

**PENGARUH KOMBINASI EKSTRAK KOPI HIJAU
ROBUSTA DAN *Lactobacillus acidophilus* PADA
MENCIT BALB/C YANG DIINFEKSI *Salmonella*
enterica TERHADAP JUMLAH RELATIF SEL CD4+
DAN IFN- γ**

SKRIPSI

Oleh :

FERNANDA SEPTI IKHRIANDANTI

165130100111004



PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2019

**PENGARUH KOMBINASI EKSTRAK KOPI
ROBUSTA DAN *Lactobacillus acidophilus* MENCIT
BALB/C YANG DIINFEKSI *Salmonella enterica*
TERHADAP JUMLAH RELATIF SEL CD4+ DAN IFN-**

γ

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :

FERNANDA SEPTI IKHRIANDANTI

165130100111004



PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2019

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**PENGARUH KOMBINASI EKSTRAK KOPI ROBUSTA DAN
Lactobacillus acidophilus PADA MENCIT BALB/C YANG
DIINFEKSI *Salmonella enterica* TERHADAP JUMLAH
RELATIF SEL CD4+ DAN IFN- γ**

Oleh :

FERNANDA SEPTI IKHRIANDANTI

NIM. 165130100111004

Setelah dipertahankan di depan Majelis penguji

Pada tanggal 8-01-2019

Dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing 1

drh. Dahliatul Qosimah, Mkes.

NIP.19820127 201504 2 001

Mengetahui,

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Dr Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc

NIP. 19631216 198803 1 002

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Fernanda Septi Ikhriandanti

NIM : 165130100111004

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulis skripsi Berjudul :

Pengaruh Kombinasi Ekstrak Kopi Robusta Dan *Lactobacillus acidophilus* Pada Mencit Balb/C yang diinfeksi *Salmonella enterica* terhadap Jumlah Sel relatif CD4+ dan IFN- γ

Dengan ini menyatakan bahwa :

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

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 08 Januari 2020

Yang menyatakan

Fernanda Septi
ikhriandanti

**PENGARUH KOMBINASI EKSTRAK KOPI ROBUSTA DAN
Lactobacillus acidophilus PADA MENCIT BALB/C YANG DIINFEKSI
Salmonella enterica TERHADAP JUMLAH RELATIF SEL CD4+ DAN IFN- γ**

Abstrak

Salmonella enterica merupakan bakteri bersifat patogen terhadap manusia maupun hewan dan ditularkan melalui *Foodborne diseases*. Bakteri *Salmonellosis enterica* mengeluarkan endotoksin sehingga sel epitel rusak terdapat inflamasi yang memicu adanya respon imun, dengan aktivasi Sel T CD4+ dan berdiferensiasi menjadi Th1 yang akan memproduksi IFN- γ untuk aktivasi makrofag sebagai sistem imunitas dalam tubuh. Asam klorogenat, Flavanoid, saponin, tannin dan alkaloid yang terkandung dalam ekstrak kopi robusta berfungsi sebagai antioksidan, antibakteri dan meningkatkan respon imun dalam tubuh. Bakteri *Lactobacillus acidophilus* sebagai bakteri asam laktat berfungsi menghambat pertumbuhan bakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh kombinasi ekstrak kopi robusta dan bakteri *Lactobacillus acidophilus* terhadap preventif peningkatan jumlah relative sel T CD4+ dan IFN- γ pada mencit Balb/C yang diinduksi *Salmonella enterica*. Penelitian dengan hewan coba Mencit Strain Balb/C, dengan kelompok perlakuan yakni, K- (Sehat), K+ (Induksi *Salmonella enterica* dosis 10^8 CFU/mL), K Lacto (Induksi *Lactobacillus acidophilus* dosis 10^8 CFU/mL), P1 (Induksi *Salmonella enterica* dosis 10^8 CFU/mL dan kombinasi ekstrak kopi 250 mg/kgBB + bakteri *Lactobacillus acidophilus* dosis 10^8 CFU/mL), P2 (*Salmonella enterica* dan kombinasi ekstrak kopi 500 mg/kgBB + bakteri *Lactobacillus acidophilus* dosis 10^8 CFU/mL), dan P3 (*Salmonella enterica* dan kombinasi ekstrak kopi 750 mg/kgBB + bakteri *Lactobacillus acidophilus* dosis 10^8 CFU/mL). Analisa data secara kuantitatif dengan perhitungan jumlah sel CD4+ dan IFN- γ pada organ lien dengan menggunakan Uji *One Way Analysis of Variance (ANOVA)* dengan Hasil terdapat adanya penurunan secara signifikan terhadap CD4 dan IFN- γ dengan nilai terbaik pada P1 dengan dosis kombinasi ekstrak kopi 250 mg/kgBB + bakteri *Lactobacillus acidophilus* dosis 10^8 CFU/mL.

Kata kunci : *Gastroenteritis*, Bakteri Asam Laktat, CD4+, IFN- γ , Kopi robusta

Effect of Combination of Robusta Coffee Extract and *Lactobacillus acidophilus* Balb / C Mice Infected with *Salmonella Enterica* Against IFN- γ and CD4 + Cells

Abstract

Salmonella enterica is a gram-negative bacterium that is pathogenic to humans and animals which is transmitted through contaminated livestock products (Foodborne diseases). Salmonellosis enterica bacteria secrete endotoxin causing gastroenteritis where epithelial cells are damaged so that there is inflammation that triggers an immune response by activation of CD4 + T cells, and differentiate into Th1 which will produce IFN- γ for the activation of macrophages as an immune system in the body. Chlorogenic acid, flavonoid, tannin, saponin and alkaloid contained in Robusta coffee extract function as antioxidants, antibacterial and increase the immune response in the body whereas in *Lactobacillus acidophilus* bacteria as lactic acid bacteria function inhibits bacterial growth. This study aims to determine the effect of a combination of Robusta coffee extract and *Lactobacillus acidophilus* bacteria on prevent increase the number relative of CD4 + T cells and IFN- γ in Mice Balb / C induced by *Salmonella enterica*. This research is experimental with experimental animals of Mice (*Mus musculus*) strain Balb / C, 8-10 weeks old males, 24 of which are divided into 6 groups namely, K- (Healthy), K + (induction of *Salmonella enterica* dose 10^8 CFU/mL), K Lacto (induction of *Lactobacillus acidophilus* dose 10^8 CFU/mL), P1 (*Salmonella enterica* and a combination of 250 mg / kgBB coffee extract and *Lactobacillus acidophilus* bacteria dose 10^8 CFU/mL), P2 (*Salmonella enterica* and a combination of 500 mg/kgBB coffee extract + *Lactobacillus acidophilus* bacteria dose 10^8 CFU/mL), and P3 (*Salmonella enterica* and combination of 500 mg / kgBB of coffee extract dose 10^8 CFU/mL) coffee 750 mg / kgBB and *Lactobacillus acidophilus* bacteria dose 10^8 CFU/mL). Quantitative data analysis by calculating the number of CD4 + cells and IFN- γ in the lien organ using the One Way Analysis of Variance (ANOVA) test with a 95% confidence level followed by the Tuckey Test ($\alpha = 5\%$) with the flowcytometry method.

Keywords: *Gastroenteric*, Lactic Acid Bacteria, CD4 +, IFN- γ , Coffee robusta

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah memberikan segala nikmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan proposal skripsi yang berjudul “Pengaruh Kombinasi Ekstrak Kopi Robusta dan *Lactobacillus acidophilus* Pada Mencit Balb/C yang diinfeksi *Salmonella enterica* Terhadap Jumlah Sel relatif CD4+ dan IFN- γ ” dapat terselesaikan.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada pihak-pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan proposal PKL, ucapan terimakasih terutama kepada :

1. Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya (FKH UB) yang telah memberikan kesempatan penulis dalam proses skripsi demi mendapatkan gelar sarjana kedokteran hewan.
2. drh. Dahliatul Qosimah, M.Kes. selaku dosen pembimbing atas bimbingan, kesabaran, nasihat, dan waktu yang telah diberikan untuk penulis, sehingga dapat menyusun proposal skripsi ini sebaik mungkin.
3. drh. Indah Amalia Amri, M.Si selaku dosen penguji I atas bimbingan, kesabaran, nasihat, dan waktu yang telah diberikan untuk penulis, sehingga dapat menyusun proposal skripsi ini sebaik mungkin.
4. drh. Dodik Prasetyo, M.Vet selaku dosen penguji II atas bimbingan, kesabaran, nasihat, dan waktu yang telah diberikan untuk penulis, sehingga dapat menyusun proposal skripsi ini sebaik mungkin.
5. Orang tua dan adik tercinta yang selalu memberikan doa, dukungan, semangat, dan motivasi yang tiada henti untuk penulis, sehingga semua menjadi lancar dalam penulisan proposal.

6. Teman-teman Penelitian Salmonellosis dan Mas Irul sebagai teman dalam perjuangan penelitian skripsi yang selalu mendukung dan support sehingga penelitian dapat berjalan lancar.

7. Sahabat Lulus Tepat Waktu, Asisten Anatomi Veteriner, Ilham Brilian dan teman-teman 2016 A, serta mahasiswa FKH UB yang telah memberikan semangat dan dukungan kepada penulis.

8. Serta semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan proposal Skripsi sehingga kegiatan ini dapat terselesaikan dengan lancar.

Penulis berharap proposal Skripsi ini dapat diterima, sehingga dapat memberikan pengalaman serta wawasan baru terhadap penulis. Penulis menyadari bahwa proposal Skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, oleh karena itu penulis memohon maaf atas kekurangan tersebut.

Malang, 8 Januari 2019

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL ii

LEMBAR PENGESAHAN iii

LEMBAR PERNYATAAN iv

ABSTRAK v

ABSTRACT vi

KATA PENGANTAR vii

DAFTAR ISI viii

DAFTAR TABEL ix

DAFTAR GAMBAR xi

DAFTAR LAMPIRAN xii

DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG xiii

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang 1

1.2 Rumusan Masalah 4

1.3 Batasan Masalah 4

1.4 Tujuan Penelitian 5

1.5 Manfaat Penelitian 6

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Mencit Balb/C 7

2.2 Bakteri Salmonella enterica 8

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi 8

2.2.2 Penularan dan Patogenesis 9

2.2.3 Struktur Antigen 11

2.2.4 Sifat Biokimia 12

2.3 Bakteri Lactobacillus acidophilus 12

2.4 Kopi Robusta 13

2.4.1 Klasifikasi Kopi robusta 14

2.4.2 Kandungan Kopi robusta 15

2.5 IFN- γ 20

2.6 Sel T CD 4+ 21

BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Teori 24

3.2 Kerangka Konsep 25

3.3 Hipotesis Penelitian 27

BAB 4. METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian 28

4.2 Alat dan Bahan 28

4.2.1 Alat 28

4.2.2 Bahan 29



4.3 Sampel Penelitian..... 28

4.4 Rancangan Penelitian..... 30

4.5 Variabel Penelitian..... 31

4.6 Tahapan penelitian..... 31

4.7 Prosedur Kerja 32

4.7.1 Persiapan Hewan Coba 32

4.7.2 Proses Ekstraksi Kopi Robusta 32

4.7.3 Induksi Ekstrak Kopi dan Bakteri *Lactobacillus acidophilus*..... 32

4.7.4 Induksi Bakteri *Lactobacillus acidophilus*..... 33

4.7.5 Induksi Bakteri *Salmonella enterica* 33

4.7.6 Euthanasi, Nekropsi dan Preparasi Lien 34

4.7.7 Pengujian kandungan ekstrak kopi Robusta 34

4.7.6.1 Uji Lc-Ms..... 34

4.7.6.2 Uji Fitokimia..... 35

4.7.8 Identifikasi bakteri *Lactobacillus acidophilus*..... 37

4.7.9 Identifikasi Bakteri *Salmonella enteritidis*..... 38

4.7.8 Flowcytometry 39

4.7.9 Analisis Data..... 40

BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Sinbiotik Terhadap Kondisi Feses Mencit..... 41

5.3 Pengaruh Kombinasi Sinbiotik Terhadap Jumlah IFN-y..... 45

5.4 Pengaruh Kombinasi Sinbiotik Terhadap CD4- IFN-y..... 50

BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 kesimpulan..... 56

6.2 Saran..... 56

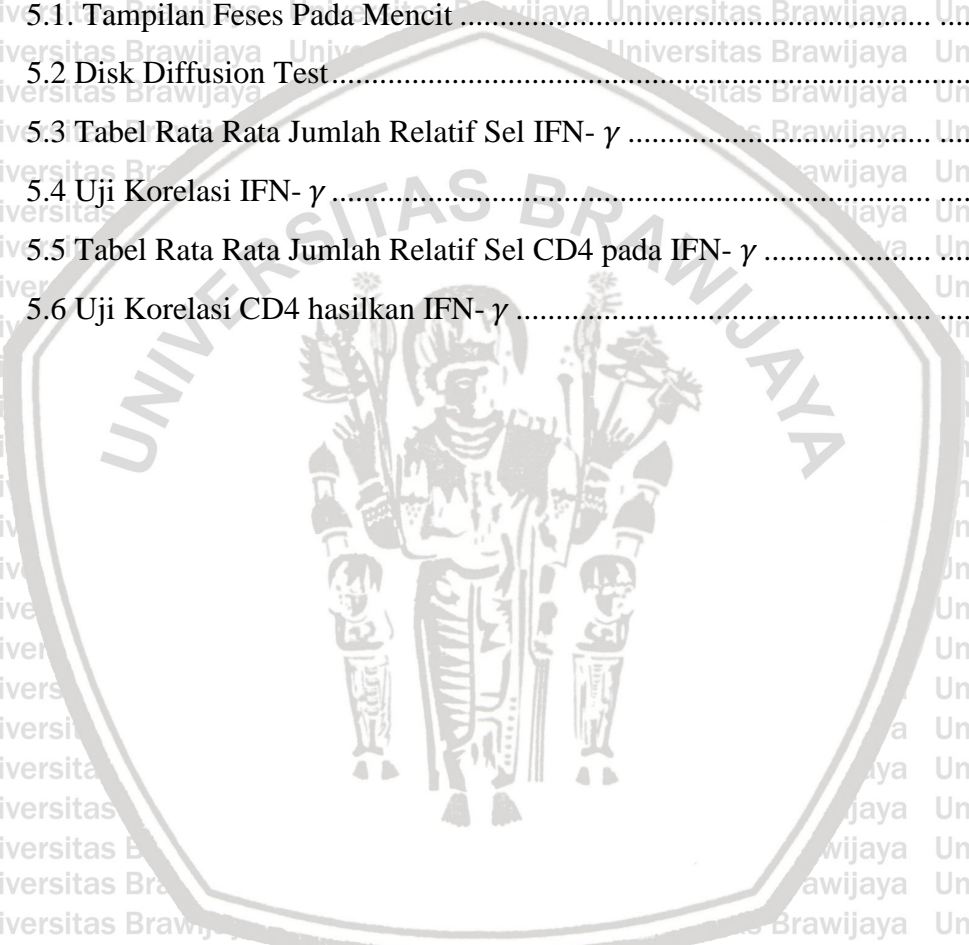
DAFTAR PUSTAKA..... 60

LAMPIRAN..... 69



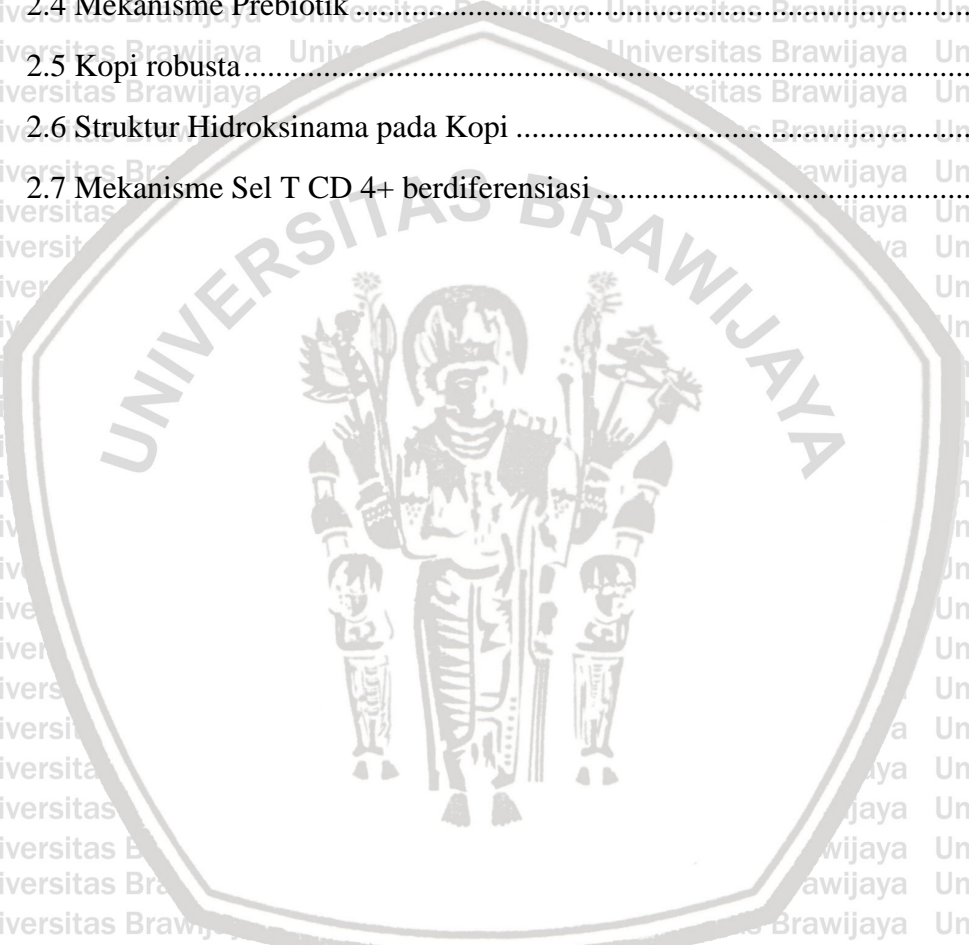
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Kandungan kopi robusta garut, bandung dan bogor	16
4.1 Rancangan Penelitian	30
5.1.1 Tampilan Feses Pada Mencit	40
5.2 Disk Diffusion Test	44
5.3 Tabel Rata Rata Jumlah Relatif Sel IFN- γ	46
5.4 Uji Korelasi IFN- γ	49
5.5 Tabel Rata Rata Jumlah Relatif Sel CD4 pada IFN- γ	51
5.6 Uji Korelasi CD4 hasilkan IFN- γ	54



