species*) meningkat karena adanya stress oksidatif. Diproduksi secara normal radikal bebas dan senyawa oksigen aktif dalam tubuh yang penting sebagai fungsi biologis, semacam sel darah (leukosit) untuk memproduksi H_2O_2 yang membunuh beberapa jenis bakteri dan jamur serta mengatur perkembangan sel, tetapi tidak menyerang

target tertentu, dapat menyerang asam lipid tak jenuh ganda dari membran sel, organ sel, atau DNA, kemudian dapat merusak struktur dan fungsi sel (Refdi dkk., 2014).

Stres oksidatif terjadi karena melibatkan ketidak seimbangan antara oksidan dan antioksidan selanjutnya menyebabkan kerusakan sel dan telah dibahas tentang pentingnya proses kerusakan hati (Elgaml dan Hashish, 2014). Peroksidasi lipid yang ditingkatkan oleh radikal bebas kemudian akan terurai menjadi malondialdehidida dalam darah. Malondialdehide adalah kerusakan sel yang disebabkan oleh radikal bebas (Latifa dkk., 2015).

Peroksidasi dari asam lipid tak jenuh ganda adalah malondialdehit, kenaikan kandungan *malondialdehyde* merupakan indikator penting dari peroksidasi lipid (Egbuniwe *et al.*, 2018; Nasiroleslami *et al.*, 2018). Aktivitas enzim antioksidan contohnya seperti *superoxide dismutase (SOD)* dan *GPx* digunakan untuk menilai toleransi ayam terhadap stres (Surai, 2015). antioksidan enzim menurun adalah indikator stres oksidatif pada ayam (Akbarian *et al.*, 2016). Sangat bermanfaat dalam memutuskan apakah stres oksidatif Reaksi terjadi dalam sel dan identifikasi sel yang rusak (Ognik, K. and Krauze, M. 2016).

Pengukuran peroksidasi dapat dilakukan dengan menggunakan uji malondialdehit di membran lipid. Kemudian, profil malondialdehidida pada serum berguna untuk penunjuk kerusakan sel yang disebabkan oleh radikal bebas (Inoue, 2001; Zaetun dkk., 2018). ROS bisa meningkat peroksidasi

lipid dan secara langsung akan meningkatkan titer MDA (Edem *et al.*, 2012).

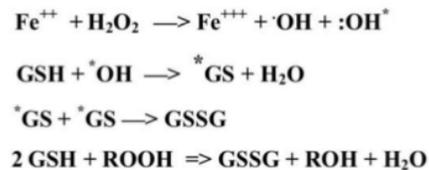
2.7 GPx (*Glutathione peroxidase*)

Antioksidan endogenous enzimatis bisa disebut enzim antioksidan adalah antioksidan yang diproduksi oleh tubuh manusia maupun tubuh hewan berfungsi untuk menghambat stress oksidatif eksogen ataupun asal endogen. Misalnya : SOD (superoksida dismutase), CAT (katalase) serta Gpx (glutathione peroxidase). antioksidan sekunder adalah antioksidan enzimatis yang bertujuan untuk menghambat radikal bebas dan menghentikan pembentukannya (Sadikin, 2002; Murray, 2009; Parwata, 2016).

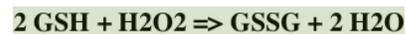
Selanjutnya yaitu glutathione peroksida yang terdiri dari 4 sub unit protein yang dapat mengkatalisis reaksi reduksi hidrogen peroksida kemudian, organik peroksida. Glutathione dapat dijumpai pada sitosol dari liver. Glutathione (γ -glutamylcysteinylglycine, GSH) ialah antioksidan sulfhydryl (-SH), antotoksin dan kofaktor enzim. GSH dapat ditemukan dimana saja termasuk sel hewan, tumbuhan atau mikroba yang dapat larut di udara dan berada di dalam sitosol sel atau substrat yang larut dalam air dan karena petunjuknya yang cukup besar, dibebankan sebagai antioksidan pada sel utama (Kidd P, 1997; Parwata, 2016). Antioksidan. Glutathione biasanya muncul dalam sel yang direduksi oleh GSH menenali sebagai Glutathione Disulfide (GSSG). Rasio GSH / GSSG adalah indikator sensitif

untuk stres oksidatif. GSH bersama enzim glutathione akan mengkatalisis reduksi lipid hidroperoksida jadi alkohol dan H₂O₂ menjadi H₂O. Pada saat mengkatalis ikatan disulfida dari 2 GSH bergabung menjadi Glutathioone oxidation (GSSG), dan enzim glutathione reductase mendaur ulang GSSG kembali menjadi GSH dengan mengoksidasi NADPH. Saat sel terpapar oleh stress oksidasif menyebabkan penimbunan GSSG dan rasio GSH/GSSG menjadi menurun (Oxford Biomedical Research, 2008 ; Parwata, 2016).

