

**PENGARUH EKSTRAK KOPI “AMSTIRDAM” TERHADAP
LEVEL Treg DAN EKSPRESI Lp-PLA2 PADA MENCIT
DENGAN DIET TINGGI LEMAK**

SKRIPSI

oleh:
WIRDATUN NAFISAH
155090100111002



JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG
2019



**PENGARUH EKSTRAK KOPI “AMSTIRDAM” TERHADAP
LEVEL Treg DAN EKSPRESI Lp-PLA2 PADA MENCIT
DENGAN DIET TINGGI LEMAK**

SKRIPSI

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam Bidang Biologi**

**oleh:
WIRDATUN NAFISAH
155090100111002**



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI

**PENGARUH EKSTRAK KOPI “AMSTIRDAM” TERHADAP
LEVEL Treg DAN EKSPRESI Lp-PLA2 PADA MENCIT
DENGAN DIET TINGGI LEMAK**

WIRDATUN NAFISAH

15509010011102

telah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 7 Mei 2019
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam Bidang Biologi

Menyetujui
Pembimbing

Prof. Muhaimin Rifa'i, M.Si, Ph.D.Med.Sc
NIP 196806261997021001

Mengetahui
Ketua Program Studi S-1 Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Rodiyati Azrianingsih, S.Si., M.Sc., Ph.D.
NIP.19700128.199412.2.001

HALAMAN PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Wirdatun Nafisah

NIM : 155090100111002

Jurusan : Biologi

Penulis Skripsi berjudul : Pengaruh Ekstrak Kopi “Amstirdam”
Terhadap Level Treg Dan Ekspresi Lp-
Pla2 Pada Mencit Dengan Diet Tinggi
Lemak

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Skripsi ini adalah benar-benara karya saya sendiri dan bukan hasil plagiat dari karya orang lain. Karya-karya yang tercantum dalam Daftar Pustaka Skripsi ini semata-mata digunakan sebagai acuan/referensi
2. Apabila kemudian hari diketahui bahwa isi Skripsi saya merupakan hasil plagiat, maka saya bersedia menanggung akibat hukum dari keadaan tersebut

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran

Malang, 13 Mei 2019

Yang menyatakan

Wirdatun Nafisah

NIM: 155090100111002

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skrripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.



Pengaruh Ekstrak Kopi “Amstirdam” terhadap Level Treg Dan Ekspresi Lp-Pla2 pada Mencit dengan Diet Tinggi Lemak

Wirdatun Nafisah dan Muhaimin Rifa'i

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Brawijaya

2019

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui pengaruh ekstrak kopi “Amstirdam” terhadap level Treg dan ekspresi Lp-PLA2 pada mencit diet tinggi lemak. Metode penelitian induksi HFD (*High Fat Diet*) pada semua mencit kecuali kelompok sehat selama 5 bulan dengan komposisi 8% protein dari kuning telur bebek, fruktosa 30%, 17% lemak sapi, kecuali 0,2% asam kolat yang hanya diberikan selama 2 bulan diawal induksi. Kemudian kelompok mencit treatment diberi ekstrak kopi secara oral selama 2 minggu (DI = 104mg/kg, DII = 520mg/kg dan DIII = 5.200mg/kg). Mencit kemudian didisolasi dan organ spleen serta aorta diisolasi. Level Treg dan ekspresi Lp-PLA2 dianalisis dengan flowcytometry. Konfirmasi atherosclerosis dilakukan melalui pengamatan histologi aorta dengan metode paraffin dan pewarnaan H&E. Hasil analisis flowcytometri dilanjutkan dengan analisis statistik menggunakan SPSS 16.0 for windows dengan *one-way ANOVA* dengan nilai $p= 0.05$ dan dilanjutkan dengan uji Duncan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase ekspresi Lp-PLA2 mengalami penurunan setelah treatment dan nilai terendah pada kelompok treatment Dosis 2 yaitu 12,81% dibandingkan dengan kelompok Sehat dan Sakit yakni berturut-turut 9,75% dan 31,24% ($p<0.05$). Persentase Treg pada kelompok treatment Dosis 3 dan kelompok Sehat menunjukkan nilai yang tidak beda nyata pada uji Duncan yakni dengan nilai berturut-turut 72,50% dan 69,43%, sedangkan nilai Treg pada kelompok sakit, Dosis 1 dan Dosis 2 berturut-turut adalah 33,82%, 58,33%, 50,57%. Pemberian ekstrak kopi amstirdam mampu menginduksi level Treg sehingga dapat mensupresi inflamasi pada aterosklerosis.

Kata Kunci: Aterosklerosis, kopi amstirdam, Lp-PLA2, Treg

Effect of "Amstirdam" Coffee Extract on Treg Level and Lp-PLA2 Expression in Mice-Induced High Fat Diet

Wirdatun Nafisah and Muhaimin Rifa'i

Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences
Brawijaya University
2019

ABSTRACT

The aim of this study is to determine the effect of "Amstirdam" coffee extract on Treg levels and Lp-PLA2 expression in mice induced High Fat Diet (HFD). The method of this research are HFD induction was performed on all mice except the healthy group for 5 months with diet composition, 8% protein from duck egg yolk, fructose 30%, 17% beef fat, except 0.2% colic acid which is only given for 2 months at the beginning of induction. Then the treatment mice group was given coffee extract orally for 2 weeks (DI = 104mg/kg, DII = 520mg/kg dan DIII = 5.200mg/kg). Mice were then dislocated and spleen and aorta organs isolated. Treg level and Lp-PLA2 expression were analyzed by flowcytometry. Confirmation of atherosclerosis is carried out through histological examination of the aorta with the paraffin method and H & E staining. The results of flowcytometry analysis continued with statistical analysis using SPSS 16.0 for windows with one-way ANOVA ($p=0.05$) and continued with Duncan test. The results showed that the lowest percentage of Lp-PLA2 expression (marker atherogenesis) in treatment group is Dosage 2 (12.81%) compared to the Healthy and Sickness group which was 9.75% and 31.24% respectively ($p < 0.05$). Based on the results of the Treg activation analysis, the values in the treatment group Dose 3 and the Healthy group showed values that were not significantly different from the Duncan test, with values of 72,50% dan 69,43% respectively. Whereas the Treg values in the sickness group, Dosage 1 and Dosage 2 were 33,82%, 58,33%, and 50,57% respectively. The increasing of Treg level caused by the treatment of coffee amstirdam extracts shows promising effect on atherosclerosis treatment.

Keywords: Atherosclerosis, coffee amstirdam, Lp-PLA2, Treg



KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan Karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi. Shalawat serta salam semoga tetap tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW yang telah memberikan jalan dobrakan terhadap kemajuan ilmu pengetahuan. Penulisan skripsi yang berjudul “Pengaruh Ekstrak Kopi “Amstirdam” terhadap Level Treg dan Ekspresi Lp-PLA2 pada Mencit dengan Diet Tinggi Lemak” diajukan untuk memenuhi salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya, Malang.

Penyusunan skripsi tidak terlepas dari bantuan, bimbingan dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati penulis menyampaikan terimakasih kepada:

1. Prof. Muhaimin Rifa'i S.Si., Ph.D., Med. Sc selaku Dosen Pembimbing Skripsi, atas bimbingan dan motivasi kepada penulis.
2. Drs. Aris Soewondo dan Prof. Sutiman Bambang Sumitro., SU., D.Sc selaku dosen penguji, atas masukan, kritik dan saran untuk penulis.
3. M. Mursyidi Fahmi, Horyati, Raudhatul Maghfiroh, Abd. Wahid Hasyim, Ahmad Mujahid Mustaghfiri dan Faizul Azmi, serta Ubaidillah dan Khaliliyati dan seluruh keluarga besar penulis atas doa dan dukungannya.
4. Teman-teman yang memberikan pengaruh positif dan semangat terhadap penulis, Tri Kurniawati Sholehah, Abu Hanifah Ramadhani, Hary Isnanto S.Si, Sapti Puspitarini M.Si, Noviana Dwi Lestari M.Si, Feri Eko Hermanto S.Si, Dliyauddin Dimyati S.Si, Bambang Pristiwanto M.Si, Yuyun Ika M.Si, Didin Wahyu Agustina S.Si, M. Fitri Athoillah M.Si dan seluruh kakak-kakak dan teman-teman di Laboratorium Anatomi Fisiologi Hewan yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.
5. Tim Aterosklerosis Tri Kurniawati Sholehah, Annia Zhafarina dan Luthfi Rahma atas kerja keras dan kerja cerdas

during the research, and the Limfosit Biologi 2015 award which has been successful together up to this stage.

Hopefully Allah SWT will give a reward to everyone and be given smoothness in achieving their goals. The author realizes that writing this manuscript is still far from perfect. Therefore, the author very appreciates any suggestions and criticism that build up to the perfection of this manuscript.

Malang, 13 Mei 2019

Penulis



DAFTAR ISI

Halaman

ABSTRAK	iii
ABSTRACT	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan	2
1.4 Manfaat	2
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Kopi “Amstirdam atau <i>Java Coffee Amstirdam</i> ...	3
2.2 Patofisiologi Atherosclerosis	3
2.3 Metabolisme Lemak dan Modifikasi LDL	4
2.4 Peran Treg pada Atherosclerosis	6
2.5 Peran Lp-LPA2 pada Atherosclerosis.....	7
BAB III METODE PENELITIAN	9
3.1 Waktu dan Tempat	9
3.2 Hewam Eksperimen	9
3.3 Preparasi Hewan Model.....	9
3.4 Pembuatan Ekstrak Kopi	9
3.5 Pengecekan Kadar Kolesterol Darah	10
3.6 Analisis Flowcytometry	11
3.7 Parameter Penelitian	12
3.8 Pembuatan Preparat Histologi Aorta	12
3.9 Analisis Data	12
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	13
4.1 Profil Lipid dengan Uji LipidPro.....	13
4.2 Analisis Ekspresi Lp-LPA2	15

4.3 Analisis Level Treg..... 18

BAB V PENUTUP 21

5.1 Kesimpulan 21

5.2 Saran 21

DAFTAR PUSTAKA 22

LAMPIRAN 28



DAFTAR TABEL

Nomor	Halaman
1	13



DAFTAR GAMBAR

Nomor	Halaman	
1	Mekanisme Aksi Treg pada Aterosklerosis.....	7
2	Hasil Analisis Flowcytometry Lp-PLA2.....	16
3	Ekspresi Lp-PLA2.....	16
4	Histologi Aorta Mencit	17
5	Hasil Analisis Flowcytometry Aktivasi Treg	19
6	Level Treg.....	20



DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Halaman
1	28
2	29

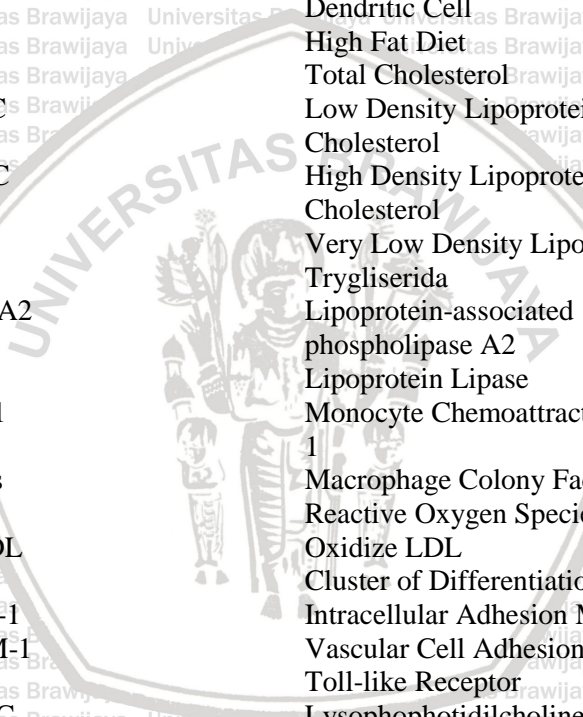


DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

Simbol/Singkatan

Keterangan

TGF	Transforming Growth Factor
NK	Natural Killer
IFN	Interferon
IL	Interleukin
Th	T Helper
Treg	T regulator
DC	Dendritic Cell
HFD	High Fat Diet
TC	Total Cholesterol
LDL-C	Low Density Lipoprotein-Cholesterol
HDL-C	High Density Lipoprotein-Cholesterol
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
TG	Trygliserida
Lp-PLA2	Lipoprotein-associated phospholipase A2
LPL	Lipoprotein Lipase
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
M-CFs	Macrophage Colony Factor
ROS	Reactive Oxygen Species
Ox-LDL	Oxidize LDL
CD	Cluster of Differentiation
ICAM-1	Intracellular Adhesion Molecule-1
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule
TLR	Toll-like Receptor
LysoPC	Lysophosphatidilcholine
OxFA	Oxidized non-esterified Fatty Acid



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diets high in animal fats atau sering dikenal sebagai *High Fat Diet* (HFD) merupakan tren makanan masa kini dengan kandungan asam lemak jenuh yang tinggi sehingga diketahui berhubungan secara langsung dengan penyakit kardiovaskular (Kearney, 2010). Tingginya minat konsumen terhadap HFD dapat dihubungkan dengan prevalensi *aterosklerosis* yang semakin meningkat. Berdasarkan hubungan tersebut, tidak jarang HFD digunakan dalam pembuatan hewan coba model *aterosklerosis*.

Aterosklerosis merupakan penyakit kronis kompleks yang ditandai dengan akumulasi lipid pada dinding arteri yang akhirnya membentuk plak. Plak yang terbentuk dapat menyebabkan penyempitan, pengerasan, dan atau penyumbatan arteri secara sempurna. Beberapa penyebab yang diketahui berkontribusi dalam pembentukan aterosklerosis adalah *hypercholestrolemia* (tingginya *total cholesterol* (TC) dan *low-density lipoporetin cholesterol* (LDL-C)) (Pearson dkk, 2002), inflamasi, stres oksidatif dan resistensi insulin (Libby dkk, 2002 dan Van Gall, 2006).

Sebagai penyakit inflamasi kronis, banyak penelitian menyebutkan bahwa Treg merupakan suatu target terapeutik baru dalam pengobatan aterosklerosis. Semua tipe Treg memediasi modulasi imun dengan cara mensekresi sitokin *inhibitory*, memproduksi enzim *immunosupresive*, menghambat kontak antar sel, gangguan metabolik, dan mensupresi maturasi dan fungsi DC (Han-Xiou dkk, 2018). Selain itu, yang menarik dalam dunia sains, khususnya bidang aterosklerosis, ditemukan biomarker spesifik inflamasi *vascular* dan *atherogenesis*. Biomarker tersebut adalah *Lipoprotein-associated phospholipase A2* (Lp-PLA2) (Cai dkk, 2013). Lp-PLA2 diekspresikan dibanyak sel yang terlibat dalam aterosklerosis seperti makrofag, *T-cells*, limfosit, dan *mast cell*.

Kopi merupakan minuman non-alkohol yang populer dan banyak dikonsumsi oleh semua kalangan didunia dan hingga saat ini kaitannya dengan penyakit kardiovaskular masih dalam perdebatan dan memunculkan hal-hal kontroversial (Floegel, 2012; Butt dan Sultan, 2011). Beberapa kajian epidemiologikal menyatakan asosiasi positif antara konsumsi kopi dan resiko penyakit kardiovaskular (Liu



dkk, 2013; Grioni dkk, 2015), sedangkan laporan lain menyatakan tidak ada asosiasi (Floegel dkk, 2012; Lopez-Gracia dkk, 2006) atau bahkan berasosiasi sebaliknya (Lopez-Gracia dkk, 2009; Ding dkk, 2014; Ding dkk, 2015).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian kopi “Amstirdam” yang merupakan salah satu dari sepuluh kopi yang paling diburu di dunia (Pudjosakti, 2017) terhadap level Treg dan ekspresi Lp-PLA2 pada mencit yang diinduksi HFD atau diet tinggi lemak.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan Masalah dari penelitian ini adalah bagaimana pengaruh ekstrak kopi “Amstirdam” terhadap level Treg dan ekspresi Lp-PLA2 pada mencit dengan diet tinggi lemak?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh ekstrak kopi “Amstirdam” terhadap level Treg dan ekspresi Lp-PLA2 pada mencit dengan diet tinggi lemak.

1.4 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini adalah dapat menjawab kontroversi efikasi dan peran kopi khususnya kopi “Amstirdam” terhadap kesehatan dan penyakit aterosklerosis atau kardiovaskular. Mengenalkan kopi “Amstirdam” yang merupakan kopi dari Malang lebih luas kepada masyarakat. Serta dapat menjadi referensi alternatif upaya preventif ataupun kuratif penyakit *aterosklerosis* secara alami.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kopi “Amstirdam” atau *Java Coffee Amstirdam*

Kopi di Indonesia terdapat beragam jenis, dari kopi aceh hingga papua dengan ciri khas rasa yang berbeda. Kopi merupakan salah satu komoditas unggulan Indonesia di pasar Internasional karena sebagian besar produk kopi asal Indonesia diekspor ke Negara-negara Uni Eropa, Amerika Serikat, dan Jepang (Simamora, 2014).

Salah satu kopi Indonesia yang termasuk dari sepuluh jenis kopi yang paling diburu di dunia selain *Tanzania Peaberry Coffee*, Hawaii Kona Coffee dll, berdasarkan survey aneka top 10 adalah Java Coffee Amstirdam atau kopi Amstirdam yang berasal dari Kabupaten Malang. Nama Amstirdam merupakan singkatan dari empat kecamatan yang ada di Kabupaten Malang, yakni kecamatan Ampelgading, Sumbermanjing Wetan, Tirtoyudo, dan Dampit (Pudjosakti, 2017). Salah satu pengusaha kopi di Kabupaten Malang yakni Sivaraja mendirikan CV. Pemenang Sejati dengan merek dagang Amstirdam *Coffee*.

Kopi Amstirdam merupakan jenis kopi robusta yang terkenal. Kopi ini tumbuh diatas bebatuan yang terdapat berbagai macam mineral. Salah satu faktor kualitas kopi Amstirdam sebagai salah satu kopi terbaik di dunia adalah karena sejak abad ke 18 Pulau Jawa telah terdapat perkebunan kopi terbesar yang didirikan oleh pemerintah Belanda dan memiliki aroma dan rasa yang khas (Pudjosakti, 2017).

2.2 Patofisiologi Aterosklerosis

Aterosklerosis merupakan penyakit inflamasi kronis yang dimulai dengan adanya timbunan lemak akibat akumulasi dari lipid yang dimuat dalam *foam cells* pada lapisan intima arteri (Alexander dan Dzau, 2000). Akumulasi lipid merupakan tahap pertama dari patogenesis aterosklerosis yang dilanjutkan dengan inflamasi kronik pada dinding utama arteri dan kemudian berkembang menjadi fibroatheromas (Pedrigo dkk, 2014; Collins dkk, 2003).

Fatty streak akibat adanya penebalan pada intima kemudian menjadi cap fibrous atheromas, plak dan secara tiba-tiba dapat mengalami kematian kardiak. Dalam kasus manusia, *fatty streak*



berkembang pada 11-12 tahun dan plak fibrous pada 15-30 tahun dan berkembang pada bagian anatomik yang sama. *Fatty streak* berkembang menjadi plak aterosklerosis yang dibentuk dari 3 komponen, yaitu sel-sel inflamasi, sel otot polos, komponen fibrous dari jaringan ikat dan komponen lemak dari lipid (Ridker dkk, 2009).

Kerusakan endotel berperan dalam inisiasi aterosklerosis. Aliran darah yang bergolak menyebabkan disfungsi endotelial, menghambat produksi NO sebagai vasodilator dan dapat menstimulasi produksi molekul adhesi yang dapat menarik sel-sel inflamasi. Monosit dan sel T berikatan pada sel-sel endotel dan bermigrasi ke ruang subendotelial. Lipid di darah, LDL, VLDL berikatan dengan sel-sel endotel dan teroksidasi di subendotelial. Monosit pada subendotelial menelan LDL yang teroksidasi dan berubah menjadi *foam cell*. Hal tersebut menandakan tahap pertama, yaitu penimbunan lemak oleh *foam cell*. Makrofag mengeluarkan sitokin inflamasi yang merekrut sel otot polos. Kemudian, otot polos bereplikasi dan densitas *matrix extracellular* meningkat. Hasil jejas terakhir adalah plak fibrous pada subendotelial yang tersusun oleh lipid yang dikelilingi oleh sel otot polos dan *fiber* jaringan ikat (Fowkes dkk, 1992).