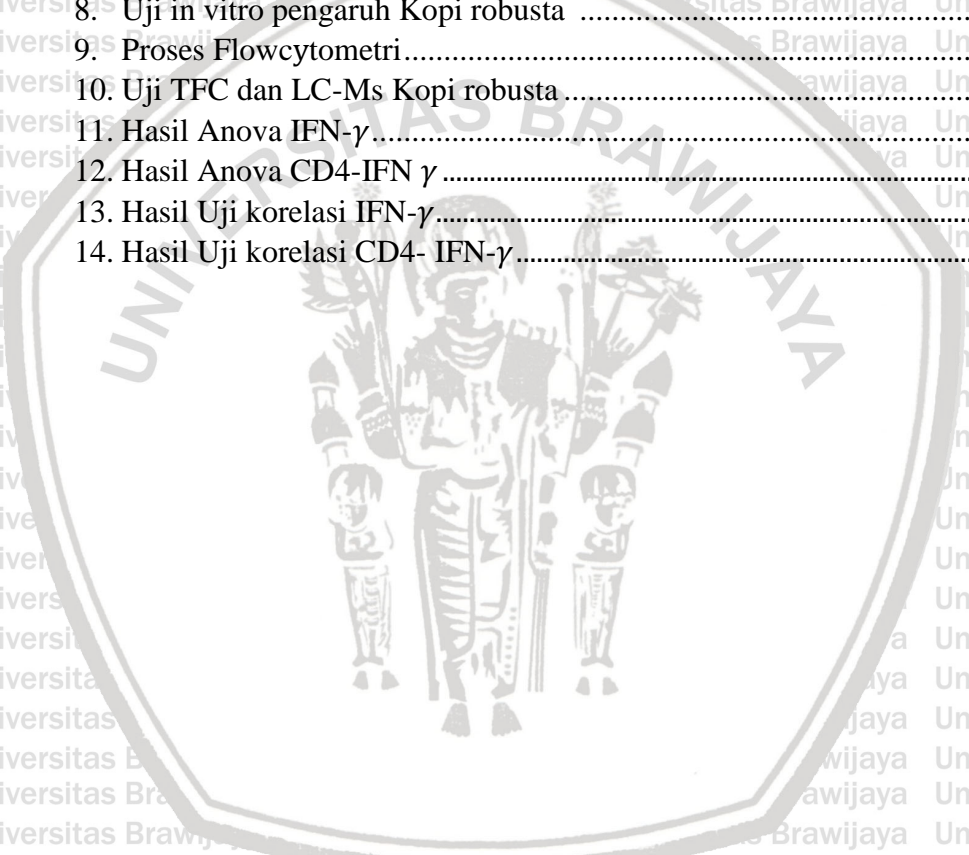
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Mencit (<i>Mus musculus</i>) Strain Balb/C.....	8
2.2 Bakteri <i>Salmonella enterica</i>	9
2.3 Mekanisme Patogen <i>S. enterica</i>	11
2.4 Mekanisme Prebiotik.....	13
2.5 Kopi robusta.....	14
2.6 Struktur Hidroksinama pada Kopi.....	17
2.7 Mekanisme Sel T CD 4+ berdiferensiasi.....	23



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Laik etik.....	61
2. Skema perlakuan.....	62
3. Perhitungan dosis.....	63
4. Pembuatan Suspensi Sinbiotik.....	64
5. Pembuatan Ekstraksi Kopi robusta.....	65
6. Identifikasi Bakteri <i>Salmonella enterica</i>	66
7. Identifikasi Bakteri <i>Lactobacillus acidophilus</i>	67
8. Uji in vitro pengaruh Kopi robusta.....	68
9. Proses Flowcytometri.....	69
10. Uji TFC dan LC-Ms Kopi robusta.....	70
11. Hasil Anova IFN- γ	73
12. Hasil Anova CD4-IFN γ	75
13. Hasil Uji korelasi IFN- γ	77
14. Hasil Uji korelasi CD4- IFN- γ	78



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

Singkatan	Keterangan
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
CD4	<i>Cluster of differentiation 4</i>
CD8	<i>Cluster of differentiation 8</i>
CFU	<i>Coloni Forming Unit</i>
CM	Centi meter
RAL	Rancangan Acak Lengkap
HE	<i>Hematoxylen Eosin</i>
AGP	<i>Antibiotic Growth Promotors</i>
IFN- γ	<i>Interferon gamma</i>
IL	<i>Interleukin</i>
LPS	<i>Lipopolisakarida</i>
MM	Mili meter
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MRSA	<i>De Mann Rogosa and Shape Agar</i>
NK	<i>Natular Killer</i>
DC	<i>Dendritik Cell</i>
MC	<i>Mac Concey</i>
MR	<i>Methyl Red</i>
OD	<i>Optical Dencity</i>
RAL	Rancangan Acak Lengkap
Tc	<i>T cytotoxic</i>
%	Persen
•	Derajat



BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Indonesia merupakan negara dengan iklim tropis, dapat berubah ubah dan merupakan salah satu faktor yang dapat memicu perubahan berbagai agen patogen yang berperan dalam penularkan penyakit ke hewan atau hewan ke manusia (*Zoonosis*), penyakit *zoonosis* yang sering menyerang manusia dan hewan salah satunya yakni Salmonellosis, diakibatkan oleh bakteri *Salmonella sp* dan menjadi penyakit endemik di negara sedang berkembang khususnya Indonesia dan kasus penyakit Salmonellosis di Indonesia mencapai 358-810/100.000 jiwa/tahun (Dewi *dkk.*, 2015). Hewan rentan yang terkena Salmonellosis adalah ayam dan kalkun. Pada ayam, DOC merupakan umur yang paling rentan terkena salmonellosis dibandingkan umur ayam 7 hari atau 4 minggu (Alisantosa *et al.*, 2000).

Bakteri *Salmonella enterica* (*S. enterica*) merupakan salah satu serotipe *Salmonella sp* yang menyebabkan Salmonellosis dan ditularkan melalui produk ternak seperti telur, daging, susu, atau air minum dan bahan-bahan lainnya yang terkontaminasi (*Foodborne diseases*). Bakteri *Salmonella enterica* mempunyai masa inkubasi yang pendek sekitar 8-48 jam setelah mengkonsumsi makanan yang sudah terkontaminasi (Portillo, 2000).

Bakteri *Salmonella enterica* akan berpenetrasi di area usus dan mengeluarkan endotoksin yang merusak sel epitel dan memicu adanya respon imun dengan aktivasi Sel T CD4+ dan berdiferensiasi menjadi Th1 dan Th2

(Mastroeni, 2003). Th1 akan memproduksi IFN- γ yang merupakan sitokin proinflamasi, mengakibatkan adanya respon peradangan akut menyebabkan kerusakan daerah usus dan mengeluarkan thermolabile enterotoxin yang merangsang aktivitas adenil siklase, dan meningkatkan konsentrasi *cAMP* terjadi inhibisi absorpsi Na dan klorida vili usus sehingga berpengaruh pada produksi cairan sehingga terjadi adanya diare (Ralph, 2016)

Pengobatan salmonellosis menggunakan metode vaksinasi kurang efektif seperti pemakaian vaksin inaktif *S. enterica* phage tipe 4 (SEPT 4) yang mengandung 10^{11} CFU/ml bakteri dalam adjuvan dapat diaplikasikan dengan dosis tunggal pada ayam umur 3 minggu atau 2x dosis pada ayam umur 3 dan 6 minggu tetapi sekresi bakteri masih ditemukan pada kelompok vaksinasi 1 – 2 hari setelah ujiantang (Tati dan Supar, 2008). Sedangkan dengan adanya pemberian antibiotik pada ayam yang terus menerus dan penggunaan sebagai pemacu pertumbuhan (*Antibiotic Growth Promoters/ AGP*) dapat menyebabkan adanya resistensi antibiotik dan dapat berakibat gagalnya pengobatan infeksi daerah gastrointestinal (Susan, 2012).

Menurut Wisnu dkk., (2005) pemakaian antibiotik berlebih dapat menyebabkan perubahan komposisi mikroflora usus yang menyebabkan resistensi antibiotik, hal ini dapat diganti dengan penggunaan sinbiotik.

Sinbiotik merupakan kombinasi dari probiotik dan prebiotik dalam mendukung adanya pertumbuhan bakteri (Schrezenmeir & Vrese, 2001).

Probiotik merupakan bakteri yang dapat memberikan pengaruh baik pada organisme karena bisa memodifikasi komunitas mikroba, memperbaiki nilai

nutrisi, memperbaiki respon inang terhadap penyakit. Salah satu contoh dari probiotik yakni bakteri *Lactobacillus achidopilus*. Bakteri ini merupakan bakteri asam laktat yang bermanfaat bagi area pencernaan karena asam laktat akan menjadikan kondisi usus menjadi asam sehingga bakteri patogen yang tidak tahan asam akan mati (Russel *et al.*, 2013). Asam laktat akan mengeluarkan antimikroba berupa bakteriosin berfungsi dalam penghancuran sel target dengan pembentukan pori atau penghambatan sintesis dinding sel bakteri patogen (Kailova., *et al* 2010), dan meningkatkan sistem imunitas dalam tubuh dengan adanya respons imun spesifik antigen mukosa diteruskan oleh sel dendrit (DC), makrofag dan menghasilkan TH1, TH2 dan Th17, TH2 yang akan menginduksi aktivasi sel plasma (sel efektor) untuk mensekresikan immunoglobulin pada permukaan selnya untuk menjadi antibodi Ig A (Stetinova *et al.*, 2010). Th2 menghasilkan IL-4, IL-5, IL-10 dan IL-13 sitokin ini menginduksi pembentukan antibodi tetapi juga sitokin anti inflamasi (Greenberg *et al.*, 2001).

Prebiotik merupakan *nondigestible food ingredient* yang mengandung oligosakarida yang memberikan efek merangsang pertumbuhan mikroba didalam gastrointestinal (Nanak, 2011). Salah satu contoh dari prebiotik yakni kopi hijau *robusta* yang mengandung oligosakarida sekitar 0-3,5% dari berat kering (Dimas *dkk.*, 2013). Pada ekstrak kopi mengandung polisakarida seperti galaktomanan dan arabinogalactan yang dapat digunakan secara baik oleh mikroba usus (Umemura *et al.*, 2004) dan kopi *robusta* juga mengandung asam klorogenik, flavonoid, yang tinggi dimana berfungsi sebagai

antioksidan, antivirus, antibakteri, antifungi, dan tidak menyebabkan resistensi antimikroba. Asam klorogenik akan mengganggu proses adhesi bakteri dalam tubuh (Farah *et al.*, 2008). Dibantu adanya Flavanoid untuk menginduksi sitokin proinflamasi (IL-1, IL-6 dan TNF- α) untuk mempercepat proses inflamasi dengan menghancurkan bakteri yang menginfeksi (Viesturs *et al.*, 2011).

Berdasarkan uraian diatas, maka penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh kombinasi ekstrak kopi robusta lokal dan bakteri *Lactobacillus acidophilus* sebagai preventif terhadap peningkatan jumlah relatif sel T CD4 dan IFN - γ pada penelitian ini peneliti akan membuat mencit BALB C yang diinfeksi *Salmonella enterica* untuk penelitian lebih lanjut

1.2 Rumusan Masalah

1.1.1 Pengaruh kombinasi ekstrak kopi robusta Lampung dan bakteri *Lactobacillus acidophilus* sebagai preventif terhadap peningkatan jumlah relatif sel T CD4+ pada mencit BALB C yang diinduksi *Salmonella enterica* ?

1.1.2 Pengaruh kombinasi ekstrak kopi robusta Lampung dan bakteri *Lactobacillus acidophilus* sebagai preventif terhadap peningkatan jumlah relatif IFN - γ pada mencit BALB C yang diinduksi *Salmonella enterica* ?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan rumusan masalah yang sudah disebutkan diatas, maka penelitian ini dibatasi pada:

1. Hewan model yang digunakan adalah Mencit BALB C jantan dengan umur 8-10 minggu dengan berat badan 20-25 gram yang didapatkan dari Laboratorium Fisiologi hewan Universitas Islam Negeri Malang. Penggunaan Mencit telah mendapat surat leik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya nomor : 1110-KEP-UB (**Lampiran 1**).
2. Bakteri *Salmonella Enterica* didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan dilakukan pembuatan suspensi bakteri dengan konsentrasi dengan nilai *Optical Density* (OD) menggunakan spektrofotometri, yaitu dengan nilai absorbansi 0,246 yang setara dengan konsentrasi bakteri 10^8 CFU/mL dan membandingkan dengan Mc Farland dengan kekeruhan 10^8 CFU/mL. Pemberian dosis induksi bakteri secara peroral dengan sonde lambung dan diinduksikan selama 2 hari (Havelaar *et al.*, 2001).
3. Bakteri *Lactobacillus achidopilus* yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan dilakukan uji perhitungan nilai OD dan hasil nilai absorbansi 0,931 yang setara dengan konsentrasi bakteri 10^8 CFU/mL dan diinduksikan selama 15 hari (Nanak, 2010)
4. Ekstrak kopi robusta dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dimana menggunakan dosis 250

mg/KgBB, 500 mg/KgBB dan 750 mg/KgBB, akan dikombinasikan dengan bakteri *Lactobacillus acidophilus* dan akan diinduksi secara per oral selama 15 hari (David, 2012)

5. Jumlah relatif sel T CD4 dan IFN - γ pada organ limpa dihitung dengan menggunakan metode *flowcytometry*

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan yang akan dicapai dalam penelitian ini, yakni :

- 1.1.3 Mengetahui pengaruh kombinasi ekstrak kopi robusta dan bakteri *Lactobacillus acidophilus* sebagai preventif terhadap peningkatan jumlah relatif sel T CD4+ pada mencit BALB C yang diinduksi *Salmonella enterica*
- 1.1.4 Mengetahui kombinasi ekstrak kopi robusta dan bakteri *Lactobacillus acidophilus* sebagai preventif terhadap peningkatan jumlah relatif IFN - γ pada mencit BALB C yang diinduksi *Salmonella enterica*

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat yang dapat diambil dari penelitian ini untuk memberikan informasi ilmiah mengenai pengaruh kombinasi ekstrak kopi robusta dan bakteri *Lactobacillus acidophilus* terhadap kadar jumlah relatif sel T CD4+ dan IFN - γ pada mencit BALB C yang selanjutnya diharapkan dapat menjadi sebuah solusi dari penyakit *salmonellosis*.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Mencit BALB C

Menurut Priyambodo (2003), mencit yang digunakan sebagai hewan coba dalam penelitian adalah *Mus musculus* strain Balb/C yang memiliki klasifikasi sebagai berikut :

Kingdom : Animalia
Filum : Chordata
Kelas : Mamalia
Ordo : Rodentia
Family : Muridae
Genus : Mus
Spesies : *Mus musculus* .

