

SKRIPSI

EFEK ANTIDIARE BERBAGAI KOMPOSISI PROBIOTIK PADA MENCIT YANG DIINDUKSI DIARE



FITRI RACHMAWATI

**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
DEPARTEMEN FARMASI KLINIS
SURABAYA
2016**

SKRIPSI

EFEK ANTIDIARE BERBAGAI KOMPOSISI PROBIOTIK PADA MENCIT YANG DIINDUKSI DIARE



**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
DEPARTEMEN FARMASI KLINIS
SURABAYA
2016**

ambar Pengesahan

**EFEK ANTIDIARE
BERBAGAI KOMPOSISI PROBIOTIK PADA
MENCIT YANG DIINDUKSI DIARE**

SKRIPSI

**buat Untuk Memenuhi Syarat Mencapai Gelar Sarjana Farmasi
Pada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga**

2016

Oleh :

FITRI RACHMAWATI

NIM : 051211132083

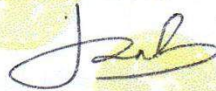
Disetujui oleh :

Pembimbing Utama



Dra. Toetik Aryani, M.Si., Apt.
NIP. 19610411 198903 2 001

Pembimbing Serta



Zamrotul Izzah, S.Farm., M.Sc., Apt.
NIP. 19850518 200812 2 002

LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH

Demi perkembangan ilmu pengetahuan, saya menyetujui skripsi/karya ilmiah saya, dengan judul:

EFEK ANTIDIARE BERBAGAI KOMPOSISI PROBIOTIK PADA MENCIT YANG DIINDUKSI DIARE

untuk dipublikasikan atau ditampilkan di internet atau media lain yaitu *Digital Library* Perpustakaan Universitas Airlangga untuk kepentingan akademik sebatas sesuai Undang-undang Hak Cipta.

Demikian pernyataan persetujuan publikasi karya ilmiah ini saya buat dengan sebenar-benarnya.



Fitri Kachmawati

051211132083

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama : Fitri Rachmawati

NIM : 051211132083

Fakultas : Farmasi

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa hasil tugas akhir yang saya tulis dengan judul:

EFEK ANTIDIARE BERBAGAI KOMPOSISI PROBIOTIK PADA MENCIT YANG DIINDUKSI DIARE

adalah benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri. Apabila di kemudian hari diketahui bahwa skripsi ini merupakan plagiarisme, maka saya bersedia menerima sanksi berupa pembatalan kelulusan dan atau pencabutan gelar yang saya peroleh.

Demikian surat pernyataan ini saya buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.



Fitri Rachmawati

051211132083

KATA PENGANTAR

Dengan mengucapkan puji syukur atas kehadiran Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas skripsi yang merupakan salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi pada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

Skripsi yang berjudul “Efek Antidiare Berbagai Komposisi Probiotik Pada Mencit Yang Diinduksi Diare” ini dapat diselesaikan atas bantuan serta dukungan dari banyak pihak. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih pada:

1. Dra. Toetik Aryani, M.Si., Apt, selaku dosen pembimbing utama yang dengan sabar dan ikhlas memberikan bimbingan, dorongan semangat serta masukan hingga terselesaikannya skripsi ini
2. Zamrotul Izzah, S.Farm., M.Sc., Apt, selaku dosen pembimbing serta atas perhatiannya selama penelitian untuk memberikan bimbingan, pengarahan, serta masukan hingga terselesaikannya skripsi ini.
3. Prof. Dr. Mohammad Nasih, SE., Mt., Ak., CMA selaku rektor Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas untuk menyelesaikan pendidikan di Universitas Airlangga.
4. Dr. Hj. Umi Athiyah, MS., Apt, selaku dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas untuk menyelesaikan program pendidikan S1 di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
5. Drs. Didik Hasmono, MS., Apt., dan Mahardian Rahmadi, S.Si., M.Sc., Ph.D., Apt, selaku dosen penguji atas kritik dan saran yang diberikan untuk perbaikan skripsi ini.

6. Kedua orang tua (Abi Zainuri dan Umi Faridah), kakak dan adik (Mas Rendi, Mbak Ifa, Dinda) dan keluarga besar Affan dan Boechori yang selalu mendoakan, memberi dukungan dan semangat hingga terselesaikannya skripsi ini.
7. Teman seperjuangan ngelab, Rianur Oktavia, teman-teman “Yes We Are” Amani, Afifatun, Ayu, Faizah, Feby, Melani, Dwi Ayu, Ariesta, Andila, teman-teman sekos Berthy, Putri, Oktya, Riski, Armila yang selalu memberikan semangat dan banyak bantuannya.
8. Bapak Mursyid, Mas Vendra dan Mbak Ari, laboran ruang praktikum Farmasi Klinis yang sudah membantu kelancaran penelitian di ruang praktikum.
9. Teman-teman Amoksilin A 2012 yang telah menemani masa perkuliahan S1 selama 4 tahun.

Semoga Allah SWT membalas kebaikan yang telah diberikan dengan pahala yang berlipat ganda.

Dalam penyusunan skripsi ini masih banyak kekurangan, untuk itu segala kritik dan saran dari semua pihak sangat diharapkan demi perbaikan pada nantinya. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan, khususnya dalam pengembangan terapi obat.

Surabaya, Agustus 2016

Penulis

RINGKASAN

EFEK ANTIDIARE BERBAGAI KOMPOSISI PROBIOTIK PADA MENCIT YANG DIINDUKSI DIARE

Fitri Rachmawati

Diare merupakan kondisi dimana terjadi peningkatan volume atau fluiditas feses, perubahan konsistensi dan peningkatan frekuensi buang air besar. Salah satu penyebab diare yaitu karena penggunaan antibiotik, yang disebut sebagai *Antibiotic-associated diarrhea* (AAD). AAD merupakan konsekuensi umum dari terapi antibiotik terkait dengan eliminasi mikroorganisme usus yang sehat. Konsumsi probiotik telah dibuktikan dapat mengurangi resiko AAD dengan mekanisme utamanya yaitu kolonisasi mikroba usus. Berdasarkan jenis strain bakteri yang digunakan, probiotik dibagi menjadi tiga jenis yaitu probiotik monostrain, multistrain dan multispecies.

Penelitian dilakukan untuk melihat perbedaan aktivitas antidiare dari ketiga macam probiotik pada mencit yang diinduksi diare dengan penggunaan antibiotik. Induksi diare dilakukan dengan pemberian kanamisin oral dosis 80mg setiap 12 jam sebanyak tiga kali. Penilaian aktivitas antidiare berdasar pada parameter persentase proteksi, persentase kadar air dan histologi cecum. Persentase proteksi didapat berdasarkan berat total feses selama lima jam yang dibandingkan pada kelompok kontrol diare. Kemudian sampel feses diukur kadar airnya dengan metode pengeringan oven, dan dilanjutkan pembedahan mencit untuk pengambilan organ cecum.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa berdasarkan persentase proteksi, semua kelompok perlakuan menunjukkan perbedaan hasil yang signifikan ($P>0,05$) terhadap kelompok susu skim kontrol negatif, kecuali pada kelompok probiotik monostrain. Sedangkan bila dibandingkan dengan metronidazole sebagai kontrol positif, kelompok probiotik multistrain dan multispecies tidak memiliki perbedaan yang signifikan ($P>0,05$) dibandingkan dengan kelompok metronidazole sebagai kontrol positif. Namun, probiotik multispecies menunjukkan aktivitas antidiare tertinggi yang ditunjukkan dengan persentase proteksi tertinggi, disusul probiotik multistrain dan monostrain. Berdasarkan konsistensi feses, ketiga kelompok probiotik menunjukkan perbaikan konsistensi feses yang ditunjukkan dengan penurunan kadar air dibandingkan dengan kelompok kontrol diare. Sedangkan berdasarkan histologi cecum, penggunaan probiotik menunjukkan perbaikan kondisi mukosa cecum dibandingkan dengan kelompok kontrol

diare, namun tetap teramati adanya jaringan yang mengalami inflamasi. Sehingga probiotik multispecies dapat menjadi pilihan untuk terapi diare yang diinduksi oleh penggunaan antibiotik.



ABSTRACT

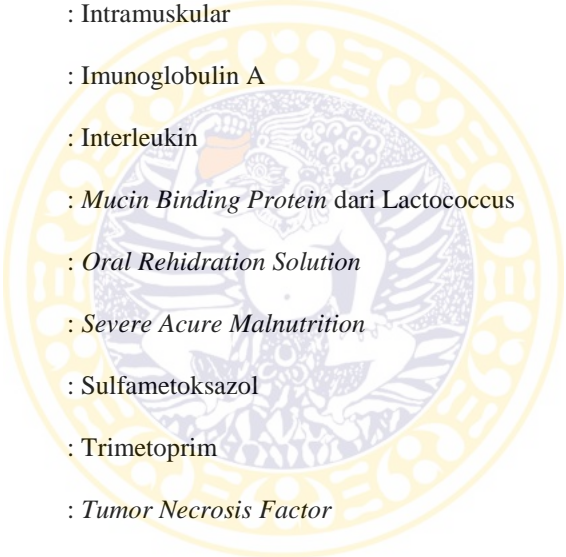
ANTIDIARRHEAL EFFECT OF VARIOUS PROBIOTIC COMPOSITIONS ON ANTIBIOTIC-ASSOCIATED DIARRHEA

Fitri Rachmawati

Antibiotic-associated diarrhea (AAD) is a general consequence of antibiotic therapy. Probiotic consumption has been proven to reduce AAD risk with colonization as the main mechanism. This study was designed to investigate the antidiarrheal activity of monostrain, multistrain and multispecies probiotic. The activity was tested in mice given oral kanamycin to induced diarrhea. Parameters measured were percent protection, water content of feces and cecum histology. The monostrain probiotic showed no significant difference in percent protection compared to the skim milk group as negative control. The multistrain and multispecies probiotics showed no significant difference compared to the metronidazole group as positive control. Furthermore, the multispecies probiotic has shown the highest percent protection against AAD, thus promising to be the more effective antidiarrheal agent than monostrain and multistrain groups. Multispecies probiotics could improve fecal consistency as well as normalize inflammatory changes of the cecum.

Keyword: probiotic, antibiotic-associated diarrhea, antidiarrheal activity

DAFTAR SINGKATAN



AAD	: <i>Antibiotic Associated Diarrhea</i>
ATCC	: <i>American Type Culture Collection</i>
BNF	: <i>Buffered Neutral Formaline</i>
FOS	: <i>Fruktooligosakarida</i>
IM	: <i>Intramuskular</i>
IgA	: <i>Imunoglobulin A</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
MbpL	: <i>Mucin Binding Protein dari Lactococcus</i>
ORS	: <i>Oral Rehidration Solution</i>
SAM	: <i>Severe Acure Malnutrition</i>
SMX	: <i>Sulfametoksazol</i>
TMP	: <i>Trimetoprim</i>
TNF	: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR.....	vi
RINGKASAN	viii
ABSTRACT	x
DAFTAR SINGKATAN.....	xi
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	6
1.3 Tujuan Penelitian.....	6
1.4 Manfaat Penelitian	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Diare	7
2.1.1 Definisi Diare	7
2.1.2 Jenis Diare.....	7
2.1.3 Etiologi Diare	8
2.1.4 Patofisiologi Diare	9
2.1.5 Pengobatan Diare.....	12
2.1.6 Antibiotic Associated Diarrhea (AAD).....	19
2.2 Probiotik.....	23
2.2.1 Definisi Probiotik	23
2.2.2 Mekanisme Kerja Probiotik	25
2.2.3 Efek Samping Probiotik	28

BAB III KERANGKA KONSEPTUAL	29
3.1 Uraian Kerangka Konseptual	29
3.2 Alur Kerangka Konseptual	33
3.3 Hipotesis Penelitian	34
BAB IV METODE PENELITIAN	35
4.1 Jenis Penelitian	35
4.2 Alat dan Bahan Penelitian	35
4.2.1 Alat Penelitian	35
4.2.2 Bahan Penelitian	35
4.3 Subjek Penelitian	36
4.3.1 Jumlah Subjek Penelitian	36
4.3.2 Kerangka Operasional	37
4.3.3 Definisi Operasional	37
4.4 Variabel Penelitian	39
4.5 Prosedur Penelitian	40
4.5.1 Penanganan Hewan Coba	40
4.5.2 Prosedur Kerja	40
4.6 Analisis Data	48
BAB V HASIL PENELITIAN	49
5.1 Hasil Karakterisasi Sediaan	49
5.2 Hasil Uji In vivo pada Hewan Coba	50
5.3 Hasil Histopatologi Cecum	52
5.3.1 Hasil Pengamatan Makroskopis	52
5.3.2 Hasil Pengamatan Histologi	54
BAB VI PEMBAHASAN	57
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN	65
7.1 Kesimpulan	65

7.2 Saran.....	65
DAFTAR PUSTAKA	66
LAMPIRAN	71



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 3.1 Skema Kerangka Konseptual	33
Gambar 4.1 Skema Uji In Vivo	37
Gambar 4.2 Skema Preparasi Susu Skim	40
Gambar 4.3 Skema Preparasi Probiotik	41
Gambar 4.4 Skema Pengukuran Kadar Air	43
Gambar 5.1 Persentase Proteksi pada Mencit yang Diinduksi Diare	50
Gambar 5.2 Hasil Pengukuran Persentase Kadar Air	51
Gambar 5.3 Cecum Mencit	52
Gambar 5.4 Gambar Irisan Melintang Mukosa Cecum Mencit	54
Gambar 5.5 Gambar Inflamasi pada Cecum Mencit	55
Gambar 5.6 Gambar Limfoid Nodul pada Cecum Mencit	56

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel II.1 Antimikroba yang Digunakan pada Pengobatan Diare dengan Penyebab Tertentu	16
Tabel II.2 Spesies Mikroorganismen yang Telah Diidentifikasi sebagai Mikroflora Probiotik	24
Tabel IV.1 Tahapan Proses Dehidrasi	45
Tabel IV.2 Tahapan Proses Penjernihan	45
Tabel IV.3 Tahapan Proses Impregnasi	46
Tabel IV.4 Tahapan Pewarnaan HE	46
Tabel V.1 Hasil Karakterisasi Sediaan	49
Tabel V.2 Data Panjang dan Lebar Kripta	53



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Tabel Konversi Dosis	71
Lampiran 2 Perhitungan Konversi Dosis.....	72
Lampiran 3 Data Hasil Uji In vivo Probiotik pada Mencit yang Diinduksi Diare	73
Lampiran 4 Data Berat Badan Hewan Coba	76
Lampiran 5 Data Hasil Statistik <i>One Way Anova</i> Persentase Proteksi	77
Lampiran 6 Data Panjang Kripta	79
Lampiran 7 Data Lebar Kripta	80



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diare didefinisikan sebagai peningkatan volume atau fluiditas feses, perubahan konsistensi, dan peningkatan frekuensi buang air besar. Untuk tujuan diagnostik tidak digunakan pengukuran kandungan fluida feses, tetapi dilakukan penilaian frekuensi feses. WHO mendefinisikan diare sebagai bagian dari feses yang cair atau berair setidaknya tiga kali dalam jangka waktu 24 jam. Gangguan diare dapat dibagi menjadi akut dan kronis, sehingga dapat dibagi berdasarkan penyebab dan manajemen terkait. Diare akut, bentuk yang paling banyak ditemui dari penyakit diare, memiliki onset mendadak, sembuh dalam waktu 14 hari, dan sebagian besar disebabkan oleh infeksi. Diare kronis berlangsung selama sekurang-kurangnya 14 hari. Diare terjadi ketika adanya gangguan pada keseimbangan elektrolit dan transpor air akibat penurunan absorpsi dari lumen usus atau peningkatan sekresi air ke lumen. Peningkatan volume isi luminal merangsang aktivitas peristaltik, kemudian berkontribusi terhadap kehilangan cairan (Thapar *et al.*, 2004).

Diare dapat disebabkan oleh banyak hal, termasuk infeksi, radiasi, terapi antibiotik, dan penggunaan pipa makanan (Narayan, 2010). *Antibiotic-Associated Diarrhea* (AAD) adalah konsekuensi umum dari terapi antibiotik, yang terkait dengan penekanan atau eliminasi mikroorganisme usus yang sehat (Videlok *et al.*, 2012). AAD terjadi pada 5 sampai 39% dari pasien tergantung pada populasi dan jenis antibiotik, sekitar 5 sampai 10 persen dari pasien yang diobati dengan ampisilin, 10

sampai 25 persen amoksisilin-klavulanat, 15 sampai 20 persen cefixime, dan 2 sampai 5 persen lainnya sefalosporin, fluoroquinolon, azitromisin, klaritromisin, eritromisin, dan tetrasiklin (Chosidow, 2006). Antibiotik akan menurunkan metabolisme karbohidrat yang dapat difermentasi, menyebabkan berkurangnya asam lemak rantai pendek (sumber energi bakteri) dan peningkatan karbohidrat yang tidak dapat diabsorpsi dalam lumen usus. Peningkatan tekanan osmotik mengurangi penyerapan air dari usus dan mencairkan feses. Selain itu, perlindungan yang disediakan oleh mikroflora usus normal terganggu dan menyebabkan penurunan kemampuan usus untuk melawan kolonisasi oleh patogen (Hickson, 2011). Diagnosa laboratorium standar mengidentifikasi bahwa patogen merupakan satu dari tiga penyebab diare akut pada anak-anak dan dewasa. Diare yang disebabkan oleh *Clostridium difficile* merupakan yang paling umum dihubungkan dengan penggunaan antibiotik. Organisme ini ditemukan dalam jumlah kecil pada usus sehat namun gangguan mikroflora oleh terapi antibiotik mengakibatkan peningkatan, baik jumlah bakteri maupun produksi toksinnya, yang menyebabkan terjadinya diare (Narayan, 2010). Konsumsi probiotik telah dibuktikan dapat mengurangi resiko AAD (Chosidow, 2006).