2.3 Metabolisme Lemak dan Modifikasi *Low-Density Lipoprotein* (LDL)

2.3.1 Peran Metabolisme Lipid pada Aterosklerosis

Kolesterol, trigliserida, dan lipoprotein terlibat dalam patogenesis aterosklerosis. Peningkatan serum LDL dan konsentrasi trigliserida bertanggung jawab terhadap formasi jejas aterosklerosis (Albertini dkk, 2002). Peran metabolisme lipid dan modifikasi LDL merupakan hal penting dalam perkembangan aterosklerosis. Metabolisme lipid muncul pada *pathway* eksogenus dan endogenus. *Pathway* eksogenus dimulai dengan sintesis kilomikron dan sekresinya oleh usus. Kilomikron mengandung apolipoprotein (Apo) B-48, C-II, dan E. Apo C-II merupakan kofaktor esensial lipoprotein lipase (LPL) (Nguyen dkk, 2008) yang menghantarkan asam lemak ke jaringan adiposa. Setelah aktifitas LPL, kilomikron tersisa cukup banyak dalam kolestrol karena kehilangan triasilgliserol,



dan diabsorpsi liver oleh Apo E. *Pathway* endogenous dimulai dari sintesis partikel LDL, yang kaya trigliserida dan mengandung Apo B-100 berikatan dengan proteoglikan, yang merupakan molekul paling penting dalam penyimpanan lipoprotein (Khalil dkk, 2004; Kramer-Guth dkk, 2006; Williams, 2001). Penyimpanan partikel LDL pada dinding pembuluh diketahui sebagai tahap pertama pathogenesis aterosklerosis (Wisniewska dkk, 2017).

2.3.2 Modifikasi dan Oksidasi LDL pada Aterosklerosis

Tahap kedua pada pathogenesis aterosklerosis adalah LDL subendothelial yang teroksidasi oleh sel-sel vaskular dan penekanan produksi sel vaskular monosit *chemattractant protein-1* (MCP-1) dan *macrophage colony factors* (M-CFs) (Choi dkk, 2009). Peningkatan produksi *reactive oxygen species* (ROS) dapat terjadi karena beberapa keadaan seperti merokok, hipertensi, hiperglikemia dan hiperlipidemia. Keadaan tersebut juga dapat menguasai respon antioksidan endogenous. Stres oksidatif meningkatkan oksidasi LDL dan merusak fungsi endotelial (Bloomer, 2007; Frostegard dkk, 2003). Stres oksidatif kronis memberikan resiko lebih besar terhadap formasi aterosklerosis. Pada fase inisiasi modifikasi LDL, komponen lipid berinteraksi dengan ROS, dan memproduksi banyak macam produk oksidasi lipid (Levitan dkk, 2010). Produk oksidasi lipid, seperti produk lifosfolipid, ditangkap oleh protein Apo B. Protein Apo B teroksidasi, dan menyebabkan perubahan pada rantai asam amino dengan memutus ikatan peptida. Setelah modifikasi Apo B, LDL teroksidasi (ox-LDL) menjadi sebuah ligan dari reseptor scavenger (Parthasarathy dkk, 2010). Penyimpanan ox-LDL dikenal berinteraksi dengan 2 reseptor scavenger utama pada makrofag: reseptor scavenger kelas A (SR) A/II dan kelas B scavenger *receptor cluster of differentiation 36* (CD36). SRA/II mengenali modifikasi protein Apo B pada ox-LDL dan phospholipid teroksidasi dikenali oleh CD36. Setelah interaksi dengan reseptor scavenger, makrofag teraktifasi dan menelan ox-LDL.

Ox-LDL juga menginduksi beberapa kondisi pro-inflamasi melalui *lectin-like oxidized LDL receptor-1* (LOX-1) (Badnya dkk, 2013). Aktivitas kemotaktik dari modifikasi oksidasi LDL



menstimulasi monosit untuk berikatan dengan sel endotel, sehingga terjadi peningkatan properti *adhesive endotelium*, seperti *overexpression* dari *intracellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) dan *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) (Cominacini dkk, 2007). Sel-sel inflamasi dan monosit mengeluarkan MCP-1 untuk mengaktifkan leukosit dan menstimulasi proliferasi SMCs, seperti SR/AI/II, SR-BI, CD36, OX-1 dan Toll-like receptors (TLRs) dan menyebabkan akumulasi lipid. Interaksi ox-LDL-CD36 menginduksi internalisasi ox-LDL dan mengaktifasi penambahan makrofag (Park dkk, 2012). Makrofag menginduksi inflamasi berkelanjutan melalui (IL)-1 β , *tumor necrosis factor* (TNF), ROS dan *metalloproteases* (Hanson dan Libby, 2006).

2.4 Peran Treg pada Aterosklerosis

Perkembangan, progresivitas dan komplikasi penyakit aterosklerosis sangat tergantung pada peran respon imunomodulasi. Hal tersebut disebabkan karena inflamasi vaskular pada aterosklerosis dimodulasi oleh respon autoimun terhadap antigen sendiri (*self-antigen*, seperti misalnya *oxidized low density lipoprotein* (Ox-LDL) pada dinding vaskular (Hansson dkk, 2006).

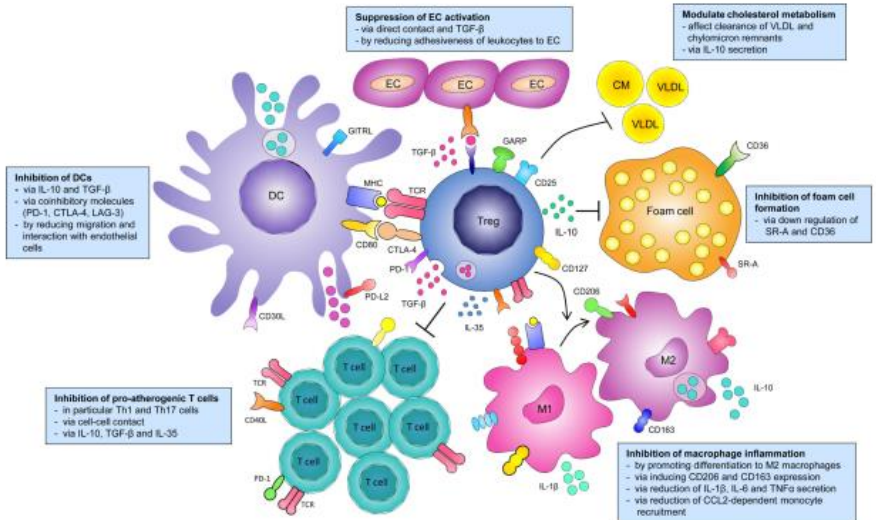
Peran aktif Treg pada sistem kontrol terhadap *self-antigen* di tingkat perifer dibutuhkan karena Treg mampu membatasi inflamasi, mencegah terjadinya formasi plak dengan mensupresi sel T yang bersifat aterogenik. Rendahnya level Treg pada perifer yang terdeteksi dengan antibodi monoklonal anti CD25 menunjukkan peningkatan ukuran lesi aterosklerosis dan kerentanan ruptur (vulnerabilitas) pada mencit defisiensi gen *apolipoprotein E* (*ApoE*^{-/-}).

Treg dan substratnya bertanggung jawab terhadap pertahanan toleransi imunologik dan mensupresi imunitas sel-sel T efektor berlebih (Peterson, 2012) sehingga dapat mengurangi perkembangan aterosklerosis. Interleukin 10 (IL-10) dan *transforming growth factor* (TGF- β) merupakan dua macam sitokin yang diproduksi oleh subset Treg dengan sifat anti-inflamasi. Kedua sitokin tersebut berperan dalam mereduksi respon inflamasi proaterogenik yang terlibat dalam aterosklerosis.

Beberapa mekanisme aksi Treg yang berperan dan terlibat



dalam perkembangan aterosklerosis yakni inhibisi sel T efektor, inhibisi dendritic sel, inhibisi formasi inflamasi makrofag dan foam cell, meningkatkan stabilitas lesi, berpengaruh pada metabolisme kolesterol, dan supresi aktivasi endothelial (Gambar 1)(Foks dkk., 2015).



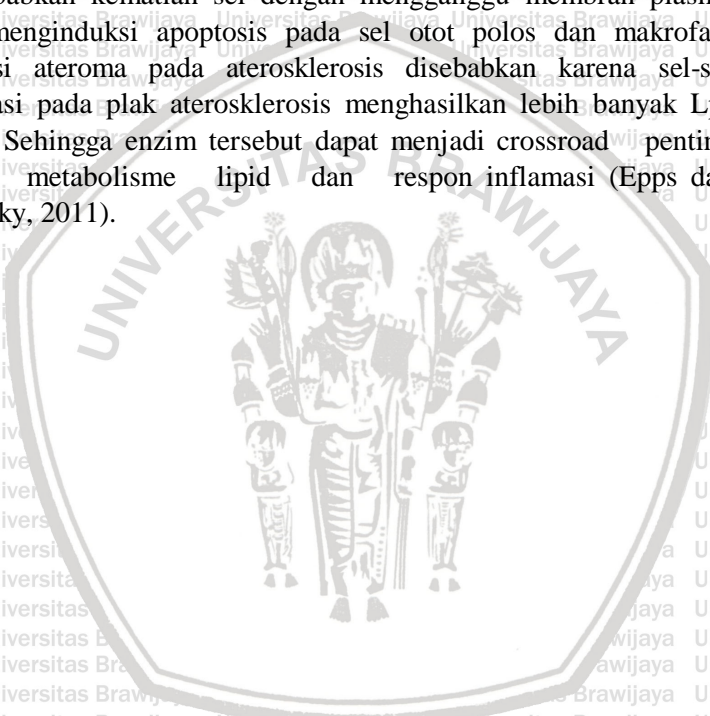
Gambar 1. Mekanisme aksi Treg pada aterosklerosis (Foks dkk., 2015).

2.5 Peran Lipoprotein – Associated Phospholipase A2 pada Inisiasi dan Perkembangan Aterosklerosis

Lipoprotein – Associated Phospholipase A2 merupakan suatu enzim yang dikode oleh gen PLA2G7 dan tersusun oleh 441 asam amino. Lp-PLA2 merupakan sebuah Ca^{2+} -independent phospholipase yang termasuk dalam phospholipase A2 superfamili (Dada dkk, 2002). Terdapat dua jenis Lp-PLA2, yaitu Lp-PLA2 yang tersekresi di sistem peredaran darah dan Lp-PLA2 pada plak aterosklerosis. Lp-PLA2 yang diproduksi oleh makrofag pada plak aterosklerosis kemudian masuk ke sistem sirkulasi dan berubah menjadi Lp-PLA2 tersekresi (Lavi dkk, 2007). Sekitar 70% Lp-PLA2 tersekresi berikatan dengan LDL-C dan sisanya berikatan dengan HDL-C dan lipoprotein lainnya (Wu dkk., 2003). Secara

biologis, Lp-PLA2 tersekresi umunya berikatan dengan porsi ApoB pada LDL dan hidrolisis LDL terhadap *lysophosphotidylcholine* (Lyso-PC) dan arachidonic acid. Padahal pada plak *aterosklerosis*, Lp-PLA2 menghidrolisis ox-LDL menghasilkan Lyso-PC dan *oxidized non-esterified fatty acids* (oxFA) yang keduanya berperan dalam atherogenesis.