Radikal bebas yang diturunkan dari GSH dalam hal kemampuannya untuk mereduksi radikal hidroksil (·OH) sumber asal reaksi Fenton (Best B, 2003 ; Pawarta, 2016).



Selain itu, enzim Glutathione peroksidase menetralkan Hidrogen Peroksida (H₂O₂) dengan cara menangkap hidrogen menjadi 2 H₂O dan satu GSSG, sementara itu enzim glutathione reduktase akan mengubah GSSG, dengan menggunakan enzim NADPH sebagai sumber hidrogen, membuat GSH kembali.



GPX dapat merubah menghambat gugus hidroksil lipid menjadi radikal lipid (·L) atau lipid peroksida LOO· dengan kedua sisi untuk menangkal

sintesis radikal hidroksil **OH**. Peningkatan peroksidasi lipid dalam lumen pembuluh dapat menyebabkan aterosklerosis yang dapat mengurangi titer peroksidase GSH dan melindungi titer protector eicosanoid prostacyclin atau ³ (PGI-2) yang mengakibatkan keseimbangan prostaglandin menjadi lebih proinflamasi. Oleh karena itu dibutuhkan enzim GSH-S transferase yg memiliki interaksi kerja dalam ³ sel endotel untuk meningkatkan produksi pelindung eicosanoid. (Kidd P, 1997 ; Parwata, 2016).

2.8 Ayam *White Leghorn*

Ayam *white leghorn* merupakan ayam jenis petelur yang merupakan telur konsumsi yang dikembangkan secara khusus untuk menghasilkan telur. Jenis ayam petelur dibedakan menjadi ¹³ tipe ringan dan sedang. Ayam petelur ringan ini memiliki tubuh langsing, berbulu putih, dan jengger merah, berasal dari strain leghorn putih murni, memproduksi ¹³ 260 telur per tahun yang dihasilkan oleh Hen House. Ayam petelur ringan peka terhadap cuaca panas dan kebisingan, responnya adalah produksi akan menurun drastis. Ayam diternakan sebagai produsen telur umumnya tidak memakai pejantan dalam kandangnya krn betina tidak perlu dikawini dan untuk pejantan biasanya akan dikonsumsi sebagai ayam pedaging (Bappenas, 2010).

Jenis-jenis strain ayam petelur yg dikembangkan dari breed Leghorn contohnya adalah : Lochmmhmann (LSyL, White), Lochmann Broown, Hy-Line W-36 dan juga W-98, Hookmbhy-Line Brown, ISA White dan

Brown (Yuwanta, 2010). Tiga tahap umum dalam pertumbuhan ayam adalah tahap awal yang disebut starter berasal dari DOC hingga usia 6 minggu, periode grower dari usia 6 minggu hingga 18 minggu dan produksi mulai dari 18 minggu hingga dipanen. (Rasyaf, 2004 ; Rifaid, 2018).

2.8.1 Klasifikasi

Gambar 2. Dokumentasi pribadi ayam *white leghorn*

Menurut Sarwono (2003) dalam Rio (2018) klasifikasi dari ayam petelur :

Memiliki Kingdom : Animalia dengan Phylum : Chordata
masuk dalam Class : Aves dengan Ordo : Galliformes tergolong
Family : Phasianidae Genusnya Gallus termasuk jenis atau Species :
Gallus gallus

Ayam jenis ini dternakan dengan tujuan untuk produksi telur (Sudaryani dan Santosa, 2000; Rifaid, 2018). pada ayam betina yang sudah dewasa khusus dternak untuk produksi telur. Ayam jenis ini terkategori spesies Gallus domesticus yg merupakan jenis leghorn putih yang memiliki proporsi tubuh yang kecil dan sering dikonsumsi setelah masa produksinya habis.