Probiotik didefinisikan sebagai mikroorganisme hidup yang bila diberikan dalam jumlah yang tepat akan memberikan manfaat untuk kesehatan sel inang. Probiotik mempengaruhi ekosistem usus dengan merangsang mekanisme kekebalan mukosa dan merangsang mekanisme non imun melalui antagonisme dan kompetisi dengan patogen yang potensial. Diperkirakan hal tersebut memediasi efek menguntungkan dari probiotik, termasuk pengurangan kejadian dan keparahan diare, yang merupakan salah satu penggunaan paling diakui luas untuk probiotik. Telah

dikonfirmasi bahwa strain probiotik yang berbeda, termasuk *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730, *L. rhamnosus* GG, *L. casei* DN-114 001, dan *Saccharomyces cerevisiae* (*boulardii*) berguna dalam mengurangi keparahan dan durasi diare infeksi akut pada anak-anak. Pemberian probiotik oral memperpendek durasi penyakit diare akut pada anak sekitar 1 hari (Guarner et al., 2011). Studi klinis telah menunjukkan bahwa probiotik yang paling efektif untuk AAD adalah *Saccharomyces boulardii*, strain *Lactobacillus rhamnosus*, dan kombinasi probiotik yang mengandung spesies *Lactobacillus sp* dan *Bifidobacterium sp* (Videlok et al., 2012).

Bakteri yang umum digunakan dalam probiotik bakteri antara lain spesies *Lactobacillus spp*, *Bifidobacterium spp*, *Streptococcus spp*, *Lactococcus lactis* dan beberapa spesies *Enterococcus spp*. Pada manusia, lactobacilli dan bifidobacteria biasa ada dalam vagina dan saluran pencernaan, serta bifidobacteria juga terdapat di mulut. Probiotik ini bertindak sebagai bakteri komensal yang berkontribusi terhadap pemeliharaan lingkungan usus yang sehat (Howarth et al., 2013). Probiotik tidak selalu mengkolonisasi saluran usus untuk menimbulkan efek. Sebagai contoh, beberapa probiotik seperti *Bifidobacterium longum* menjadi bagian dari mikroflora usus manusia, sedangkan yang lain seperti *Lactobacillus casei* secara tidak langsung memberikan efek dengan *remodeling* atau mempengaruhi mikroba yang ada. *Lactobacillus rhamnosus* GG mampu mencegah sitokin yang menginduksi apoptosis pada model sel epitel usus dengan menghambat *tumor necrosis factor* (TNF). Spesies *Lactobacillus spp* telah terbukti dapat meningkatkan ekspresi mucin in vitro pada sel epitel usus manusia, sehingga menghalangi invasi dan pertahanan terhadap patogen *E. coli*. *S. boulardii* mengeluarkan faktor yang labil panas dan telah terbukti bertanggung jawab pada penurunan pertahanan bakteri. Beberapa

spesies *Lactobacillus* dapat mengekspresikan defensin tertentu yang mempunyai aktivitas antimikroba terhadap berbagai bakteri, jamur dan beberapa virus (Gogieni *et al.*, 2013).

Terdapat tiga jenis produk probiotik, yaitu probiotik monostrain, multistrain dan multispecies. Probiotik monostrain didefinisikan sebagai probiotik yang mengandung satu strain dari spesies tertentu. Probiotik multistrain berisi lebih dari satu strain dari spesies yang sama atau setidaknya dari genus yang sama (misalnya *Lactobacillus acidophilus* dan *Lactobacillus casei*). Sedangkan probiotik multispecies adalah probiotik yang mengandung lebih dari satu strain milik satu atau lebih genera (misalnya *L. acidophilus*, *Bifidobacterium longum*, *Enterococcus faecium* dan *Lactococcus lactis*) (Timmerman *et al.*, 2004). Kombinasi probiotik tertentu dapat meningkatkan persentase penghambatan adhesi patogen pada lendir usus bila dibandingkan dengan monostrain. Hal ini menunjukkan bahwa kombinasi dari strain probiotik lebih berguna dan efektif dari pada monostrain. Ada kemungkinan bahwa kombinasi ini dapat meningkatkan efek menguntungkan pada kesehatan terkait sifat penghambatan adhesi patogen dan pengaruhnya dalam kolonisasi (Collado *et al.*, 2006). Canani *et al.* (2007) juga membandingkan efikasi lima macam komposisi probiotik untuk pengobatan diare akut pada anak-anak, yaitu *Lactobacillus casei* (kelompok 2), *Saccharomyces boulardii* (kelompok 3), *Bacillus clausii* (kelompok 4), kombinasi *L. delbrueckii var bulgaricus*, *L. acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, serta *B. bifidum* (kelompok 5) dan *Enterococcus faecium* (kelompok 6). Didapatkan durasi dan frekuensi diare yang menurun pada kelompok dengan komposisi probiotik *Lactobacillus casei* (kelompok 2) dan kombinasi 4 strain bakteri (kelompok 5). Sedangkan ketiga kelompok lainnya mempunyai hasil yang kurang lebih

sama dengan kelompok kontrol, yaitu kelompok yang hanya menerima pengobatan rehidrasi oral. Dibandingkan dengan data kelompok kontrol, yaitu dengan rata-rata durasi diare 115,5 jam, kelompok 2 dan 5 menunjukkan penurunan durasi diare dengan rata-rata durasi diare berturut-turut 78,5 dan 70,0 jam. Hal tersebut menunjukkan adanya perbedaan efek antidiare pada berbagai komposisi probiotik.

Berdasarkan uraian di atas, maka perlu dilakukan penelitian pengaruh komposisi probiotik, yaitu probiotik monostrain, multistain dan multispecies, terhadap aktivitas antidiare pada hewan coba mencit (*Mus musculus*) yang diinduksi diare dengan penggunaan antibiotik. Diharapkan dapat diketahui penggunaan produk probiotik dengan komposisi probiotik optimal sehingga penyakit diare dapat ditangani dengan cara yang tepat. Perbedaan aktivitas antidiare dilihat berdasarkan karakteristik feses dan histopatologi usus. Karakteristik feses penting dalam menilai etiologi diare. Pengamatan frekuensi, volume, konsistensi, dan warna memberikan petunjuk diagnostik. Misalnya, diare yang dimulai di usus kecil menghasilkan feses berlebihan, berair atau berlemak (berminyak) dan berbau busuk, mengandung partikel makanan tercerna serta biasanya bebas dari darah kotor. Feses dari diare kolon berpenampakan kecil, pucat, dan kadang-kadang berdarah atau berlendir. Tenesmus rektal dengan flatus menyertai diare usus besar (Dipiro, 2008). Karakteristik diare dapat ditunjukkan pula dari perubahan morfologi usus walaupun lesinya tidak spesifik. Sebuah penelitian menunjukkan dari hasil analisis biopsi jejunum terdeteksi adanya hipotrofi mukosa jejunum dengan tingkatan ringan, sedang, dan berat terdeteksi pada 82% kasus, dan atrofi mukosa pada 12%. Pemeriksaan perbandingan yang lebih rinci menunjukkan bahwa ketebalan

mukosa lebih tipis pada anak-anak yang kekurangan gizi dengan diare berkepanjangan (Péret Filho et al., 1997).

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana pengaruh komposisi probiotik terhadap aktivitas antidiare berdasarkan karakteristik feses dan histopatologi usus pada mencit (*Mus musculus*) yang diinduksi diare?

1.3 Tujuan

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah

- a. Menentukan aktivitas antidiare dari tiga macam komposisi probiotik pada mencit yang diinduksi diare oleh antibiotik.
- b. Membandingkan komposisi yang paling efektif dalam mengatasi diare pada mencit akibat penggunaan antibiotik.

1.4 Manfaat

Memberikan informasi baru terkait aktivitas antidiare dari berbagai komposisi probiotik yang berguna untuk pemilihan produk probiotik yang tepat sebagai tindakan untuk mengatasi diare, terutama yang disebabkan oleh penggunaan antibiotik.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Diare

2.1.1 Definisi diare

Diare didefinisikan sebagai peningkatan volume atau fluiditas feces, perubahan konsistensi, dan peningkatan frekuensi buang air besar. Untuk tujuan diagnostik tidak digunakan pengukuran kandungan fluida feces, tetapi dilakukan penilaian frekuensi feces. WHO mendefinisikan diare sebagai bagian dari feces yang cair atau berair setidaknya tiga kali dalam jangka waktu 24 jam (Thapar *et al.*, 2004). Biasanya episode diare dimulai dengan tiba-tiba dan hilang dalam 1 atau 2 hari tanpa pengobatan, juga sering merupakan gejala dari penyakit sistemik (Dipiro, 2008).

2.1.2 Jenis Diare

Jenis diare dapat digolongkan menjadi dua, berdasarkan durasi dan berdasarkan gangguan patofisiologi. Berdasarkan durasi, diare dibagi menjadi diare akut dan diare kronis. Diare akut didefinisikan sebagai peningkatan jumlah tinja atau tekstur lebih lembek daripada biasanya untuk pasien, yang berlangsung kurang dari 2 minggu, dan sering dikaitkan dengan gejala perut seperti kram, kembung, dan kentut. Meskipun lebih sering ringan, diare akut dapat menyebabkan dehidrasi yang parah sebagai akibat dari kehilangan cairan dan elektrolit yang besar. Diare akut yang berair biasanya disebabkan oleh virus (virus gastroenteritis.) Obat-obatan seperti antibiotik dan obat-obatan yang mengandung produk magnesium juga merupakan penyebab umum. Perubahan pola makan juga dapat menyebabkan diare akut. Ini termasuk kopi, teh, cola, diet makanan, permen karet atau permen yang mengandung gula yang penyerapannya rendah.

Diare berdarah akut umumnya disebabkan bakteri seperti *Campylobacter*, *Salmonella* atau *Shigella*. Bepergian ke negara berkembang di dunia dapat mengakibatkan paparan bakteri patogen umum di daerah-daerah tertentu. Makan makanan yang terkontaminasi seperti daging sapi atau buah segar dapat menyebabkan diare karena *E.coli* 0157: H7. Kebanyakan diare akut selesai dengan cepat tanpa terapi antibiotik dan dengan modifikasi diet sederhana. Meskipun sebagian besar diare merupakan akut dan dapat diselesaikan dengan menyeluruh, diare dapat bertahan dan menyebabkan dengan nyeri perut atau gejala lainnya. Jika diare berlangsung lebih dari dua minggu, disebut diare kronis. Penting untuk melihat karakteristik feses, apakah diare berdarah, berminyak (lemak) atau berair, yang dapat membantu dokter mendiagnosa penyebab diare (Surawicz, 2007).

2.1.3 Etiologi Diare

Terdapat beberapa penyebab diare, termasuk infeksi, radiasi, terapi antibiotik, dan penggunaan tabung makanan. Laboratorium diagnostik standar mengidentifikasi bahwa patogen merupakan satu dari tiga penyebab dari kasus diare akut pada anak-anak dan orang dewasa. Antibakteri bertanggung jawab untuk sekitar 10% dari penyakit diare di negara-negara industri. Virus (terutama rotavirus) banyak menginfeksi bayi dan menyebabkan *food-borne gastroenteritis* dan *water-borne gastroenteritis* (norovirus) di semua kelompok umur. Protozoa kebanyakan adalah penyebab umum dari diare akut. Di negara berkembang, bakteri enteropatogen, terutama *Escherichia coli* enterotoksigenik, menyebabkan hanya kurang dari setengah kasus diare pediatrik endemik dan sekitar setengah dari semua kasus diare di kalangan wisatawan internasional daerah tersebut (Narayan *et al.*, 2010).

2.1.4 Patofisiologi Diare

Diare adalah ketidakseimbangan dalam absorpsi dan sekresi air dan elektrolit. Mungkin berkaitan dengan penyakit tertentu dari saluran gastrointestinal atau dengan penyakit luar saluran pencernaan. Empat mekanisme patofisiologis umum mengganggu keseimbangan elektrolit dan air yang menyebabkan diare yaitu perubahan transportasi aktif ion dengan baik menurun penyerapan natrium atau peningkatan sekresi klorida, perubahan motilitas usus, peningkatan osmolaritas luminal, dan peningkatan tekanan hidrostatik jaringan. Mekanisme ini telah terkait dengan empat kelompok diare yaitu sekretori, osmotik, eksudatif, dan perubahan transit usus (Dipiro, 2012).

a. Diare sekretori

Diare sekretori terjadi bila ada peningkatan jumlah cairan ke dalam lumen usus sehingga kemampuan usus untuk menyerap kembali menurun. Biasanya, infeksi adalah penyebab diare sekretori, tetapi juga dapat disebabkan adanya zat (sekretagog) yang menyebabkan penarikan cairan ke usus (Sisson, 2011). Sekretagog, seperti toksin cholera, terikat pada permukaan epitel usus sehingga menstimulasi akumulasi adenosine siklik monofosfat atau guanosin siklik monofosfat intraseluler. Juga terdapat banyak penyebab non-infeksi lainnya, termasuk yang dimediasi oleh peptida gastrointestinal (seperti peptida usus vasoaktif dan gastrin). Zat tertentu, seperti asam empedu, asam lemak, dan obat pencahar, juga dapat menghasilkan diare sekretorik. Diare tidak terkait dengan sekretagogue eksogen juga mungkin memiliki komponen sekretori (penyakit genetik inklusi mikrovillus) (Frank-briggs, 1999).

b. Diare osmotik

Diare osmotik terjadi bila ada disfungsi dalam kemampuan usus untuk menyerap kembali cairan yang mengalir melalui lumen, yang mungkin disebabkan oleh kerusakan atau malabsorpsi nutrisi di usus kecil dan memungkinkan massa yang lebih besar dan lebih cair untuk memasuki usus besar. Feses kemudian membuat gradien osmotik negatif menyebabkan kebocoran cairan lebih ke dalam usus sehingga meningkatkan volume feses. Penyebab dari jenis diare osmotik bervariasi antara lain ketersediaan enzimatis (intoleransi laktosa), kelainan genetik, atau hilangnya kemampuan tubuh untuk menyerap nutrisi tertentu, penyerapan gula yang buruk (sorbitol, manitol atau laktosa), konsumsi pencahar, antasida yang mengandung magnesium, amebiasis dan penggunaan antibiotik.

c. Perubahan transit usus

Selama fungsi usus normal, padatan dan cairan akan bergerak melalui usus dengan gelombang peristaltik otot polos dalam usus. Gerakan ini lambat dan massa mungkin memakan waktu 3-5 jam untuk bergerak dari katup pilorus pada titik proksimal dari usus kecil ke usus besar. Dan mungkin memakan waktu selama 24 jam untuk bergerak dari usus kecil ke rektum, dieksresikan saat buang air besar. Ketika usus tidak berfungsi normal, motilitas meningkat atau menurun, dan keduanya dapat menyebabkan diare. Peningkatan motilitas dapat disebabkan oleh infeksi, perubahan usus akibat inflamasi usus atau adanya sindrom iritasi usus besar. Hal tersebut meningkatkan motilitas yang menyebabkan transportasi feses lebih cepat melalui usus sehingga hanya ada sedikit kesempatan untuk penyerapan kembali cairan dari usus besar (Sisson, 2011).

Hipermotilitas dapat diamati pada orang yang mengalami operasi pengambian sebagian dari usus, sehingga waktu total untuk penyerapan nutrisi kurang. Motilitas yang dikaitkan dengan diare juga dapat disebabkan oleh vagotomy, neuropati diabetes, atau komplikasi menstruasi. Hipertiroidisme dapat menghasilkan hipermotilitas dan menyebabkan pseudodiare dan kadang-kadang *real diarrhea* (Frank-briggs, 1999).

d. Diare eksudatif

Diare eksudatif terjadi karena adanya inflamasi akut atau kronis, atau nekrosis mukosa usus yang disebabkan oleh bakteri, virus, jamur, protozoa, bahan kimia dan tumor, yang akan berakibat adanya produksi cairan dan produk inflamasi, termasuk hilangnya protein serum dan penurunan penyerapan cairan serta elektrolit. Contohnya adalah disentri babi, virus diare sapi dan keracunan arsenik anorganik. Ada juga bukti bahwa sekresi elektrolit aktif terjadi di enterocolitis karena salmonellosis di beberapa spesies hewan. Dalam penyakit disentri babi, permeabilitas usus besar dapat tetap normal atau bahkan menurun, namun penyerapan air dan elektrolit menurun. Hal ini menunjukkan bahwa penyebab utama kehilangan cairan dan elektrolit mungkin karena kegagalan epitel yang terkena untuk menyerap cairan dan elektrolit (Mohammed, 2010). Diare jenis ini termasuk dengan penyebab multifaktorial tetapi sebagian disebabkan peradangan mukosa, yang menyebabkan malabsorpsi. Zat yang tidak diabsorpsi menghasilkan beban osmotik dalam lumen usus yang mengakibatkan diare. Beberapa infeksi bakteri pada saluran pencernaan menyebabkan diare akibat produksi toksin. Contohnya yaitu enterotoksin yang dihasilkan oleh *Clostridium perfringens* dan

Clostridium difficile, dan *shiga-like toxin Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan spesies *Shigella sp* (Frank-briggs, 1999).