Lysophosphotidylcholine dan *oxFA* berperan penting dalam atherogenesis karena dapat menarik monosit, merusak fungsi endotel, menyebabkan kematian sel dengan mengganggu membran plasma serta menginduksi apoptosis pada sel otot polos dan makrofag. Progresi atheroma pada aterosklerosis disebabkan karena sel-sel inflamasi pada plak aterosklerosis menghasilkan lebih banyak Lp-PLA2. Sehingga enzim tersebut dapat menjadi crossroad penting antara metabolisme lipid dan respon inflamasi (Epps dan Wilensky, 2011).



BAB III METODE

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan selama empat bulan dimulai pada Bulan September-Maret 2018 di Laboratorium Fisiologi dan Perkembangan Hewan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya Malang.

3.2 Hewan Eksperimen

Tiga puluh mencit *swiss* jantan (umur 5-6 minggu, berat 20-30 g) didapatkan dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Mencit dipelihara di *experimental animal centre* Biologi Molekuler Universitas Brawijaya. Pemilihan hewan jantan didasarkan dari perbedaan hormon yang dimiliki dari jantan atau betina. Estrogen merupakan hormon penting yang berpengaruh terhadap atherogenesis. Hormon tersebut berkontribusi terhadap *oestrogen-mediated antioxidant action* (Rifici dan Khacharudin, 1992), pengembangan profil lipid (reduksi LDL dan meningkatkan HDL) (Nabulsi dkk, 1993; Hong dkk, 1992), dan secara langsung *atheroprotection* jaringan kardiovaskular (Fogelberg dkk, 1990; Mikkola dkk, 1995). Setiap seekor mencit diletakkan dalam satu kandang yang berbeda karena mencit jantan cenderung lebih agresif sehingga tidak direkomendasikan untuk meletakkan lebih dari satu mencit dalam satu kandang (Fawcett, 2012), sehingga total kandang terdapat 30 kotak yang kemudian seluruhnya diletakkan pada *experimental animal chamber*. Suhu, pencahayaan serta blower pada *animal chamber* diatur sehingga memberikan kondisi terbaik untuk mencit. Setiap mencit disediakan air dan makan (8-9 g/hari HFD/sehat) yang dapat dengan bebas dikonsumsi. Mencit dipelihara dalam siklus 12 jam gelap/terang, dengan temperatur 20 ± 2 °C. Hewan dipelihara sesuai dengan protokol dan prosedur pemeliharaan di Laboratorium Biologi Molekuler dan Anatomi Fisiologi Hewan Universitas Brawijaya.

3.3 Preparasi Hewan Model

Setelah 1 minggu aklimatisasi, mencit *swiss* kemudian secara acak dibagi menjadi 5 grup yang terdiri dari lima kelompok, antara lain kelompok kontrol positif, kelompok kontrol negatif, perlakuan



dosis 1, perlakuan dosis 2, dan perlakuan dosis 3. Replikasi minimal yaitu lima kali, sesuai dengan perhitungan uji t. Total durasi waktu yang digunakan untuk preparasi hewan model Aterosklerosis adalah 3 bulan. Selama 5 bulan mencit dalam kelompok sakit dan perlakuan dosis 1, dosis 2 dan dosis 3 diberi *High Fat Diet* atau disebut pakan aterogenik. HFD mengandung 8% protein dari kuning telur bebek, fruktosa 30%, 17% lemak sapi dan 0.2% asam kolat. Penambahan asam kolat pada HFD ditujukan agar mengubah lipoprotein menjadi lebih aterogenik yaitu menurunkan kadar HDL dan meningkatkan LDL (Srivastava dkk, 2000).

3.4 Pembuatan Ekstrak Kopi

Bubuk kopi Amstirdam yang didapatkan dari Prof. Muhaimin Rifa'i diekstraksi. Bubuk kopi dilarutkan ke dalam akuades dengan perbandingan 1:10 g/mL lalu dipanaskan hingga suhu 80°C dan diinkubasi pada suhu 80°C selama 2 jam menggunakan inkubator. Setelah 2 jam inkubasi, larutan disaring menggunakan kertas saring halus dan dimasukkan kedalam beberapa botol kaca. Bagian mulut botol ditutup menggunakan plastik bening yang telah dilubangi kecil-kecil. Larutan dalam botol dibekukan dengan deep freezer dengan suhu -70°C selama 3 hari hingga membeku dengan sempurna dan kemudian difreeze dry.

Perhitungan dosis dilakukan dengan mengacu pada dosis manusia dengan berat badan 60 kg yang mengkonsumsi kopi dengan dosis 2 mg x 2 per hari. Kemudian dilakukan konversi dosis manusia ke mencit dan diperoleh dosis absolut yakni 15,6 mg/30 g berat badan mencit. Tiga dosis berbeda yang digunakan yakni: DI = 3,12 mg/ 30 g, DII = 15,6 mg/30g dan DIII = 156 mg/30g.

3.5 Pengecekan Kadar Kolesterol Darah dengan *Lipid Pro*

Kadar kolesterol darah pada hewan coba diukur menggunakan kit *Lipid Pro*TM yang didapatkan dari Ekomed Medical pada sebelum perlakuan dan setelah perlakuan dan sebelum didislokasi. Pengecekan diawal perlakuan dilakukan secara random pada 4 ekor mencit HFD dan 1 ekor mencit sehat. Ujung ekor mencit diusap dengan tisu yang sudah disemprot alkohol 70%. Kemudian



ujung ekor digunting menggunakan gunting bedah steril sepanjang 1-2 mm. Darah yang keluar diteteskan pada 3 buah sensor pada *strip* masing-masing hingga kit berbunyi. Hasil total kolesterol, HDL, LDL dan trigliserida akan terbaca pada layar kit.

3.6 Analisis Flowcytometry

Setelah didislokasi, mencit dibedah dan dilakukan isolasi organ limpa (*spleen*) untuk dilakukan pewarnaan antibodi dan isolasi aorta untuk dilakukan uji histopatologi.

Spleen yang sudah diisolasi diletakkan pada petri dish berisi 3 mL PBS kemudian dicuci dan digerus didalam PBS hingga membentuk homogenat. Homogenat yang sudah terbentuk dimasukkan kedalam tabung propilen untuk dilakukan sentrifugasi. Kemudian homogenat disentrifugasi dengan kecepatan 2.500 rpm selama 5 menit dengan suhu 10°C. Setelahnya, supernatan dibuang lalu pelet diresuspensi dengan 1 mL PBS dan di-*pipetting*.

Suspensi yang diperoleh dipisahkan kedalam *microtube* sebanyak 50 μ L yang telah terisi PBS sebanyak 400 μ L. Suspensi disentrifugasi dengan kecepatan 2.500 rpm selama 5 menit dengan suhu 10°C hingga terbentuk pelet dan supernatan. Kemudian supernatan dibuang.

Pelet dilakukan pewarnaan ekstraseluler dan intraseluler. Pewarnaan ekstraseluler yaitu CD4, CD25, dan CD62L ditambahkan sebanyak 50 μ L kedalam *microtube* berisi sel kemudian diinkubasi selama 20 menit pada suhu 4°C dalam ruangan gelap. Setelah 20 menit, ditambahkan 400 μ L PBS dan dipindahkan ke kuvet untuk analisis menggunakan flowcytometry.

Pewarnaan intraseluler yaitu untuk analisis CD11b, B220 dan Lp-PLA2 dilakukan dengan penambahan 50 μ L larutan *cytofix* terlebih dahulu kedalam pelet hasil sentrifugasi dan diinkubasi selama 20 menit dalam suhu 4°C dan keadaan gelap. Setelah diinkubasi 20 menit, ditambahkan larutan wash buffer (Washperm) sebanyak 500 μ L kemudian dihomogenasi. Kemudian homogenate disentrifugasi dengan kecepatan 2.500 rpm selama 5 menit dalam suhu 10oC dan supernatan dibuang. Kemudian pelet yang diperoleh ditambahkan 50 μ L antibodi intraseluler dan diinkubasi selama 20 menit pada suhu 40C dan ruang gelap. Setelah 20 menit, ditambahkan 400 μ L PBS dan dipindah



ke kuvet untuk analisis *flowcytometry*.

3.7 Paramater Penelitian

Parameter penelitian yang digunakan adalah CD4⁺CD25⁺ dan Lp-PLA2.

3.8 Pembuatan Preparat Histopatologi Aorta dengan Metode Parafin

Pembuatan preparat histopatologi jaringan aorta pada menciit dilakukan sebagai uji konfirmasi aterosklerosis. Uji histopatologi dilakukan dengan pengamatan histopatologi pembuluh darah aorta dari 1 menciit kelompok sehat dan 13 menciit kelompok perlakuan HFD. Jaringan aorta yang telah diisolasi kemudian difiksasi menggunakan larutan formalin 4% kemudian dibuat preparat dengan metode paraffin dan pewarnan H&E.

3.9 Analisis Data

Analisis data hasil *flowcytometri* menggunakan 'SPSS versi 16.0 for windows'. Data yang digunakan berupa jumlah relatif (presentase) dari setiap paramater yang diamati, kemudian diuji sehatitas dan homogenitasnya. Data yang terdistribusi sehat, diuji dengan *one-way ANOVA* dengan nilai $p=0.05$.



BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Profil Lipid dengan Uji LipidPro

Level *low-density lipoprotein* (LDL) diketahui menjadi salah satu faktor resiko aterosklerosis terbesar. Hal tersebut dikarenakan LDL dapat terakumulasi di sub-edonthelial dinding arteri dan secara progresif mengalami modifikasi oksidatif membentuk *oxidized* LDL (oxLDL). Perubahan tersebut menginduksi respon inflamasi yang dikarakterisasikan dengan *overexpression* dari *chemotactic protein* seperti *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), dan *adhesion molecules* (*vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1), E-selectin dan P-selectin). Molekul adesi mempromosikan infiltrasi darah yang mengandung monosit ke dinding arteri. Monosit tersebut kemudian berdiferensiasi menjadi makrofag dan lalu menelan oxLDL, kemudian bertransformasi menjadi *foam cell* dan berkontribusi terhadap perkembangan plak dengan mensekresi mediator proses inflamasi di dinding pembuluh (Veseli dkk, 2017).

Berdasarkan hasil penelitian, diketahui terdapat perbedaan profil lipid pada kelompok mencit sehat dan kelompok mencit yang diinduksi HFD (Tabel 1).