Ciri ciri morfologi mencit (**Gambar 2.1**) yakni warna rambut putih dan mata berwarna hitam atau merah (Murwanti *dkk.*, 2004). Siklus estrus mencit sangat pendek dan teratur sekitar 4-5 hari. Berat badan Mencit jantan bisa mencapai 18-35 gram, berat dewasa rata-rata 18-35 gram dan umur hidup mencit sekitar 1-2 tahun. Umur dewasa pada mencit sekitar 35-60 hari dan berat lahir 0,5-1.0 gr. Suhu mencit 35-39°C dengan respirasi 140-180 kali/menit, dan *Heart rate* 600-650 kali (Somala, 2006). Terdapat beberapa strain Mencit seperti strain ICR, ddY, C57BL / 6, DBA / 2 dan Balb/C dan mencit strain Balb/C sering digunakan

dalam penelitian bakteri dikarenakan memiliki sensitivitas dan respon imun yang tinggi, sehingga sering digunakan dalam studi imunogenik dibanding mencit strain lainnya, dengan umur 4-6 minggu sering digunakan dalam penelitian polarisasi sel T, interleukin dan sensitivitas alergi setelah induksi antigen (Sindhana, 2019).



Gambar 2.1 Mencit (*Mus musculus*) Strain Balb/C (Garcia *et al.*, 2009)

2.2 Bakteri *Salmonella enterica*

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi

Menurut Todar, (2008) Klasifikasi *Salmonella enterica* yakni sebagai berikut :

Kingdom : Bacteria,

Phylum : Proteobacteria

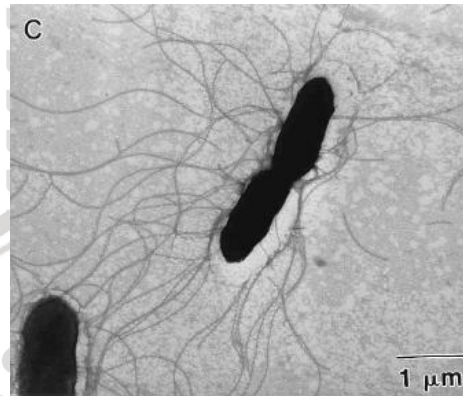
Class : Gamma Proteobacteria

Ordo : Enterobacteriales

Family : Enterobacteriaceae

Genus : Salmonella

Species : *S. enterica*



Gambar 2.2 *Salmonella enterica* (Teo, 2009)

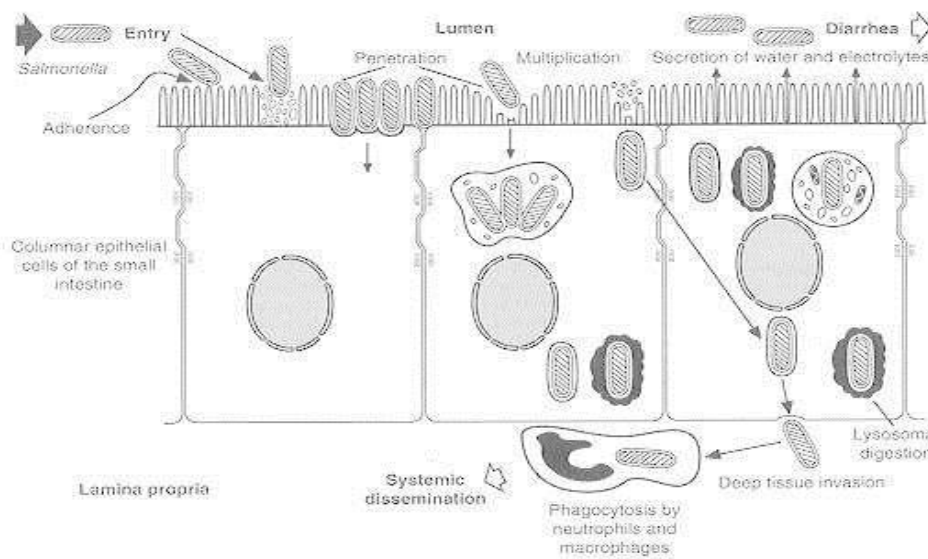
Salmonella enterica mempunyai morfologi bakteri non-motil berbentuk batang, gram negatif, yang tidak membentuk spora dan bergerak melalui flagella (**Gambar 2.2**), bakteri anaerob fasilitatif, yang berarti bakteri ini dapat bertahan hidup dengan atau tanpa oksigen (Teo, 2009). Habitat *S. enteritidis* di saluran pencernaan khususnya usus halus manusia dan hewan. Suhu optimum pertumbuhan *Salmonella sp.* ialah 37°C dan pada pH 6-8 dan *S. enterica* mempunyai lebih dari 1500 serotipe (Jawezt *et al.*, 2008).

2.2.2. Penularan dan Patogenesis

Bakteri *Salmonella enterica* dapat ditularkan secara *fecal-oral* dikarenakan makanan atau produk ternak seperti pangan telur, daging, susu, atau air minum dan bahan-bahan lainnya yang terkontaminasi oleh

feses, bakteri *Salmonella enterica* mempunyai kemampuan untuk menyerang, mereplikasi dan bertahan hidup dalam sel inang, untuk masa inkubasinya 8-48 jam, gejala dari *S. enterica* seperti mual, sakit kepala, muntah, diare hebat, dan terdapat darah dalam feses (Jawezt *et al.*, 2008). Mekanisme patogen *S. enterica* (**Gambar 2.3**) yakni dengan menembus sel epitel dinding usus dan *Salmonella pathogenicity islands* (SPIs), SPIs sendiri merupakan *region* DNA yang berhubungan dengan patogenitas dan berfungsi untuk meningkatkan virulensi terhadap inang (Dzen, 2003).

SPIs 1 dan SPIs-2 mengkodekan untuk sistem sekresi tipe III (T3SS) dan protein multi-channel yang memudahkan *S. enterica* untuk memudahkan efekturnya melintasi membran sel epitel usus ke dalam sitoplasma. Efektor bakteri kemudian mengaktifkan jalur transduksi sinyal dan memicu rekonstruksi sitoskeleton aktin sel inang, menghasilkan ekstensi keluar atau kerutan pada membran sel epitel untuk menelan bakteri *salmonella* dan berkoloni serta merusak epitel usus (Takaya *et al.*, 2003). Invasi sel epitel merangsang pelepasan sitokin proinflamasi yang menginduksi reaksi inflamasi. Respons inflamasi akut menyebabkan diare dan dapat menyebar dari usus untuk menyebabkan penyakit sistemik, dan mengeluarkan thermolabile enterotoxin yang berpengaruh dalam produksi air dan elektrolit dalam usus (Ralph, 2016).



Gambar 2.3 Mekanisme patogen *S. enteritidis* (Ralph, 2016).

2.2.3 Struktur Antigen

Salmonella memiliki tiga antigen utama: H atau antigen flagellar, O atau antigen somatic dan Vi antigen (dimiliki oleh hanya beberapa serovar) mempunyai sifat antifagositosis yang akan menurunkan sekresi TNF- α dan meningkatkan infektivitas dari *S. enterica* dan meningkatkan keparahan penyakitnya, Antigen H dapat terlibat dalam aktivasi respon imun inang dan memiliki kemampuan khusus untuk mengekspresikan hanya satu protein pada suatu waktu dan oleh karena itu disebut difasik (fase I dan II) (McQuiston *et al.*, 2008). Antigen O terjadi pada permukaan membran luar dan ditentukan oleh urutan gula spesifik pada permukaan sel, antigen O akan memberikan perlindungan karena adanya LPS dan juga adanya *complement-activating* A, Antigen Vi adalah antigen superfisial yang melapisi antigen O yang diemukan dalam beberapa serovar (Chuang, 2009). Analisis antigenik *salmonella* dengan menggunakan antiserum spesifik memberikan manfaat untuk pemeriksaan

klinis dan epidemiologis. Penentuan struktur antigenik memungkinkan untuk mengidentifikasi organisme secara klinis dan menetapkannya ke salah satu dari sembilan serogrup (A-I), masing-masing berisi banyak serovar (Giannella *et al.*, 2009).

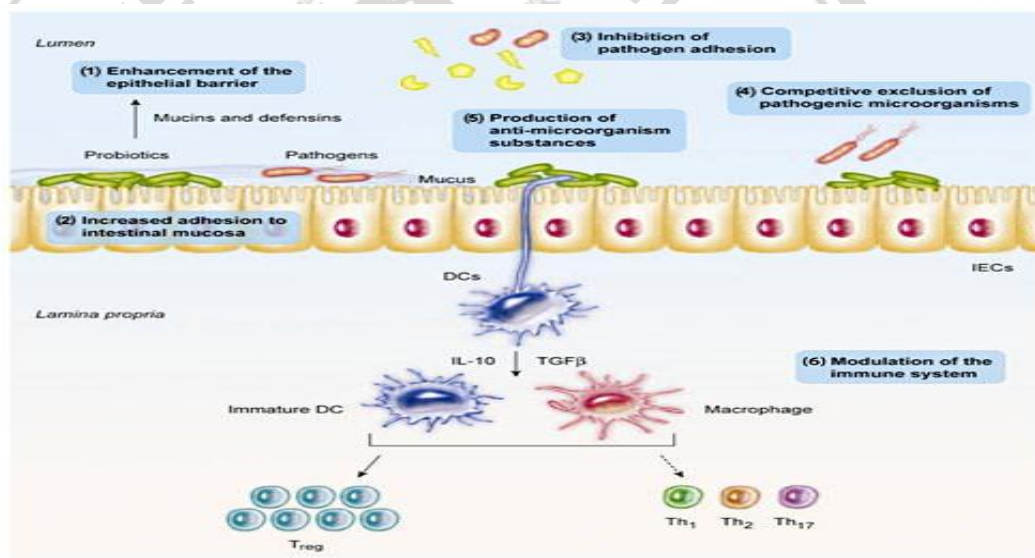
2.2.4 Sifat Biokimia

Sifat biokimia pada bakteri *Salmonella Sp.* pada biakan agar terbentuk adanya koloni bergaris tengah sekitar 2-8milimeter, bulat agak cembung, halus dan jernih. Sedangkan pada media BAP (*Blood Agar Plate*) tidak terdapat hemolysis dan pada media MC (*Mac Concey*) tidak ada fermentasi Laktosa atau Non Laktosa Fermenter (NLF) dan konsistensinya smooth dan serotipe *Salmonella enterica* memiliki flagel jadi pada uji motilitas hasilnya positif dan *S. enterica* memfermentasi glukosa, manitol dan maltosa disertai pembentukan asam dan gas. Pada media indol (-) negatif, MR (*Methyl Red*) positif, Vp (*Voges Proskauer*) negative, Uji sitrat positif, tidak hidrolisis urea dan menghasilkan Hidrogen sulfida (H₂S) (WHO, 2003)

2.3 *Lactobacillus acidophilus*

Bakteri *Lactobacillus acidophilus* merupakan kelompok mikrobiota gastrointestinal yang merupakan bakteri probiotik yang paling banyak digunakan dan termasuk dalam banyak makanan fungsional dan suplemen makanan, probiotik sendiri merupakan bahan pangan yang tidak dapat dicerna oleh saluran cerna dan memberikan efek yang positif terhadap mikroflora dengan secara selektif

menstimulasi pertumbuhan bakteri pada usus (Endang, 2011), terdapat beberapa mekanisme *Lactobacillus* sebagai probiotik (**Gambar 2.4**) yakni meliputi mekanisme tindakan probiotik utama termasuk peningkatan penghalang epitel, peningkatan adhesi pada mukosa usus, dan penghambatan bersamaan dari adhesi patogen, pengecualian kompetitif mikroorganisme patogen, produksi zat anti-mikroorganisme dan modulasi sistem kekebalan tubuh dan stimulasi reseptor ini oleh bakteri komensal memiliki peran penting untuk memperoleh respon antimikroba yang diukur dengan kerusakan jaringan inflamasi minimal (Karger, 2012).



Gambar 2.4 Mekanisme prebiotik (Stetinova *et al.*, 2010)

2.4 Kopi Robusta

Tanaman kopi (*Coffea sp.*) merupakan tanaman perkebunan yang berasal dari Benua Afrika yaitu negara Ethiopia pada abad ke-9, Jenis kopi yang terkenal di Indonesia yaitu kopi arabika (*Coffea arabica*) dan kopi robusta (*Coffea robusta*). Kopi robusta masuk ke Indonesia pada tahun 1900, jenis kopi ini lebih

tahan terhadap penyakit karat daun dibandingkan kopi arabika dan memiliki syarat tumbuh dan pemeliharaan yang ringan, serta produktivitas yang tinggi, sehingga cepat berkembang di Indonesia. Sekitar 90% areal pertanaman kopi di Indonesia saat ini merupakan kopi robusta (Prastowo *et al.*, 2012).

2.4.1 Klasifikasi Kopi Robusta

Menurut Prastowo *et al.*, (2012) Kopi robusta mempunyai klasifikasi sebagai berikut :

Kingdom : Plantae (Tumbuhan)

Subkingdom : Tracheobionta

Super Divisi : Spermatophyta

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Magnoliopsida

Sub Kelas : Asteridae

Ordo : Rubiales

Famili : Rubiaceae

Genus : Coffea

Spesies : Coffea Canephora



Gambar 2.5 Kopi Robusta (Ludwig *et al.*,2014)

Kopi robusta adalah kopi yang paling banyak dibudidayakan di Indonesia. Provinsi Lampung adalah produsen terbesar di Indonesia.

Morfologi kopi robusta memiliki sistem akar tunggang dengan warna kuning muda dan tumbuh sebagai pohon yang kuat hingga mencapai 10 meter. Berbunga tidak teratur, buah kopi berbentuk bulat dan terdiri atas tiga lapisan, yakni lapisan kulit luar, lapisan daging, dan lapisan kulit tanduk. Tanaman robusta memiliki hasil panen yang lebih besar daripada arabika, mengandung lebih banyak kafein sekitar 2,7% dibandingkan kopi arabika, dan mengandung lebih sedikit gula sekitar 3-7% dibandingkan dengan kopi arabika. Suhu optimum rata-rata kopi robusta sekitar 24-30 °C, kopi robusta biasanya tumbuh sekitar ketinggian 400-800 meter. Kopi robusta membutuhkan lebih sedikit herbisida dan pestisida dibandingkan arabika. Terdapat Beberapa varietas kopi robusta seperti varietas Quillou, Uganda, dan Chanephora. Setiap varietas memiliki perbedaan bentuk morfologi dan sifat yang berbeda (Djaenudin *dkk.*,2003).

2.4.2 Kandungan Kopi Robusta

Kopi mengandung dua senyawa yang terkenal yaitu kafein dan asam chlorogenic dan derivat (Hydroxycinnamic acid) sedangkan menurut Chairgulprasert (2016) Kopi robusta mengandung komponen kimia seperti

alkaloid, tanin, saponin, flavanoid dan Komposisi kandungan senyawa kimia kopi terdapat pada **Tabel 2.1**.