2.1.5 Pengobatan Diare

a. Terapi Non Farmakologi

Rehidrasi dan mempertahankan keseimbangan air serta elektrolit merupakan pengobatan primer sampai episode diare berakhir. Jika pasien mengalami depleksi volume, harus segera dilakukan rehidrasi untuk penggantian air dan elektrolit sampai komposisi dalam tubuh normal. Kemudian dilakukan pertahanan komposisi air dan elektrolit. Banyak pasien tidak mengalami depleksi volume sehingga hanya akan membutuhkan pertahanan cairan dan terapi elektrolit. Rute parenteral dan enteral dapat digunakan untuk memasok air dan elektrolit. Jika muntah dan dehidrasi tidak berat, rute enteral adalah metode yang lebih murah dan disukai. Karena kekhawatiran tentang hipernatremia, dokter memilih pasien untuk terus dirawat inap dan memperbaiki defisiensi cairan dan elektrolit secara intravena yang pada dehidrasi berat. Sangat dianjurkan menggunakan larutan oral atau *Oral Rehydration Solution* (ORS). Larutan oral yang direkomendasikan WHO kini telah diformulasikan untuk memiliki osmolaritas, kandungan natrium, dan beban glukosa lebih rendah. Larutan oral berbasis beras atau *rice-based oral solution* juga merupakan substrat yang aktif secara hiposmotik, yang melulusi glukosa tanpa meningkatkan feses atau urin. Rehidrasi pada bayi dengan diare akut menggunakan larutan oral berbasis beras merupakan terapi yang efektif. Hasilnya berupa penurunan jumlah feses, penyerapan yang lebih besar dan retensi cairan elektrolit (Dipiro, 2008).

b. Terapi Farmakologi

1. Adsorben

Kaolin dan pectin sering dikombinasi dalam bentuk suspensi, dan produknya sering dikombinasi dengan antibiotik, vitamin, atau obat-obatan lain. Kaolin diklaim dapat mengabsorpsi toksin, mempengaruhi flora bakteri, dan dapat “menyelimuti” lapisan usus sehingga menghasilkan “*general protective effect*”. Kaolin tidak mempunyai efek bakterisidal dan tidak memiliki kemampuan untuk mengadsorpsi bakteri. Dinyatakan bahwa kemampuan kaolin-pektin untuk berikatan dengan asam empedu adalah mekanisme lain untuk efek antidiare yang ditimbulkan.

Attapulgit dan smectite, *mineral clay* yang hampir sama dengan kaolin dalam hal komposisi, merupakan obat antidiare yang melindungi mukosa usus dan mengikat toksin bakteri. Walaupun dengan penggunaannya terdapat pengaruh pada konsistensi dan penampakan feses, namun tidak ada bukti yang cukup bahwa attapulgit dan smectite dapat mempengaruhi hilangnya cairan dan elektrolit pada diare akut. Dan seperti adsorben pada umumnya, dapat berikatan dan menginaktivasi obat lain.

Adsorben lain yaitu karbon aktif (*activated charcoal*). Karbon aktif mengadsorpsi dan menginaktivasi beberapa senyawa organik dan non organik bahkan ketika digunakan beberapa jam setelah pencernaannya. Karena erat mengikat obat dan racun dalam lumen usus, karbon aktif menciptakan gradien konsentrasi yang mempermudah difusi senyawa dari sirkulasi sistemik kembali ke

lumen usus. Karkoal dapat digunakan sebagai terapi tambahan untuk rehidrasi oral pada pengobatan diare akut (WHO, 1990).

2. Antagonis Opioid

Opioid memiliki efek konstipasi yang signifikan. Opioid bekerja melalui penghambatan saraf kolinergik presinaptik di submukosa dan plexus myenterik sehingga menyebabkan peningkatan waktu transit feses dalam kolon dan penyerapan air. Opioid juga menurunkan gerakan massa feses dalam kolon dan refleks gastrokolik. Meskipun semua opioid memiliki efek antidiare, efek pada sistem saraf pusat dan potensi kecanduan sangat membatasi penggunaannya. Loperamid merupakan agonis opioid non preskripsi yang tidak melewati sawar darah otak dan tidak memiliki sifat analgesik atau potensi untuk kecanduan. Toleransi untuk penggunaan jangka panjang belum dilaporkan. Loperamid biasanya diberikan dalam dosis 2 mg 1-4 kali sehari. Difenoksilat adalah agonis opioid yang tidak memiliki sifat analgesik dalam dosis lazim. Namun, dengan dosis yang lebih tinggi akan memiliki efek sistem saraf pusat, dan penggunaan jangka panjang dapat menyebabkan ketergantungan. Sediaan umumnya mengandung sejumlah kecil atropin untuk mencegah overdosis (2,5 mg difenoksilat dengan 0,025 mg atropin). Sifat antikolinergik atropin dapat berkontribusi pada efek antidiare.

3. Senyawa Bismuth Koloid

Mekanisme kerja yang tepat dari bismut belum diketahui. Bismuth subsalisilat mengurangi frekuensi dan likuiditas feses pada diare infeksi akut, karena penghambatan prostaglandin dalam usus oleh salisilat dan sekresi klorida. Senyawa bismuth

non preskripsi (misalnya, Pepto-Bismol, Kaopectate) secara luas digunakan oleh pasien untuk pengobatan dispepsia nonspesifik dan diare akut. Bismuth subsalisilat juga digunakan untuk pencegahan diare pada orang bepergian (30 mL atau 2 tablet empat kali sehari).

4. Resin Pengikat Garam Empedu

Garam empedu terkonjugasi biasanya diserap di ileum terminal. Penyakit ileum terminal (misalnya penyakit Crohn) atau reseksi bedah menyebabkan malabsorpsi garam empedu, yang dapat menyebabkan diare sekretorik kolon. Resin pengikat garam empedu seperti cholestyramine, colestipol, atau colesevelam, dapat menurunkan diare yang disebabkan oleh berlebihnya asam empedu dalam feses. Produknya tersedia dalam formulasi puyer dan pil yang dapat dikonsumsi satu sampai tiga kali sehari sebelum makan. Efek samping yang ditimbulkan antara lain kentut, perut kembung, konstipasi, dan impaksi feses. Pada pasien dengan menurunnya sirkulasi asam empedu, klirens lebih lanjut dari asam empedu dapat menyebabkan eksaserbasi dari malabsorpsi lemak. Cholestyramine dan colestipol mengikat sejumlah obat dan mengurangi absorpsinya. Karenanya, tidak harus diberikan dalam waktu 2 jam dari obat lain. Colesevelam tampaknya tidak memiliki efek signifikan pada absorpsi obat lain.

5. Octreotide

Octreotide menghambat sekresi pada usus dan memiliki efek yang terkait dosis pada motilitas usus. Dalam dosis rendah (50 mcg subkutan) efeknya merangsang motilitas, sedangkan pada

dosis yang lebih tinggi (misalnya, 100-250 mcg subkutan) mempunyai efek menghambat motilitas. Octreotide efektif dalam dosis tinggi untuk pengobatan diare yang disebabkan karena sindrom vagotomy atau *dumping* serta untuk diare yang disebabkan oleh *short bowel syndrome* atau AIDS (Katzung, 2012).

6. Antibiotik

Beberapa antibiotik yang digunakan dalam terapi diare antara lain:

Tabel II.1 Antimikroba yang digunakan pada pengobatan diare dengan penyebab tertentu (WHO, 1990)

Penyebab	Pilihan Antibiotik	Alternatif
Cholera	Tetrasiklin 12,5 mg/kg BB empat kali sehari selama 3 hari	Furazolidone 12,5 mg/kg BB empat kali sehari selama 3 hari
Shigella disentri	Trimetoprim (TMP) – Sulfametoksazol (SMX) TMP 5 mg/kg BB dan SMZ 25 mg/kg BB dua kali sehari selama 5 hari	Nalidixic acid 15 mg/kg BB empat kali sehari selama 5 hari atau Ampisilin 25 mg/kg BB empat kali sehari selama 5 hari

Amoebiasis	Metronidazol 10 mg/kg BB tiga kali sehari selama 5 hari (10 hari untuk penyakit yang parah)	Injeksi IM Dehydroemetine HCl 1-1,5 mg/kg BB (maksimum 90 mg) selama lebih dari 5 hari, tergantung respon
Giardiasis	Metronidazol 5 mg/kg BB tiga kali sehari selama 5 hari	Quinacrine 2,5 mg/kg BB tiga kali sehari selama 5 hari

7. Probiotik

Diperkirakan bahwa 100 spesies yang berbeda (dengan total populasi bakteri antara 10^{10} dan 10^{12}) ada dalam saluran usus manusia. Komposisi flora saluran pencernaan bervariasi antar individu dan juga dalam individu yang sama selama hidup. Saluran pencernaan mengandung bakteri baik dan patogen yang ada dalam simbiosis kompleks. Berbagai faktor seperti diet, iklim, penuaan, obat-obatan (terutama konsumsi antibiotik), penyakit, stres, dan gaya hidup dapat mengganggu keseimbangan ini dan menyebabkan diare, inflamasi mukosa, atau penyakit serius lainnya. Pemeliharaan keseimbangan flora usus optimal mengharuskan bakteri baik, seperti lactobacilli Gram-positif dan bifidobacteria mendominasi (> 85% dari total bakteri), membentuk penghalang untuk bakteri patogen. Probiotik adalah mungkin cara yang paling alami dan aman menjaga

keseimbangan ini (Narayan *et al.*, 2010). Potensi probiotik dalam meningkatkan pengobatan diare baik dengan memperpendek durasi dan/atau mencegah komplikasinya telah cukup luas diperiksa di sejumlah besar percobaan klinis menggunakan strain, dosis, dan metode analisis yang berbeda (Guandalini, 2011).

Sebuah hasil penelitian dari aktivitas antidiare dari probiotik dengan komposisi *Lactobacillus acidophilus* dan *Bifidobacterium infantis* menunjukkan adanya penurunan durasi diare, yaitu $3,1 \pm 0,7$ hari pada kelompok perlakuan dan rata-rata durasi diare $3,6 \pm 0,8$ hari pada kelompok kontrol (Lee *et al.*, 2001). Sedangkan penggunaan probiotik multistrain dengan komposisi *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. bulgaricus*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis* dan *Streptococcus thermophilus* yang dikombinasi dengan prebiotik FOS, atau disebut juga produk sinbiotik, juga menunjukkan penurunan rata-rata *stool remission time*, yaitu pada kelompok kontrol 74,94 jam dan pada kelompok perlakuan 41,53 jam (Ahmed *et al.*, 2014). Selain itu, Canani *et al.* (2007) juga membandingkan efikasi lima macam komposisi probiotik untuk pengobatan diare akut pada anak-anak, yaitu *Lactobacillus casei* (kelompok 2), *Saccharomyces boulardii* (kelompok 3), *Bacillus clausii* (kelompok 4), kombinasi *L. delbrueckii var bulgaricus*, *L. acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, serta *B. bifidum* (kelompok 5) dan *Enterococcus faecium* (kelompok 6). Didapatkan durasi dan frekuensi diare yang menurun pada kelompok dengan komposisi probiotik *Lactobacillus casei* (kelompok 2) dan kombinasi 4 strain bakteri (kelompok 5).

Sedangkan ketiga kelompok lainnya mempunyai hasil yang kurang lebih sama dengan kelompok kontrol, yaitu kelompok yang hanya menerima pengobatan rehidrasi oral. Dibandingkan dengan data kelompok kontrol yaitu rata-rata durasi diare 115,5 jam, kelompok 2 dan 5 menunjukkan penurunan durasi diare dengan rata-rata durasi diare berturut-turut 78,5 dan 70,0 jam

Mikroflora usus terdiri dari banyak strain dari bakteri dan jamur yang berbeda. Sayangnya, identitas spesifik strain tertentu dari mikroflora yang bertanggung jawab untuk resistensi kolonisasi tidak diketahui, sehingga pemilihan strain untuk menyertakan dalam campuran probiotik tidak pasti.

8. Zinc

Zinc direkomendasikan oleh WHO dan UNICEF sebagai terapi ajuvan dengan ORS pada pengobatan diare. Pada pasien anak-anak dengan SAM (*Severe Acute Malnutrition*), suplemen Zinc direkomendasikan untuk diberikan setiap hari setidaknya selama dua minggu (2 mg/kg BB/hari) (Manary, 2012).

2.1.6 *Antibiotic Associated Diarrhea* (AAD)

a. Definisi dan Antibiotik Penyebab AAD

Diare adalah komplikasi umum dari antibiotik. Hal ini terjadi pada 5 sampai 39% dari pasien tergantung pada populasi dan jenis antibiotik. Diare terjadi pada sekitar 5 sampai 10 persen dari pasien yang diobati dengan ampisilin, 10 sampai 25 persen amoksisilin-klavulanat, 15 sampai 20 persen cefixime, dan 2 sampai 5 persen lainnya sefalosporin, fluoroquinolon, azitromisin, klaritromisin, eritromisin, dan tetrasiklin. Tingkat diare terkait antibiotik yang

diberikan secara parenteral, terutama yang mempunyai sirkulasi enterohepatik, mirip dengan persentase antibiotik oral (Chosidow, 2002). Pasien dewasa di atas usia 65 tahun diketahui merupakan penderita terbesar (Hammer *et al.*, 1998).

Berbagai jenis antibiotik memiliki berbagai tingkat AAD, yang mungkin disebabkan karena dua faktor, yaitu spektrum aktivitas terhadap mikrobiota normal dan tingkat absorpsi dari saluran usus. Antibiotik dengan spektrum sempit memiliki tingkat AAD yang rendah dan antibiotik dengan spektrum luas, terutama yang mempengaruhi mikrobiota normal anaerob, berhubungan dengan tingkat AAD yang lebih tinggi. Tingkat penyerapan dapat mempengaruhi tingkat AAD. Antibiotik yang kurang diabsorpsi di usus atau disekresikan dalam empedu (seperti clyndamicin, cefixime, ceftriaxone atau cefoperatzone) berhubungan dengan tingginya tingkat AAD. Antibiotik dengan absorpsi yang tinggi, seperti doxycycline dan cefaclor, memiliki tingkat AAD yang lebih rendah (McFarland, 2008).

Sebuah penelitian jenis eksperimental dengan hewan coba mencit yang dilakukan oleh Hammami (2015), kanamisin yang diberikan secara intragastrik dapat menginduksi gangguan mikrobiota usus pada mencit. Semua mencit yang menerima antibiotik mengalami diare ringan dengan kadar air yang tinggi dari feses, dibandingkan dengan kontrol. Penelitian lain menyebutkan seekor kelinci dengan berat badan 4 kg diberi 75 mg amoksisilin injeksi *long acting*. Dua hari kemudian terjadi *circulatory collapse* dan diare. Pada nekropsi, cecum terlihat membesar, feses yang cair dan mukosa yang hemoragik. Pemeriksaan histologi dari sekum menunjukkan

perdarahan, ulserasi mukosa dan invasi heterofil dari lamina propria dan permukaan epitel, mirip dengan lesi dilaporkan dalam klindamisin menginduksi radang usus (Morris, 1995).

b. Mekanisme AAD

Mekanisme antibiotik menyebabkan AAD adalah gangguan komposisi dan fungsi dari flora normal usus, pertumbuhan berlebih oleh mikroorganisme patogen, efek alergi dan toksik antibiotik pada mukosa usus atau efek farmakologis pada motilitas (Hammer *et al.*, 1998). Antibiotik mengganggu mikroflora normal kolon dan akibatnya mengganggu metabolisme karbohidrat dan aktivitas antimikroba dalam usus besar, berpotensi menyebabkan diare osmotik atau diare yang disebabkan oleh bakteri patogen. Pertama, antibiotik menurunkan metabolisme karbohidrat yang dapat difermentasi, menyebabkan berkurangnya asam lemak rantai pendek (sumber energi bakteri) dan peningkatan karbohidrat yang tidak dapat diabsorpsi dalam lumen usus. Peningkatan tekanan osmotik mengurangi penyerapan air dari usus dan mencairkan feses. Kedua, perlindungan yang disediakan oleh mikroflora usus normal terganggu dan menyebabkan penurunan kemampuan usus untuk melawan kolonisasi oleh patogen (Hickson, 2011). Resistensi kolonisasi merupakan kemampuan mikrobiota yang normal untuk menahan pertumbuhan berlebih dari organisme patogen. Resistensi kolonisasi bekerja pada beberapa tingkat dalam lumen usus: mikrobiota yang normal bersaing untuk nutrisi mikroba, menghasilkan bakteriosin dan melindungi tempat pelakatan patogen atau toksin. Resistensi kolonisasi adalah hasil dari interaksi yang

kompleks dari banyak spesies bakteri, yang dapat terganggu oleh adanya antibiotik. Sekali resistensi kolonisasi telah terganggu, pertumbuhan berlebih oleh patogen oportunistik mungkin terjadi (McFarland, 2008).

Diare yang disebabkan oleh *Clostridium difficile* merupakan yang paling umum dihubungkan dengan penggunaan antibiotik. Organisme ini ditemukan dalam jumlah kecil pada usus sehat namun gangguan mikroflora oleh terapi antibiotik mengakibatkan peningkatan baik jumlah bakteri maupun produksi toksinnya, yang menyebabkan terjadinya diare (Narayan, 2010). Lesi inflamasi akibat infeksi *C. difficile* yang paling konsisten dan signifikan teramati pada cecum, terkadang teramati pada kolon, tetapi jarang pada usus kecil (Sun *et al.*, 2011). *C. difficile* menyebabkan 25% dari kasus AAD, sehingga merupakan patogen yang banyak teridentifikasi dan disembuhkan pada kondisi ini. *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella oxytoca*, *Candida spp* dan *Salmonella spp* hanya sedikit terlibat. Probiotik telah dibuktikan berguna dalam pencegahan dan penyembuhan AAD (Narayan, 2010). Satu percobaan menguji minuman fermentasi dengan campuran *Lactobacillus casei* DN-114001, *Streptococcus thermophilus* dan *Lactobacillus bulgaricus* terhadap kontrol *milkshake*. Perlakuan penelitian diberikan secara acak untuk orang dewasa usia lebih dari 50 tahun dirawat di rumah sakit dengan antibiotik selama penggunaan antibiotik dan minggu tambahan. Pengamatan perkembangan pasien tetap diikuti pada empat minggu tambahan untuk *Antibiotic Associated Diarrhea* (AAD). Para pasien diberikan campuran probiotik dilaporkan secara signifikan berkurangnya AAD

(12,3%, $P < 0,05$) dibandingkan dengan kontrol (33,9%). Tidak ada efek samping yang dilaporkan. (McFarland, 2009)

c. Manajemen Terapi AAD

Terapi dengan metronidazole atau vancomisin biasanya efektif untuk digunakan, tapi umumnya terjadi kekambuhan (Narayan, 2010). Namun metronidazole merupakan terapi pilihan (*drug of choice*) untuk AAD dengan dosis anak-anak 20-40 mg/kg BB/hari terbagi menjadi 3 dosis (Silva *et al.*, 2006). Untuk dosis dewasa, metronidazole biasanya digunakan secara oral dengan dosis 250-500 mg empat kali sehari atau 500-750 mg tiga kali sehari selama 7 – 10 hari. Terapi oral dengan metronidazole atau vancomycin biasanya hanya diberikan 7 sampai 10 hari, kecuali keadaan parah atau diare lambat untuk disembuhkan. Pasien yang memerlukan terapi selama lebih dari hari 10 sering memiliki kolitis berat, atau keterlambatan dalam diagnosis dan pengobatan radang usus, atau kondisi yang mendasarinya predisposisi diare, seperti intoleransi laktosa, penyakit iritasi usus, enteropati diabetes, atau diare akibat yang merugikan reaksi terhadap obat atau diet (Fekety, 1997).