Tabel 1. Profil lipid (mg/dL)

Kelompok	LDL		TC		TG		HDL	
	a	b	a	b	a	b	a	b
Sehat	58	61	100	103	72	77	47	45
Sakit		93		187		76		70
Dosis 1	89.	56	165.	100	123.	112	69.5	83
Dosis 2	5	59	25	141	25	96		54
Dosis 3		84		175		99		60

Tabel 1. (a) minggu ke 20 (sebelum treatment kopi kecuali kelompok sehat dan kelompok sakit), (b) minggu ke 22 (setelah treatment kopi kecuali kelompok sehat dan kelompok sakit).

Low Density Liporotein (LDL) dan *Total Cholesterol* (TC) adalah salah satu hal yang berperan dalam aterosklerosis. Nilai TC pada kelompok sehat lebih rendah daripada kelompok sakit, baik pada minggu ke 20, ataupun minggu ke 22. Nilai TC pada kelompok



sehat pada minggu ke 22 adalah 103 mg/dL, sedangkan pada kelompok sakit adalah 187mg/dL. Nilai TC kelompok treatment mengalami penurunan setelah ditreatment kopi, baik di kelompok Dosis 1 dan Dosis 2. Kelompok yang diinduksi dengan HFD baik pada kelompok sakit dan kelompok treatment memiliki nilai rata-rata TC 165.25 mg/dL. Kelompok mencit yang ditreatment ekstrak kopi amstirdam dosis 1 mengalami penurunan nilai TC menjadi 100mg/dL dan 141mg/dL pada dosis 2. Namun, pada kelompok Dosis 3, level TC setelah ditreatment kopi menjadi 175mg/dL.

Profil LDL pada mencit yang tidak diinduksi HFD adalah 58mg/dL pada minggu ke 20 dan 61mg/dL pada minggu ke 22. Rata-rata level LDL pada kelompok mencit yang diinduksi HFD sebelum ditreatment dengan ekstrak kopi amstirdam adalah sebesar 89.5mg/dL. Level tersebut mengalami peningkatan pada mencit kelompok sakit yaitu sebesar 93mg/dL pada minggu ke 22. Padahal, level LDL pada kelompok treatment, baik pada Dosis 1, 2 dan 3 mengalami penurunan. Level LDL pada kelompok mencit Dosis 1 setelah ditreatment kopi setiap hari selama 2 minggu menjadi 56mg/dL, 59mg/dL pada dosis 2 dan 84mg/dL pada dosis 3.

Menurut Chan dkk (2015), terdapat perbedaan lipoprotein dan metabolisme lipid antara manusia dan mencit. Mencit tidak memiliki enzim cholesteryl ester transfer protein (CETP) yang berperan dalam mentransfer kolesterol ester dari HDL menjadi LDL dan VLDL dengan imbalan TG. Tidak adanya CETP pada mencit normal menyebabkan 80% plasma kolesterol dibawa oleh HDL, jadi mencit dengan tinggi HDL bersifat resisten terhadap hypercholesterolemia dan aterosklerosis. Selain itu, perbedaan manusia dan mencit adalah terkait kemampuan merespon terhadap diet kolesterol. Manusia dapat mengabsorbsi sekitar 50% diet kolesterol sedangkan mencit tidak dapat mengabsorbnya (Lin dkk, 2015). Nilai TC mencit sakit pada penelitian ini adalah sebesar 165-187mg/dL. Didukung dengan penelitian Chan dkk (2015), nilai TC pada mencit normal berbeda signifikan dengan mencit transgenic TECP. Mencit transgenic CETP memiliki rata-rata TC sebesar 250mg/dL, sedangkan pada mencit normal hanya 163mg/dL. Hal tersebut juga dapat menjadi penyebab rendahnya profil LDL pada penelitian ini. Dibandingkan dengan mencit knock out gene LDL reseptor (LDLR^{-/-}), profil LDL dapat mencapai 293mg/dL hingga 425mg/dL.



Profil HDL pada penelitian ini, baik pada kelompok sehat, sakit maupun treatment menunjukkan HDL yang sangat tinggi. Hal tersebut juga berkaitan dengan tidak adanya enzim CEPT pada mencit tanpa modifikasi genetik.

Penurunan level TC pada kelompok mencit yang ditreatment dengan kopi amstirdam selaras dengan penelitian FatimatuZZahro dan Rendra (2018) yang menunjukkan adanya penghambatan level TC pada tikus jantan galur witsar yang diinduksi diet tinggi lemak setelah diberikan kopi robusta selama 4 minggu. Beberapa komponen penting pada kopi robusta yang berkaitan secara langsung dengan kolesterol adalah asam klorogenik dan polifenol. Asam klorogenik dapat mencegah penyerapan kolesterol di usus dan menghambat pelepasan glukosa ke aliran darah. Selain itu, kandungan polifenol pada kopi robusta berpotensi menurunkan akumulasi lemak visceral.

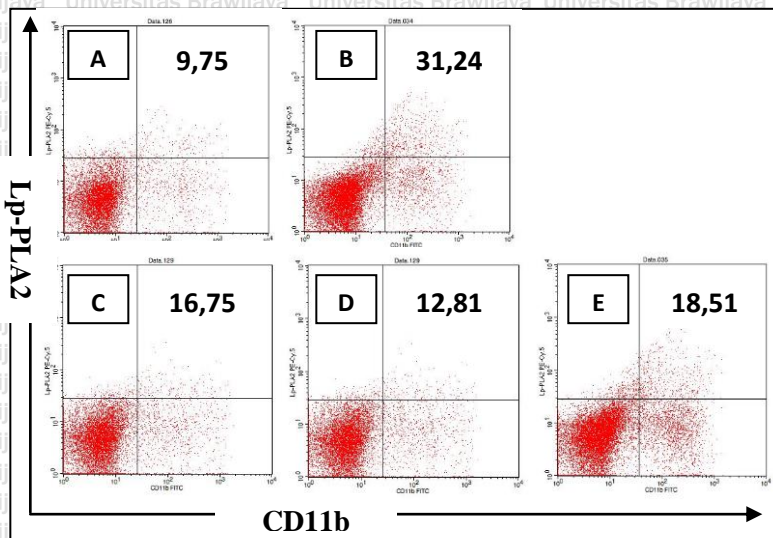
4.2 Analisis Ekspresi Lp-PLA2

Lp-PLA2 merupakan sebuah marker atherogenesis karena keterlibatannya dalam perkembangan aterosklerosis. Sumber utama Lp-PLA2 yang ditemukan pada lesi aterosklerosis adalah Lp-PLA2 yang dibawa ke dalam lapisan intima yang terikat dengan LDL (dari sirkulasi) dan yang disintesis oleh sel-sel inflamasi pada plak (Mohler dkk, 2008).

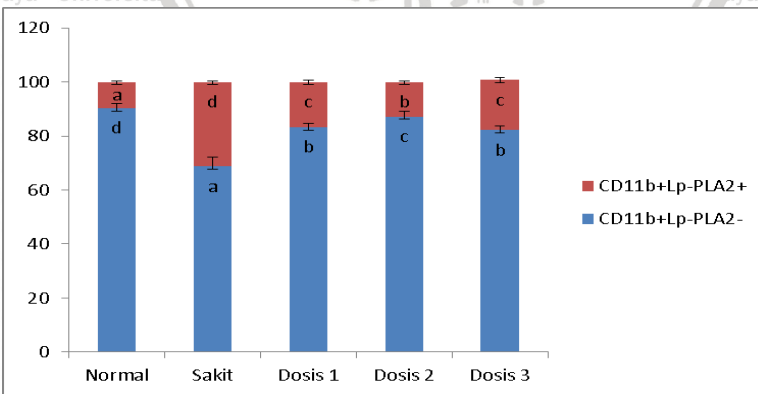
Berdasarkan hasil analisis *flowcytometry* ekspresi Lp-PLA2 dari sel makrofag (Gambar 1), terdapat perbedaan yang sangat signifikan ($p>0.05$) (Gambar 2).



Eksresi Lp-PLA2 dari makrofag pada kelompok sakit jauh lebih tinggi dari kelompok sehat yaitu 31.24% pada kelompok sakit dan 9.75% pada kelompok sehat ($p>0.05$). sedangkan pada kelompok treatment, ekspresi Lp-PLA2 dari makrofag pada Dosis 1 yaitu 16.75%, Dosis 2 12,81%, dan Dosis 3 18,51% ($p>0.05$). Ekspresi Lp-LPA2 terendah pada kelompok treatment adalah pada Dosis 2 dan kondisi tersebut mendekati normal.

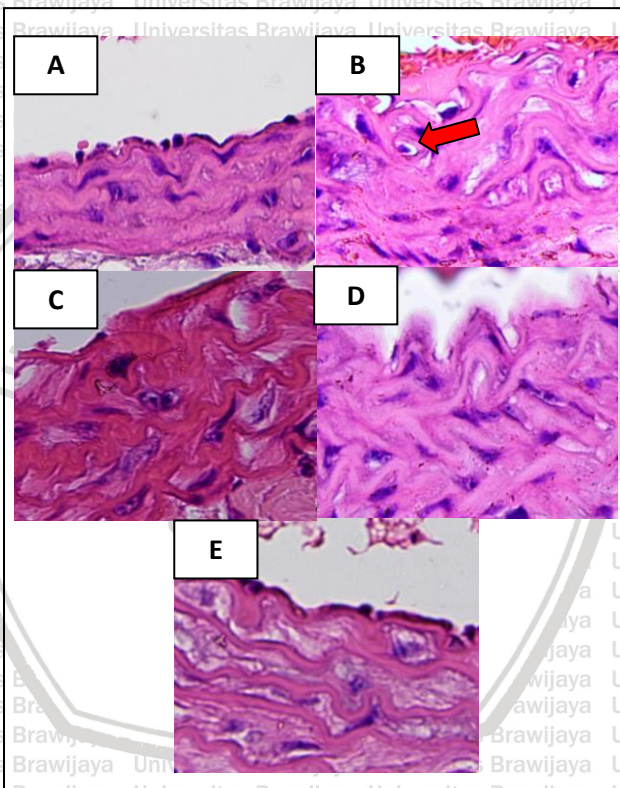


Gambar 2. Hasil analisis flowcytometry Lp-PLA2 dari makrofag, A. Sehat, B. Sakit, C. Dosis 1, D. Dosis 2, E. Dosis 3.



Gambar 3. Ekspresi Lp-PLA2 dari makrofag

Lp-PLA2 sebagai enzim yang disekresi makrofag (*foam cell*) maka ekspresi tersebut dapat dibandingkan dan dikonfirmasi dengan pengamatan preparat. Berdasarkan preparat histologi (Gambar 2), ekspresi Lp-PLA2 makrofag dari spleen yang dianalisis dengan flowcytometry berbanding lurus dengan penampakan *foam cell* pada preparat histologi aorta mencit. Plak rawan ruptur mengekspresikan Lp-PLA2 yang tinggi dan juga dapat dilepaskan menuju sirkulasi darah (Weintraub 2008; Epps dan Wilensky 2011).