Ayam petelur golongan tipe ringan dari white leghorn, tipe medium dari Plymouth barel ada juga Rhode Island Reds, tipe rock berasal New Hampshire, White Plymouth Rock dan Cornish dst. (Amrullah, 2004 ; Rifaid, 2018). Asal mula ayam petelur yakni ayam hutan yg disilangkan. Tetapi lantaran ayam hutan bisa dimanfaatkan telur dan dagingnya jadi tujuan seleksi lekas spesifik. Broiler adalah contoh terseleksi yang di ambil dagingnya sedangkan untuk produksi telur dikenal denganayer. Kemudian dari 16 enyeleksian juga diarahkan terhadap pola warna kulit dari telur yang dikenal oleh masyarakat sebagai telur coklat serta telur putih (Rasyaf, 1997; Rifaid, 2018).

16

III. MATERI DAN METODE

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Karena pada saat ini sedang terjadi situasi yang tidak memungkinkan (wabah pandemi covid-19) untuk pemeliharaan hewan coba dipelihara dan diadaptasi lingkungan di Rumah Lamongan dengan

menggunakan kandang batrai sesuai umur pemeliharaan kemudian dikelompokkan sesuai perlakuan dan selanjutnya penelitian ini dilanjutkan pada Laboratorium Biomedik Terintegrasi Fakultas Kedokteran UNISSULA Semarang untuk pemeriksaan Mda (*Malondialdehyde*) dan Aktivitas GPx (Glutation Peroksidase).

Penelitian ini dilakukan bulan mei sampai ²⁴juli 2020.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan penelitian

menggunakan **bahan** :

Ayam white leghorn DOC, Bakteri *Bacillus subtilis* diperoleh dari BBLK (Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya, Pakan *standart* dan air minum *ad libitum*, Media umum NA (Natrium Agar),

3.2.2. Alat

Alat yg dipakai ialah :

syringe atau spuit 1 ml dan 3 ml, Tabung *centrifuge*, kertas label, Box blue tips, *Centrifuge*, Kandang ayam, inkubator, Tas Freezable gel walls, tabung *ependorf*, *venojeck non-EDTA*, Kit Elisa GPx.

²¹ 3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan menggunakan rancangan acak lengkap yang disebut (RAL). Penelitian ini memakai 24 sampel ayam *white leghorn* jantan yang dibagi 6 pengulangan dengan 4 kelompok .

3.3.2 Dosis, Sampel, Besaran Sempel dan Teknik Pengambilan Sempel

3.3.2.1 Dosis Bakteri *Bacillus subtilis*

¹⁶ Dosis yang digunakan dalam penelitian ini yaitu sebanyak 1 ml yang diambil dari pengenceran dari bakteri *Bacillus subtilis* kemudian diberikan secara peroral pada ayam *white leghorn* jantan sesuai kelompok perlakuan dengan pengenceran masing-masing. Pemberian pada pagi hari sebanyak 1x dalam sehari untuk menghindari tingkat stress pada ayam dan dilakukan selama 1 minggu.

Berdasarkan penelitian yang sudah ada, probiotik dapat dicampurkan pd pakan unggas dan air minumnya dengan dosis spesifik. Berlandaskan penelitian Rowghani *et al.*, (2007), contoh dosis probiotik ialah 0,1% hingga 0,15% dan ²⁰ pada penelitian yang dilakukan Shareef dan AlDabbagh (2009), dosis probiotik ²⁰ menggunakan kurang lebih 0% - 2% dalam pakan dan air minum

unggas secara *ad libitum*. Pada penelitian tersebut membuahkan hasil dosis probiotik optimal pada dosis 2% (Prabowo, 2016).

3.3.2.2 Sampel

Awalnya menggunakan sampel ayam *white leghorn* jantan yang berumur 31 hari. Sebelumnya ayam *white leghorn* jantan yang diambil adalah DOC yang dipesan khusus dan dilakukan pemeliharaan (pembesaran), adaptasi lingkungan kemudian dipisahkan sesuai perlakuan, diberi pakan *standart* dan air minum *ad libitum*. Kemudian selama 1 minggu terakhir ayam diberikan perlakuan kemudian ayam siap diambil sampel darah pada usia 38 hari.

3.3.2.3 Besaran Sampel

Besar sampel dihitung berdasarkan rumus Federeer yaitu :

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

$$(n-1)(4-1) \geq 15$$

$$(n-1)(3) \geq 15$$

$$3n-3 \geq 15$$

$$3n \geq 15 + 3$$

$$n = 6$$

Keterangan : t : merupakan jumlah perlakuan

n : adalah ulangan

Pada penelitian ini digunakan 24 ekor ayam yang dibagi 6 ulangan dengan 4 perlakuan . Kelompok 1 adalah kontrol negatif,

kelompok 2 adalah kelompok perlakuan 1 dan 3 adalah kelompok perlakuan 2 dan ke 4 adalah kelompok perlakuan 3.