2.2 Probiotik

2.2.1 Definisi Probiotik

Probiotik adalah mikroorganisme hidup yang bila diberikan dalam jumlah yang tepat akan memberikan manfaat untuk kesehatan sel inang. Probiotik dapat diformulasikan menjadi berbagai macam produk, termasuk makanan, obat, dan suplemen makanan. Spesies *Lactobacillus spp* dan *Bifidobacterium spp* merupakan yang paling umum digunakan sebagai probiotik, tapi jamur *Saccharomyces cerevisiae*, beberapa *E.coli* dan spesies

Bacillus spp juga digunakan (Guarner et al., 2011). Selain alasan keamanan, pemilihan strain probiotik juga terutama dari potensinya untuk memberikan manfaat kesehatan bagi manusia. Secara umum, untuk pengaplikasian pada makanan, probiotik harus bertahan hingga mencapai bagian dari saluran cerna dimana efeknya diinginkan bekerja. Misalnya, bila diinginkan aktif di usus besar, probiotik harus bertahan dari aktivitas enzim saliva, asam lambung, sekresi enzim dan empedu usus kecil serta perubahan pH dan lingkungan kimia lain yang akan dihadapi selama perjalanan di sepanjang saluran cerna. Selain itu, probiotik harus bersaing dengan mikrobiota tubuh. Dan strain yang dipilih juga harus memenuhi sejumlah persyaratan teknologi, seperti kemampuan untuk dikultur dalam skala besar, stabilitas genetik dan terjaganya viabilitas dalam produk makanan atau suplemen. Dengan demikian, identifikasi strain probiotik yang layak studi lebih lanjut adalah proses yang sangat kompleks dan rinci serta membutuhkan usaha penelitian yang besar (Gray, 2006).

Tabel II.2 Spesies mikroorganisme yang telah diidentifikasi sebagai mikroflora probiotik (Marshall, 2007)

Mikroflora	Spesies
Lactobacilli	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
	<i>Lactobacillus reuteri</i>
	<i>Lactobacillus casei</i>
	<i>Lactobacillus gasseri</i>
	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
Bifidobacteria	<i>Bifidobacterium bifidum</i>

	<i>Bifidobacterium longum</i>
	<i>Bifidobacterium breve</i>
	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>
	<i>Bifidobacterium infantis</i>
Enterococci	<i>Enterococcus faecalis</i>
	<i>Enterococcus faecium</i>
Yeast	<i>Saccharomyces boulardii</i>
Lactococci	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>

2.2.2 Mekanisme Kerja

Efek menguntungkan dari probiotik kemungkinan merupakan hasil dari beberapa mekanisme interaksi yang kompleks, yang akan ada perbedaan untuk strain dan tempat aksi yang berbeda. Mekanismenya antara lain kompetisi untuk mengikat tempat aksi pada dinding usus, kompetisi untuk nutrisi esensial, produksi zat antimikroba, stimulasi produksi musin, stabilisasi pertahanan usus, peningkatan transit usus, metabolisme nutrisi menjadi asam lemak volatil, dan immunomodulasi (stimulasi imun dan imunoregulasi). Beberapa mekanisme ini telah dibuktikan melalui percobaan laboratorium atau model hewan dan tidak dibuktikan pada manusia (Sanders *et al.*, 2007).

Probiotik tidak selalu mengkolonisasi saluran usus untuk menimbulkan efek. Sebagai contoh, beberapa probiotik seperti *Bifidobacterium longum* menjadi bagian dari mikroflora usus manusia, sedangkan yang lain seperti *Lactobacillus casei* secara tidak langsung memberikan efek dengan *remodeling* atau mempengaruhi mikroba yang ada. *Streptococcus thermophiles* meringankan diare yang disebabkan toleransi

laktosa dengan produksi enzim lactase (Vonk *et al.*, 2012). Berikut ini adalah mekanisme kerja utama dari probiotik pada inang.

a. Perubahan komposisi mikrobiota

Penggunaan probiotik memiliki potensi untuk menggeser komposisi mikrobiota dari dominasi patogen menjadi ekosistem mikrobiota yang lebih menguntungkan. Namun, karena kolonisasi probiotik hanya bersifat sementara, komposisi mikroba dari mikrobiota cenderung kembali normal jika penggunaan probiotik dihentikan. Pemberian probiotik (*Bifidobacterium sp* dan *Lactobacillus sp*) selama 7 hari setelah operasi laparoskopi radikal elektif pada pasien kanker kolorektal telah terbukti secara signifikan mengembalikan komposisi mikrobiota usus pada sampel tinja, yang diukur dengan peningkatan kadar *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, dan *Enterococcus*, serta mengurangi jumlah *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* (Howarth *et al.*, 2013).

b. Fungsi pertahanan

Probiotik mampu banyak mempengaruhi komponen dari fungsi pertahanan epitel, baik dengan mengurangi apoptosis sel-sel usus atau peningkatan produksi musin. Spesies *Lactobacillus* telah terbukti secara *in vitro* dapat meningkatkan ekspresi musin pada sel epitel usus manusia, sehingga menghalangi invasi dan pelekatan patogen *E. coli*. *Lactobacillus rhamnosus GG* mampu mencegah sitokin yang menginduksi apoptosis pada model sel epitel usus dengan menghambat *Tumor Necrosis Factor* (TNF). *Lactobacillus rhamnosus GG* mempunyai aktivitas mencegah inflamasi dan pengaturan kematian sel dari sel-sel epitel yang melapisi usus dan terbukti menimbulkan efek mitogenik dan meningkatkan regenerasi mukosa (Gogineni *et al.*, 2013).

c. Produksi zat antimikroba

Beberapa bakteri probiotik telah terbukti menghasilkan berbagai zat antimikroba termasuk asam organik (asam laktat dan asam asetat), hidrogen peroksida, karbon dioksida, dan diacetyl, bakteriosin, serta defensin. Asam laktat dan asetat menghambat mikroba dengan menurunkan pH usus, yang menghambat metabolisme bakteri. Hidrogen peroksida menghambat pertumbuhan bakteri gram positif dan negatif. Diacetyl mempunyai efek menghambat pertumbuhan mikroba dengan mengganggu penggunaan arginin atau dengan bereaksi dengan protein yang mengikat arginin (Sanders *et al.*, 2007). Bakteriosin, yang diproduksi oleh bakteri gram positif (laktasin B dari *L. acidophilus*, plantarisin dari *L. plantarum* dan nisin dari *Lactococcus lactis*) mempunyai aktivitas antibakteri dengan spektrum sempit (Bermudez-Brito *et al.*, 2012). Defensin dihasilkan oleh beberapa spesies *Lactobacillus* (Gogineni *et al.*, 2013). Strain *Bifidobacterium infantis* telah dibuktikan dapat memproduksi zat antimikroba, berkaitan dengan produksi asam, yang menghambat pertumbuhan patogen. Dua strain bifidobacteria dapat memproduksi faktor lipofilik antibakteri (atau beberapa faktor) dengan perkiraan berat molekul kurang dari 3500 (Picard *et al.*, 2005).

d. Kompetisi untuk beradhesi dengan sel epitel

Mekanisme kerja probiotik salah satunya yaitu menghambat adhesi bakteri pada permukaan mukosa dan sel epitel. *Lactococcus lactis ssp. lactis* BGKP1 memiliki protein pengikat musin (MbpL atau *mucin-binding protein* dari *Lactococcus sp*) pada permukaannya, yang memberikan sifat pelekatan dalam usus *in vivo* dan *in vitro*. Selain itu, MbpL pada permukaan *Lactococcus lactis ssp. lactis* BGKP1 mempunyai afinitas yang lebih besar untuk terikat pada protein musin lambung. Selain itu, transaldolase, protein

pengikat permukaan musin, yang terdapat pada permukaan spesies *Bifidobacterium bifidum* bertindak sebagai faktor kolonisasi yang penting, berpotensi membantu adhesi *B.bifidum* ke usus (Howarth *et al.*, 2013). *S. boulardii* mengeluarkan faktor labil panas yang telah terbukti menurunkan adhesi bakteri (Gogineni *et al.*, 2013).

e. Modulasi sistem imun

Penggunaan probiotik bisa menjadi strategi untuk memodulasi ekosistem usus yang terganggu. Pemberian probiotik tertentu dapat meningkatkan imunitas. Misalnya, suplementasi diet dengan *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* 8481 selama 6 bulan meningkatkan respon kekebalan pada orang lanjut usia, dengan meningkatkan jumlah sirkulasi sel NK dan subset sel T yang belum matang. Probiotik *Lactobacillus plantarum* NCC1107 telah dilaporkan dapat mengurangi peradangan paru-paru pada tikus dengan mengurangi jumlah sel inflamasi, eotaksin dan IL-5 (Howarth *et al.*, 2013). *L. casei* menunjukkan kemampuan untuk meningkatkan kadar IgA sekretorik yang spesifik patogen tertentu saat infeksi pada tikus dengan merangsang kelas sel B menjadi IgA. (Gogineni *et al.*, 2013).

2.2.3 Efek Samping Probiotik

Penggunaan probiotik dapat menyebabkan gangguan keseimbangan antara bakteri gram positif dan gram negatif dalam flora usus, yang mungkin diinduksi oleh penggunaan bakteri gram positif dalam probiotik seperti lactobacilli dan bifidobacterium yang memiliki pertumbuhan lebih kuat daripada bakteri gram negatif. Ketidakseimbangan ini mungkin mengakibatkan asidosis metabolik D-laktat, sebagai akibat dari metabolisme karbohidrat oleh bakteri (Qureshi, 2010).

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 Uraian Kerangka Konseptual

Diare terjadi ketika adanya gangguan pada keseimbangan elektrolit dan transpor air akibat penurunan absorpsi dari lumen usus atau peningkatan sekresi air ke lumen. Peningkatan volume isi luminal merangsang aktivitas peristaltik, kemudian berkontribusi terhadap kehilangan cairan (Thapar *et al.*, 2004). Empat mekanisme patofisiologis umum pengganggu keseimbangan elektrolit dan air yang menyebabkan diare yaitu perubahan transportasi aktif ion dengan baik menurunnya penyerapan natrium atau peningkatan sekresi klorida, perubahan motilitas usus, peningkatan osmolaritas luminal, dan peningkatan tekanan hidrostatik jaringan. Mekanisme ini telah terkait dengan empat kelompok diare yaitu sekretori, osmotik, eksudatif, dan perubahan transit usus (Dipiro, 2012).

Diare sekretori terjadi bila ada peningkatan jumlah cairan ke dalam lumen usus sehingga kemampuan usus untuk menyerap cairan kembali menurun. Biasanya, infeksi adalah penyebab diare sekretori, tetapi juga dapat disebabkan adanya zat (sekretagog) yang menyebabkan penarikan cairan ke usus, seperti toksin cholera. Perubahan transit usus termasuk peningkatan maupun penurunan motilitas usus dapat menyebabkan diare. Peningkatan motilitas menyebabkan transportasi feces lebih cepat melalui usus sehingga hanya ada sedikit kesempatan untuk penyerapan kembali cairan dari usus besar. Hipertiroidisme dapat menghasilkan hipermotilitas dan menyebabkan pseudodiare dan kadang-kadang *real diarrhea* (Sisson, 2011; Frank-briggs, 1999). Sedangkan mekanisme antibiotik menyebabkan diare yaitu antibiotik akan menurunkan metabolisme karbohidrat yang dapat difermentasi, menyebabkan berkurangnya asam lemak rantai pendek

(sumber energi bakteri) dan peningkatan karbohidrat yang tidak dapat diabsorpsi dalam lumen usus. Peningkatan tekanan osmotik mengurangi penyerapan air dari usus dan mencairkan feses, menyebabkan diare osmotik. Selain itu, perlindungan yang disediakan oleh mikroflora usus normal terganggu dan menyebabkan penurunan kemampuan usus untuk melawan kolonisasi oleh patogen (Hickson, 2011). Toksin yang diproduksi oleh bakteri patogen seperti *Clostridium perfringens* dan *Clostridium difficile*, dan *shiga-like toxin Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Shigella sp* menyebabkan diare disebabkan peradangan mukosa, yang menyebabkan malabsorpsi. Zat yang tidak diabsorpsi menghasilkan beban osmotik dalam lumen usus yang mengakibatkan diare eksudatif (Frank-briggs, 1999).

Antibiotic-Associated Diarrhea (AAD) adalah konsekuensi umum dari terapi antibiotik, yang terkait dengan penekanan atau eliminasi mikroorganisme usus yang sehat (Videlok *et al.*, 2012). AAD terjadi pada 5 sampai 39% dari pasien tergantung pada populasi dan jenis antibiotik, sekitar 5 sampai 10 persen dari pasien yang diobati dengan ampisilin, 10 sampai 25 persen amoksisilin-klavulanat, 15 sampai 20 persen cefixime, dan 2 sampai 5 persen lainnya sefalosporin, fluoroquinolon, azitromisin, klaritromisin, eritromisin, dan tetrasiklin. Konsumsi probiotik telah dibuktikan dapat mengurangi resiko AAD (Chosidow, 2006).

Probiotik mempengaruhi ekosistem usus dengan merangsang mekanisme kekebalan mukosa dan merangsang mekanisme non imun melalui antagonisme dan kompetisi dengan patogen yang potensial. Diperkirakan hal tersebut memediasi efek menguntungkan dari probiotik, termasuk pengurangan kejadian dan keparahan diare, yang merupakan salah satu penggunaan paling diakui luas untuk probiotik. (Guarner *et al.*, 2011) Bakteri yang umum digunakan dalam probiotik bakteri antara lain spesies

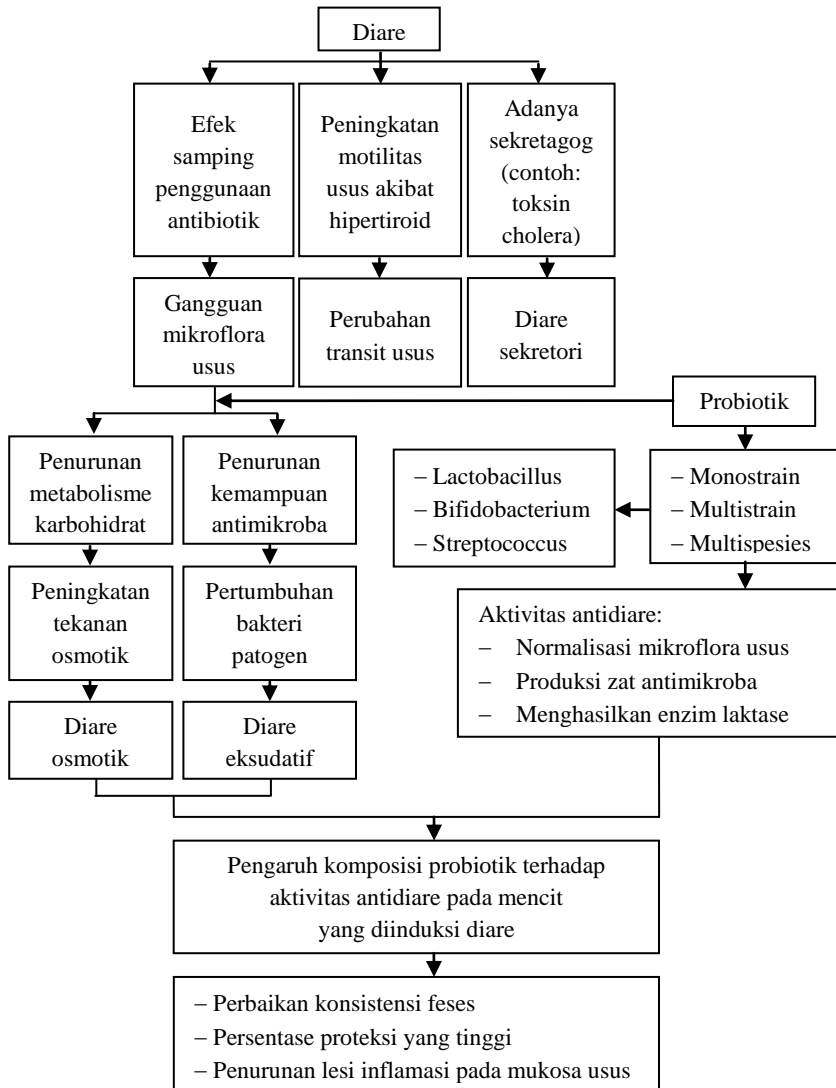
Lactobacillus spp, *Bifidobacterium spp*, *Streptococcus spp*, *Lactococcus lactis* dan beberapa spesies *Enterococcus spp*. (Gogieni *et al.*, 2013) Terdapat tiga jenis produk probiotik, yaitu probiotik monostrain, multistrain dan multispecies. Probiotik monostrain didefinisikan sebagai probiotik yang mengandung satu strain dari spesies tertentu, probiotik multistrain berisi lebih dari satu strain dari spesies yang sama atau setidaknya dari genus yang sama, sedangkan probiotik multispecies adalah probiotik yang mengandung lebih dari satu strain milik satu atau lebih genera. (Timmerman *et al.*, 2004)

Kombinasi probiotik tertentu dapat meningkatkan persentase penghambatan adhesi patogen pada lendir usus bila dibandingkan dengan monostrain. Hal ini menunjukkan bahwa kombinasi dari strain probiotik lebih berguna dan efektif dari pada monostrain terkait sifat penghambatan adhesi patogen dan pengaruhnya dalam kolonisasi (Collado *et al.*, 2006). Perbandingan efikasi lima macam komposisi probiotik menunjukkan bahwa probiotik dengan komposisi kombinasi mempunyai aktivitas anti diare terbaik dibandingkan dengan komposisi tunggal. Hal tersebut ditunjukkan dengan rata-rata durasi diare yang menurun signifikan dibanding kelompok kontrol yang hanya menerima perlakuan rehidrasi oral (Canani *et al.*, 2007). Hal tersebut menunjukkan adanya perbedaan aktivitas antidiare dengan adanya perbedaan komposisi probiotik sehingga perlu dilakukan penelitian pengaruh komposisi probiotik terhadap aktivitas antidiare pada mencit yang diinduksi diare dengan penggunaan antibiotik. Diharapkan dapat diketahui komposisi probiotik yang optimal dalam memperbaiki kondisi diare terutama melalui efek langsung dan tidak langsung pada mikrobiota usus dan lingkungan dan/atau fungsi inang. Probiotik juga diharapkan dapat meningkatkan fungsi pertahanan dari lapisan mukosa atau sel-sel epitel sehingga dapat mengakibatkan peningkatan ekspresi gen dalam sel goblet

penghasil lendir yang melapisi saluran cerna (Gray, 2006). Pengamatan kondisi diare pada mencit meliputi karakteristik tinja dan histologi usus. Karakteristik tinja penting dalam menilai etiologi diare karena pengamatan frekuensi, volume, konsistensi, dan warna memberikan petunjuk diagnostik (Dipiro, 2008). Serta kondisi diare dapat ditunjukkan pula dari perubahan morfologi usus walaupun lesinya tidak spesifik yaitu adanya hipotrofi mukosa jejunum (Péret Filho *et al.*, 1997).