Tabel 2.1 Kandungan Kopi Robusta dari bandung, garut dan bogor

Nama Bahan	Golongan Senyawa Kimia			
	Alkaloid	Tanin	Saponin	Flavanoi d
Bandung	+	+	+	+
Bogor	+	+	+	+
Garut	+	+	+	+

Keterangan : + = Positif mengandung senyawa tersebut

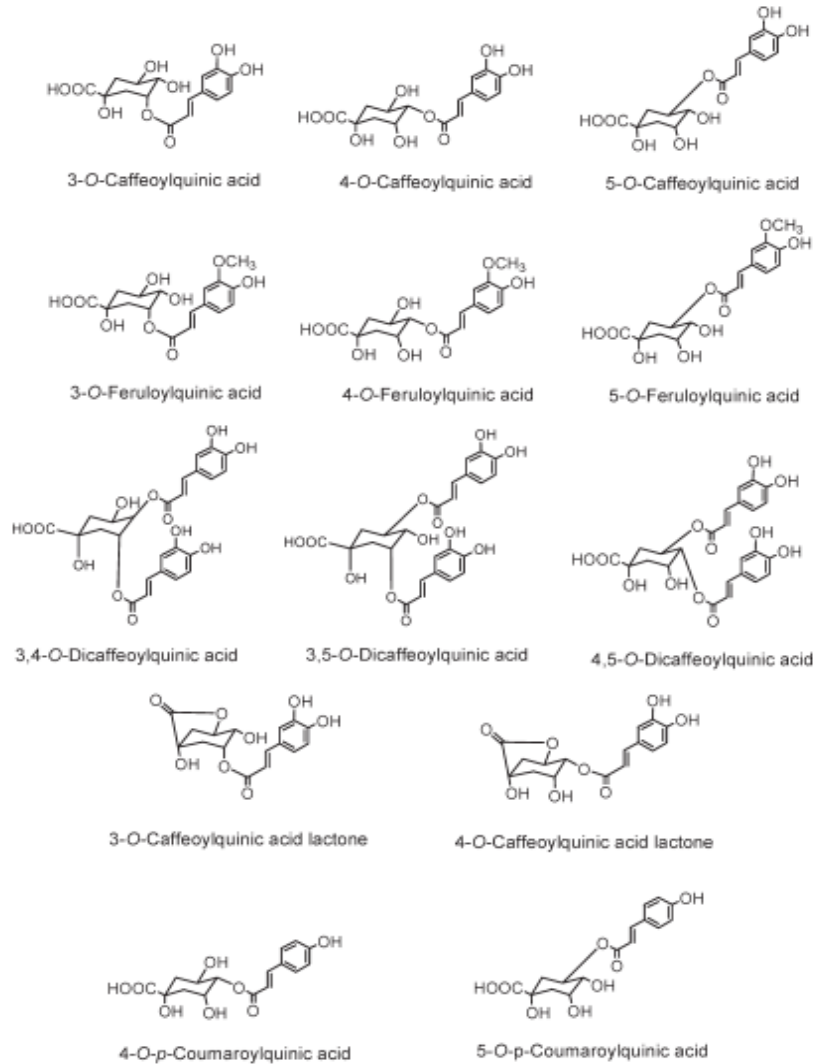
Sumber : Evi *dkk*, 2018

A. Asam Klorogenik

Asam klorogenik adalah keluarga ester yang terbentuk di antara quinic asam dan asam trans-cinnamic tertentu, paling sering caffeic, ferulic dan p-coumaric.¹ Struktur beberapa komponen utama ditunjukkan pada **Gambar 2.5**, Sekarang diketahui bahwa asam klorogenik tersebar luas di tanaman tetapi pada biji kopi mencapai (hingga 10% basis kering) termasuk setidaknya 45 asam klorogenat yang tidak terasilasi pada C1 dari asam kuinat moiety. Biji kopi juga mengandung hingga tujuh cinnamoyl konjugat asam amino (Mullen *et al.*, 2011), Farhaty dan Muctaridi (2017) kopi robusta (Coffea canephora; robusta) memiliki kandungan CGA lebih banyak dibandingkan kopi lain mencapai 6,1-11,3 mg/ gr biji. Kandungan ini akan menurun jika dilakukan pemanggangan/ roasted pada biji kopi tersebut. Menurut Xu *et al.*, (2010) bahwa CGA memiliki efek



sitoprotektif yang kuat dari radikal bebas. Penelitian yang dilakukan Wu *et al.*, (2012) melaporkan bahwa pemberian CGA mampu melindungi sel dari kerusakan akibat radikal bebas dengan mekanisme meningkatkan aktivitas antioksidan enzim.



Gambar 2.6 Struktur Hidroksisina pada Kopi (Mullen *et al.*, 2011).

B. Flavanoid

Flavonoid dikenal sebagai agen antibakteri terhadap berbagai mikroorganisme patogen. Hidroksil di situs khusus pada cincin aromatik flavonoid meningkatkan aktivitas. Namun, metilasi dari gugus hidroksil aktif umumnya mengurangi aktivitas. Selain itu, lipofilitas cincin A sangat penting untuk aktivitas chalcone. Substituen hidrofobik seperti gugus prenil, rantai alkilamino, rantai alkil, dan nitrogen atau oksigen yang mengandung gugus heterosiklik biasanya meningkatkan aktivitas untuk semua flavonoid. Mekanisme antibakteri flavonoid dengan adanya hambatan sintesis asam nukleat, penghambatan fungsi membran sitoplasma, penghambatan metabolisme energi, penghambatan perlekatan dan pembentukan biofilm (Juliantina, 2008). Penghambatan porin pada membran sel, perubahan permeabilitas membran, dan pelemahan patogenesis. Senyawa flavonoid dapat menginduksi adanya aktivitas IFN- γ dan mengaktifasi makrofag dan limfosit T. Aktivasi makrofag akan mensekresi sitokin (IL-1, IL-6, IL-12 dan TNF- α) dan mengaktifasi sel T untuk menghancurkan mikroorganisme yang menginfeksi (Viesturs *et al.*, 2011).

C. Saponin

Saponin merupakan senyawa yang dihasilkan tanaman yang mengandung glikosida kompleks, saponin diklasifikasikan menjadi 2 kelompok, yakni steroid (terdiri dari kerangka spirostane C27 yang terdiri

dari struktur enam cincin) dan triterpenoid (terdiri dari kerangka C30 yang terdiri dari struktur pentasiklik (Sprag *et al*, 2004). Triterpenoid dapat menjadi antibakteri dengan cara bereaksi dengan protein transmembrane pada dinding sel bakteri dan akhirnya merusak porin yang berdampak berkurangnya permeabilitas membran sel bakteri sehingga bakteri akan kekurangan nutrisi dan pertumbuhan bakteri terhambat hingga mati (Rachmawati, 2009). Saponin dapat meningkatkan proliferasi limfosit-T dan meningkatkan ekspresi interleukin (IL) -1, IL-2, IL-12, interferon- γ , tumor necrosis factor (TNF) $-\alpha$ dan menurunkan tingkat ekspresi IL-10 dan IL-8 (Bhardwaj, 2014).

D. Tanin

Kandungan senyawa tannin mempunyai aksi antibakteri yang berhubungan dengan kemampuannya untuk menonaktifkan adhesin bakteri, menghambat kerja enzim, menghambat transport protein pada selubung sel, mekanisme kerja tanin sebagai bahan antibakteri antara lain melalui perusakan membran sel bakteri (Chung *et al.*, 2006)

E. Alkaloid

Alkaloid menghambat aktivitas dihydrofolate reduktase, sehingga menghambat sintesis asam nukleat. Dihydrofolate reductase adalah enzim yang sangat penting dalam produksi prekursor pirimidin dan purin untuk asam amino, RNA, dan biosintesis DNA (Rao dan Venkatachalam, 2000). Protein FtsZ penting dalam pembelahan sel bakteri, dan itu adalah homolog prokariotik tubulin eukariotik. Berberin, suatu alkaloid, berikatan

dengan protein FtsZ dengan afinitas tinggi, menyebabkan penghambatan perakitan FtsZ dan aktivitas GTPase-nya, yang menyebabkan perpanjangan sel, yang menyebabkan penghambatan pembelahan sel (Boberek et al., 2010). Ungeremine, alkaloid, menghambat topoisomerase bakteri (*E. coli*) (Casu et al., 2011). Semua alkaloid kuinolon yang terjadi secara alami diketahui tidak memiliki gugus 3-karboksi, yang penting untuk mengikat dan memblokir kompleks topoisomerase IIA tipe-DNA (Heeb et al., 2011), dan Alkaloid, bekerja melalui mekanisme aksi melawan bakteri Gram-negatif, menyebabkan gangguan pada membran luarnya, dan mendepolarisasi membran bakteri Gram-positif (Alhanout et al., 2010). DNA sehingga akan mengalami kerusakan akan mendorong terjadinya lisis sel bakteri yang akan menyebabkan kematian sel pada bakteri (Gunawan, 2009). Alkaloid dapat meningkatkan kemampuan sel deritik untuk mengarahkan diferensiasi sel T untuk aktivasi CD4 (+) dan produksi sitokin IL-13 yang lebih banyak (Hardardotir *et al.*, 2015).

2.5 IFN- γ

Sitokin merupakan salah satu komponen sistem imun yang berperan penting terhadap patogenitas dan progresivitas atau keparahan suatu penyakit.

Interferon-gamma (IFN- γ) adalah sitokin yang memainkan peran penting dalam menginduksi dan memodulasi berbagai respons imun. Respon seluler terhadap IFN- γ dimediasi oleh reseptor permukaan-sel heterodimernya (IFN- γ R), yang mengaktifkan kaskade transduksi sinyal, yang pada akhirnya mengarah pada regulasi ekspresi gen (Tau and Rothman, 2014).

IFN- γ , atau interferon tipe II, adalah sitokin yang sangat penting untuk kekebalan bawaan dan adaptif terhadap infeksi virus, beberapa infeksi bakteri dan protozoa. IFN- γ adalah aktivator penting makrofag dan penginduksi ekspresi molekul MHC (*Major Histocompatibility Complex*) kelas II. Ekspresi penyimpangan IFN- γ dikaitkan dengan sejumlah penyakit autoinflamasi dan autoimun. Pentingnya IFN- γ dalam sistem kekebalan sebagian berasal dari kemampuannya untuk menghambat replikasi virus secara langsung, dan yang paling penting dari efek imunostimulator dan imunomodulatornya. IFN- γ diproduksi terutama oleh sel-sel natural killer (NK) sebagai bagian dari respon imun bawaan, dan oleh sel T efektor limfosit T (CDL) sel CD1 Th1 dan CD8 setelah sel antigen spesifik kekebalan berkembang, IFN- γ juga diproduksi oleh sel limfoid bawaan non-sitotoksik (ILC), keluarga sel kekebalan yang pertama kali ditemukan pada awal 2010-an (David and Hergen, 2015).

IFN- γ disekresi oleh sel T helper (khususnya, sel Th1), sel T sitotoksik (sel TC), makrofag, sel epitel mukosa, dan sel NK. IFN- γ adalah satu-satunya interferon Tipe II dan secara serologis berbeda dari interferon Tipe I karena Interferon tipe I asam labil, sedangkan varian tipe I adalah asam-stabil. IFN- γ memiliki sifat antivirus, imunoregulatori, dan anti tumor. Ini mengubah transkripsi hingga 30 gen yang menghasilkan berbagai respons fisiologis dan seluler (Schroder *et al.*, 2004).

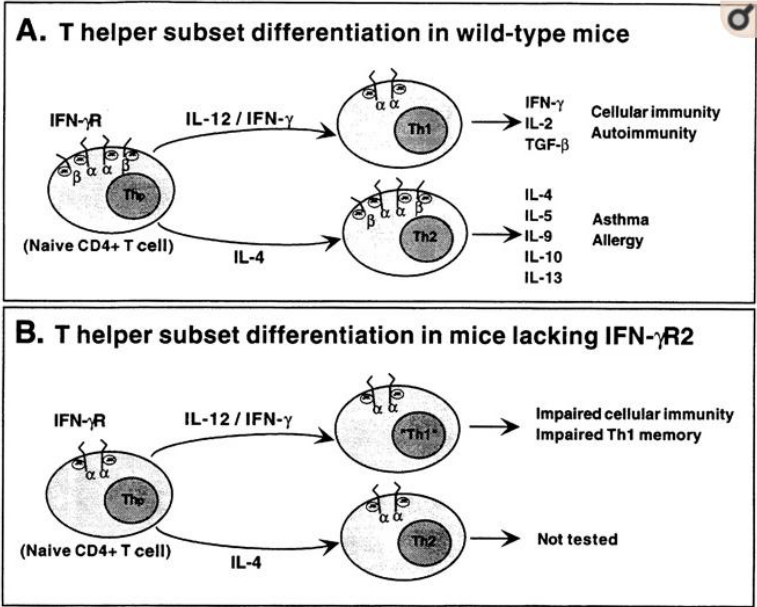
2.6 Sel T CD 4+

Sel T atau limfosit T adalah kelompok sel darah putih yang berfungsi sebagai kekebalan seluler. Sel T mampu membedakan jenis patogen dengan kemampuan berevolusi sepanjang waktu demi peningkatan kekebalan setiap kali tubuh terpapar patogen. Hal ini dimungkinkan karena sejumlah sel T teraktivasi menjadi sel T memori dengan kemampuan untuk berproliferasi dengan cepat untuk melawan infeksi yang mungkin terulang kembali. Kemampuan sel T untuk mengingat infeksi tertentu dan sistematis perlawanannya, Respon yang dilakukan oleh sel T adalah interaksi yang terjadi antara *Cell T receptor (TCR)* dan peptida yang terikat pada MHC pada permukaan sel penyaji antigen (APC). Ikatan polivalen yang terjadi memungkinkan pengiriman sinyal antar kedua sel (Lewis *et al.*, 2002). Sebuah fragmen peptida kecil yang melambangkan seluruh isi seluler, dikirimkan oleh sel target ke antarmuka sebagai MHC untuk dipindai oleh TCR yang mencari sinyal asing dengan lintasan pengenalan antigen. Dengan demikian respon imun adaptif terhadap berbagai macam penyakit dapat diterapkan (Gary, 2010)

Sel T yang telah disintesis dari kelenjar timus disebut *naive T cell*, akan terbawa oleh sirkulasi darah hingga masuk ke dalam limpa dan bermigrasi ke dalam jaringan limfatik, kemudian bermigrasi kembali ke dalam sirkulasi darah, hingga terjadi terstimulasi oleh antigen tertentu dengan ikatan pada molekul MHC kelas II. Sel T helper merupakan sel yang berperan dalam proses pematangan sel B menjadi sel plasma dan aktivasi makrofag. Sel T helper menjadi aktif saat terpapar molekul MHC kelas II yang mengandung peptida antigen yang terdapat

pada permukaan sel penyaji antigen (APC). Sel T teraktivasi, sel T helper segera membelah dengan cepat dan mensekresikan sitokin yang mengatur atau membantu respon kekebalan aktif (Gutcher and Becher, 2007).

Sel CD4 + naif memiliki potensi untuk berkembang menjadi sel CD4 + T: sel Th1 dan Th2 (**Gambar 2.7**). Sel-sel Th1 terutama ditentukan oleh kemampuan mereka untuk mengeluarkan IFN- γ , IL-2, dan tumor necrosis factor (TNF) - β , dan secara klinis terkait dengan kemampuan untuk mengatur respon imun yang dimediasi sel dan autoimunitas khusus organ. Diferensiasi sel CD 4+ terhadap fenotip Th1 tergantung pada keberadaan IL-12 dalam lingkungan mikro mereka selama stimulasi di seluruh reseptor antigen sel-T (TCR). Efek polarisasi Th1 mirip dengan IL-12 telah dianggap berasal dari IFN- γ . Di sisi lain, sel Th2 muncul ketika IL-4 hadir selama stimulasi antigenik, dan menghasilkan IL-4, IL-5, IL-10, dan IL-13. Sel-sel ini secara klinis terkait dengan pertahanan inang yang dimediasi antibodi-independen dan respons imun alergi. Karena peran potensial IFN- γ dalam menghasilkan sel Th1, memediasi fungsi efekturnya dan mengatur keseimbangan Th1 / Th2, respons sel T diperiksa pada IFN- γ R1 (- / -) (Tau and Rothmen, 2014).