²³ 3.3.2.4 Teknik Pengambilan Sampel

Penelitian ini yang dipakai adalah serum, darah yang diambil dari ayam yang berumur 38 hari setelah satu minggu pemberian probiotik teknik pengambilan sampel menggunakan darah ayam yang akan di diambil melalui jantung dan juga di sayap ayam (*vena brachialis*) dengan menggunakan spuit yang steril kemudian darah ayam ditampung dalam tabung *venoject non-EDTA* dipindahkan ke tabung *centrifuge* kemudian di *centrifuge* selama 3 menit dengan kecepatan 3000 rpm kemudian serum diambil menggunakan spuit steril dan dimasukkan dalam tabung *ependorf*.

³ 3.4 Variabel Penelitian

Variabel penelitian ini terdiri dari 3 buah yaitu :

Variabel bebas : Pengenceran bakteri

Variabel Tergantung : *Malondialdehyde* dan *Glutathione Peroxidase*

Variabel Kendali : Umur ayam, jenis kelamin ayam, pakan, kondisi lingkungan dan asal isolat *Bacillus subtilis*.

² 3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Sterilisasi Alat

Siapkan semua alat dan bahan yang perlu disterilisasi, kemudian dilakukan pembungkusan menggunakan kertas karton. Masukkan alat dan

bahan kedalam autoclave. Tutuplah autoclave dengan rapat. Biarkan suhu autoclave mencapai 121° C selama 20 menit. Kemudian matikan autoclave. Alat dan bahan siap digunakan.

3.5.2 Perlakuan Pada Hewan Coba

24 ekor ayam *white leghorn* jantan pada penelitian ini yang berumur 31 hari dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan. Keempat kelompok ayam perlakuan yang dipakai dalam penelitian ini dapat digambarkan sebagai berikut :

Kelompok kontrol positif (P0) terdiri dari 6 ekor ayam *white leghorn* jantan tanpa diberikan probiotik *Bacillus subtilis*.

Kelompok Pertama (P1) terdiri dari 6 ekor ayam *white leghorn* jantan yang diberikan probiotik *Bacillus subtilis* 1×10^{-6} CFU secara per oral.

Kelompok Kedua (P2) terdiri dari 6 ekor ayam *white leghorn* jantan yang diberikan probiotik *Bacillus subtilis* 1×10^{-7} CFU secara per oral.

Kelompok Ketiga (P3) terdiri dari 6 ekor ayam *white leghorn* jantan yang diberikan probiotik *Bacillus subtilis* 1×10^{-8} CFU secara per oral.

3.5.3 Pemeriksaan Titer MDA (*Malondialdehyde*)

Metode pengukuran titer malondialdehida metode zat reaktif asam Thiobarbituric (TBARS) digunakan dalam penelitian ini. Berdasarkan prinsip kemampuan membentuk kompleks merah muda antara malondialdehida dan asam tiobarbiturat (TBA) (Capeyron et al., 2002). 1 ml serum darah dihomogenkan dengan 9,0 ml larutan KCl

1,15% menggunakan homogenizer Teflon Potter-Elvehjem. Sebanyak 0,2 ml homogenat, ditambah 0,2 ml natrium dodesil sulfat 8,1% dan 1,5 ml larutan asam asetat 20% untuk pH 3,5 dan 1,5 ml larutan TBA 0,8%. Campuran ditambahkan air dengan volume 4,0 ml, dipanaskan pada suhu 95 ° C selama 60 menit, kemudian didinginkan menggunakan air. Setelah pendinginan, campuran ditambahkan ke 1,0 ml air dan 5,0 ml campuran n-butanol: piridin (15: 1 v / v) dan dikocok. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm dengan waktu 10 menit, lapisan organik diambil dan diukur absorbansi pada panjang gelombang 532 nm menggunakan spektrofotometer sinar tampak. Menggunakan 1,1,3,3-tetraetoksipropan (TEP) merupakan larutan standar (Widyaningsih, 2015). Senyawa 1,1,3,3-tetraetoksipropan dapat digunakan sebagai standar karena dalam lingkungan yang asam TEP dihidrolisis untuk menghasilkan hemiasetal dan etanol. Hemiasetal yang terbentuk kemudian terurai menjadi etanol dan malondialdehid (Widyaningsih, 2015).