3.2 Alur Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Skema Kerangka Konseptual

3.3 Hipotesis Penelitian

Probiotik multispecies dengan kombinasi tiga bakteri mempunyai aktivitas antidiare terbaik dibandingkan dengan probiotik monostrain dan multistrain, yang dicerminkan dari perbedaan karakteristik feses dan/atau perbedaan histologi usus.



BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Penelitian yang dilakukan adalah studi eksperimental dengan rancangan penelitian yaitu *true experimental* dan tipe *posttest control grup design*.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

4.2.1 Alat

- a. Alat-alat gelas
- b. Alat sonde mencit
- c. Kadang mencit beserta tutup kandang
- d. Viskosimeter
- e. pH meter
- f. Piknometer
- g. Oven
- h. Cawan porselin beserta tutupnya

4.2.2 Bahan

- a. Probiotik monostrain yang mengandung *Lactobacillus acidophilus*.
- b. Probiotik multistrain yang mengandung *Lactobacillus rhamnosus* Rosell-11 (R0011) dan *Lactobacillus acidophilus* Rosell-52 (R0052).
- c. Probiotik multispecies yang mengandung *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium longum*, dan *Streptococcus thermophilus*.
- d. Akuades

- e. Susu skim
- f. Kanamisin serbuk injeksi
- g. Metronidazole suspensi

4.3 Subjek Penelitian

Subjek penelitian adalah mencit (*Mus musculus*) jantan galur Balb/c dengan berat badan antara 15-30 gram.

4.3.1 Jumlah Subjek Penelitian

Jumlah hewan coba yang digunakan tiap kelompok perlakuan dihitung dengan menggunakan rumus:

$$n = (Z\alpha - Z\beta)^2 \frac{S^2}{d^2}$$

$$n = (1,96 - (-1,645))^2 \frac{0,029^2}{0,058^2}$$

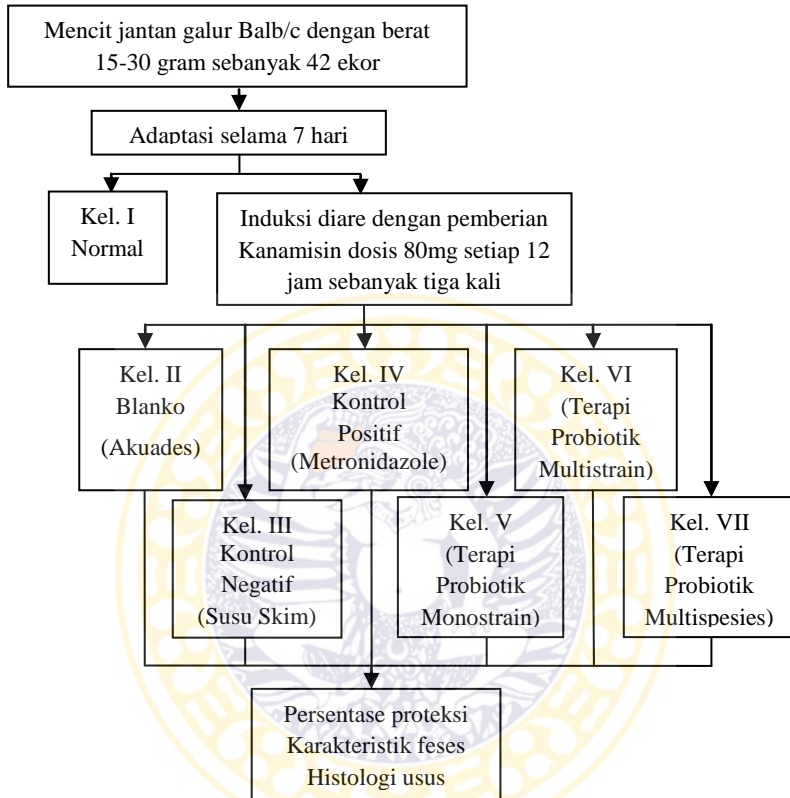
$$n = 4$$

Keterangan: nilai S diperoleh dari penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Rajamanickam, 2010.

$$\begin{aligned} \text{Estimasi kematian } 25\% &= \frac{1}{1-f} \times r \\ &= \frac{1}{1-0,25} \times 4 \\ &= 6 \end{aligned}$$

Berdasarkan perhitungan di atas, jumlah hewan coba yang digunakan tiap kelompok perlakuan berjumlah 6 ekor.

4.3.2 Kerangka Operasional



Gambar 4.1 Skema Uji In Vivo

4.3.3 Definisi Operasional

a. Hewan Coba

Dalam penelitian digunakan mencit (*Mus musculus*) jantan galur Balb/c dengan berat badan antara 15-30 gram.

b. Terapi probiotik monostrain

Probiotik yang digunakan yaitu dengan komposisi *tyndallized lyophilisate Lactobacillus acidophilus* 340 mg. Dosis yang diberikan pada mencit yaitu 44,2 mg/kg BB per hari dengan dengan frekuensi pemberian satu kali sehari.

c. Terapi probiotik multistrain

Probiotik yang digunakan yaitu dengan komposisi *Lactobacillus rhamnosus* Rosell-11 (R0011) $1,9 \times 10^9$ CFU dan *Lactobacillus acidophilus* Rosell-52 (R0052) $0,1 \times 10^9$ CFU atau total bakteri hidup yaitu 2×10^9 CFU. Dosis yang diberikan pada mencit yaitu $2,6 \times 10^8$ CFU/kg BB per hari dengan frekuensi pemberian satu kali sehari.

d. Terapi probiotik multispecies

Probiotik yang digunakan yaitu dengan total bakteri hidup 1×10^9 CFU berkomposisi *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium longum*, dan *Streptococcus thermophilus*. Dosis yang diberikan pada mencit yaitu $1,3 \times 10^8$ CFU/kg BB per hari dengan frekuensi pemberian satu kali sehari.

e. Terapi Metronidazole

Terapi antibiotik Metronidazole diberikan dengan dosis 130 mg/kg BB/hari diberikan dalam empat dosis terbagi.

f. Induksi diare

Induksi diare dengan pemberian Kanamisin dosis 80mg setiap 12 jam.

g. Diare

Pengamatan terjadinya diare pada mencit dilakukan dengan menempatkan menampung feses di atas kertas saring. Lalu

diamati konsistensi fekesnya. Bila jumlah air yang diserap oleh kertas saring lebih banyak dari pada kelompok normal, maka dipastikan hewan coba mengalami diare.

h. Karakteristik fekes

Pengamatan karakteristik fekes yaitu konsistensi dari fekes dengan parameter kadar air.

i. Persentase proteksi

Persentase proteksi yang dimaksud adalah berat akumulasi fekes yang ditampung selama lima jam dibandingkan dengan jumlah fekes pada kelompok blanko (Rajamanickam, 2010). Nilai persentase proteksi menunjukkan adanya aktivitas antidiare yang ditandai dengan penurunan frekuensi diare dibandingkan dengan kontrol (Wansi *et al.*, 2014). Persentase proteksi dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$= \frac{\text{berat fekes kelompok blanko} - \text{perlakuan}}{\text{berat fekes kelompok blanko}} \times 100\%$$

j. Histopatologi

Histopatologi usus digunakan untuk mengetahui kerusakan usus pada tingkat seluler. Perubahan yang diamati adalah perubahan struktur mukosa cecum dan ada tidaknya inflamasi.

4.4 Variabel Penelitian

- a. Variabel bebas : pemberian Probiotik
- b. Variabel tergantung :
 1. Persentase proteksi
 2. Kadar air

- c. Variabel kendali :
1. Dosis Kanamisin
 2. Dosis Metronidazole
 3. Cara pemberian
 4. Galur hewan coba
 5. Kandang hewan coba
 6. Pemeliharaan hewan coba
 7. Metode pemeriksaan

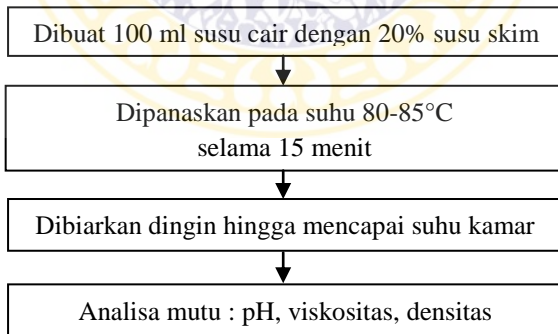
4.5 Prosedur Penelitian

4.5.1 Penanganan Hewan Coba

Satu minggu sebelum digunakan sebagai subyek penelitian, hewan dikondisikan dalam lingkungan di bawah kontrol yang ketat dengan diet seimbang dan diberi akses bebas untuk meminum air, ventilasi yang baik dan suhu dikontrol konstan (Cristina *et al.*, 2012).

4.5.2 Prosedur Kerja

a. Preparasi Susu Skim



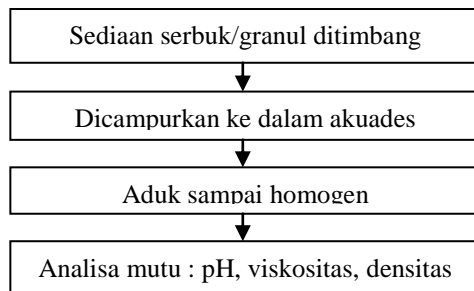
Gambar 4.2 Skema Preparasi Susu Skim

Sebanyak 20% b/v susu skim dilarutkan dalam akuades, kemudian dipanaskan sampai suhu 80-85°C selama 15-20 menit. Kemudian didinginkan sampai suhu kamar. Analisis mutu susu berupa pemeriksaan pH, viskositas dan densitas. Pemeriksaan pH digunakan pH meter yang telah dikalibrasi dengan buffer pH. Pengukuran dilakukan dengan mencelupkan elektroda (yang telah dibersihkan dengan air suling) ke dalam sampel lalu dibaca skala yang tertera. Pemeriksaan viskositas dilakukan dengan alat viskosimeter. Sedangkan pemeriksaan densitas dengan ditentukan suhu 27,5°C, kemudian sampel dimasukkan ke dalam piknometer sampai penuh. Ditimbang kembali piknometer tersebut pada suhu yang sama. Dihitung densitas dengan rumus:

Densitas

$$= \frac{\text{berat piknometer dengan sampel} - \text{berat piknometer kosong}}{\text{volume piknometer}}$$

b. Preparasi Probiotik



Gambar 4.3 Skema Preparasi Probiotik

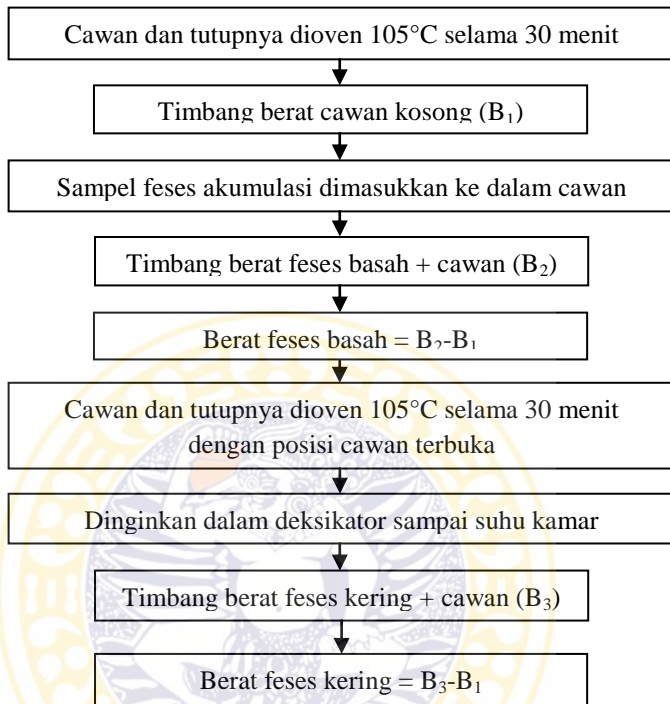
Sediaan jadi probiotik ditambahkan ke dalam akuades, diaduk hingga serbuk larut dan homogen. Untuk sediaan kapsul,

serbuk dikeluarkan dari cangkang kapsulnya terlebih dahulu dan ditambahkan ke dalam akuades. Kemudian dilakukan analisis mutu formula sediaan berupa pemeriksaan organoleptis, bau, rasa, pH, viskositas, serta densitas. Semua prosedur sama dengan prosedur analisis mutu susu skim.

c. Uji *In Vivo* pada Hewan Coba

Hewan coba dibagi menjadi 7 kelompok, dengan 6 hewan di masing-masing kelompok. Kelompok I sebagai kelompok normal merupakan kelompok hewan sehat yang tidak diinduksi diare dan tidak diberikan terapi. Kelompok II hingga kelompok VII merupakan kelompok yang diinduksi diare dengan pemberian antibiotik namun menerima perbedaan perlakuan. Kelompok II sebagai blanko hanya diberi akuades. Kelompok III sebagai kontrol negatif hanya diberi susu skim. Kelompok IV sebagai kontrol positif menerima terapi antibiotik Metronidazole. Kelompok V, VI dan VII merupakan kelompok perlakuan dan menerima berturut-turut probiotik monostRAIN, multistRAIN dan multispecies. Induksi diare dilakukan dengan memberikan Kanamisin 80mg per mencit secara intragastrik dengan interval pemberian tiap 12 jam. Probiotik segera diberikan setelah mencit mengalami diare. Setiap mencit ditempatkan pada kandang terpisah. Selama lima jam, jumlah dan berat feses diambil dan dicatat kemudian dihitung persentase proteksi. Data persentase proteksi dinyatakan sebagai rata-rata \pm SD (Rajamanickam, 2010; Chai, 2001).

d. Pengukuran Kadar Air pada Feses



Gambar 4.4 Skema Pengukuran Kadar Air

Panaskan cawan kosong beserta tutupnya dalam oven suhu 105°C selama 30 menit, kemudian dimasukkan ke dalam deksikator selama 20 menit. Timbang cawan kosong beserta tutupnya. Catat sebagai B₁. Sampel feses ditampung selama lima jam dalam cawan. Kemudian beratnya ditimbang dan dicatat sebagai B₂. Masukkan cawan yang berisi sampel ke dalam oven dan dipanaskan dengan suhu 105°C selama 90 menit dengan posisi cawan terbuka. Masukkan cawan ke dalam deksikator selama 20 menit. Timbang berat cawan yang berisi

sampel kering beserta tutupnya. Catat beratnya sebagai B₃. Kadar air dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{berat feses basah} - \text{berat feses kering}}{\text{berat feses basah}} \times 100\%$$

e. Preparasi Histopatologi Sel Usus

1. Pengambilan Sampel

Pada hewan coba dilakukan pembedahan pada bagian peritoneal. Segera setelah bagian peritoneal terbuka, segera dilakukan reseksi bagian cecum. Keterlambatan pengambilan jaringan akan mengakibatkan jaringan cepat busuk.

2. Merendam Jaringan dengan Larutan *Buffered Neutral Formalin* (BNF) 10%

Selanjutnya dilakukan fiksasi dengan merendam jaringan dalam larutan *buffered neutral formalin* 10% dengan pH berkisar antara 6,5 – 7,5. pH ideal adalah 7,0. Perendaman ini berfungsi untuk mengawetkan agar jaringan terhindar dari pencernaan oleh enzim-enzim (otolisis) atau bakteri serta melindungi struktur fisik sel. Agar fiksasi jaringan dengan larutan tersebut berlangsung sempurna, maka perbandingan antrara organ dan larutan yaitu 1:10, sedangkan lamanya fiksasi minimal 2 hari.

3. Pemotongan Jaringan Organ

Jaringan ditiriskan selanjutnya dipotong dengan menggunakan pisau *scalpel* dengan ketebalan 0,3 - 0,5 mm dan disusun ke dalam *tissue cassette*, kemudian sejumlah *tissue cassette* dimasukkan ke dalam tabung.

4. Proses Dehidrasi

Merupakan proses penarikan air secara bertahap. Tabung yang di dalamnya berisi jaringan organ, dimasukkan ke dalam mesin auto technicon selama 20 jam. Selanjutnya jaringan mengalami proses dehidrasi bertahap dengan putaran waktu sebagai berikut:

Tabel IV.1 Tahapan Proses Dehidrasi

Larutan	Waktu
Alkohol 70%	1 jam
Alkohol 80%	2 jam
Alkohol 90%	2 jam
Alkohol 96%	2 jam
Akohol absolut	2 jam
Akohol absolut	2 jam

Keranjang yang berisi *tissue cassette* kemudian dikeluarkan untuk dilakukan proses berikutnya.