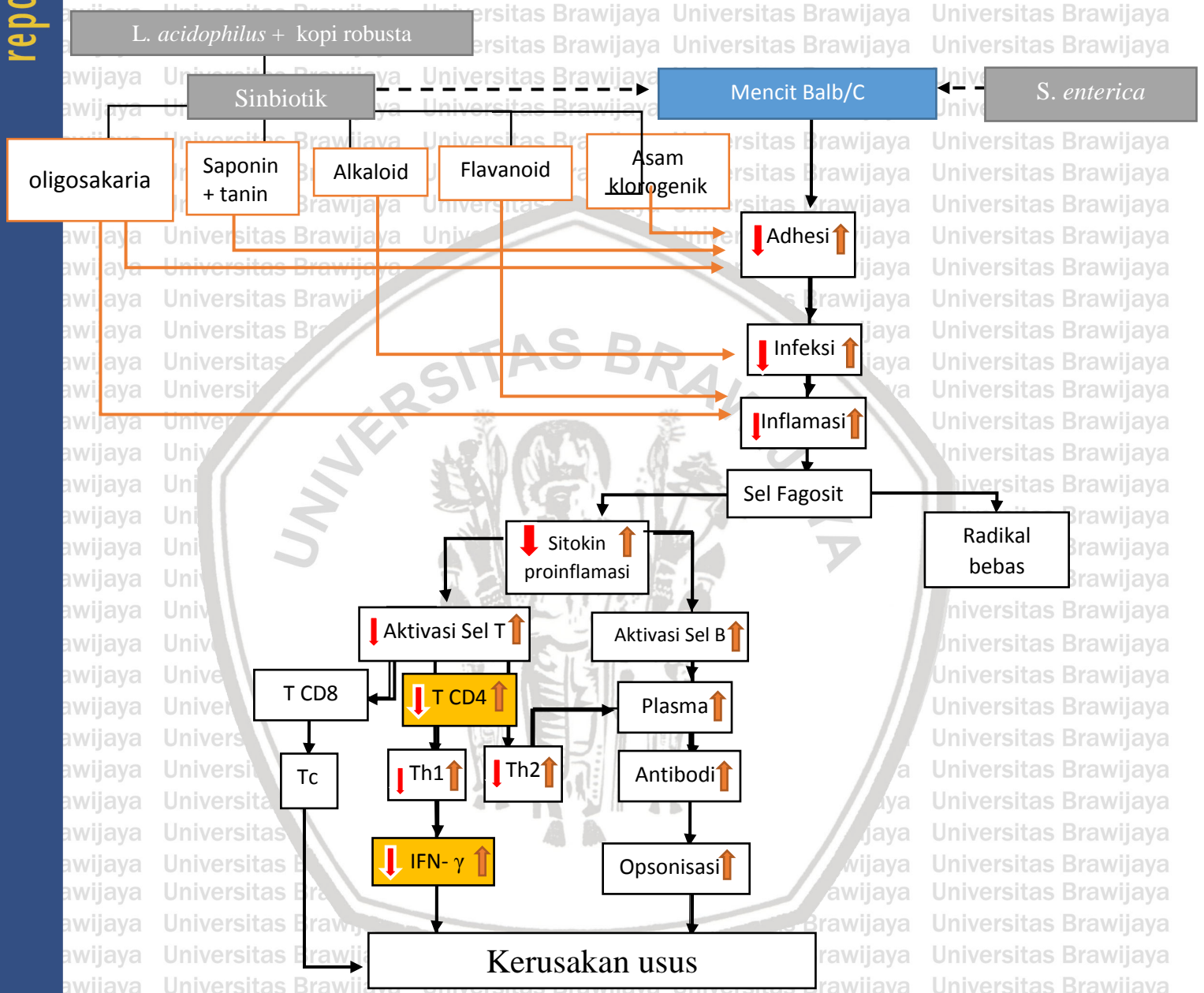


Gambar 2.7 Mekanisme Sel T CD4+ menjadi Th1 dan Th2 (Tau and Rothmen, 2014).



BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Teori

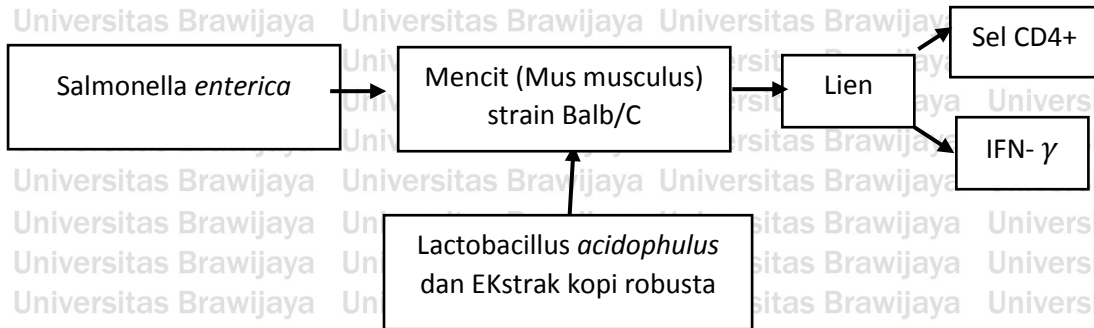


Keterangan

- = Variabel tergantung
- = Variabel kontrol
- = Variabel bebas
- = Inducer
- = Aktivasi, menghasilkan
- = Efek Salmonella
- = Efek Sinbiotik



3.2 Kerangka konsep



Hewan coba mencit Balb/C diberi sinbiotik yang terdiri atas kombinasi probiotik berupa bakteri *Lactobacillus acidophilus* dan prebiotik berupa ekstrak kopi hijau robusta. Bakteri *L. acidophilus* mengandung antimikroba berupa bakteriosin untuk menurunkan bakteri patogen, mengganggu gradien potensial membran dan pelepasan molekul intraseluler maupun masuknya substansi ekstraseluler bakteri, gangguan ini menjadi awal pembentukan pori-pori sehingga substrat intraseluler keluar sel. Bakteri ini juga memodulasi respon imun spesifik yang menghasilkan sitokin antiinflamasi seperti IL-4, IL-5, IL-10 dan IL-13 yang bekerja untuk memodulasi dan koordinasi terhadap respon inflamasi yang berlebihan. Pada area usus memproduksi mukus yang mengandung konsentrasi tinggi peptida antibakteri dan protein yang disekresikan oleh sel Paneth dan enterosit. Zat antibakteri ini membunuh bakteri patogen, dengan demikian menjaga sel-sel epitel dan bakteri *Lactobacillus acidophilus* menempel pada area mukus dan mencegah adhesi mikroba patogen di area epitel usus.

Ekstrak kopi robusta mempunyai kandungan asam klorogenik, flavonoid, tannin, saponin dan alkaloid. Asam Klorogenik akan mengganggu proses adhesi bakteri patogen dengan merusak membran sel bakteri dan menghambat Nf-KB



untuk menurunkan inflamasi jika ada serangan bakteri patogen kedalam usus.

Flavonoid akan membantu proses aktivasi sitokin proinflamasi berupa IL-1, IL-6 dan TNF- α untuk mempercepat proses inflamasi, sehingga proses penyembuhan luka lebih cepat. Kandungan saponin akan meningkatkan produksi sitokin proinflamasi berupa (IL) -1, IL-2, IL-12, IFN- γ dan (TNF) - α , tannin berfungsi mencegah adhesi bakteri dengan merusak membrane sel sehingga intisel rusak dan sebabkan bakteri mati dan alkaloid meningkatkan produksi IL-13 sebagai sitokin antiinflamasi.

Bakteri *salmonella enterica* yang diinduksi akan menyebabkan kerusakan vili usus dikarenakan adanya lipopolisakarida (LPS) yang terkandung dalam bakteri sebagai faktor virulensi. Apabila bakteri sudah berhasil melakukan adhesi dan merusak epitel usus akan mengeluarkan endotoksin dan thermolanile enterotoxin, akan ada inflamasi di usus dan sebabkan diare. Sistem imunitas tubuh akan mengeluarkan sitokin proinflamasi dan apabila berlebih akan menyebabkan peradangan akut di dalam tubuh.

Imunitas host yang dilakukan sel T naif yang akan menjadi sel CD4+ dan sel CD8+. Bakteri akan mengaktifkan respon imun tubuh dengan proses aktivasi makrofag untuk proses fagositosis bakteri. Melalui proses endositosis untuk degradasi antigen menjadi peptida yang akan berikatan dengan MHC II menuju reticulum endoplasma (RE) dibantu dengan *Transporter associated Ag Processing* (TAP) lalu keluar sel dan bertemu dengan sel T CD4. Sel CD4 akan berdiferensiasi menjadi Th1 dan Th2. Th1 akan memproduksi sitokin seperti IFN- γ untuk mempercepat proses inflamasi dalam tubuh.

Sel Th2 berfungsi diferensiasi menjadi sel B. sel B akan menyajikan ag di permukaan sel B yang memiliki reseptor BCR(Ig), jika terdapat antigen akan di hancurkan dan menjadi sel plasma untuk memproduksi antibodi Ig M dan IgD yang berfungsi opsonisasi antigen, meningkatkan reseptor Fc dan aktivasi komplemen dan terjadinya fagosit oleh makrofag yang sudah teraktiasi oleh sel Th. Sel plasma sebagai respon imun humoral akan di bantu inisiasi oleh IL-4, sedangkan sel CD8+ akan berikatan dengan MHC kelas I akan memediasi Sel T cytotoxic (Tc) untuk proses nekrosis terhadap sel yang terinfeksi di area epitel vili usus.

Dengan pemberian preventif dari kombinasi bakteri *Lactobacillus acidophilus* dan ekstrak kopi terhadap mencit Balb/C yang diinduksi salmonella, diharapkan kandungan dari asam klorogenik, tannin, saponin, alkaloid dan antimikroba kopi robusta akan mencegah adanya adhesi bakteri menuju sel epitel usus. Untuk bakteri yang berhasil melakukan adhesi ke epitel usus dihancurkan dengan kandungan flavonoid dari kopi robusta dan bakteri *Lactobacillus acidophilus* sehingga dapat menurunkan efek inflamasi yang dapat dilihat dari jumlah sel CD4+ dan IFN- γ .

3.3 Hipotesis penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah ada, maka hipotesis yang dapat diajukan yakni, Pemberian ekstrak kopi robusta dan *Lactobacillus acidophilus* sebagai preventif terhadap peningkatan aktivitas jumlah sel CD4+ dan IFN- γ pada mencit Balb/C yang diinduksi *Salmonella enterica*.

BAB 4. METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Kegiatan penelitian ini dilaksanakan mulai bulan mei hingga bulan juni 2019 dan dilaksanakan di beberapa laboratorium, antara lain:

1. Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk melakukan proses ekstraksi kopi robusta
2. Laboratorium hewan coba Fakultas Kedokteran Hewan untuk pemeliharaan mencit sebagai hewan coba.
3. Laboratorium FMIPA untuk uji jumlah kadar sel T CD4⁺ dan IFN- γ dengan metode flowcytometri.
4. Laboratorium teknik kimia Politeknik Negeri Malang untuk uji fitokimia kandungan kopi robusta.
5. laboratorium mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan untuk proses nekropsi dan adaptasi hewan coba.

4.2 Alat dan Bahan

4.2.1 Alat

Alat digunakan didalam penelitian ini antara lain sentrifuge, cawan petri, *dissecting set*, timbangan, gelas ukur, tabung erlenmeyer, bunsen, vortex, tabung reaksi, tabung valcon (10 ml, 50 ml dan 100 ml), rak tabung, ice box, inkubator media, *laminar air flow* (LAF), autoklaf, mikropipet (10 μ l dan 100 μ l), mortar, *rotary evaporator*, kulkas, papan pembedahan hewan, kandang mencit, pakan dan minum mencit.

4.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan antara lain mencit (*Mus musculus*) Strain Balb/C, *Salmonella enterica*, *Lactobacillus acidophilus*, ekstrak kopi 250 gram, 500 gram, dan 750 gram dan spuit 1 mL, spuit 3mL, spuit 10 mL, aquades, sentrifuge tube 15 mL, pot sampel, yellow tip, blue tip, cover glass, object glass, pakan tikus BR dan SP, sekam, H₂O₂ 3%, antibodi CD4⁺ dan IFN- γ , *Phospate Buffer Saline* (PBS), media *Bismuth Sulfat Agar* (BSA), media MRSA, etanol absolut, alkohol 95%.

4.3 Sampel Penelitian

Hewan coba yang digunakan yakni mencit (*Mus musculus*) strain Balb/C sekitar umur 2-3 bulan dengan berat badan sekitar 20-30 gram dan dilakukan aklimatisasi selama tujuh hari untuk beradaptasi dengan lingkungan, untuk besaran sampel dihitung berdasarkan rumus (Montgomery and Kowalsky, 2011):

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

$$6(n-1) \geq 15$$

$$6n - 6 \geq 15$$

$$6n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan:

t : Jumlah perlakuan

n : Jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan dengan menggunakan rumus diatas, untuk setiap perlakuan jumlah ulangan minimal 4 kali dalam setiap kelompok, sehingga dibutuhkan paling sedikit 24 ekor hewan coba. Penggunaan hewan coba berupa mencit dalam kegiatan penelitian terdapat dalam laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya dengan nomor: 1110-KEP-UB (**Lampiran 1**).

4.4 Rancangan Penelitian

Kegiatan penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL), yang merupakan rancangan percobaan yang bersifat homogen, sehingga media dan lingkungan tidak memberikan pengaruh yang berarti. Penelitian ini menggunakan rancangan eksperimen yang membagi subyek menjadi 6 kelompok secara acak dan untuk setiap kelompok terdapat minimal 4 ekor mencit. Untuk kelompok perlakuan yakni sebagai berikut (Tabel 4.1):

Tabel 4.1 Rancangan Penelitian

KELOMPOK	PERLAKUAN
Kontrol Positif (-)	Mencit sehat dengan pemberian pakan BR-1
Kontrol Negatif (+)	Mencit positif sakit, diberi perlakuan induksi bakteri <i>Salmonella enterica</i> secara peroral selama 2 hari dengan dosis 10^8 CFU/ml
Kontrol Lactobacillus	Mencit diinduksi dengan <i>Salmonella enterica</i> 10^8 CFU/ml selama 2 hari dan pemberian preventif <i>Lactobacillus acidophilus</i> secara peroral dengan dosis 10^8 CFU/ml selama 18 hari
Kontrol perlakuan 1 (P1)	Mencit diinduksi dengan <i>Salmonella enterica</i> 10^8 CFU/ml selama 2 hari dan pemberian preventif kombinasi ekstrak kopi 250 mg/kg dan bakteri <i>Lactobacillus acidophilus</i> 10^8 CFU/ml selama 18 hari
Kontrol Perlakuan 2 (P2)	Mencit diinduksi dengan <i>Salmonella enterica</i> 10^8 CFU/ml selama 2 hari dan pemberian preventif kombinasi ekstrak kopi 500 mg/kg dan bakteri <i>Lactobacillus acidophilus</i> 10^8 CFU/ml selama 18 hari

Kontrol Perlakuan 3 (P3)

Mencit diinduksi dengan *Salmonella enterica* 10^8 CFU/ml selama 2 hari dan pemberian preventif kombinasi ekstrak kopi 750mg/kg dan bakteri *Lactobacillus acidophilus* 10^8 CFU/ml selama 18 hari.

4.5 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini yakni,

Variabel bebas : Dosis ekstrak kopi robusta, dosis bakteri *Lactobacillus acidophilus* dan bakteri *Salmonella enterica*

Variabel terikat : Jumlah relatif Sel CD4+ dan IFN- γ

Variabel kontrol : Mencit Strain Balb/C jantan, berat badan, umur, pakan, minum, dan kandang.

4.6 Tahapan Penelitian

1. Persiapan hewan coba
2. Proses ekstraksi kopi robusta
3. Induksi kombinasi ekstrak kopi robusta dan bakteri *Lactobacillus acidophilus*
4. Induksi bakteri *Lactobacillus acidophilus*
5. Induksi bakteri *Salmonella enterica*
6. Pengujian kandungan ekstrak kopi Robusta (Fitokimia dan Lc-Ms)
7. Identifikasi Bakteri *Lactobacillus acidophilus*
8. Identifikasi Bakteri *Salmonella enterica*
9. Euthanasi, nekropsi dan preparasi organ lien
10. Menghitung jumlah Sel CD4+ dan IFN- γ dengan *flowcytometry*
11. Analisis data

4.7 Prosedur Kerja

4.7.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan adalah Mencit (*Mus musculus*) Strain Balb/C jantan dengan berat badan 20-30 gram dan berjumlah 24 ekor, hewan coba merupakan hewan coba *free patogen* dan dalam kondisi sehat, diberi pakan berupa pellet BR-1[®] yang mengandung lemak, karbohidrat, protein, vitamin dan juga mineral dan air minum ad libitum, mencit dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan dengan masing masing kelompok minimal 4 ekor mencit, dan mencit diaklimatisasi selama 7 hari dengan kandang terpisah dengan tujuan untuk meminimalkan stress dan hewan dapat mengekspresikan tingkah laku alamiahnya (ILARCLS, 2010).

4.7.2 Proses Ekstraksi Kopi Robusta

kopi robusta dilakukan pengeringan proses awal dicuci dengan bersih, lalu dipotong kecil, dimasukkan oven suhu 40o-60o atau dikeringkan dengan panas matahari, setelah kering dilakukan proses ekstraksi dengan dihaluskan dengan blender dan ditimbang sebanyak 100 gram, rendam dengan pelarut etanol 90% sebanyak 900 ml (1 Liter) di shaker 30 menit dan rendam 1 malam sampai mengendap, lalu diambil lapisan atas yang merupakan campuran pelarut dan zat aktif. Proses evaporasi dengan dimasukkan dalam labu evaporasi dan dipasang pada evaporator, waterbath diisi air sampai penuh. Suhu waterbath diatur hingga 90°C, semua rangkaian alat dipasang dan disambungkan dengan aliran listrik dan pelarut dibiarkan terpisah dengan zat aktif. Aliran pelarut

dibiarkan sampai berhenti menetes pada Labu penampung ($\pm 1,5$ - 2 jam) didapatkan hasil ekstraksi 1/5 dari bahan alam kering, hasil di masukkan ke botol plastic atau kaca dan disimpan di freezer agar tidak rusak (Asti, 2015).