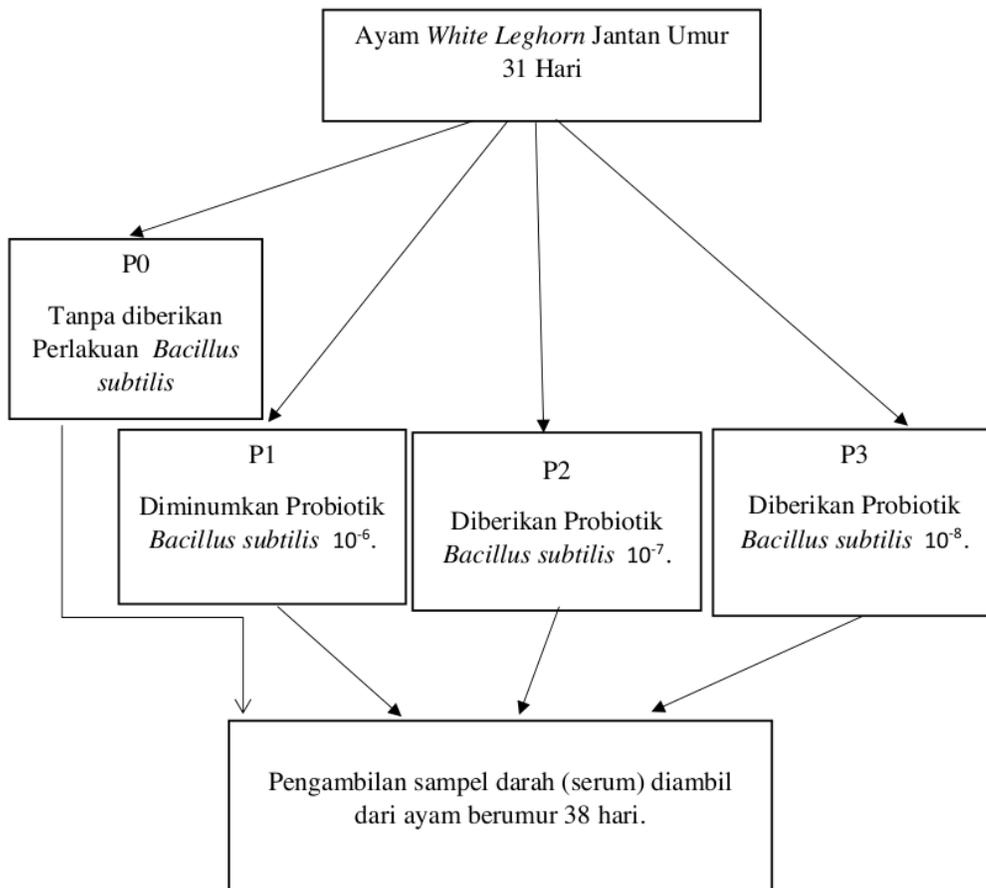
3.5.4 Pemeriksaan Titer GPx (Glutathione Peroxidase)

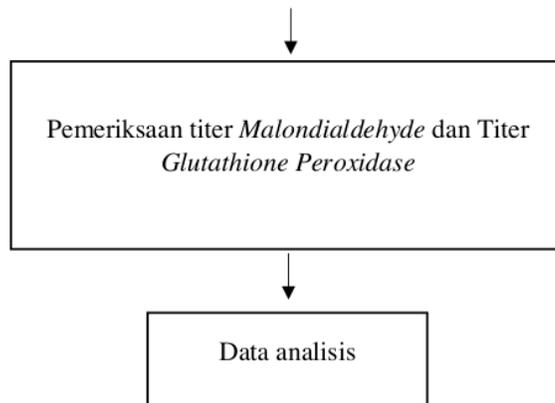
Darah yang ditampung kedalam venojeck plain, kemudian dilakukan sentrifugasi untuk mendapatkan serum, kemudian serum yang didapat diambil pengenceran dengan diluent solution (sesuai Kit) sebanyak 5 kali.

Tahapan kedua adalah pembuatan standart solution dengan pengenceran sesuai kit elisa yang digunakan, untuk membuat kontrol standart.

Tahapan ketiga adalah membaca absorbansi GPX dengan well elisa, sampel yang tadi telah diencerkan dengan diluent solution maka dilakukan prosedur sesuai kit elisa, kemudian dilakukan pencucian well. Kemudian diinkubasikan. Lalu ¹² Masukkan 100 μ L TMB Substrate Solution (Chromogen-Substrate Solution) di setiap well lalu inkubasi pada suhu ruangan dan keadaan gelap selama 10 menit. Kemudian masukkan 100 μ L Stop Solution pada masing-masing well. Masukkan seluruh well ke Elisa Reader Multiskan GO dan lakukan pembacaan hasil dengan gelombang absorbansi 450 nm.