5. Penjernihan (*clearing*)

Proses ini bertujuan membuat jaringan menjadi transparan dan menghilangkan alkohol dari jaringan dengan tahapan sebagai berikut:

Tabel IV.2 Tahapan Proses Penjernihan

Larutan	Waktu
Xylol	1 jam
Xylol	2 jam
Xylol	2 jam

6. Impregnasi

Impregnasi bertujuan menyamakan keadaan jaringan dengan bahan pengeblok (*embedding*).

Tabel IV.3 Tahapan Proses Impregnasi

Bahan	Suhu	Waktu
Parafin cair	50 – 60 °C	2 jam
Parafin cair	50 – 60 °C	2 jam

7. Mencetak blok paraffin dengan alat tissue embedding dengan tujuan memudahkan penyayatan dengan mikrotom

8. Bahan yang sudah diblok kemudian disayat dan dimasukkan ke dalam *water bath* suhu 40°C.

9. Pewarnaan jaringan

Preparat yang akan diwarnai diletakkan pada rak khusus dan dicelupkan secara berurutan ke dalam larutan dengan waktu sebagai berikut:

Tabel 4.4 Tahapan Pewarnaan HE

No	Tahapan	Larutan	Waktu
1	Deparafinisasi	Xylol	5 menit
		Xylol	5 menit
		Xylol	5 menit
2	Hidrasi	Alkohol absolut	4 menit
		Alkohol 96%	3 menit
		Alkohol 90%	3 menit

		Alkohol 80%	2 menit
		Alkohol 70%	2 menit
		Dimasukkan dalam air mengalir	10 menit
3	Pengecatan utama	Mayer's Hematoksilin	5 menit
		Harris' Hematoksilin	5 menit
4	Cat pembanding	Eosin 1%	3-5 menit
5	Dehidrasi	Alkohol 70%	2 menit
		Alkohol 80%	2 menit
		Alkohol 90%	3 menit
		Alkohol 96%	4 menit
		Alkohol absolut	5 menit
6	Penjernihan	Xylo	5 menit
		Xylo	5 menit
		Xylo	5 menit

Preparat diangkat satu per satu dari larutan xylo dalam keadaan basah diberi satu tetes cairan perekat (DPX) dan selanjutnya ditutup dengan kaca penutup. Hasil pewarnaan dapat dilihat di bawah mikroskop (Muntiha, 2001).

4.6 Analisis Data

Data yang dikumpulkan pertama adalah data evaluasi kualitas susu skim dan probiotik, berat feses, serta kadar air. Data yang didapat kemudian adalah persentase proteksi, hasil data dianalisis secara statistik pada masing-

masing kelompok dengan Analisis Varian (ANOVA *one way*) menggunakan *post hoc* LSD. Pengamatan karakteristik feses berdasarkan data kadar air dan histopatologi usus dianalisa secara deskriptif.



BAB V

HASIL PENELITIAN

5.1 Hasil Karakterisasi Sediaan

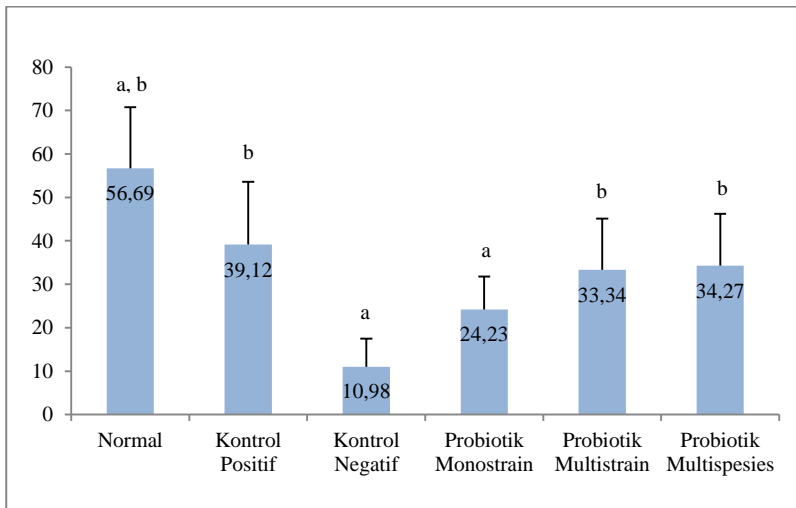
Hasil karakterisasi sediaan meliputi pemeriksaan pH, viskositas, densitas tercantum pada tabel V.1.

Tabel V.1 Hasil Karakterisasi Sediaan

No	Kelompok	pH	Viskositas (dPas)	Densitas (g/ml)
1	Kontrol Positif (Metronidazole)	7,23 ± 0,03	0,30 ± 0,00	1,020 ± 0,000
2	Kontrol Negatif (Susu skim)	6,40 ± 0,01	0,30 ± 0,00	1,073 ± 0,001
3	Probiotik Monostrain	7,61 ± 0,01	0,37 ± 0,00	1,000 ± 0,001
4	Probiotik Multistrain	7,55 ± 0,01	0,30 ± 0,00	1,001 ± 0,001
5	Probiotik Multispesies	7,07 ± 0,01	0,37 ± 0,00	1,018 ± 0,000

Keterangan: hasil pengukuran berdasarkan replikasi tiga kali.

5.2 Hasil Uji Invivo pada Hewan Coba



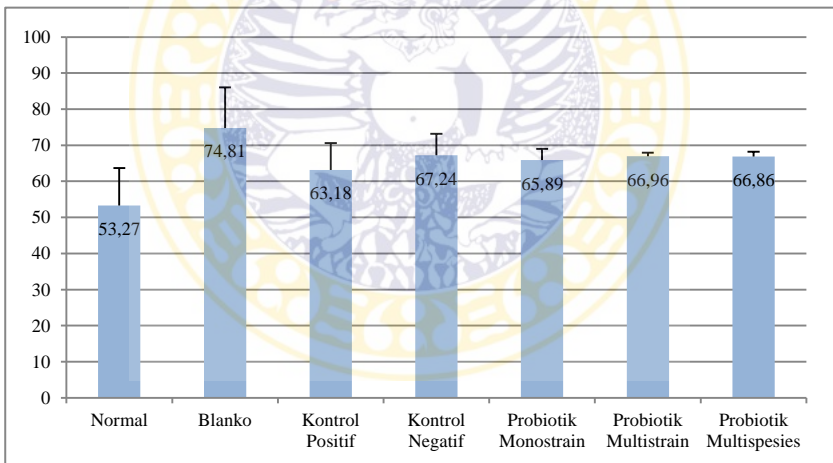
Keterangan : tanda “a” menunjukkan ada perbedaan signifikan dibandingkan kontrol positif
 tanda “b” menunjukkan ada perbedaan signifikan dibandingkan kontrol negatif

Gambar 5.1 Persentase Proteksi pada Mencit yang Diinduksi Diare

Data pada gambar 5.1 menunjukkan adanya penurunan persentase proteksi pada semua kelompok perlakuan yang diinduksi antibiotik dibandingkan dengan kelompok normal (hewan sehat). Nilai persentase proteksi terbesar kedua setelah kelompok normal adalah kelompok kontrol positif, sedangkan yang terkecil adalah kontrol negatif. Semua kelompok perlakuan probiotik memiliki persentase proteksi lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol positif namun lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol negatif. Kelompok probiotik multispecies menunjukkan rata-rata persentase proteksi tertinggi, disusul kelompok probiotik multistrain, dan

probiotik monostrain menghasilkan persentase proteksi terendah diantara ketiga kelompok.

Persentase proteksi yang dihasilkan oleh probiotik multistrain dan multispecies tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P>0,05$) dengan kelompok kontrol positif (metronidazole) meskipun nilai persentase proteksinya lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol positif. Di sisi lain, hasil uji statistik semua kelompok perlakuan menunjukkan perbedaan hasil yang signifikan ($P>0,05$) terhadap kelompok kontrol negatif, kecuali pada kelompok probiotik monostrain. Namun persentase proteksi kelompok probiotik monostrain menunjukkan nilai lebih tinggi dari pada kelompok kontrol negatif.



Gambar 5.2 Hasil Pengukuran Persentase Kadar Air

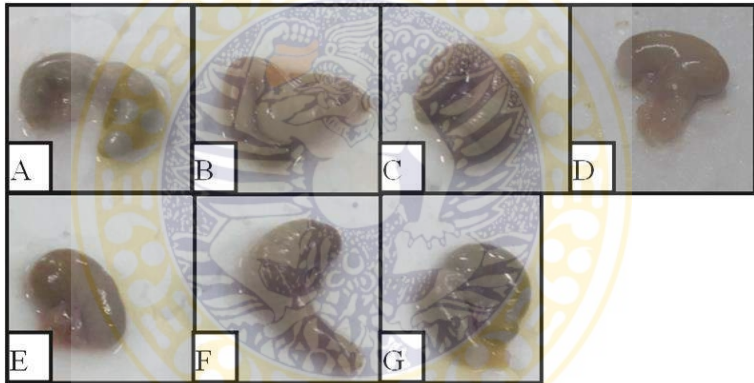
Gambar 5.2 menunjukkan kenaikan rata-rata kadar air pada semua kelompok yang diinduksi antibiotik dibandingkan dengan kelompok normal (hewan sehat). Nilai kadar air terbesar dimiliki oleh kelompok blanko,

disusul kelompok kontrol negatif, kemudian kelompok-kelompok perlakuan probiotik, yaitu probiotik multistrain, multispesies dan monostrain, serta kelompok kontrol positif dengan kadar air paling rendah.

5.3 Hasil Pengamatan pada Organ Cecum

5.3.1 Hasil Pengamatan Makroskopis

Dilakukan pengamatan histopatologi pada organ cecum yang telah diambil. Histopatologi usus digunakan untuk mengetahui kerusakan usus pada tingkat seluler. Perubahan yang diamati adalah perubahan struktur mukosa usus.



Gambar 5.3 Cecum mencit kelompok normal (A), blanko (B), kontrol positif (C), kontrol negatif (D), probiotik monostrain (E), probiotik multistrain (F) dan probiotik multispesies (G)

Bedasarkan gambar 5.3, setelah dilakukan pengambilan organ cecum, secara makroskopis, dapat terlihat bahwa terdapat pembesaran cecum pada hewan coba yang diinduksi antibiotik (B, C, D, E, F dan G) dibandingkan dengan kelompok normal (hewan sehat).

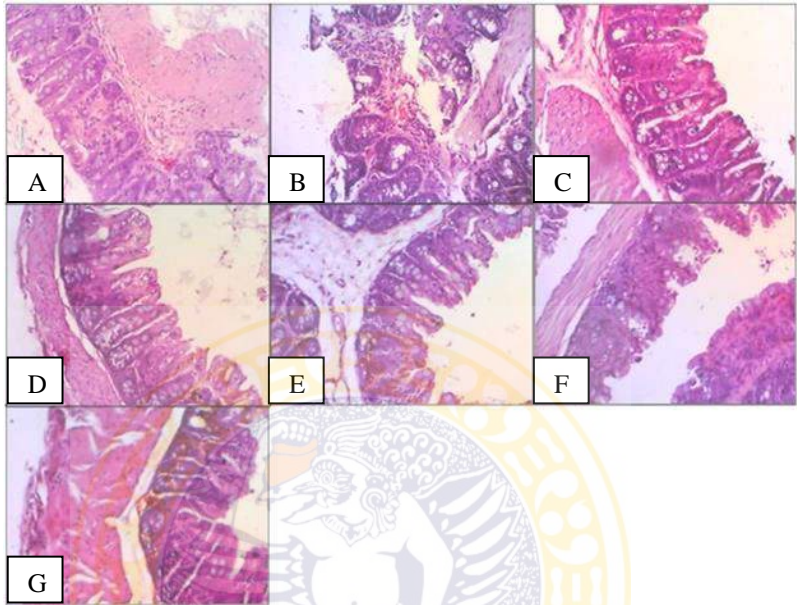
Tabel V.2 Data Panjang dan Lebar Kripta

Kelompok	Panjang (μm)	Lebar (μm)
Normal	164,55 \pm 31,69	58,06 \pm 1,63
Blanko	174,20 \pm 4,62	63,44 \pm 4,36
Kontrol Positif	145,36 \pm 36,15	57,72 \pm 2,16
Kontrol Negatif	173,70 \pm 3,39	62,54 \pm 7,17
Probiotik Monostrain	169,12 \pm 9,85	60,02 \pm 3,08
Probiotik Multistrain	151,79 \pm 2,23	60,93 \pm 6,94
Probiotik Multispecies	152,42 \pm 18,38	53,67 \pm 5,73

Keterangan: pengamatan dilakukan dengan mikroskop perbesaran 100x

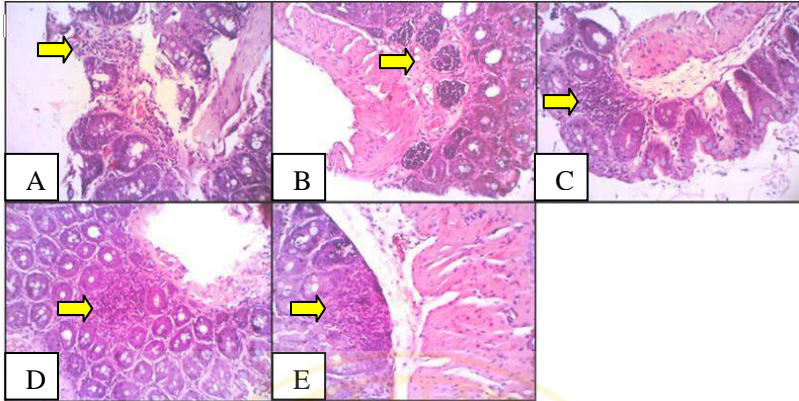
Berdasarkan tabel V.2, bila dibandingkan dengan kelompok normal, terjadi ekspansi dari kripta yang ditunjukkan dengan peningkatan panjang dan atau lebar kripta pada semua kelompok yang diinduksi diare, kecuali pada kelompok kontrol positif dan probiotik multispecies.

5.3.2 Hasil Pengamatan Histologi



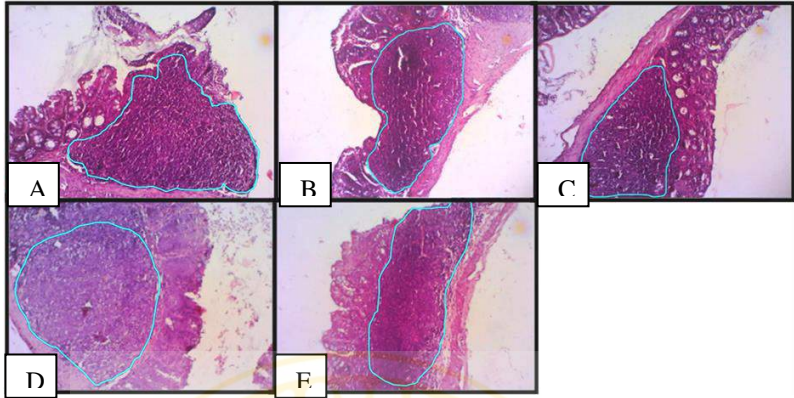
Gambar 5.4 Gambar irisan melintang mukosa cecum mencit pada kelompok normal (A), blanko (B), kontrol positif (C), kontrol negatif (D), probiotik monostrain (E), probiotik multistrain (F) dan probiotik multispecies (G) Perbesaran 200x

Pada gambar 5.4 menunjukkan perbedaan morfologi jaringan mukosa cecum, Pada semua kelompok normal, susunan mukosa nampak utuh dengan kripta yang rapat, Pada kelompok blanko, terjadi kerusakan mukosa, Sedangkan pada kelompok lain yaitu kontrol positif, kontrol negatif, probiotik monostrain, multistrain dan multispecies, tidak terjadi kerusakan mukosa namun tampak kripta yang lebih renggang dibandingkan dengan kelompok normal,



Gambar 5.5 Gambar inflamasi pada cecum mencit kelompok blanko (A), kontrol positif (B), probiotik monostrain (C), probiotik multistrain (D) dan probiotik multispecies (E) Perbesaran 100x

Pada gambar 5.5 menunjukkan adanya jaringan yang mengalami inflamasi pada kelompok blanko, kontrol positif, probiotik monostrain, probiotik multistrain dan probiotik multispecies. Inflamasi ditunjukkan dengan adanya sel leukosit yang menggerombol.



Gambar 5.6 Gambar limfoid nodul pada cecum mencit kelompok blanko (A), kontrol positif (B), kontrol negatif (C), probiotik multistrain (D) dan probiotik multispecies (E)

Pada gambar 5.6 menunjukkan adanya pembesaran limfoid nodul pada kelompok blanko, kontrol positif, kontrol negatif, probiotik multistrain dan probiotik multispecies. Limfoid nodul ditunjukkan dengan lingkaran berwarna biru.

BAB VI

PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan pengaruh komposisi probiotik terhadap aktivitas antidiare pada mencit (*Mus musculus*) yang diinduksi diare dengan penggunaan antibiotik. *Antibiotic-associated diarrhea* (AAD) adalah konsekuensi umum dari terapi antibiotik yang terkait dengan penekanan atau eliminasi mikroorganisme usus yang sehat (Videlok *et al.*, 2012). Diare yang disebabkan oleh *Clostridium difficile* merupakan penyebab paling umum yang dihubungkan dengan penggunaan antibiotik (Narayan, 2010). Antibiotik akan menurunkan metabolisme karbohidrat yang dapat difermentasi, menyebabkan berkurangnya asam lemak rantai pendek (sumber energi bakteri) dan peningkatan karbohidrat yang tidak dapat diabsorpsi dalam lumen usus. Selain itu, perlindungan yang disediakan oleh mikroflora usus normal terganggu dan menyebabkan penurunan kemampuan usus untuk melawan kolonisasi oleh patogen (Hickson, 2011). Konsumsi probiotik telah dibuktikan dapat mengurangi resiko AAD (Chosidow, 2006). Probiotik mempengaruhi ekosistem usus dengan merangsang mekanisme kekebalan mukosa dan merangsang mekanisme non imun melalui antagonisme dan kompetisi dengan patogen yang potensial. Diperkirakan hal tersebut memediasi efek menguntungkan dari probiotik, termasuk pengurangan kejadian dan keparahan diare, yang merupakan salah satu penggunaan paling diakui luas untuk probiotik (Videlok *et al.*, 2012).