4.7.3 Induksi Kombinasi Ekstrak Kopi Robusta Dan Bakteri *Lactobacillus Acidophilus*

Mencit untuk perlakuan 1 (P1), perlakuan 2 (P2) dan Perlakuan 3 (P3) diberi perlakuan dengan induksi kombinasi ekstrak kopi robusta dan bakteri *Lactobacillus acidophilus*, setiap perlakuan mempunyai perbedaan dosis untuk P1 diberi ekstrak kopi sebesar 250 mg/KgBB dan *Lactobacillus acidophilus* sebesar 10^8 CFU/ml, untuk P2 diberi ekstrak kopi 500 mg/kg dan bakteri *lactobacillus acidophilus* 10^8 CFU/ dan P3 kombinasi ekstrak kopi 750 mg/kg dan bakteri *lactobacillus acidophilus* 10^8 CFU/ml diberikan selama 18 hari (Nanak, 2011), dosis kopi sebesar 250 mg - 500 mg untuk ekstrak kopi robusta dihomogenkan dengan bakteri *Lactobacillus acidophilus* dengan pengenceran diberikan dengan menggunakan sonde lambung dengan tujuan agar bakteri langsung menuju kedalam lambung dan berinteraksi dengan bakteri dalam tubuh (David, 2012)

4.7.4 Induksi bakteri *Lactobacillus acidophilus*

Mencit dengan kontrol *Lactobacillus acidophilus* diberikan dengan dosis 10^8 CFU/ml dan dilakukan induksi ke mencit sebesar 0,5 ml per ekor selama 18 hari, diharapkan dengan pemberian *Lactobacillus acidophilus*

dapat membantu dalam menstimulasi pertumbuhan bakteri baik pada usus (Choiroqui, 2008).

4.7.5 Induksi *Salmonella enterica*

Mencit pada hari ke 15 dilakukan induksi bakteri salmonella enterica dengan dosis 10^8 CFU/ml dengan pemberian sonde lambung selama 2 hari pemberian sehari puasa agar dapat sebabkan imunitas lebih sensitif jika adanya infeksi sistemik pada organ lien (Havelaar *et al.*, 2001).

4.7.6 Pengujian Kandungan Ekstrak Kopi Robusta (Fitokimia dan Lc-Ms)

4.7.6.1 Uji Lc-Ms

Sampel kopi yang berupa maserat konsentrasi 100% di vortek selama 30 detik lalu disentrifus pada 13.000 rpm selama 30 menit, dan pindahkan ke autosampler vial. Cairan jernih tersebut diinjeksikan pada sistem LC-MS yang terdapat pelarut A terdiri dari 0,1% asam format dalam aquabidest, pelarut B terdiri dari 0,1% asam format dalam acetonitril. Sebuah gradien linier dengan kecepatan 300 μ l/menit dengan pengaturan fase gerak sebagai berikut : a) 0-0.6 menit 95%A; 0.6-3.0 menit 75%B; 3.0-3.5 menit 75%B; 3.5-4.0 menit 75%B dan 4.0-5.5 menit 95%A. Volume injeksi pada LC adalah 2 μ L . Kolom dikontrol pada 30°C, dan kompartemen autosampler ditetapkan untuk 16°C (Suhendra, 2019).

4.7.6.2 Uji Fitokimia

a. Uji TPC (Total Phenolic Content)

Sampel ditambahkan 0,5 ml methanol lalu ditambahkan aquadest 2,5 ml dan folin 50% sebanyak 2,5 ml selanjutnya didiamkan selama 5 menit, ditambahkan natrium carbonat 7,5 % 2 ml, di vortex, diinkubasi selama 15 menit pada suhu 45°C. setelah diinkubasi diukur absorbansinya pada panjang gelombang max. 765 nm.

b. Uji TFC (Total Flavanoid Content)

Sampel ditambahkan methanol 4 ml lalu ditambahkan ALCL3 2% sebanyak 1 ml dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit setelah diinkubasi sampel diukur absorbasinya pada panjang gelombang max. 430

c. Uji Senyawa Alkaloid

4 gram sampel dihaluskan dan ditambahkan kloroform secukupnya, ditambahkan 20 ml amoniak dan kloroform, disaring kedalam tabung reaksi, ditambahkan H₂SO₄ 2n sebanyak 10 tetes, filtrat dikocok kemudian didiamkan sampai terbentuk 2 lapisan. Lapisan atas dipindahkan ke dalam 3 tabung reaksi dan larutan ketiga dianalisis dengan ditambahkan larutan mayer, dragon dorf, dan wagner (yang dipakai wagner, mayer). Hasil positif jika terdapat endapan putih (Mayer), dan merah kecoklatan (Wagner).

d. Uji Senyawa Saponin

200 mg sampel dihaluskan dan dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan air suling hingga sampel terendam lalu dididihkan selama 2-3 menit, dan selanjutnya didinginkan, kemudian dikocok kuat-kuat dan ditambahkan hcl 2 tetes dan apabila masih terbentuk buih yang stabil, maka sampel tersebut positif mengandung saponin

e. Uji Senyawa Tannin

Sebanyak 200 mg sampel yang telah dihaluskan, ditambah ethanol hingga sampel terendam semua, kemudian sebanyak 1 ml larutan dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan larutan fecl₃ 1% sebanyak 2-3 tetes dan hasil positif ditunjukkan dengan warna biru tua atau hitam kehijauan (Suhendra, 2019)

4.7.7. Identifikasi Bakteri *Lactobacillus acidophilus*

Dilakukan proses identifikasi bakteri *Lactobacillus acidophilus* dengan metode pewarnaan gram dan uji katalase. Untuk pewarnaan gram dilakukan dengan cara teteskan aquades steril pada obyek glass dan inokulasi satu ose baktei pada obyek glass, fiksasi dan teteskan krisal violet dan biarkan selama 1 menit, bilas dengan air mengalir dan selanjutnya ditetesi lugol 1 menit. Bilas kembali dan beri alkohol 95% selama \pm 20 detik dan selanjutnya preparat diwarnai dengan larutan safranin selama \pm 20 detik dan bilas dengan air. Dilakukan pengamatan di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x dan diamati jika

bakteri bewarna keunguan merupakan bakteri gram positif dan jika bewarna merah muda merupakan bakteri gram negatif. Bakteri *Lactobacillus* merupakan bakteri gram positif sehingga dalam pewarnaan gram bewarna keunguan.

Uji katalase untuk mengidentifikasi bakteri yang menghasilkan toksik H_2O_2 . Uji katalase dilakukan dengan cara teteskan aquades steril di atas *object glass* kemudian mengambil 2 ose bakteri dan disuspensikan, lalu suspensi ditetesi larutan H_2O_2 3% dan diamati pembentukan gelembung udara pada obyek glass.

Jika terdapat gelembung maka bakteri bersifat aerobik dan hasilkan H_2O_2 .

4.7.8 Identifikasi Bakteri *Salmonella enterica*

Identifikasi bakteri identifikasi *Salmonella enterica* dilakukan dengan pembiakan bakteri pada agar selektif dan uji pewarnaan gram. Hal ini bertujuan untuk memastikan akan kemurnian kultur yang akan digunakan. Media selektif yang digunakan yaitu *Bismuth Sulfite Agar* (BSA). Di streak bakteri pada media BSA dengan ose lalu inkubasi media pada incubator dengan suhu $37^\circ C$ selama 1 hari. Hasil koloni *Salmonella enterica* berwarna coklat, abu-abu atau hitam, kadang tampak berwarna kilau metalik. Sekeliling koloni biasanya akan berwarna coklat pada awalnya dan akan menjadi hitam dengan bertambahnya waktu inkubasi (BAM, 2007).

Pewarnaan Gram diawali dengan menginokulasikan satu ose kultur ke atas gelas objek yang telah diberi setetes akuades steril, kemudian difiksasi di atas api bunsen. Setelah film kultur siap, ditetesi violet kristal dan dibiarkan selama 1 menit, lalu bilas dengan akuades dan ditetesi larutan lugol selama 1 menit. Setelah dicuci kembali dengan akuades, Bilas kembali dan beri alkohol 95%.

selama \pm 20 detik dan selanjutnya preparat diwarnai dengan larutan safranin selama \pm 20 detik dan bilas dengan air. Dilakukan pengamatan di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x dengan penambahan minyak imersi. Di bawah mikroskop akan terlihat sel-sel *S. enterica* berwarna merah dengan bentuk batang pendek (BAM, 2007).

4.7.9 Euthanasi, Nekropsi Dan Preparasi Organ Lien

Proses euthanasi dan pengambilan organ lien pada hewan coba Mencit (*Mus musculus*) Strain Balb/C dilakukan pada hari 30, dilakukan euthanasi dengan cara dislokasi cervicalis, nekropsi dilakukan melalui linea alba dan diambil organ lien untuk proses *flowcytometry* untuk mengukur jumlah Sel CD4+ dan IFN- γ .

4.7.10 Flowcytometry

Mencit dilakukan euthanasia dengan dislokasi cervicalis, lalu dilakukan pengambilan organ lien secara aseptik dengan gunting dan pinset. Organ lien yang sudah diambil menggunakan gunting dan pinset di bersihkan jaringan dengan PBS 2x pengulangan setelah itu dilakukan penggerusan organ lien dengan pangkal spuit 5 cc di cawan petri berisi 5 ml PBS, disaring dengan wire dan dimasukkan propilen 15 ml dan masukkan kedalam tabung valcon untuk di sentrifuge dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit dan dibuang cairan supernatan, pellet ditambah 1 ml PBS kemudian dihomogenkan dengan cara *pipetting*, cairan suspensi dipindahkan kedalam microtube 1,5 ml, selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan 2500 rpm selama 5 menit suhu 4° C, dibuang cairan supernatan dan dilakukan pewarnaan intraseluler berupa ditamhkannya larutan

fiksatif berupa cytofix sebanyak 50 μ L, kemudian inkubasi selama 20 menit suhu 4°C pada ruang gelap dan ditambahkan larutan permeabilitas (*Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer*) sebanyak 500 μ L, homogenisasi kemudian di sentrifuge dengan kecepatan 2500 rpm dan dibuang cairan supernatant dan ditambahkan larutan antibodi CD4+ dan juga IFN- γ diinkubasi selama 20 menit pada suhu 4°C ditambahkan 400 μ L PBS masukkan pada alat flowcytometri untuk dilakukan pembacaan hasil (Muhaimin, 2013).

4.7.11 Analisis Data

Pada penelitian ini analisa data secara kuantitatif dengan perhitungan jumlah relatif sel CD4+ dan IFN- γ pada organ lien dengan menggunakan Uji *One Way Analysis of Variance (ANOVA)* dengan tingkat kepercayaan 95% untuk mengetahui perbedaan kelompok perlakuan secara menyeluruh, jika terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) dilanjutkan Uji *Tuckey* ($\alpha = 5\%$) untuk mengetahui hasil perbedaan antara masing masing kelompok perlakuan, uji perhitungan jumlah dengan metode *flowcytometry* dengan IBM SPSS ver. 21.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Sinbiotik (Ekstrak Kopi Robusta Lampung dan Bakteri *Lactobacillus acidophilus*) Terhadap Kondisi Feses Mencit.

Salah satu adanya infeksi bakteri *Salmonella enterica* ditandai dengan adanya perubahan kondisi feses seperti diare. Menurut Astawan, *dkk* (2012), diare pada mencit terdiri atas 5 kategori yakni : kategori ke-1, feses normal dengan bentuk bulat/ lonjong, warna hitam dan keras. Katergori ke-2, feses bulat atau lonjong, warna hitam dan agak lembek. Katageri ke-3, feses berbentuk bulat atau lonjong, bewarna agak hitam dan lembek. Kategori ke-4, feses tidak berbentuk bulat atau lonjong, warna agak kecoklatan dan lembek. Kategori ke-5, feses cair, tidak berbentuk, berwarna coklat, hingga muncul lendir. Feses dikatakan diare jika dalam kategori 3, 4 dan 5.

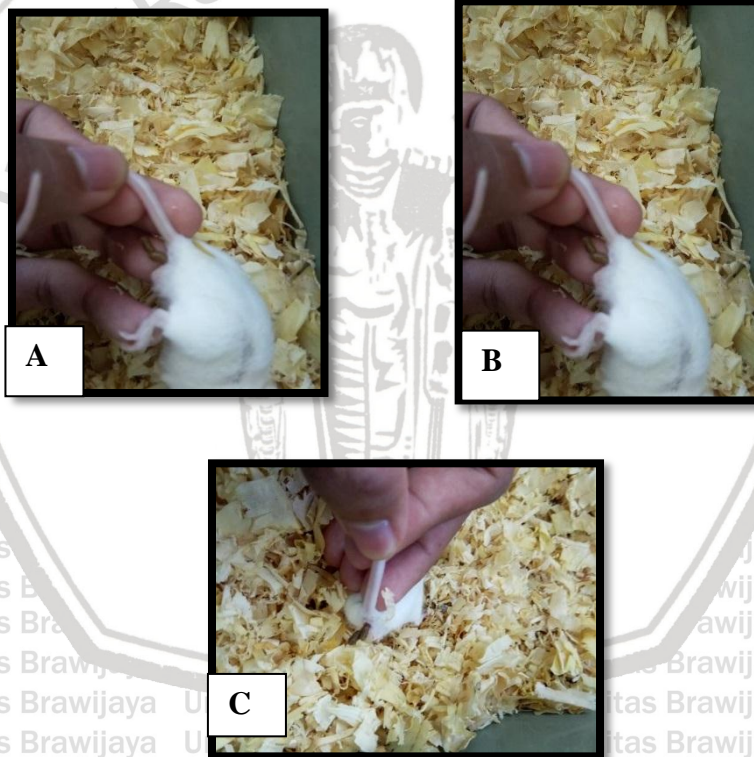
Pada penelitian ini terlihat pada kelompok K+ feses mengalami diare setelah pemberian dari bakteri *Salmonella enterica* selama 2 hari pada hari ke-22 dan ke-23 hal ini dikarenakan bakteri *Salmonella enterica* menyerang bagian gastrointestinal, dimana mengeluarkan thermolabile enterotoxin yang menghinibisi absorpsi Na dan Ca vili vili usus sehingga menyebabkan adanya diare (Ralph, 2016). Menurut Ari, (2014) dengan pemberian probiotik dapat mengurangi frekuensi dari diare dimana frekuensi 8 hari menjadi 5 hari, Sedangkan pada kelompok *Lactobacillus acidophilus* mengalami feses diare hal ini bisa dikarenakan masih dalam kondisi inflamasi dari fase penyembuhan luka tetapi tidak parah sepeti kelompok perlakuan K+ (**Gambar 5.1**). untuk kelompok

perlakuan P1 terlihat termasuk kedalam feses kategori 2 (Normal) hal ini menandakan bahwa Sinbiotik ekstrak kopi robusta dan bakteri *Lactobacillus acidophilus* dapat menurunkan tingkat diare pada mencit., sedangkan kelompok perlakuan P2 dan P3 terlihat feses pada kondisi diare (Tabel 5.1) hal ini dikarenakan karena dosis ekstrak kopi yang lebih tinggi, kopi mengandung kafein, jika berlebih dapat menyebabkan adanya iritasi pada vili vili usus yang menyebabkan absorpsi usus terganggu dan feses diare (Aryanu, 2016).

Tabel 5.1. Tampilan Feses Pada Mencit

Perlakuan	Tampilan Feses	Kriteria Diare	Keterangan
Kontrol negatif (K+)	- Berbentuk Lonjong, - Warna Hitam, - Solid.	Feses Normal	Normal
Kontrol Negatif (K-)	- bentuk tidak lonjong, tidak bulat, - warna coklat mentah - lembek, berlendir	Feses diare	Diare
Kontrol <i>Lactobacillus acidophilus</i> (KL)	- bentuk agak bulat, - warna coklat - lembek	Feses kategori 4	Diare
Perlakuan 1 (P1)	- berbentuk lonjong, - warna coklat tua. - Tidak terlalu keras	feses kategori 2	Normal
Perlakuan 1 (P2)	- bentuk lonjong, - warna coklat - agak lembek	Feses kategori 3	Diare
Perlakuan 1 (P3)	- bentuk lonjong, - warna coklat - agak lembek	Feses kategori 3	Diare

Mekanisme dari sinbiotik ekstrak kopi robusta dan bakteri *Lactobacillus acidophilus* dimana mengandung bakteri patogen antara lain melalui sifat antibiokroba dengan menghambat kolonisasi bakteri dengan merusak integritas membran bakteri (Lou, et al, 2011). Asam klorogenat akan menghambat inflamasi sehingga akumulasi cairan dan hipersekresi cairan usus sebagai bentuk respon inflamasi pada usus akan terhambat (Tenorio *et al.*,2016) dan bakteri *lactobacillus* mengeluarkan bakteriosin berfungsi dalam penghancuran sel target dengan pembentukan pori atau penghambatan sintesis dinding sel bakteri patogen (Kailova, 2010).