Gambar 4. Histologi aorta mencit (M 400x) A. Kelompok sehat, B. Sakit, C. Dosis 1, D. Dosis 2, E. Dosis 3;

Penurunan ekspresi Lp-PLA2 dari makrofag pada kelompok treatment memberikan dampak dan hasil yang positif. Lp-PLA2 yang rendah menunjukkan progresi baik pada. Menurut (Weintraub 2008; Epps dan Wilensky 2011), Lp-PLA2 merupakan enzim yang

berperan penting dalam perkembangan aterosklerosis karena perannya dalam menghidrolisis fosfolipid. Proses hidrolisisi Ox-LDL yang dihasilkan LDL saat teroksidasi di dinding arteri merupakan peran kunci dalam atherogenesis. Progresi atheroma disebabkan karena Ox-LDL yang dihidrolisis oleh Lp-PLA2 dapat menghasilkan dua produk samping yang bersifat proinflamasi dan atherogenik, yaitu lifosfotidilkolin (LysoPC) dan Oxidized Fatty Acid (OxFA). Peran penting dalam atherogenesis adalah pada LysoPC yang berperan dalam rekrutmen monosit, disfungsi endothel, menginduksi apoptosis pada sel otot polos dan makrofag.

4.3 Analisis Level Treg

Treg secara umum dicirikan dengan sel CD4+CD25+ yang mengekspresikan faktor transkripsi forkhead box P3 (Foxp3) yang memiliki beberapa subset dengan fungsi yang bermacam-macam pada aterosklerosis. Kemampuan Treg dalam mensupresi sel T pathogenic diketahui karena adanya produksi IL-10 dan TGFβ.

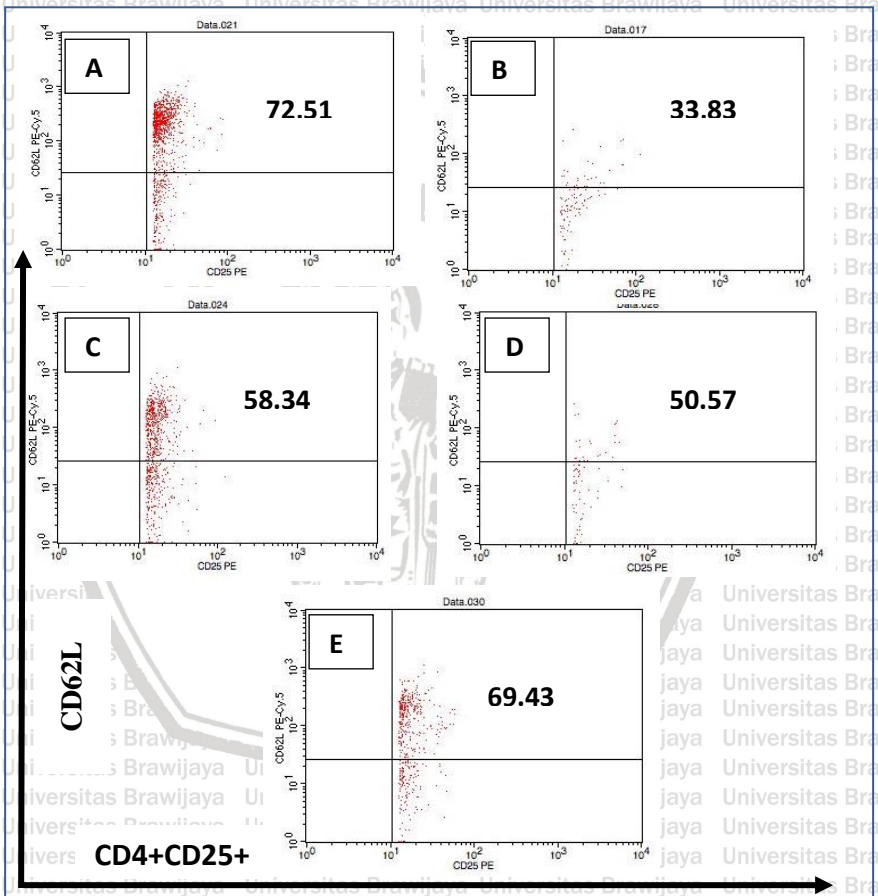
Treg merupakan salah satu subkelas dari sel T yang memiliki peran penting pada aterosklerosis. Endogenous Treg CD4+CD25+ berperan dalam proteksi atherogenesis pada hyperlipidemic mencit. Kemampuan Treg dalam mensupresi dan menghambat *pro-inflammatory immune responses* pada aterosklerosis membuat Treg menjadi fokus penelitian dalam pemanfaatan terapi imun dalam mengatasi aterosklerosis.

Treg memiliki kemampuan mensupresi *pro-atherogenic T cell effector* pada aterosklerosis. Sebagian besar T cell CD4+ pathogenic pada aterosklerosis adalah Th1 cells yang disekresi via IFN-γ yang menstimulasi rekrutmen monosit dan sel T menuju plak, meningkatkan uptake lipid dengan makrofag dan aktivasi APCs lesional. IL-10 dan TGF-β memiliki kontribusi yang besar dalam mensupresi sel T efektor oleh Treg pada aterosklerosis. Tingginya IL-10 pada mencit menunjukkan reduksi ukuran plak inflamasi yang ditunjukkan dengan rendahnya level IFN-γ. Kemampuan Treg lainnya adalah menginhibisi inflamasi makrofag dan formasi foam cell. Kemampuan atheroprotective Treg yaitu dengan mempromosi diferensiasi M1 makrofag terhadap anti-inflammatory M2 makrofag (Foks dkk, 2015).

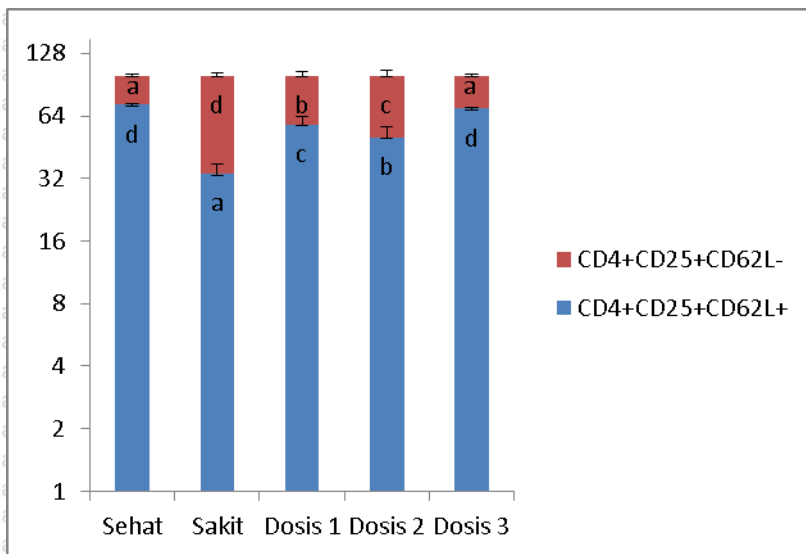
Berdasarkan hasil analisis flowcytometry (Gambar 4), persentase jumlah Treg (CD4+CD25+CD762L+) pada kelompok sehat adalah



72.51% menunjukkan level yang paling besar dibandingkan kelompok sakit yakni 33.83%, kelompok mencit dosis 1 58.34%, dosis 2 50.57%, dan 69.43% pada kelompok mencit dosis 3. Berdasarkan uji Duncan, level Treg pada kelompok sehat dan dosis 3 tidak berbeda nyata, sedangkan pada kelompok Dosis 1 dan 2 terdapat perbedaan yang signifikan terhadap kelompok sehat dan sakit (Gambar 5).



Gambar 4. Hasil analisis *flowcytometry* level Treg, A. sehat, B. Sakit, C. Dosis 1, D. Dosis 2, E. Dosis 3.



Gambar 5. Level Treg

Salah satu dari dua subset utama Treg, natural Tregs (nTregs) berkembang di dalam timus dan mengenali self-antigen spesifik. nTregs melakukan homing menuju jaringan perifer untuk meningkatkan self-tolerance dan mencegah autoimun dengan menghambat limfosit patogenik dan *self-reactive*. Foxp3 nTregs menekan proliferasi sel T jaringan spesifik dan diferensiasinya menjadi Th1, Th2, dan Th17. Selain itu, Foxp3 nTregs juga menghambat aktivasi poliklonal sel T dan fungsi dari sel imun lain seperti sel B, makrofag, dan DCs (Spitz dkk., 2015).

Subset utama Treg lainnya adalah iTregs, berkembang dari naïve T cells pada perifer selama respon aktif imun. iTregs dapat dibagi pada sel Tr1 yang memproduksi IL-10, dan Th3 yang mensekresi TGFβ. IL-10 dapat menghambat sel Th1 dan produksi sitokin pro-inflamasi (misal: IFNγ) namun juga berpengaruh terhadap tipe sel yang berkaitan dengan aterosklerosis (misalnya: promosi makrofag M1 menjadi M2) (Spitz dkk., 2015).

BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kopi “amstirdam” dapat mempengaruhi level Treg dan ekspresi Lp-PLA2. Level Treg pada kelompok treatment (Dosis 1, Dosis 2, dan Dosis 3) menunjukkan level yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok sakit yakni 58.34% pada dosis 1, dosis 2 50.57%, 69.43% pada dosis 3 dan 33.83% pada kelompok sakit. Sedangkan level Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kopi amstirdam mampu menginduksi Treg yang kemudian dapat mensupresi inflamasi pada lesi aterosklerosis. Ekspresi Lp-PLA2 dari makrofag pada kelompok sakit jauh lebih tinggi dari pada kelompok sehat dan treatment, yakni 31.24%. Sedangkan pada kelompok sehat adalah 9.75%, 16.75% pada Dosis 1, 12.81% pada Dosis 2, dan 18.51% pada kelompok 3. Berdasarkan hasil analisis level Treg dan ekspresi Lp-PLA2 pada mencit yang diinduksi HFD menunjukkan bahwa treatment ekstrak kopi “amstirdam” berkorelasi positif atau dapat menjadi obat alternative aterosklerosis dan CVD.

5.2 Saran

Sebaiknya dilakukan penelitian lanjutan seperti analisis senyawa kopi “amstirdam”, analisis potensi kopi “amstirdam” terhadap aterosklerosis melalui pendekatan bioinformatika, dan analisis pengaruh ekstrak kopi “amstirdam” terhadap sel inflamasi dengan pendekatan *in vitro*.