Terdapat tiga macam probiotik yang dibandingkan dalam penelitian ini, yaitu probiotik monostrain (mengandung *Lactobacillus acidophilus*), probiotik multistrain (mengandung *Lactobacillus rhamnosus* dan

Lactobacillus acidophilus) dan probiotik multispesies (mengandung *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium longum* dan *Streptococcus thermophilus*). Probiotik yang digunakan berupa sediaan jadi sehingga perlu juga dilakukan uji karakterisasi sediaan, yaitu berupa pengujian pH, viskositas, dan densitas. Pengujian ini dilakukan untuk memastikan karakter sediaan tidak jauh berbeda, sehingga tidak mempengaruhi hasil. Pengamatan pH dilakukan untuk memastikan kelangsungan hidup bakteri dalam sediaan, sebab bakteri probiotik hanya dapat hidup dalam rentang pH tertentu, sebagai contoh *Lactobacillus sp.* masih bisa bertahan pada pH 8 (Deshpande *et al.*, 2014). Dari pengamatan pH, didapatkan pH probiotik monostrain tidak lebih dari 8 sehingga masih dalam rentang. Pengamatan pH juga dilakukan pada metronidazole dan susu skim memastikan bahwa pH sediaan tidak terlalu asam sehingga tidak memicu diare. Dari pengamatan viskositas, antar sediaan tidak mempunyai perbedaan viskositas yang besar. Pengamatan viskositas ditujukan untuk memastikan bahwa tidak banyak cairan sediaan yang tertinggal dalam spuit. Begitu pula pada hasil pengujian densitas, tidak teramati adanya perbedaan yang besar. Pengamatan densitas bertujuan untuk konversi sediaan dalam bentuk gram.

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) dengan kelamin jantan galur Balb-C, berumur 3-5 minggu dan sehat. Sebelum digunakan, mencit diadaptasi selama 1 minggu terlebih dahulu, Untuk mencapai kondisi diare, mencit diinduksi diare dengan pemberian antibiotik kanamisin. Karena kanamisin yang diberikan secara intragastrik dapat menginduksi gangguan mikrobiota usus pada mencit (Hammami, 2015). Kemudian dilakukan percobaan pendahuluan untuk mengetahui besarnya dosis kanamisin yang dapat menginduksi diare pada mencit. Dan didapatkan hasil bahwa hewan coba mengalami diare setelah

pemberian kanamisin 80mg setiap 12 jam sebanyak tiga kali, yang ditunjukkan dengan peningkatan kadar air feses dibanding kelompok normal. Dosis kanamisin tidak bergantung berat badan dan sama tiap hewan coba. Selama penginduksian, hewan coba diberi akses bebas untuk minum, namun dengan pembatasan jumlah makanan. Setelah dilakukan induksi, terlebih dahulu dipastikan hewan coba mengalami diare. Pemastian dilakukan dengan penampungan feses di atas kertas saring. Lalu diamati konsistensi fesesnya. Bila jumlah air yang diserap oleh kertas saring lebih banyak dari pada kelompok normal, maka menunjukkan hewan coba mengalami diare. Penggunaan kertas saring hanya untuk pemastian diare, tidak untuk menampung feses selama periode diare. Kemudian hewan coba diberi perlakuan sesuai masing-masing kelompok dan dilakukan penampungan feses selama lima jam. Waktu lama penampungan feses juga didapat dari hasil percobaan pendahuluan dimana dalam waktu lima jam setelah perlakuan, sudah terdapat perubahan konsistensi feses menjadi lebih padat. Feses yang telah tertampung ditimbang beratnya untuk kemudian diolah menjadi data persentase proteksi dan diukur kadar airnya dengan metode pengeringan oven. Setelah itu, dilakukan sampling pembedahan pengambilan cecum masing-masing dua ekor tiap kelompok untuk pengamatan histopatologi.

Berdasarkan data berat feses yang telah diolah menjadi persentase proteksi, kelompok normal menunjukkan rata-rata persentase proteksi tertinggi, disusul kelompok kontrol positif, probiotik multispecies, probiotik multistrain, probiotik monostain, dan kelompok kontrol negatif dengan persentase proteksi paling rendah. Hasil uji statistik *one way anova* dengan tipe *posthoc* LSD menunjukkan adanya perbedaan persentase proteksi yang signifikan ($P < 0,05$) pada semua kelompok jika dibandingkan dengan

kelompok kontrol negatif, kecuali pada kelompok probiotik monostrain. Sehingga, hasil penggunaan probiotik monostrain dibanding dengan penggunaan pembawa probiotik, yaitu susu skim, dalam mengatasi AAD secara statistik tidak menunjukkan perbedaan aktivitas antidiare. Hal tersebut dikarenakan keterbatasan aktifitas dari strain probiotik yang digunakan dalam probiotik monostrain. Ditinjau dari keberhasilan kolonisasi, kelangsungan hidup bakteri probiotik monostrain hanya tergantung pada sifat satu strain tertentu. Strain tersebut harus mengatasi barrier yang diberikan oleh host dan mikroflora endogen. Sedangkan berdasarkan efeknya terhadap kesehatan juga terbatas pada sifat satu strain (Timmerman et al., 2004). Namun berdasarkan rata-rata hasil kelompok menunjukkan persentase proteksi kelompok probiotik monostrain yang lebih besar pada dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif.

Hasil lainnya dari uji statistik menunjukkan tidak ada perbedaan persentase proteksi yang signifikan ($P > 0,05$) antara kelompok kontrol positif (metronidazole) dengan kelompok probiotik multistrain dan multispecies. Sehingga menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan aktivitas antidiare yang signifikan antara probiotik multistrain dan probiotik multispecies dengan metronidazole. Metronidazole merupakan *drug of choice* dari AAD. Walaupun beberapa penelitian menunjukkan vankomisin lebih efektif, namun penggunaan vankomisin dihindari karena dapat menyebabkan munculnya strain yang resisten terhadap vankomisin (Silva et al., 2006). Beberapa probiotik mempunyai aktivitas antibakteri dengan menghasilkan protease yang langsung menurunkan toksin bakteri atau meningkatkan respon imun. Probiotik sebelumnya hanya digunakan sebagai terapi ajuvan untuk AAD, yaitu dengan diberikan bersamaan dengan antibiotik standar vankomisin atau metronidazole (McFarland, 2009).

Walaupun secara statistik tidak ada perbedaan yang signifikan, berdasarkan rata-rata hasil tiap kelompok menunjukkan persentase proteksi pada kelompok probiotik multistrain dan multispecies lebih rendah jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif, dengan persentase proteksi probiotik multispecies lebih besar dari pada probiotik multistrain.

Jika dibandingkan dari ketiga kelompok probiotik, probiotik multispecies menunjukkan rata-rata persentase proteksi tertinggi, disusul berurutan dari tinggi ke rendah kelompok probiotik multistrain, dan probiotik monostain. Studi yang dilakukan oleh Timmerman *et al.*, (2004) menjelaskan memang terdapat bukti untuk probiotik multistrain lebih efektif dibandingkan probiotik monostain. Penggunaan preparasi multispecies, dimana mengandung beberapa strain lebih dari satu genus, bahkan bisa lebih efektif daripada probiotik multistrain. Namun mekanisme yang mendasari efek dari kombinasi probiotik ini tetap tidak jelas. Perbedaan antara probiotik monostain dan multispecies, yaitu terletak pada keberhasilan kolonisasi mereka dan efeknya terhadap kesehatan. Ditinjau dari keberhasilan kolonisasi, probiotik multispecies dengan strain dan karakteristik yang berbeda, akan memiliki peluang peningkatan kolonisasi. Begitu pula dengan efeknya terhadap kesehatan. Pada probiotik multispecies, efeknya akan meningkat dikarenakan efek aditif dari kombinasi strain. Hasil penelitian lain dari Collado *et al.*, (2006) menunjukkan terdapat kemungkinan bahwa probiotik dengan strain kombinasi dapat meningkatkan efek yang menguntungkan dalam kesehatan, yaitu akibat dari karakternya pada penghambatan adhesi patogen dan pengaruhnya dalam kolonisasi. Kombinasi dari strain probiotik yang berbeda mungkin lebih efektif secara *in vitro* dari pada probiotik monostain.

Berdasarkan karakterisasi feses, yaitu konsistensi feses yang diukur dengan parameter kadar air, teramati bahwa rata-rata kadar air pada kelompok blanko lebih besar dari pada kelompok normal, yang menunjukkan bahwa mencit kelompok blanko mengalami diare setelah diinduksi dengan pemberian kanamisin. Begitu pula dengan kelompok lain yang diinduksi diare dengan pemberian antibiotik. Semuanya menunjukkan peningkatan kadar air bila dibandingkan dengan kelompok normal. Diare sendiri didefinisikan sebagai peningkatan volume atau fluiditas feses, perubahan konsistensi, dan peningkatan frekuensi buang air besar. Serta WHO mendefinisikan diare sebagai bagian dari feses yang cair atau berair setidaknya tiga kali dalam jangka waktu 24 jam (Thapar *et al.*, 2004). Hasil tersebut juga sesuai dengan studi yang dilakukan oleh Hamami (2015) bahwa semua mencit yang menerima antibiotik kanamisin mengalami diare ringan dengan kadar air feses yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol. Data lain pada kelompok yang diberi perlakuan yaitu kontrol positif, kontrol negatif, probiotik monostRAIN, multistRAIN dan multispecies, teramati adanya penurunan kadar air jika dibandingkan dengan blanko, namun perbedaan antara kelompok perlakuan tidak berbeda jauh. Nilai kadar air kelompok probiotik yang lebih rendah dari pada kelompok blanko menunjukkan adanya perbaikan konsistensi feses dengan penggunaan probiotik walaupun tidak lebih baik dari pada kelompok kontrol positif.

Pada hewan coba dilakukan pembedahan untuk pengambilan organ cecum. Dipilih organ cecum karena berdasarkan penelitian yang dilakukan pada kelinci yang diinduksi diare dengan pemberian antibiotik amoksisilin selama dua hari, pemeriksaan histologi dari cecum menunjukkan perdarahan, ulserasi mukosa dan invasi heterofil dari lamina propria dan permukaan epitel, mirip dengan lesi dilaporkan dalam klindamisin

menginduksi radang usus (Morris, 1995). Selain itu, bila terjadi infeksi akibat *C. difficile*, lesi inflamasi akan paling konsisten dan signifikan teramati pada cecum (Sun *et al.*, 2011).

Secara makroskopis, terlihat bahwa cecum pada hewan coba yang diinduksi diare mengalami pembesaran dibandingkan dengan hewan sehat. Hal tersebut sesuai dengan studi yang dilakukan oleh Hill *et al.*, (2015) bahwa hewan yang diberi perlakuan antibiotik sampai menyebabkan perubahan mikrobiota usus akan menunjukkan karakteristik pembesaran cecum, serta ekspansi lamina propria yang menyebabkan peningkatan nilai panjang dan lebar kripta. Berdasarkan pengukuran panjang dan lebar kripta, teramati bahwa pada semua kelompok yang diinduksi diare mempunyai nilai panjang dan lebar kripta yang lebih tinggi dari pada hewan sehat, kecuali pada kelompok kontrol positif dan probiotik multispecies.

Pengamatan histologi pada cecum ditujukan untuk melihat apakah terjadi kerusakan mukosa dan inflamasi. Berdasarkan hasil histologi, pada kelompok blanko teramati adanya kerusakan mukosa. Sedangkan pada kelompok lain tidak teramati kerusakan mukosa cecum. Sehingga pemberian probiotik dapat berpengaruh pada morfologi mukosa cecum pada mencit. Sedangkan ditinjau dari inflamasi, teramati adanya jaringan yang inflamasi pada kelompok blanko, kontrol positif, probiotik monostain, probiotik multistain dan probiotik multispecies. Inflamasi ditandai dengan adanya sel leukosit yang menggerombol. Sedangkan pada kelompok normal dan kontrol negatif tidak ditemui adanya jaringan yang mengalami inflamasi. Walaupun pada kelompok kontrol negatif tidak ditemukan adanya inflamasi, namun terdapat pembesaran limfoid nodul. Pembesaran limfoid nodul juga teramati pada kelompok lain yang diinduksi diare yaitu kelompok blanko, kontrol positif, probiotik multistain dan probiotik

multispecies. Limfoid nodul merupakan bagian dari sistem imun tubuh dan mempunyai peran penting dalam respon imun alami dan adaptif. Limfoid nodul menyebar ke seluruh tubuh dan mempunyai bentuk yang bervariasi di daerah anatomi tubuh yang berbeda, pembesaran limfoid nodul merupakan respon imun sebagai akibat dari adanya inflamasi dan reaksi imun yang dipicu oleh respon humoral dan penyakit, termasuk infeksi bakteri dan virus (Miranda, 2013). Dari data tersebut menunjukkan bahwa pemberian probiotik memiliki efek lebih baik pada mukosa cecum dibandingkan dengan kelompok blanko, namun tidak berpengaruh dalam perbaikan jaringan yang inflamasi.

Bila dilihat dari persentase proteksi yang terbesar, probiotik multispecies dapat menjadi pilihan untuk terapi diare yang diinduksi oleh penggunaan antibiotik. Penelitian ini juga menunjukkan bahwa dengan penggunaan probiotik, terjadi perbaikan konsistensi feses dan berefek lebih baik pada mukosa cecum.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Penelitian bertujuan menentukan dan membandingkan aktivitas antidiare tiga macam komposisi probiotik, yaitu probiotik monostrain, multistrain dan multispecies, pada mencit yang diinduksi diare dengan penggunaan antibiotik

1. Probiotik monostrain, multistrain dan multispecies memiliki aktivitas antidiare dengan nilai persentase proteksi berturut-turut $24,23 \pm 7,54$; $33,34 \pm 11,78$; $34,27 \pm 11,97$, dan ditunjukkan adanya penurunan kadar air feses serta perbaikan pada mukosa cecum.
2. Probiotik multispecies lebih efektif dalam mengatasi diare dari pada probiotik monostrain dan multistrain ditunjukkan dengan nilai persentase proteksi yang lebih tinggi.

7.2 Saran

Diperlukan waktu pengamatan kondisi diare yang lebih panjang, seperti diare sub kronis ataupun kronis, pada mencit yang diinduksi diare oleh penggunaan antibiotik untuk melihat penurunan kadar air yang signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, R.R. & Ghafoor, M.A. 2014. **Role of Synbiotic (Combination of Pre and Probiotic) in the Management and Prevention of Acute Watery Diarrhoea**, Vol. 32, No.2, p. 228
- Bermudez-Brito, M. et al., 2012. Probiotic Mechanisms of Action. *Annals of Nutrition and Metabolism*, Vol. 61, No. 2, p.164
- Canani, R.B. et al., 2007. *Probiotics for treatment of acute diarrhoea in children: randomised clinical trial of five different preparations*. p.340
- Chai, J.Y. et al., 2001. Intestinal histopathology and in situ postures of *Gymnophalloides seoi* in experimentally infected mice. *The Korean journal of parasitology*, Vol. 39, No. 1, p.32-33
- Chosidow, O., 2006. Clinical Practice. *Prevention*, Vol. 346, No. 5, p.334
- Collado, M.C. et al., 2006. Protection mechanism of probiotic combination against human pathogens: in vitro adhesion to human intestinal mucus. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, Vol. 15, No. 4, p. 1, 6
- Cristina, P. et al., 2012. *Asterophorum In Mice*. , p.131–136
- Deshpande, K.G., Dolas, C.B. & Chavan, N.S., 2014. **Original Research Article Investigation of tolerance of Lactobacillus casei to the presence of acids , bile salts and Deconjugation of bile salts**. , Vol.3, No.7, pp.600–612.