Gambar 5.1 Feses Tikus Percobaan, (A) Feses Mencit P1 (B) Feses Mencit P2; (C) Feses Mencit P3

Dilakukan uji Sensitifitas dengan menggunakan metode Disk Diffusion Test pada ekstrak Kopi robusta dengan persentase 10%, 20%, 30%, 40%, 50% dan 60% sebanyak 20 mikrolit terhadap bakteri *Lactobacillus acidophilus*, dengan kontrol (+) menggunakan antibiotik Gentamycin dan control (-) dengan blank disc isi aquades 20 mikrolit pada media MRSA + CaCO₃ 1% dengan hasil (Tabel 5.2)

2. Lactobacillus Acidophilus

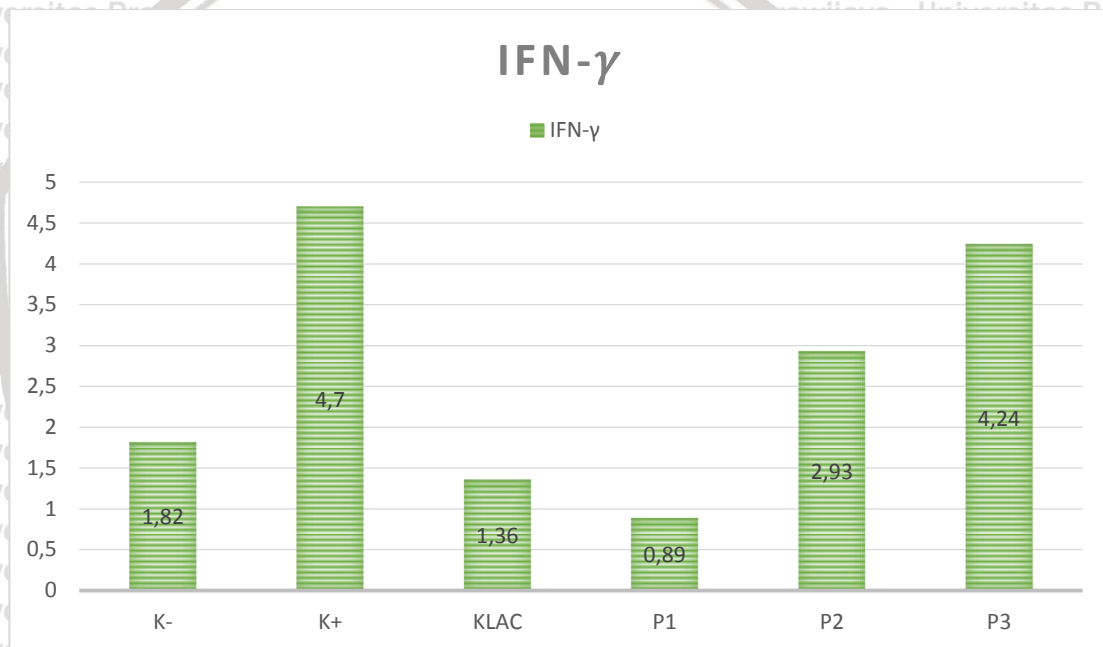
Media	Ulangan ke	(+) (Genta)	Ekstrak 10%	Ekstrak 20%	Ekstrak 30%	Ekstrak 40%	Ekstrak 50%
MRSA	1	0,8 cm	-	-	-	-	-
	2	0,8 cm	-	-	-	-	-

Dengan hasil diatas dapat dilihat bahwa dengan persentase 10% - 50% ekstrak kopi robusta tidak menghambat pertumbuhan dari bakteri *Lactobacillus acidophilus*, sehingga ekstrak kopi robusta dapat dikombinasikan dengan bakteri *Lactobacillus acidophilus*.



5.2 Pengaruh Pemberian Kombinasi Ekstrak Kopi Robusta Lampung dan *Lactobacillus acidophilus* Terhadap Jumlah Relatif Sel IFN- γ

Pada penelitian ini dilakukan dengan metode *flowcytometri* untuk mengetahui jumlah relatif sel IFN- γ dengan pengambilan organ lien. Data yang didapatkan dianalisis dan mendapatkan hasil rata-rata IFN- γ tertinggi pada nilai K+, dan pada kelompok perlakuan KL, P1, P2 dan P3 mengalami penurunan dari rata-rata K-. Hasil rata-rata terendah pada perlakuan P1. Grafik hasil rata-rata jumlah relatif sel IFN- γ berdasarkan *flowcytometry* ditunjukkan **Gambar 5.4**



Gambar 5.2 Grafik Rata-Rata Jumlah Relatif Sel IFN- γ

Selanjutnya hasil *flowcytometri* di analisis menggunakan *SPSS Statistic 21* dengan uji normalitas (**Lampiran 12**) dan uji homogenitas yang menunjukkan data terdistribusi normal dan homogen, selanjutnya dilanjutkan dengan uji statistik *One Way Anova* dan dilanjutkan dengan Uji *Tuckey*. Hasil menunjukkan bahwa kombinasi *Lactobacillus acidophilus* dan ekstrak kopi robusta lampung dapat menurunkan jumlah sel IFN- γ secara nyata pada **Tabel 5.3**

Tabel 5.3 Tabel Rata Rata Jumlah Relatif Sel IFN- γ

Perlakuan	Ulangan				Total	Rata-Rata \pm Std Deviasi
	1	2	3	4		
K-	0,85	1,64	2,71	2,1	7,28	1,82 \pm 0,78 ^a
K+	15,73	5,33	4,39	3,38	18,83	4,7 \pm 1,04 ^b
KL	2,41	2,8	0,15	0,09	5,45	1,36 \pm 1,44 ^a
P1	2,39	0,27	0,41	0,49	3,56	0,89 \pm 1,04 ^a
P2	2,49	3,2	3,41	2,63	11,73	2,93 \pm 0,44 ^{ab}
P3	3,41	4,38	4,26	4,93	16,98	4,24 \pm 0,62 ^b

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

Pada penelitian ini menunjukkan rata rata kelompok kontrol negatif (K-) memiliki perbedaan yang signifikan dengan kelompok kontrol positif (K+).

Pada nilai K- memiliki nilai 1,82 \pm 0,78^a yang menunjukkan bahwa pada kondisi sehat IFN- γ tetap ditemukan dalam tubuh, karena berfungsi dalam menginduksi dan memodulasi berbagai respons imun dalam tubuh seperti respon imun terhadap infeksi virus, beberapa infeksi bakteri dan protozoa (Tau and Rothman, 2014).

Pada perlakuan K+ mempunyai nilai tertinggi yakni 4,7 \pm 1,04^b dikarenakan pada kelompok K+ diberikan perlakuan induksi bakteri *Salmonella enterica* dengan dosis 10⁸ CFU/ml, dengan ini tubuh akan merespon antigen yang masuk dalam tubuh, IFN- γ yang akan mengaktifasi makrofag, sehingga terjadi peningkatan untuk membunuh bakteri yang sudah terfagositosis dan terjadi produksi isotope antibodi (IgG2 pada mencit) yang akan mengopsonisasi bakteri



dan mengaktivasi sistem komplek yang akan melisis sel yang terinfeksi (Abbas *et al.*, 2003).

Pada kelompok perlakuan K⁺ tidak berbeda signifikan dengan P2 dan P3, dan K⁺ berbeda signifikan dengan KL dan P1. Kelompok perlakuan KL merupakan mencit yang diinduksi bakteri *Lactobacillus acidophilus* dengan dosis 10⁸ CFU/ml hasil rataan yang didapatkan yakni 1,36±1,44^a terdapat penurunan dari nilai rataan K⁺, hal ini dikarenakan bakteri *Lactobacillus acidophilus* merupakan bakteri asam laktat yang kompetitif terhadap mikroorganisme patogen saat adhesi di mukosa usus, mengeluarkan bakteriosin untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella enterica* dalam tubuh, dan adanya modulasi respon imun spesifik yang menghasilkan sitokin antiinflamasi seperti IL-4, IL-5, IL-10 dan IL-13 yang bekerja untuk terhadap respon inflamasi yang berlebihan sehingga terjadi penurunan nilai rataan dari nilai K⁺ (Hata *et al.*, 2010).

Perlakuan P1, P2, dan P3 adalah perlakuan dengan pemberian sinbiotik (*Lactobacillus acidophilus* dan ekstrak kopi robusta Lampung) dengan adanya peningkatan konsentrasi yakni 250mg/KgBB, 500mg/KgBB dan 750mg/KgBB.

Hasil rataan menunjukkan bahwa nilai rataan terkecil pada nilai P1 yakni, 0,89±1,04^a hal ini dikarenakan ekstrak kopi mengandung senyawa kimia seperti saponin, tannin, flavonoid, alkaloid dan Asam klorogenik (**Lampiran 10**).

Alkaloid dalam kopi robusta akan bereaksi dengan senyawa asam amino yang menyusun dinding sel dan DNA bakteri. DNA bakteri sebagai penyusun inti sel akan terjadi perubahan struktur asam amino. Perubahan asam amino akan

merubah susunan rantai DNA sehingga keseimbangan genetik DNA bakteri mengalami kerusakan dan sel bakteri mendorong adanya lisis pada inti bakteri.

Lisis bakteri akan menyebabkan kerusakan sel bakteri yang mengakibatkan bakteri tidak mampu melakukan metabolisme dan bakteri akan inaktif dan hancur (Gunawan, 2009).

Senyawa flavonoid dalam kopi akan merusak dinding sel bakteri, melalui perbedaan kepolaran antara lipid penyusun DNA dengan gugus alkohol pada senyawa flavonoid sehingga dinding sel akan rusak dan senyawa tersebut dapat masuk ke dalam inti sel bakteri (Gunawan, 2009). Tannin mempunyai fungsi antibakteri dengan cara terjadinya reaksi dengan membran sel, inaktivasi enzim, dan destruksi atau inaktivasi fungsi materi genetik (Ajizah A, 2004).

Menurut Galves *et al.*, (2017) asam klorogenat memiliki fungsi sebagai antimikroba terhadap berbagai spesies bakteri dengan mengganggu permeabilitas dinding sel bakteri. Kepekaan ini bergantung pada tebal struktur dinding sel antar bakteri yang menyebabkan perbedaan dalam permeabilitas. Mengganggu proses adhesi bakteri patogen dengan merusak membran sel bakteri, menurunkan aktivitas Nf-Kb dengan merangsang perubahan permeabilitas membran sel menjadi ireversibel dan menyebabkan gangguan potensial membran sel bakteri sehingga keluarnya makromolekul sitoplasma seperti nukleotida (Lou *et al.*, 2011). Kandungan dari *Lactobacillus acidophilus* sebagai probiotik berfungsi dapat menurunkan aktivasi NF-kB, dengan cara pemberian probiotik pada mencit menghambat translokasi NF-kB ke dalam terpapar merupakan suatu model nucleus (Couper *et al.*, 2008) dan menghambat fosforilasi Ik-B (Asihing, 2018).

Untuk memastikan pengaruh dari kombinasi ekstrak kopi robusta dan *Lactobacillus acidophilus* terhadap jumlah IFN- γ maka dilakukan uji korelasi spearman terlihat pada (Tabel 5.4).

Correlations			
	KELOMPOK	IFN	
KELOMPOK	Pearson Correlation	1	.902**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	12	12
IFN	Pearson Correlation	.902**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	12	12

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Diketahui hasil positif yang berarti semakin tinggi kelompok perlakuan maka akan semakin tinggi jumlah IFN- γ , dan juga nilai signifikansi bernilai 0.00 yang dimana kurang dari 0.05 yang berarti sinbiotik ekstrak kopi robusta dan *Lactobacillus acidophilus* terhadap jumlah IFN- γ berkorelasi, dan tingkat keeratan sekitar 0.902 yang dimana termasuk dalam korelasi sempurna. Sehingga dapat disimpulkan bahwa sinbiotik ekstrak kopi robusta dan *Lactobacillus acidophilus* berkorelasi secara kuat terhadap jumlah relatif IFN- γ .

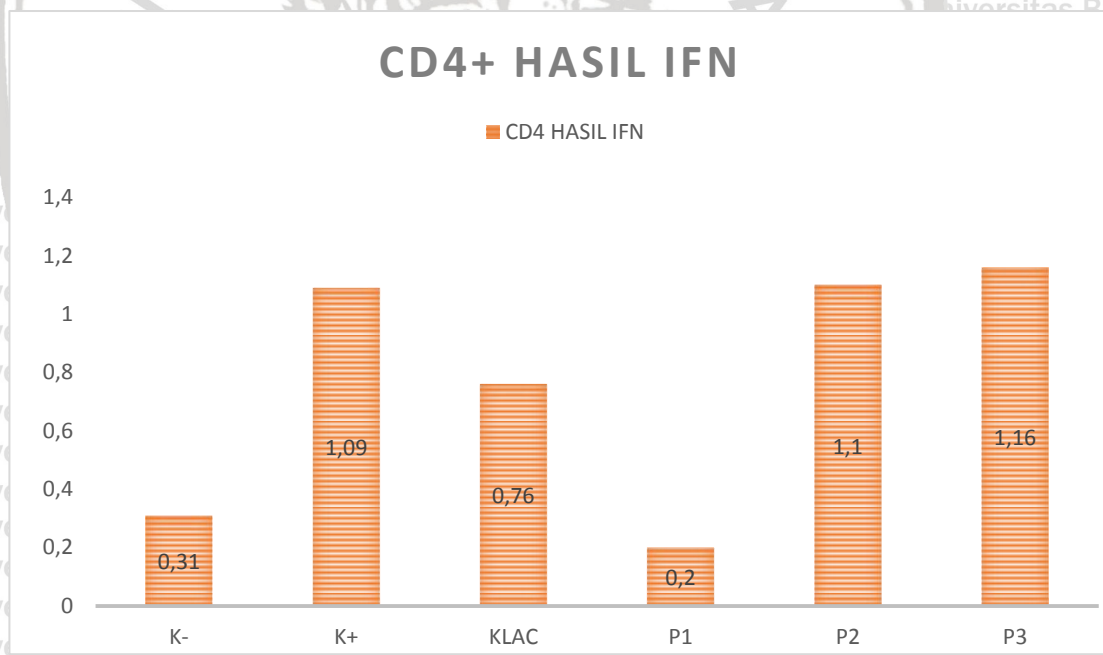
5.3 Hubungan Jumlah Relatif Sel CD4+ Dan IFN- γ Terhadap Pengaruh Pemberian Kombinasi Ekstrak Kopi Robusta Lampung dan *Lactobacillus acidophilus*



Pada penelitian ini dilakukan dengan metode *flowcytometri* untuk mengetahui jumlah relatif sel CD4+ dengan pengambilan organ lien dikarenakan

Sel T naïve yang berasal dari kelenjar timus akan terbawa melalui sirkulasi kedalam darah dan masuk ke dalam lien, hingga terdapat antigen masuk maka sel T akan menyerang antigen dan kembali kedalam sirkulasi darah.