3.6 Kerangka Operasional





3.7 Data analisis

Memakai One Way ANOVA diharapkan dapat memperlihatkan perbedaan yang bermakna antara setiap kelompok perlakuan dan data yang diperoleh dari pemeriksaan *Malondialdehyde* dan *Glutathione Peroxidase* disajikan dan dianalisis.

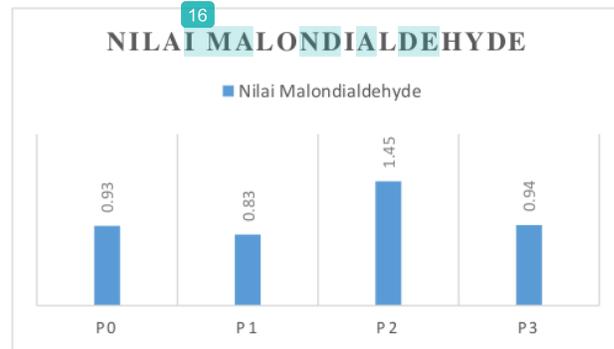
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil dari Penelitian

Tabel 4.1 Rerata Titer Malondialdehyde Pada Ayam White Leghorn Jantan Setelah Pemberian Perlakuan Probiotik *Bacillus subtilis*

Perlakuan	Mean \pm Std. Deviasi
P0	0,89 ^a \pm 0,18
P1	0,83 ^a \pm 0,22
P2	0,45 ^b \pm 0,22
P3	0,94 ^a \pm 0,17

Notasi : Sidik ragam menunjukkan hasil yaitu setiap kelompok perlakuan berbeda nyata dari ¹³ hasil yang diperoleh dengan nilai kemaknaan $P < 0,05$, berdasarkan nilai kemaknaan P3, P1 dan P3 berbeda nyata dengan P2.



Gambar 4.1 Diagram Titer Malondialdehyde Pada Setiap Kelompok Perlakuan

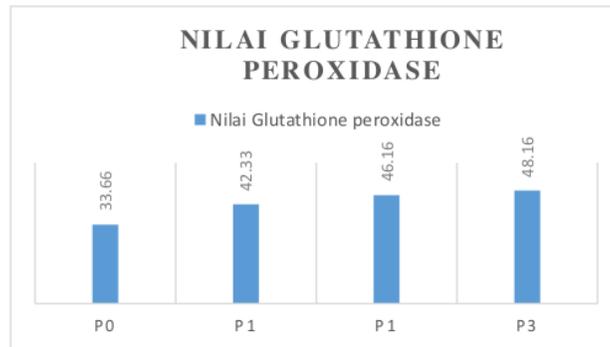
Tabel 4.2 Rerata *Optical Density Glutathione Peroxidase* pada Ayam White Leghorn Jantan Setelah Pemberian Perlakuan Probiotik *Bacillus subtilis*

Perlakuan	Mean ± Std. Deviasi
P0	33,66 ^a ± 2,88
P1	42,33 ^{a,b} ± 12,48
P2	46,16 ^b ± 3,54
P3	48,16 ^b ± 4,53

Notasi : Sidik ragam menunjukkan hasil yaitu setiap kelompok perlakuan

³⁷ berbeda nyata dengan nilai kemaknaan $P < 0,05$, berdasarkan nilai kemaknaan

³⁵ P1 dan P0 berbeda nyata dengan P2 dan P3.



Gambar 4.2 Diagram Optical Density Pada Setiap Kelompok Perlakuan

4.2 Pembahasan

4.2.1 Malodialdehyde

Analisis sidik ragam memiliki hasil menunjukkan bahwa titer malondialdehyde setiap kelompok perlakuan menunjukkan perbedaan yang real ($P < 0,05$). Menurut data yang disajikan pada tabel 4.1 Menunjukkan bahwa kelompok P2 (6 ekor ayam yang diberikan probiotik *Bacillus subtilis* mengalami kenaikan titer malondialdehyde pada serum.