- Diniz-santos, D,R., Silva, L,R, & Silva, N., 2006, **Antibiotics for the Empirical Treatment of Acute Infectious Diarrhea in Children**. 10, pp,217–227,
- Dipiro, Joseph T., 2008. **Pharmacotherapy A Patophysiological Approach 7th edition**. USA: The McGraw Hill Companies. p.619-620
- Gogineni, V.K., Morrow, L.E. & Malesker, Mark a. 2013. Probiotics & Health Probiotics : Mechanisms of Action and Clinical Applications Immune modulation. *Journal of Probiotic and Health*, Vol. 1, No.1, p.1–2
- Gray, J., 2006. *Ilsi Europe Concise Monograph Series*. p.13
- Guandalini, S., 2011. Probiotics for prevention and treatment of diarrhea. *J Clin Gastroenterol*. p.3
- Guarner, F. et al., 2011. Probiotics and prebiotics. *Probiotics and prebiotics-World Gastroenterology Organisation Global Guidelines*. p.3-4
- Hammami, R. et al., 2015. Symbiotic maple saps minimize disruption of the mice intestinal microbiota after oral antibiotic administration. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, p.1–7
- Hammer, H.F., Krejs, G.J. & Reisinger, E.C., 1998. **Mechanisms and Management of Antibiotic-Associated Diarrhea**. p.702
- Hickson, M., 2011. Probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and Clostridium difficile infection. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, Vol. 4, No. 3, p.185–186

- Hill, D,A, et al., 2010, **Metagenomic analyses reveal antibiotic-induced temporal and spatial changes in intestinal microbiota with associated alterations in immune cell homeostasis**, Vol. 3, No.2
- Howarth, G.S. & Wang, H., 2013. Role of endogenous microbiota, probiotics and their biological products in human health. *Nutrients*, Vol. 5, No.1, p.2, 65-66
- Katzung, Bertram G., Masters, Susan B., Trevor, Anthony J., 2012. **Basic & Clinical Pharmacology 12th edition**. USA: The McGraw Hill Companies. p.1090, 1094, 1095
- Lee *et al.*, 2001. **Oral bacterial therapy promotes recovery from acute diarrhea in children**, Vol. 42, No. 5. p.1
- Marshall, V.M., 2007. Microbiota of Human Gut. *Probiotic Dairy Products*. p. 7
- Mcfarland, L. V, 2008. **Antibiotic-associated diarrhea : epidemiology , trends and treatment** , Vol. 3, p.567
- McFarland, L. V., 2009. Evidence-based review of probiotics for antibiotic-associated diarrhea and Clostridium difficile infections. *Anaerobe*, Vol. 15, No. 6, p.275
- Miranda, R.N, & Khoury, J.D., 2013, *Atlas of Lymph Node Pathology*.
- Mohammed, S. & El, A., 2010. **Anti-diarrhoeal Activity of Hydnora abyssinica Aqueous Root Extract in Rats**. p.13
- Morris, T.H., 1995. Antibiotic therapeutics in laboratory animals. *Laboratory animals*, Vol. 29, p.28

- Muntiha, M., 2001. Teknik Pembuatan Preparat Dengan Pewarnaan Hematoksilin Dan. *Balai Penelitian Veteriner*, p.157–162.
- Narayan, S.S. et al., 2010. Probiotics: current trends in the treatment of diarrhoea. *Hong Kong medical journal = Xianggang yi xue za zhi / Hong Kong Academy of Medicine*, Vol. 16, No. 3, p.1
- Péret-Filho, L. a., Brasileiro-Filho, G. & Penna, F.J., 1997. Morphological changes of the jejunal mucosa in protracted diarrhea and their correlation with disease duration, weight loss and serum albumin levels. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Vol. 30, No. 9, p.1069–1071
- Picard, C. et al., 2005. Review article: Bifidobacteria as probiotic agents - Physiological effects and clinical benefits. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, Vol. 22, No. 6, p.503
- Qureshi, A.A. et al., 2010. Probiotics in diarrhea: Myths and facts. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Vol. 2, p.24
- Rajamanickam, V. et al., 2010. Anti-diarrheal activity of *Dodonaea viscosa* root extracts. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, Vol. 1, No. 4, p.184
- Sanders, M.E. et al., 2007. Probiotics: Their Potential to Impact Human Health. *Council of Agricultural Science and Technology*, Vol. 36, No. 36, p.13, 20
- Sisson, V., 2014. **Types of Diarrhea and Management Strategies**. , p.4-6

- Sun, X. et al., 2011. Mouse relapse model of *Clostridium difficile* infection. ***Infection and Immunity***, Vol. 79, No. 7, p.2863
- Surawicz, C.M., 2007. **Diarrheal Diseases**. Department of Medicine University of Washington School of Medicine. p.1-2
- Thapar, N. & Sanderson, I., 2004. Diarrhoea in children: an interface between developing and developed countries. ***The Lancet***, Vol. 363, p.641
- Timmerman, H.M. et al., 2004. Monostrain, multistain and multispecies probiotics—A comparison of functionality and efficacy. ***International Journal of Food Microbiology***, Vol. 96, No. 3, p.219
- Vidlock, E.J. & Cremonini, F., 2012. Probiotics for antibiotic-associated diarrhea. ***JAMA : the journal of the American Medical Association***, Vol. 308, No. 7, p.665
- Vonk, R.J. et al., 2012. **Probiotics and Lactose Intolerance**. p.154
- Wansi, S.L. et al., 2014. **Antidiarrheal Activity of Aqueous Extract of the Stem Bark of *Sapium Ellipticum* (Euphorbiaceae)** . , 13(June), pp.929–935.
- Well, Barbara G., 2014. **Pharmacotherapy Handbook 9th edition**. USA: The McGraw Hill Companies. p. 200
- World Health Organization, 1990. **The Rational Use of Drugs in Management Acute Diarrhea in Children**. p5-65

LAMPIRAN 1

Tabel Konversi Dosis

	Mouse 20 g	Rat 200 g	Guinea Pig 400 g	Rabbit 1,5 kg	Cat 2 kg	Monkey 4 kg	Dog 12 kg	Man 70 kg
Mouse 20 g	1,0	7,0	12,25	27,8	29,7	64,1	124,2	387,9
Rat 200 g	0,14	1,0	1,74	3,9	4,2	9,2	17,8	56,0
Guinea Pig 400 g	0,08	0,57	1,0	2,25	2,4	5,2	10,2	31,5
Rabbit 1,5 kg	0,04	0,25	0,44	1,0	1,08	2,4	4,5	14,2
Cat 2 kg	0,03	0,23	0,41	0,92	1,0	2,2	4,1	13,0
Monkey 4 kg	0,016	0,11	0,19	0,42	0,45	1,0	1,9	6,2
Dog 12 kg	0,008	0,06	0,10	0,22	0,24	0,52	1,0	3,1
Man 70kg	0,0026	0,018	0,01	0,07	0,076	0,16	0,32	1,0

Dikutip dari : Gosh., 1971. **Fundamental of Experimental Pharmacology**. India : 109 College St., Kolkata

LAMPIRAN 2**Perhitungan Dosis**

Dosis Metronidazole : 250 mg empat kali sehari

Dosis Metronidazole per ekor mencit

$$= 0,0026 \times 1000 \text{ mg/hari}$$

$$= 2,6 \text{ mg/hari/20g mencit}$$

$$= 0,13 \text{ mg/g mencit}$$

$$= 130 \text{ mg/kg BB/hari}$$

Dosis probiotik monostrain : 340 mg *tyndallized lyophilisate*

Lactobacillus acidophilus/ hari

Dosis probiotik monostrain per ekor mencit

$$= 0,0026 \times 340 \text{ mg/hari}$$

$$= 0,884 \text{ mg/hari/20 g mencit}$$

$$= 0,0442 \text{ mg/g mencit}$$

$$= 44,2 \text{ mg/kg BB}$$

Dosis probiotik multistrain : 2×10^9 CFU/hari

Dosis probiotik multistrain per ekor mencit

$$= 0,0026 \times 2 \times 10^9 \text{ CFU/hari}$$

$$= 5,2 \times 10^6 \text{ CFU/hari/20 g mencit}$$

$$= 2,6 \times 10^5 \text{ CFU/g mencit}$$

$$= 2,6 \times 10^8 \text{ CFU/kg BB}$$

Dosis probiotik multispecies : 1×10^9 CFU/hari

Dosis probiotik multispecies per ekor mencit

$$= 0,0026 \times 10^9 \text{ CFU/hari}$$

$$= 2,6 \times 10^6 \text{ CFU/hari/20 g mencit}$$

$$= 1,3 \times 10^5 \text{ CFU/g mencit}$$

$$= 1,3 \times 10^8 \text{ CFU/kg BB}$$

LAMPIRAN 3

Data Hasil Uji In vivo Probiotik pada Mencit yang Diinduksi Diare

Kelompok	Hewan ke-	Berat Cawan Kosong (g)	Berat Cawan + Feses(g)	Berat Setelah Pemanasan (g)	Berat Feses basah (g)	Berat Feses Kering (g)	% Proteksi	Rerata \pm SD	% Kadar Air	Rerata \pm SD
Normal	1	15,3556	15,6153	15,4485	0,2597	0,0929	44,52	56,69 \pm 14,04	64,23	53,27 \pm 10,44
	2	16,5835	16,8763	16,7042	0,2928	0,1207	52,92		58,78	
	3	16,5836	16,7821	16,6879	0,1985	0,1043	57,74		47,46	
	4	16,5830	16,8932	16,7010	0,3102	0,1180	39,32		61,96	
	5	16,5839	16,7637	16,6727	0,1798	0,0888	72,15		50,61	
	6	16,5828	16,6869	16,6488	0,1041	0,0660	73,46		36,60	
Blanko	1	14,6730	15,1411	14,8278	0,4681	0,1548	-	-	66,93	74,81 \pm 11,27
	2	15,3561	15,9780	15,3952	0,6219	0,0391	-		93,71	
	3	16,7836	17,2533	16,9310	0,4697	0,1474	-		68,62	
	4	15,3551	15,8663	15,4380	0,5112	0,0829	-		83,78	
	5	15,3561	16,0018	15,5573	0,6457	0,2012	-		68,84	
	6	13,9795	14,3718	14,1090	0,3923	0,1295	-		66,99	

Kontrol Positif	1	16,5829	16,9422	16,7127	0,3593	0,1298	23,24	39,12 ± 14,44	63,87	63,18 ± 7,43
	2	13,9805	14,3902	14,1138	0,4097	0,1333	34,12		67,46	
	3	14,6735	15,0333	14,8004	0,3598	0,1269	23,40		64,73	
	4	15,5660	15,8474	15,7061	0,2814	0,1401	44,95		50,21	
	5	15,5669	15,8754	15,6529	0,3085	0,0860	52,22		72,12	
	6	15,5662	15,7357	15,6329	0,1695	0,0667	56,79		60,65	
Kontrol Negatif	1	13,9798	14,4005	14,1038	0,4207	0,1240	10,13	10,98 ± 6,54	70,53	67,24 ± 5,95
	2	15,5672	16,0736	15,7377	0,5064	0,1705	18,57		66,33	
	3	15,3561	15,8005	15,5267	0,4444	0,1706	5,39		61,61	
	4	14,6726	15,1012	14,7716	0,4286	0,0990	16,16		76,90	
	5	14,6732	15,2283	14,8551	0,5551	0,1819	14,03		67,23	
	6	15,3553	15,7414	15,5064	0,3861	0,1511	1,58		60,87	
Probiotik Monostrain	1	15,5666	15,9814	15,7099	0,4148	0,1433	11,39	24,23 ± 7,54	65,45	65,89 ± 3,08
	2	16,7837	17,2575	16,9277	0,4738	0,1440	23,81		69,61	
	3	13,9801	14,3328	14,1091	0,3527	0,1290	24,91		63,43	
	4	13,9795	14,3779	14,1128	0,3984	0,1333	22,07		66,54	
	5	13,9805	14,4322	14,1216	0,4517	0,1411	30,04		68,76	
	6	14,6726	14,9348	14,7734	0,2622	0,1008	33,16		61,56	

Probiotik Multistrain	1	16,7833	17,1643	16,9088	0,3810	0,1255	18,61	33,34 ± 11,78	67,06	66,96 ± 0,96
	2	14,6733	15,0875	14,8048	0,4142	0,1315	33,40		68,25	
	3	15,5672	15,9303	15,6919	0,3631	0,1247	22,70		65,66	
	4	16,7830	17,0300	16,8637	0,2470	0,0807	51,68		67,33	
	5	16,7837	17,1843	16,9198	0,4006	0,1361	37,96		66,03	
	6	16,1766	16,4288	16,2587	0,2522	0,0821	35,71		67,45	
Probiotik Multispecies	1	16,1777	16,5573	16,2974	0,3796	0,1197	18,91	34,27 ± 11,97	68,47	66,86 ± 1,34
	2	16,1780	16,5893	16,3170	0,4113	0,1390	33,86		66,20	
	3	16,1778	16,5388	16,3054	0,3610	0,1276	23,14		64,65	
	4	16,1768	16,4239	16,2569	0,2471	0,0801	51,66		67,58	
	5	16,1773	16,5578	16,3007	0,3805	0,1234	41,07		67,57	
	6	16,7833	17,0305	16,8657	0,2472	0,0824	36,99		66,67	

LAMPIRAN 4

Data Berat Badan Hewan Coba

Kelompok	Hewan ke-	BB (g)	Rerata ± SD	Kelompok	Hewan ke-	BB (g)	Rerata ± SD
Normal	1	23	21,33 ± 3,08	Probiotik Monostrain	1	27	22,50 ± 3,27
	2	25			2	25	
	3	22			3	22	
	4	22			4	23	
	5	20			5	20	
	6	16			6	18	
Blanko	1	23	21,83 ± 3,92	Probiotik Multistrain	1	23	20,67 ± 2,66
	2	28			2	22	
	3	22			3	22	
	4	22			4	22	
	5	20			5	19	
	6	16			6	16	
Kontrol Positif	1	26	22,50 ± 4,04	Probiotik Multispesies	1	27	21,33 ± 3,39
	2	26			2	22	
	3	23			3	21	
	4	25			4	22	
	5	18			5	19	
	6	17			6	17	
Kontrol Negatif	1	28	21,33 ± 4,08				
	2	23					
	3	22					
	4	20					
	5	19					
	6	16					

LAMPIRAN 5**Data Hasil Statistik *One Way Anova* Persentase Proteksi**

Multiple Comparisons

Dependent Variable: persentproteksi

LSD

(I) jenis kelompok	(J) jenis kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Normal	K. Positif	17,56500*	6,61209	,013	4,0613	31,0687
	K. Negatif	45,70833*	6,61209	,000	32,2046	59,2120
	P. Mono-strain	32,45500*	6,61209	,000	18,9513	45,9587
	P. Multi-strain	23,34167*	6,61209	,001	9,8380	36,8454
	P. Multi-spesies	22,41333*	6,61209	,002	8,9096	35,9170
K. Positif	Normal	-17,56500*	6,61209	,013	-31,0687	-4,0613
	K. Negatif	28,14333*	6,61209	,000	14,6396	41,6470
	P. Mono-strain	14,89000*	6,61209	,032	1,3863	28,3937
	P. Multi-strain	5,77667	6,61209	,389	-7,7270	19,2804
	P. Multi-spesies	4,84833	6,61209	,469	-8,6554	18,3520
K. Negatif	Normal	-45,70833*	6,61209	,000	-59,2120	-32,2046
	K. Positif	-28,14333*	6,61209	,000	-41,6470	-14,6396
	P. Mono-strain	-13,25333	6,61209	,054	-26,7570	,2504
	P. Multi-strain	-22,36667*	6,61209	,002	-35,8704	-8,8630
	P. Multi-spesies	-23,29500*	6,61209	,001	-36,7987	-9,7913

P. Mono-strain	Normal	-32,45500*	6,61209	,000	-45,9587	-18,9513
	K. Positif	-14,89000*	6,61209	,032	-28,3937	-1,3863
	K. Negatif	13,25333	6,61209	,054	-,2504	26,7570
	P. Multi-strain	-9,11333	6,61209	,178	-22,6170	4,3904
	P. Multi-spesies	-10,04167	6,61209	,139	-23,5454	3,4620
P. Multi-strain	Normal	-23,34167*	6,61209	,001	-36,8454	-9,8380
	K. Positif	-5,77667	6,61209	,389	-19,2804	7,7270
	K. Negatif	22,36667*	6,61209	,002	8,8630	35,8704
	P. Mono-strain	9,11333	6,61209	,178	-4,3904	22,6170
	P. Multi-spesies	-,92833	6,61209	,889	-14,4320	12,5754
P. Multi-spesies	Normal	-22,41333*	6,61209	,002	-35,9170	-8,9096
	K. Positif	-4,84833	6,61209	,469	-18,3520	8,6554
	K. Negatif	23,29500*	6,61209	,001	9,7913	36,7987
	P. Mono-strain	10,04167	6,61209	,139	-3,4620	23,5454
	P. Multi-strain	,92833	6,61209	,889	-12,5754	14,4320

*, The mean difference is significant at the 0,05 level.

LAMPIRAN 6**Data Panjang Kripta**

Kelompok	Replikasi	Hewan ke-3		Hewan ke-4	
			Rerata ± SD		Rerata ± SD
Normal	1	168,21	165,41 ± 12,61	160,06	139,42 ± 19,66
	2	151,63		137,29	
	3	176,38		120,91	
Blanko	1	143,66	142,14 ± 6,83	193,65	186,95 ± 19,33
	2	148,08		165,16	
	3	134,67		202,04	
Kontrol Positif	1	140,66	150,21 ± 37,02	131,21	153,36 ± 20,43
	2	118,91		157,41	
	3	191,07		171,46	
Kontrol Negatif	1	185,50	170,93 ± 20,40	167,33	177,46 ± 10,51
	2	179,68		188,31	
	3	147,61		176,73	
Probiotik Monostrain	1	132,50	119,79 ± 21,17	185,84	170,92 ± 17,42
	2	131,51		151,77	
	3	95,35		175,14	
Probiotik Multistrain	1	176,67	171,30 ± 5,18	151,28	176,10 ± 28,20
	2	170,89		170,25	
	3	166,34		206,76	
Probiotik Multispecies	1	207,22	176,09 ± 30,21	142,46	162,15 ± 20,15
	2	174,14		182,73	
	3	146,90		161,27	

LAMPIRAN 7**Data Lebar Kripta**

Kelompok	Replikasi	Hewan ke-3		Hewan ke-4	
			Rerata \pm SD		Rerata \pm SD
Normal	1	168,21	165,41 \pm 12,61	45,25	47,99 \pm 3,93
	2	151,63		50,73	
	3	176,38		52,86	
Blanko	1	143,66	142,14 \pm 6,83	63,79	63,18 \pm 6,90
	2	148,08		62,56	
	3	134,67		51,28	
Kontrol Positif	1	140,66	150,21 \pm 37,02	50,19	50,19 \pm 10,10
	2	118,91		50,19	
	3	191,07		67,68	
Kontrol Negatif	1	185,5	170,93 \pm 20,40	64,43	54,63 \pm 13,95
	2	179,68		44,83	
	3	147,61		71,82	
Probiotik Monostrain	1	132,5	119,79 \pm 21,17	61,88	57,63 \pm 5,10
	2	131,51		53,37	
	3	95,35		62,49	
Probiotik Multistrain	1	176,67	171,30 \pm 5,18	60,45	60,02 \pm 4,44
	2	170,89		59,59	
	3	166,34		52,36	
Probiotik Multispecies	1	207,22	176,09 \pm 30,21	53,27	58,03 \pm 4,77
	2	174,14		62,78	
	3	146,9		57,49	