DAFTAR PUSTAKA

- Albertini, R., Moratti, R., De Luca, G. 2002. Oxidation of Low-Density Lipoprotein in Aterosklerosis from Basic Biochemistry to Clinical Studies. *Curr. Mol. Med.* 2,579–592.
- Alexander RW, Dzau VJ. 2000. Vascular Biology: the past 50 years. *Circulation.* 102: IV-112-IV-116.
- Badrnya, S., Assinger, A., Volf, I. 2013. Native High Density Lipoproteins (HDL) Interfere with Platelet Activation Induced by Oxidized Low Density Lipoproteins (OxLDL). *Int. J. Mol. Sci.* 14, 10107.
- Bloomer, R.J. 2007. Decreased Blood Antioxidant Capacity and Increased Lipid Peroxidation in Young Cigarette Smokers Compared to Nonsmokers: Impact of Dietary Intake. *Nutr. J.* 2007, 6, 39.
- Butt MS., Sultan MT. 2011. Coffee and Its Consumption Benefits and Risk. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 51:363-373.
- Cai, Anping., Dongdan Zheng., Ruofeng Qui., Weiyi Mai., Yingling Zhou. 2013. Lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2): A novel and Promising biomarker for cardiovascular risk assessment. *Disease Markers.* 34. 323–331.
- Chan, Jeannie., Genesio M.K., Laura A.C., Jhon L.V. 2015. 2015. Animal Models of Diet-Induced Hypercholesterolemia. INTECH. <http://dx.doi.org/10.5772/59610>. Diakses 4 Mei 2018.
- Cominacini, L., Garbin, U., Pasini, A.F., Davoli, A., Campagnola, M., Contessi, G.B., Pastorino, A.M., Cascio, V.L. 2007. Antioxidants Inhibit the Expression of Intercellular Cell Adhesion Molecule-1 and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Induced by Oxidized LDL on Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Free Radic. Biol. Med.* 22, 117–127.
- Dada N., Kim NW., Wolfert RL. 2002. Lp-PLA2: An emerging biomarker of coronary heart disease. *Expert Rev Mol Diagn.* 2(1): 17-22.
- Ding M., Satija A., Bhupathiraju SN., Hu Y., Sun O., Han J., Lopez-Gracia E., Willewt W., Van Dam RM., Hu FB. 2015. Association of Coffee Consumption with Total and Cause-specific Mortality in Three Large Prospective Cohorts.



Circulation. 132:2305-2315.

Ding M., Bhupathiraju SN., Satija A., Van Dam RM., Hu FB. 2014. Long-term Coffee Consumption and Risk of Cardiovascular Disease: a Systemic Review and a Dose-response Meta-analysis of Prospective Cohorts. *Circulation*. 129:643-659,

Epps K.C. dan Willensky R.L. 2011. Lp-PLA2- A Novel Risk Factor for High Risk Coronary and Carotid Artery Disease. *J Intern Med* 269, 94.

Fatimatuzzahro, Nadie dan Rendra Chriestedy P. 2018. Efek Seduhan Kopi Robusta terhadap Profil Lipid Darah dan Berat Badan Tikus yang Diinduksi Pakan Tinggi Lemak. Diakses dari

<https://jkb.ub.ac.id/index.php/jkb/article/viewFile/2147/604> pada 2 Mei 2019.

Fawcett, Anne. 2012. Guidline for the Housing of Mice in Scientific Institution. Diakses dari https://www.animaethics.org.au/data/assets/pdf_file/0004/249898/Guideline-22-mouse-housing.pdf pada 25 Mei 2018.

Floegel A., Pischon T., Bergmann NM., Teucher B., Kaaks R., Boeing H. 2012. Coffee Consumption and Rosk of Chronic Disease in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Germany Study. *Am J Clin Nutr*. 95:901-908.

Fogelberg, M., Vesterqvist, O., Diczfalusy, U. and Henriksson, P. 1990. Experimental Aterosklerosis: effects of oestrogen and Aterosklerosis on thromboxane and prostacyclin formation. *Eur. J. Clin. Invest.* 20, 105–110.

Foks, Amanda C., Andrew H.L., Johan Kuiper. 2015. Treating aterosklerosis with regulatory T cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 35(2): 280-287.

Fowkes FG., Housley E., Riemersma RA., Macintyre CC., Cawood EH, dkk, 1992. Smoking, lipids, glucose intolerance, and blood pressure as risk factors for peripheral Aterosklerosis compared with ischemic heart disease in the Edinburgh Artery Study. *Am J Epidemiol*. 135: 331-340.

Frostegard, Johan. 2013. Immunity, Aterosklerosis and Cardiovascular Disease. *BMC Medicine*. 11:117.

Frostegård, J., Ruihua, W.U., Lemne, C., Thulin, T., Witztum, J.L., 23



- de Faire, U. 2003. Circulating Oxidized Low-Density Lipoprotein Is Increased in Hypertension. *Clin. Sci.* 105, 615–620.
- Griioni S., Agnoli C., Sieri S., Pala V., Ricceri F., Masala G., Saieva C., Panico S., Mattiello A., Chiodini P., Tumino R., Frasca G., Lacoviello L., de Curtis A., Vineis P., Krogh V. 2015. Espresso Coffee Consumption and Risk of Coronary Heart Disease in a Large Italian Cohort. *PLoS One.* 10:e0126550.
- Hansson, G.K., Robertson, A.K., Soderberg-Naucler, C. 2006. Inflammation and Atherosclerosis. *Annu. Rev. Pathol.* 1, 297–329.
- Han-xiou Ou., Bing-bing Guo., Qi LIU., Yu-kun Li., Zhen Yang., Wen-jie FENG., Zhong-cheng mo. 2018. Regulatory T cell as a new therapeutic target for atherosclerosis. *Acta Pharmacologica Sinica.* 39:1-10.
- Hong, M. K., Romm, P. A., Reagan, K., Green, C. E. and Rackley, C. E. 1992. Effects of estrogen replacement therapy on serum lipid values and angiographically defined coronary artery disease in postmenopausal women. *Am. J. Cardiol.* 69, 176–178.
- Kearney, John. 2010. Food consumption trends and drivers. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 27; 365(1554): 2793–2807.
- Khalil, F.M., Wagner, W.D., Goldberg, I.J. 2004. Molecular Interactions Leading to Lipoprotein Retention and the Initiation of Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 2211–2218.
- Kramer-Guth, A., Greiber, S., Pavenstadt, H., Quaschnig, T., Winkler, K., Schollmeyer, P., Wanner, C. 2006. Interaction of Native and Oxidized Lipoprotein(a) with Human Mesangial Cells and Matrix. *Kidney Int.* 49, 1250–1261.
- Lavi S., McConnell JP., Rihal CS. 2007. Local production of lipoprotein-associated phospholipase A2 and lysophosphatidylcholine in the coronary circulation: association with early coronary atherosclerosis and endothelial dysfunction in humans. *Circulation.* 115(21): 2715-21.
- Libby, P., Ridker PM, Maseri A. 2002. Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation.* 105:1135-1143.
- Liu, J. Sui X., Lavie CJ., Hebert JR., Eamest CP., Zhang J., Blair SN. 2013. Association of Coffee Consumption with All- cause

and Cardiovascular Disease Mortality. *Mayo Clin Proc.* 88:1066-1074.

Lopez-Gracia E., Rodriguez-Artalejo F., Rexrode KM., Logroscino G., Hu FB., Van Dam RM. 2009. Coffee Consumption and Risk of Stroke in Women. *Circulation.* 119:1116-1123.

Lopez-Gracia E., Van Dam RM., Willet WC., Rimm EB., Manson JE., Stampfer MJ., Rexrode KM., Hu FB. 2006. Coffee Consumption and Coronary Heart Disease in Men and Women. *Circulation.* 113:2045-2053.

Mikkola, T., Turunen, P., Avela, K., Orpana, A., Viinikka, L. and Ylikorkala O. 1995. 17 β -estradiol stimulates prostacyclin, but not endothelin-1, production in human vascular endothelial cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80, 1832–1836.

Mohler E.R, Ballantyn C.M. 2008. The effect of darapladip on plasma lipoprotein-associated phospholipase A2 activity and cardiovascular biomarkers in patient with stable coronary heart disease or coronary heart disease risk equivalent: the result of multicenter, randomized, double-blind, placebo-control study. *J Am Coll Cardiol.* 51(17), 1632.

Park, Y.M., Drazba, J.A., Vasanthi, A., Egelhoff, T., Febbraio, M., Silverstein, R.L. 2012. Oxidized LDL/CD36 Interaction Induces Loss of Cell Polarity and Inhibits Macrophage Locomotion. *Mol. Biol. Cell.* 23, 3057–3068.

Parthasarathy, S., Raghavamenon, A., Garelnabi, M.O., Santanam, N. 2010. Oxidized Low-Density Lipoprotein. *Methods. Mol. Biol.* 610, 403–417.

Pearson TA, Blair SN, Daniels SR, Eckel RH, Fajr JM, Fortmann SP, Franklin BA, Goldstein LB, Greenland P, Grundy SM, Hong Y, Miller NH, Lauer RM, Ockene IS, Sacco RL, Sallis JF, Smith SC, Stone NJ, Taubert KA. 2002. AHA Guidelines for Primary Prevention of Cardiovascular Disease and Stroke: 2002 Update: Consensus Panel Guide to Comprehensive Risk Reduction for Adult Patients Without Coronary or Other Atherosclerosis Vascular Disease. *Circulation.* 106:338-391.

Pedrigi RM., De Silva R., Bovens SM., Mehta VV., Petretto E. 2014. Thin-cap fibroatheroma rupture is associated with a fine interplay of shear wall stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 34: 2224-2231.



Peterson R.A. 2012. Regulatory T-Cells: Diverse Phenotypes Integral to Immune Homeostasis and Suppression. *Toxicol Pathol* 40, 186.

Pudjosakti, Ira. 2017. Kopi Amstirdam Malang termasuk Kopi yang Paling as Br Diburu Unive Di as Br Dunia. Unive Diakses d a r i <https://www.malangtimes.com/baca/18638/20170531/171628/kopi-amstirdam-malang-termasuk-kopi-yang-paling-diburu-di-dunia/> pada 30 Oktober 2018.

Ridker PM., Danielson E., Fonseca FA., Genest J., Gotto AM. 2009. Reduction in C-reactive protein and LDL cholesterol and cardiovascular event rates after initiation of rosuvastatin: a prospective study of the JUPITER trial. *Lancet*. 373: 1175-1182.

Rifici, V. A. dan Khachadurian, A. K. 1992. The inhibition of low-density lipoprotein oxidation by 17- β estradiol. *Metab. Clin. Exp.* 41, 1110-1114.

Simamora, Sehat Dinati. 2014. Langkah dan Strategi Ekspor ke Uni Eropa: Produk Kopi. Apindo-EU Active Market Brief. Edisi Juli 2014.