Malondialdehyde merupakan biomarker terjadinya stres oksidatif baik pada tingkatan sel maupun jaringan. Malondialdehyde dapat dihasilkan akibat adanya penyakit kronik, peradangan akut, cedera sel, zat karsinogenik ataupun aktivitas imunologis. Pada ayam kenaikan

malondialdehyde dapat diakibatkan oleh adanya heat stress (Fishcer *et al.*, 2013; Hidayat, 2018). Berdasarkan hasil menunjukkan bahwa pemberian probiotik cenderung meningkatkan titer malondialdehyde serum. Penurunan yang berarti ditunjukkan pada kelompok P1 yaitu 6 ekor ayam yang diberikan *Bacillus subtilis* 10^{-6} CFU, peningkatan malondialdehyde seiring meningkatnya jumlah kepadatan suspensi probiotik. Hal ini dapat dikaitkan semakin banyaknya bakteri *Bacillus subtilis* memungkinkan dapat memacu imunitas pada sel host, sehingga titer malondialdehyde cenderung mengalami peningkatan. Pada sistem imun stress oksidatif biasanya diakibatkan oleh adanya super inflamasi ataupun karena pelepasan NO, ROS oleh makrofag dan sel PMN (*polimorfo nuclear*). Spesies *Bacillus* lebih disukai dalam industri pakan karena stabilitasnya sebagai bakteri dapat membentuk spora, dalam kondisi ini bakteri dapat bertahan dalam lingkungan yang ekstrem (Li *et al.*, 2013).

Mekanisme kerja *Bacillus subtilis* membatasi ROS adalah Seperti halnya hewan, probiotik juga memiliki sistem enzimatik antioksidan mereka sendiri. Salah satu yang terbaik enzim yang dikenal adalah SOD. Superoksida adalah salah satu anti radikal bebas yang paling banyak diproduksi oleh mitokondria, sementara SOD mengkatalisis pemecahan superoksida menjadi hidrogen peroksida dan air dan karena itu merupakan regulator pusat tingkat ROS (Ehtajed *et al.*, 2012; Aluwong *et al.*, 2013). Berpartisipasi dalam pertahanan antioksidan seluler dengan menguraikan

hidrogen peroksida, dengan demikian mencegah pembentukan radikal hidroksil oleh reaksi Fenton (Spyropoulus *et al.*, 2011).

4.2.2 Glutathione Peroxidase

Berdasarkan data analisis sidik ragam pada setiap kelompok perlakuan ayam pejantan yang diberikan probiotik *Bacillus subtilis* menunjukkan peningkatan titer glutathione peroxidase ($P < 0,05$). Kenaikan enzim glutathione peroxidase seiring dengan peningkatan kepadatan suspensi bakteri *Bacillus subtilis* yang diberikan.

Glutathione peroxidase merupakan salah satu enzim yang berperan sebagai antioksidan, antioksidan di dalam tubuh diproduksi untuk menghambat proses oksidasi ataupun mencegah terjadinya kerusakan sel akibat oksidan, namun antioksidan didalam tubuh di produksi dalam jumlah yang kecil sehingga harus mendapatkan asupan dari luar. probiotik telah terbukti dalam meningkatkan enzim guthatione. Jumlah enzim glutathione dapat digunakan sebagai biomarker didalam tubuh untuk melihat jumlah antioksidan yang diproduksi, seringkali dilakukan penelitian untuk membandingkan titer malondialdehyde sebagai oksidan dengan titer enzim glutahtione peroxidase ataupun superoxide dismutase untuk mengetahui keseimbangan antara stress oksidatif dengan antioksidan yang diproduksi.

Glutathione peroxidase mempunyai mekanisme kerja dalam menginaktivasi lipid dan hidrogen perokidase yang akan menghambat stress oksidatif dan kerusakan jaringan (Stojiljkovic *et al.*, 2007; Espinoza *et al.*, 2008). Peran

probiotik adalah meningkatkan antioksidan didalam tubuh adalah mempromosikan scrosing ROS, menghambat peroksidasi lipid dan mengaktifkan dan translokasi N κ β (Nuclear factor kappa) untuk menginduksi berbagai macam enzim antioksidan (Capcarova *et al.*, 2010). Mekanaisme lain yang dijelaskan peran probiotik dengan cara mendetoksifikasi produksi oksigen singlet dan radikal bebas untuk mengatasi terjadinya proses stress oksidatif lebih lanjut (Na dan Surh, 2008). Peran probiotik dalam meningkatkan antioksidan didalam usus adalah dengan peningkatan pengolahan nutsiri dan arbsorbsinya pada usus. Selain itu *Bacillus subtilis* dapat *merangsang* transduksi rangsangan eksogen ke transkripsi eukariotik tanggapan adalah dengan aktivasi jalur Nrf2-Keap1-ARE. Aktivasi Nrf2 meningkatkan serangkaian gen termasuk senyawa yang trlibat dalam detoksifikasi xenobiotik dan ROS untuk stresor dan stressor lingkungan (Jones *et al.*, 2015).

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Pembahasan berdasarkan dari hasil penelitian ini maka dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut, bahwa :

1. Terdapat kenaikan nilai MDA pada serum darah ayam kelompok perlakuan yang diberikan *Bacillus subtilis*¹⁰⁻⁷ (P2) dibanding kelompok P0, P1 dan P3.
2. Terdapat kenaikan nilai GPx pada semua kelompok ayam yang diberikan *Bacillus subtilis* (P1) (P2) (P3) dibanding dengan kelompok P0
3. Kenaikan nilai MDA pada kelompok (P2) diiringi kenaikan nilai GPx

5.2 Saran

penelitian ini berdasarkan hasil sesuai penelitian , saran dari peneliti ialah sebagai berikut :

1. Perlunya dilakukan penelitian tentang antioksidan lain misalnya SOD (Superoxide Dismutase) pada ayam pejantan yang diberikan *Bacillus subtilis*.
2. Perlunya dilakukan penelitian tentang perubahan jaringan secara histologis pada organ vital ayam pejantan yang diberikan *Bacillus subtilis*.

ORIGINALITY REPORT

25%

SIMILARITY INDEX

20%

INTERNET SOURCES

2%

PUBLICATIONS

15%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	repositori.uin-alauddin.ac.id Internet Source	6%
2	etheses.uin-malang.ac.id Internet Source	3%
3	Submitted to Udayana University Student Paper	1%
4	www.agrobisnisinfo.com Internet Source	1%
5	www.scribd.com Internet Source	1%
6	Submitted to Universitas Pelita Harapan Student Paper	1%
7	digilib.unila.ac.id Internet Source	1%
8	Siti Zaetun, Lale Budi Kusuma Dewi, Ida Bagus Rai Wiyadna. "PROFIL KADAR MDA (MALONDIALDEHIDE) SEBAGAI PENANDA KERUSAKAN SELULER AKIBAT RADIKAL	1%

BEBAS PADA TIKUS YANG DIBERIKAN AIR
BEROKSIGEN", Jurnal Analisis Medika Biosains
(JAMBS), 2019

Publication

9	Submitted to UIN Sunan Ampel Surabaya Student Paper	1%
10	es.scribd.com Internet Source	1%
11	libbertysatmosfer.blogspot.com Internet Source	1%
12	www.openwetware.org Internet Source	1%
13	Submitted to Universitas Brawijaya Student Paper	1%
14	Submitted to Universitas Islam Indonesia Student Paper	1%
15	repository.ipb.ac.id Internet Source	1%
16	docplayer.info Internet Source	1%
17	www.slideshare.net Internet Source	<1%
18	Submitted to KYUNG HEE UNIVERSITY Student Paper	<1%

19

Submitted to UIN Sunan Gunung Djati Bandung

Student Paper

<1%

20

Submitted to Politeknik Negeri Jember

Student Paper

<1%

21

id.123dok.com

Internet Source

<1%

22

Submitted to Universitas Jenderal Soedirman

Student Paper

<1%

23

Submitted to Universitas Muhammadiyah
Surakarta

Student Paper

<1%

24

Submitted to Universitas Jambi

Student Paper

<1%

25

Submitted to Perguruan Tinggi Pelita Bangsa

Student Paper

<1%

26

repository.unair.ac.id

Internet Source

<1%

27

Submitted to Universitas Dian Nuswantoro

Student Paper

<1%

28

"Microorganisms in Biorefineries", Springer
Science and Business Media LLC, 2015

Publication

<1%

29

fr.scribd.com

Internet Source

<1%

30	Submitted to UIN Syarif Hidayatullah Jakarta Student Paper	<1%
31	id.scribd.com Internet Source	<1%
32	mikhameilinda.blogspot.com Internet Source	<1%
33	repositori.umsu.ac.id Internet Source	<1%
34	text-id.123dok.com Internet Source	<1%
35	Submitted to Universitas Airlangga Student Paper	<1%
36	Submitted to Universitas Diponegoro Student Paper	<1%
37	Submitted to Syiah Kuala University Student Paper	<1%
38	Submitted to Universitas Andalas Student Paper	<1%
39	Submitted to Sriwijaya University Student Paper	<1%

Exclude quotes Off

Exclude matches Off

Exclude bibliography Off