Spitz, Charlotte, Holger Winkles, Chirstina Burgur, Christian Weber, Esther Lutgens, Goran K. Honson, Norbert Gerdes. 2015. Regulatory T Cells in Atherosclerosis: Critical Immune Regulatory Function and Therapeutic Potencial. *Cellular and Molecular Life Science*. DOI 10.1007/s00018-015-2080-2.

Srivastava RAK, Srivastava N, Avena M. 2000. Dietary Cholic Acid Lower Plasma Level of Mouse and Human Apolipoprotein A-I Primarily Via Transcriptional Mechanism. *Eur. J. Biochem*. 267: 4272-80.

Van Gall, LF, Martens IL, De Block CE. 2006. Mechanisms Linking Obesity with Cardiovascular Disease. *Nature*. 444:875-880.

Veseli, B Emini., Paola Perrotta., Gregory RA.D. Meyer., Lynn Roth., Carole Van der Donckt., Wim Martinet., Guido R.Y. Meyer. 2-17. Animal models in aterosklerosis. *European Journal Pharmacology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.05.010>.

Weinraub H.S. 2008. Identifying the vulnerable patient with Rupture-Prone Plaque. *Am J Cardiol*. 101, 3F.



Weinrub H.S. 2008. Identifying the Vulnerable Patient with Rupture-Prone Plaque. *Am J Cardiol.* 101, 3F.

Wisniewska, A., Olszanecki, R., Toton´ Z´ uran´ ska, J., Kus´, K., Stachowicz, A., Suski, M., Gebska, A., Gajda, M., Wu JN., Ho SC., Zhou C., Ling WH., Chen WQ., Wang CL., Chen YM. 2009. Coffee Consumption and Risk of Coronary Heart Disease: a Meta-analysis of 21 Prospective Cohort Studies. *Int J Cardiol.* 137:216-225.

Wu X, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM, Stafforin DM 2003. Molecular characterization of the constitutive expression of the plasma platelet-activating factor acetylhydrolase gene in macrophages. *Biochem J.* 375(Pt 2): 351-63.

Zhou, S.M., Chadipiralla, K., Mendez, A.J., Jaimes, E.A., Silverstein, R.L., Webster, K., Raj, L. 2013. Nicotine Potentiates Proatherogenic Effects of OxLDL by Stimulating and Upregulating Macrophage CD36 Signaling. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 305, H563–H574.



LAMPIRAN

Lampiran 1: Perhitungan Dosis

Ekstrak kopi dilarutkan dengan akuades dengan tiga dosis berbeda. Perkiraan berat kopi murni dalam kopi kemasan yang dijual adalah 5 gram dari 31 gram berat total. Berat kopi yang telah diekstraksi diperkirakan 15% atau sama dengan 1,25 gram. Rata-rata manusia dewasa mengkonsumsi kopi adalah dua kali sehari sehingga diasumsikan manusia mengkonsumsi kopi sebanyak 2,5 gram perhari. Sehingga didapatkan persamaan sebagai berikut:

$$2,5 \text{ g} : 60 \text{ kg BB Manusia} = 0,0416 \text{ g/kg BB manusia} \dots\dots\dots (1)$$

Persamaan (1) dikonversi menjadi mg/kg sebelum dikonversi ke berat badan mencit menggunakan konversi koefisien FDA.

$$0.0416 \text{ g/kg BB manusia} = 41,6 \text{ mg/kg} \dots\dots\dots (2)$$

Persamaan (2) dikonversi ke berat badan mencit menggunakan koefisien FDA yakni 0,08.

$$41,6 \text{ mg/kg} : 0,08 = 520 \text{ mg/kg BB mencit} \dots\dots\dots (3)$$

$$520 \text{ mg/kg} = 5,2 \text{ g/kg BB mencit} \dots\dots\dots (\text{Dosis 2})$$

Dosis 1 merupakan 5 kali lebih rendah dari dosis 2 (1,04 g/kg), dan dosis 3 10 kali lebih tinggi dari dosis 1 (10,4 g/kg).



Lampiran 2. Hasil Analisis Statistik SPSS.

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
						CD4_CD25	Sehat		
	Sakit	5	2.4900	.22338	.09990	2.2126	2.7674	2.24	2.74
	Dosis 1	5	3.9060	.30320	.13559	3.5295	4.2825	3.44	4.29
	Dosis 2	5	3.1460	.40414	.18074	2.6442	3.6478	2.47	3.54
	Dosis 3	5	3.1900	.36380	.16270	2.7383	3.6417	2.69	3.69
	Total	25	2.9376	.74269	.14854	2.6310	3.2442	1.61	4.29
CD4_25_62Lp	Sehat	5	72.5080	1.05713	.47276	71.1954	73.8206	71.01	74.00
	Sakit	5	33.8220	3.64984	1.63226	29.2901	38.3539	30.18	39.73
	Dosis 1	5	58.3380	5.05775	2.26190	52.0580	64.6180	51.71	65.86
	Dosis 2	5	50.5700	6.32698	2.82951	42.7140	58.4260	40.18	57.30
	Dosis 3	5	69.4300	1.13192	.50621	68.0245	70.8355	68.18	70.68

Total	25	56.9336	14.72244	2.94449	50.8565	63.0107	30.18	74.00
CD4_25_62Ln Sehat	5	27.4920	1.05713	.47276	26.1794	28.8046	26.00	28.99
Sakit	5	66.1780	3.64984	1.63226	61.6461	70.7099	60.27	69.82
Dosis 1	5	41.6620	5.05775	2.26190	35.3820	47.9420	34.14	48.29
Dosis 2	5	49.4300	6.32698	2.82951	41.5740	57.2860	42.70	59.82
Dosis 3	5	30.5700	1.13192	.50621	29.1645	31.9755	29.32	31.82
Total	25	43.0664	14.72244	2.94449	36.9893	49.1435	26.00	69.82

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
CD4_CD25	.169	4	20	.952
CD4_25_62Lp	1.456	4	20	.253
CD4_25_62Ln	1.456	4	20	.253

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
CD4_CD25	.169	4	20	.952
CD4_25_62Lp	1.456	4	20	.253
CD4_25_62Ln	1.456	4	20	.253

CD4_CD25

	Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
			1	2	3	4
Tukey HSD ^a	Sehat	5	1.9560			
	Sakit	5	2.4900			
	Dosis 2	5		3.1460		

	Dosis 3	5		3.1900		
	Dosis 1	5			3.9060	
	Sig.		.119	1.000	1.000	
Duncan ^a	Sehat	5	1.9560			
	Sakit	5		2.4900		
	Dosis 2	5			3.1460	
	Dosis 3	5			3.1900	
	Dosis 1	5				3.9060
	Sig.		1.000	1.000	.836	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.



CD4_25_62Lp

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	
Tukey HSD ^a	Sakit	5	33.8220			
	Dosis 2	5		50.5700		
	Dosis 1	5			58.3380	
	Dosis 3	5				69.4300
	Sehat	5				72.5080
	Sig.		1.000	1.000	1.000	.748
Duncan ^a	Sakit	5	33.8220			
	Dosis 2	5		50.5700		
	Dosis 1	5			58.3380	
	Dosis 3	5				69.4300
	Sehat	5				72.5080

Sig.		1.000	1.000	1.000	.242
------	--	-------	-------	-------	------

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

CD4_25_62Ln

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	
Tukey HSD ^a	Sehat	5	27.4920			
	Dosis 3	5	30.5700			
	Dosis 1	5		41.6620		
	Dosis 2	5			49.4300	
	Sakit	5				66.1780
	Sig.		.748	1.000	1.000	1.000
Duncan ^a	Sehat	5	27.4920			

Dosis 3	5	30.5700				
Dosis 1	5		41.6620			
Dosis 2	5			49.4300		
Sakit	5				66.1780	
Sig.		.242	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
CD11Bp_LpPLA2n Sehat	5	90.2500	1.83770	.82185	87.9682	92.5318	87.60	91.57
Sakit	5	68.7600	3.26998	1.46238	64.6998	72.8202	64.81	73.90
Dosis 1	5	83.2440	1.56663	.70062	81.2988	85.1892	82.10	85.92

Dosis 4	5	87.1900	2.13661	.95552	84.5370	89.8430	85.28	90.43
Dosis 5	5	81.4820	1.46592	.65558	79.6618	83.3022	79.51	83.64
Total	25	82.1852	7.77993	1.55599	78.9738	85.3966	64.81	91.57
CD11Bp_LpPLA2p Sehat	5	9.7500	1.83770	.82185	7.4682	12.0318	8.43	12.40
Sakit	5	31.2400	3.26998	1.46238	27.1798	35.3002	26.10	35.19
Dosis 1	5	16.7560	1.56663	.70062	14.8108	18.7012	14.08	17.90
Dosis 4	5	12.8100	2.13661	.95552	10.1570	15.4630	9.57	14.72
Dosis 5	5	18.5180	1.46592	.65558	16.6978	20.3382	16.36	20.49
Total	25	17.8148	7.77993	1.55599	14.6034	21.0262	8.43	35.19

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
CD11Bp_LpPLA2n	.636	4	20	.643
CD11Bp_LpPLA2p	.636	4	20	.643

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CD11Bp_LpPLA2n	Between Groups	1359.703	4	339.926	73.139	.000
	Within Groups	92.953	20	4.648		
	Total	1452.656	24			
CD11Bp_LpPLA2p	Between Groups	1359.703	4	339.926	73.139	.000
	Within Groups	92.953	20	4.648		
	Total	1452.656	24			

CD11Bp_LpPLA2n

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	
Tukey HSD ^a	Sakit	5	68.7600			
	Dosis 5	5		81.4820		
	Dosis 1	5		83.2440	83.2440	
	Dosis 4	5			87.1900	87.1900
	Sehat	5				90.2500
	Sig.		1.000	.699	.061	.204
Duncan ^a	Sakit	5	68.7600			
	Dosis 5	5		81.4820		
	Dosis 1	5		83.2440		
	Dosis 4	5			87.1900	
	Sehat	5				90.2500

Sig.		1.000	.211	1.000	1.000
------	--	-------	------	-------	-------

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

CD11Bp_LpPLA2p

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	
Tukey HSD ^a	Sehat	5	9.7500			
	Dosis 4	5	12.8100	12.8100		
	Dosis 1	5		16.7560	16.7560	
	Dosis 5	5			18.5180	
	Sakit	5				31.2400
	Sig.		.204	.061	.699	1.000
Duncan ^a	Sehat	5	9.7500			

Dosis 4	5		12.8100		
Dosis 1	5			16.7560	
Dosis 5	5			18.5180	
Sakit	5				31.2400
Sig.		1.000	1.000	.211	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