Data yang didapatkan dianalisis dan mendapatkan hasil rata rata CD4+ yang menghasilkan IFN- γ Hasil rata-rata terendah pada perlakuan P1 dengan pemberian ekstrak Kopi Robusta 250mg/kgBB dan Bakteri *Lactobacillus acidophilus* 10^8 CFU/ml. Grafik hasil rata-rata jumlah relatif sel CD4++ menghasilkan IFN- γ berdasarkan *flowcytometry* ditunjukkan **Gambar 5.2**



Gambar 5.2 Grafik Rata-Rata Jumlah Relatif Sel IFN- γ

Selanjutnya hasil *flowcytometri* di analisis menggunakan *SPSS Statistic 21* dengan uji normalitas (**Lampiran 13**) dan uji homogenitas yang menunjukkan data terdistribusi normal dan homogen, selanjutnya dilanjutkan dengan uji statistik

One Way Anova dan dilanjutkan dengan Uji *Tuckey*. Hasil menunjukkan bahwa kombinasi *Lactobacillus acidophilus* dan ekstrak kopi robusta lampung dapat menurunkan jumlah sel CD4+ yang menghasilkan IFN- γ secara nyata pada

Tabel 5.5

Tabel 5.5 Tabel Rata Rata Jumlah Relatif Sel CD4+ yang menghasilkan IFN- γ

Perlakuan	Ulangan				Total	Rata-Rata± Std Deviasi
	1	2	3	4		
K-	0,28	0,43	0,28	0,25	2,27	0,31±0,81 ^a
K+	1,0	1,58	0,81	1,0	3,25	1,09±0,33 ^b
KL	0,55	0,49	1,0	1,0	1,1	0,76±0,27 ^{ab}
P1	0,24	0,15	0,19	0,25	0,83	0,20±0,04 ^a
P2	0,88	0,92	1,75	0,84	4,39	1,1±0,43 ^b
P3	1,01	1,16	1,77	0,73	4,67	1,16±0,43 ^b

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

Dari data yang didapatkan dimana kelompok perlakuan K+ memiliki nilai yang lebih tinggi dibanding K- hal ini dikarenakan Infeksi *Salmonella enterica* pada mencit Strain BALB/C dengan dosis 10^8 CFU/ml akan menyebabkan adanya respon imun dalam tubuh. Menurut Lehner, (2001) bakteri yang masuk dalam tubuh akan memicu sistem imunitas tubuh secara non spesifik dengan cara memusnahkan bakteri hingga cara spesifik dengan adanya pertahanan yang lebih kompleks dengan produksi antibodi dan sitokin.



Bakteri *Salmonella enterica* masuk kedalam tubuh dan menembus epitel dengan mengeluarkan T3SS-1 sehingga dapat mencapai lamina propia, bakteri akan selalu berada di lokasi intraseluler di dalam sel fagosit seperti neutrophil dan sel mononuklear (Suprpto, 2009). Keberadaan bakteri yang terdapat PAMP (*pathogen-associated molecular pattern*) dapat dideteksi dengan ekspresi PRR oleh sel fagosit. Adanya respon tubuh yang memproduksi sel T dan sel B, sel T akan berdiferensiasi menjadi sel CD8+ dan sel CD4+. Sel CD4+ akan menghasilkan beberapa sitokin seperti TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL15 dan IL-18 yang merupakan fase adaptif yang esensial (Vasques *et al.*, 2001). IFN- γ yang diproduksi oleh sel NK sebagai respon dari IL-12 dan IL-18 akan meningkatkan antibakterial dari makrofag yang bersifat *nitric-oxide synthase (iNOS)-dependent* (Suprpto, 2009) sehingga pada perlakuan K+ memiliki tingkat imunitas yang tinggi dibanding kelompok perlakuan K-.

Sedangkan pada K- sendiri masih terdapat nilai sel CD4+ hal ini karena adanya sel limfosit T CD4+ yang belum teraktivasi pada mice sehat, sel limfosit T akan berproliferasi jika ada antigen masuk kedalam tubuh dan dikenali oleh APC (Antigen Presenting Cell) (Akrom, 2013). Sel CD4+ akan diferensiasi menjadi sel T helper 1 dan sel T helper 2, yang akan membantu pematangan sel B dan aktivasi makrofag jika terdapat antigen.

Jika K+ dibandingkan dengan KL terdapat penurunan yang signifikan hal ini dikarenakan adanya bakteri *Lactobacillus acidophilus* sebagai bakteri asam laktat (BAL) yang menginduksi adanya sel CD4+ akan berdeferensiasi menjadi

Th2 yang terdapat sitokin antiinflamasi seperti IL-4 dan IL-5 agar sitokin tidak bekerja secara berlebihan dan secara signifikan menurunkan kadar inflamasi.

Sedangkan pada perlakuan P1 mengalami penurunan yang signifikan dibandingkan perlakuan lainnya hal ini dikarenakan kombinasi ekstrak kopi robusta 250mg/kgBB dan bakteri *Lactobacillus acidophilus* 10⁸ CFU/ml dimana kandungan efek pemberian ekstrak kopi robusta yang mengandung asam klorogenik. Asam klorogenik merupakan Subgrup utama dari isomer asam klorogenat pada kopi adalah asam caffeoylquinic (CQA), asam feruloylquinic (FQA), asam dicaffeoylquinic (diCQA) dan asam p-coumaroylquinic (pCQA) pada jumlah yang lebih kecil. Berfungsi menurunkan produksi histamin, bradikinin, dan leukotrien sehingga pada akhirnya juga dapat mengurangi peningkatan permeabilitas kapiler selama fase inflamasi (Seok *et al.*, 2013). Asam Klorogenik juga berfungsi untuk mengurangi produksi sejumlah mediator proinflamasi, termasuk TNF- α , interleukin (IL) -1 β , IL-6 dan interferon (IFN) - γ dalam sel makrofag (Hall *et al.*, 2015). Kandungan alkaloid yang berada pada kafein memiliki efek antiinflamasi, berperan untuk menghambat produksi tumor necrosis factor alpha (TNF- α) yang dirangsang LPS dan merupakan antioksidan kuat yang melindungi terhadap kerusakan sel yang disebabkan oleh radikal bebas dan peroksida (Hall *et al.*, 2015). Pemberian probiotik *Lactobacillus acidophilus* dapat meningkatkan absorpsi nutrisi dengan memproduksi enzim proteolitik dan melepaskan sejumlah asam amino bebas dan mensintesis vitamin yang sangat dibutuhkan oleh pertumbuhan inangnya (Parvez *et al.*, 2006). Sehingga dalam

perlakuan P1 dengan dosis 250 mg/KgBB dapat secara efektif menurunkan jumlah sel relatif sel CD4++ yang menghasilkan IFN- γ .

Pada perlakuan P2 dan P3 hasil yang diperoleh tidak berbeda nyata dengan K+ hal ini menandakan adanya inflamasi yang tinggi, hal ini dikarenakan ekstrak kopi robusta dengan dosis 500mg/KgBB dan 750mg/KgBB dapat meningkatkan iritasi pada usus, menurut (Wan et al., 2019) ekstrak kopi mengandung adanya kafein, asam klorogenik, catechin dan procyanidin dimana dapat menyebabkan adanya iritasi pada usus, karena dapat menyebabkan sekresi asam lambung dan perlukaan pada usus sehingga adanya peningkatan inflamasi.

Untuk memastikan pengaruh dari kombinasi ekstrak kopi robusta dan *Lactobacillus acidophilus* terhadap jumlah sel relatif sel CD4+ yang menghasilkan IFN- γ maka dilakukan uji korelasi spearman, terlihat pada (Tabel 5.6)

Correlations

	kelompok	IFNCD4+
kelompok	Pearson Correlation	.731**
	Sig. (2-tailed)	.007
	N	12
IFNCD4+	Pearson Correlation	.731**
	Sig. (2-tailed)	.007
	N	12

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Diketahui hasil positif yang berarti semakin tinggi kelompok perlakuan maka akan semakin tinggi jumlah CD4+ yang menghasilkan IFN- γ , dan juga nilai signifikansi bernilai 0.07 yang dimana kurang dari 0.05 yang berarti sinbiotik ekstrak kopi robusta dan *Lactobacillus acidophilus* terhadap jumlah sel CD4+

yang menghasilkan IFN- γ berkorelasi, dan tingkat keeratan sekitar 0.731 yang dimana termasuk dalam korelasi sedang. Sehingga dapat disimpulkan bahwa sinbiotik ekstrak kopi robusta dan *Lactobacillus acidophilus* berkorelasi secara sedang terhadap jumlah relatif CD4+ yang menghasilkan IFN- γ



DAFTAR PUSTAKA

Alisantosa, M. Shivaprasad S. Dhillon, and O. Jack 2001. *Pathogenicity of Salmonella enterica phage types 4, 8 and 23 in specific pathogen free chicks*. Veterinary Medicine University of California Davis. USA

Ali, L. Nadya. M, Nur. 2015. *Hubungan Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Insidens Penyakit Demam Tifoid Di Kelurahan Samata Kecamatan Somba Opu Kabupaten Gowa*. Jurnal Kesehatan. Volume VII No. 1/2015.

Abbas AK, Litchman AH, Pober JS. *Cellular and molecular immunology. Fourth edition*. Philadelphia; WB Saunders Co, 2003 : 1-16, 343-52 9.

Asihing T. 2011. *Pengaruh Pemberian L. rhamnosus dan L. acidophilus terhadap Sekresi Sitokin Th1, Treg, Th17 Produced by Lactobacillus Dissociated IKK-G and pada Mukosa Usus Mencit yang Terpapar Hsp90 Complex Lipolisakarida E.coli. [Penelitian]. Malang, Universitas in Helicobacter Pylori-Infected Gastric Epithelial Cells*. Brawijaya.

Ari, Y. 2014. *Buku Monograf Probiotik*. Unnes Press. Semarang

Astawan, M., T. Wresdiyati, Suliantari, dan Y.M.S. Nababan. 2012 *Yoghurt Sinbiotik Berbasis Probiotik Lokal Dapat Mencegah Diare dan Mengubah Status Hematologi Tikus*. Jurnal Veteriner, 13(2): 145-153

Ajizah, A., 2004. *Sensitivitas Salmonella Typhimurium terhadap Ekstrak Daun Psidium Guajava L*. Bioscientiae Vol.1 No.1. pp: 8-31

Bhardwaj J, Chaudhary N, Seo HJ and Kim MY. 2014. Immunomodulatory effect of tea saponin in immune T-cells and T-lymphoma cells via regulation of Th1, Th2 immune response and MAPK/ERK2 signaling pathway. US National Library of Medicine. Natinal Instite of Health.

Couper K, Blount D, and Riley EM. 2008. IL 10: The Master 42. Larsson R, Rocksen D, Liliehook B, Jonsson A, and Regulatory of Immunity to Infection. *The Journal of Bucht A. Dose-dependent Activation of Lymphocytes in Immunology*. 180(9): 5771-5777

Chuang CH, Su LH, Perera J, Carlos C, Tan BH, Kumarasinghe G, So T, Van PH Chongthaleong A, Hsueh PR. 2009. *Surveillance of antimicrobial resistance of Salmonella enterica serotype Typhi in seven Asian countries*. Epidemiology and Infection.

Chung KT, Stevens SE, Lin WF, Wei CI. 2006. *Growth inhibition of selected food borne bacteria by tannic acid, propyl gallate and related compounds*. Lett. Appl. Microbiol. 17: 29-31

Chairgulprasert, V. 2016. *Chemical constituents of the essential oil and organic acids from longkong (Aglaia dookoo Griff.) fruits*. <<https://www.researchgate.net>> Diakses 2 Agustus

David M and Hergen. 2015. *Requirement for MAP kinase (ERK2) activity in interferon alpha- and interferon beta-stimulated gene expression through STAT proteins*. Science. 269:1721-1723

David, L. 2012. *Surface changes in rat gastric mucosa induced by sodium fluoride: A scanning electron micron*. United Kingdom, North Toronto Animal Clinic, Ontario, Canada

Djaenudin, D., Marwan H., Subagyo H., dan A. Hidayat. 2003. *Petunjuk Teknis untuk Komoditas Pertanian*. ISBN 979-9474-25-6. Balai Penelitian Tanah, Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanah dan Agroklimat. Bogor

Dimas, R. Velina, A. Aylilianawat. 2017. *Ekstraksi Kafeina Dari Serbuk Kopi Java Robusta Dengan Pelarut Minyak Jagung*. Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya.

Dimas Rizky Widagdyo, Velina Agustien Budiman, Aylilianawati, Nani Indraswati2, 2013. *Ekstraksi Kafeina Dari Serbuk Kopi Java Robusta Dengan Pelarut Minyak Jagung*. Fakultas Teknik Jurusan Teknik Kimia Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya

Dzen, S.M. 2003. *Bakteriologi Medical*. Edisi I. Cetakan I. Malang : Bayumedia publishing, Halaman 134

Endang, N.W. 2011. *Peran Probiotik Untuk Kesehatan*. *Jurnal Kesehatan*, ISSN

1979-7621, Vol. 4, No. 1, 14-20

Farah, A., and Donangelo C. M. 2016. *Phenolic Compounds in Coffee*. Braz. J. Plant. Physiol., 18(1): 23-36.

Farah A., S Luisa. Marco, A. 2008. *Potential Prebiotic Effect of Coffee: Consumption and Health Implications*. <<https://www.researchgate.net/>>. Diakses 2 Agustus 2019

Farhaty, N., dan Muctaridi. 2017. *Tinjauan Kimia dan Aspek Farmakologi Senyawa Asam Klorogenat pada Biji Kopi: Review*. Farmaka, 4(3): 1-19

Faseela, T.S., Malli, C.S., Balakrishna, A.K., Gomes, L., & Nayak, N., 2010, *Salmonella typhi Septic Arthritis Of The Hip—A Case Report*, *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 4, 2308-2310

Gary R, K. 2010. *Immune Defenses*. University of Texas Medical Branch at Galveston

García M, García C, Fernández-Ruiz J. 2009. Cannabinoids and Parkinson's disease. *CNS Neurol Disord Drug Target*. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>> Diakses Tanggal 10 Agustus 2019

Giannella RA, Formal SB, Dammin GJ. et al. 2009. *Pathogenesis of salmonellosis. Studies of fluid secretion, mucosal invasion, and morphologic reaction in the rabbit ileum*. J Clin Invest. 52:441

Greenberg CJ, Hilton DJ. 2001. *Negative regulation of cytokine signaling*. J Leukoc Biol. 70:348-56.

Gunawan, I.W.A. 2009. *Potensi Buah Pare (Momordica Charantia L) sebagai Antibakteri Salmonella typhimurium*. Denpasar: Progam Studi

Pendidikan Biologi Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan
Universitas Mahasaraswati.

Gutcher I, Becher B. 2007. *APC-derived cytokines and T cell polarization i autoimmune inflammation*. *J Clin Invest*. **117** (5): 1119–977.

Haveelar, Rajashekhar, P. J. Prakash, D.S Singh, and C. Saleem. 2001. Immunoprophylactic Activity of Immunol, a Polyherbal Formulation Against Dexametason Induced Immunosuppression in Rat. *Journal of Pharmacology and Toxicology*; 1-3.

Hardardotir, Ahmad, S. and Roula M. 2015. *Antimicrobial Activity of Polyphenols and Alkaloids in Middle Eastern Univ Plants*. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>> .Diakses 3 Agustus 2019.

Hall S, Desbrow B, AnoopkumarDukie S.2015. *A review of the bioactivity of coffee, caffeine and key coffee constituents on inflammatory responses linked to depression*. Food Research International.

Jawetz, Adelberg, and Melnick. 2008. *Medical Microbiology*. Edisi 23. Jakarta: Penerbit Buku kedokteran EGC.

Julius, W. 1990. *Salmonellosis: Microbiologic, Pathologic and Clinical Features*. Stratton Intercontinental Medical Book Corp, New York.

Juliantina, Farida. 2008. *Manfaat Sirih Merah (Piper crocatum) Sebagai Agen Anti Bakterial Terhadap Bakteri Gram Positif Dan Gram Negatif*. from: <http://journal.uui.ac.id/index.php/JKKI/article/viewFile/543/467>.

Kailova L, Mount Patrick SK, Arganbright KM, Halpern M, Kinouchi T, Dvorak B. 2010. *Bifidobacterium bifidum reduces apoptosis in the intestinal epithelium in necrotizing enterocolitis*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010.

Lewis J, Alberts B and Johnson A. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. Garland Science, New York

Ludwig, I. A, M. N. Clifford, M. E. J. Lean, H. Ashiharad, and A. Crozier. 2014.

Coffee: Biochemistry And Potential Impact On Health. Food and Function, 5(8): 1695-1717.

Karger, A. 2012. *Probiotic Mechanisms of Action*. Ann Nutr Metab ;61:160-174

Lou, Z.; Wang, H.; Zhu, S.; Ma, C.; Wang, Z. 2011. *Antibacterial activity and mechanism of action of chlorogenic acid*. J. Food Sci. 76, M398-M403.

Mastroeni P, 2003. *Development of acquired immunity to Salmonella*. Department of Clinical Veterinary Medicine, University of Cambridge. USA

Mahfudz, A. Deanny, L dan H. I. Wahyuni. 2017. *Penggunaan Probiotik, Acidifier, Antibiotik dan Kombinasinya terhadap Bobot Organ Limfoid dan Hati Ayam Broiler*. Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro. Semarang

McQuiston JR, Fields PI, Tauxe RV, Logsdon JM Jr. 2008. *Do Salmonella carry spare tyres Trends in Microbiology*. 16:142-148.

Murwanti, R., Meiyanto, E., Nurrochmad, A. and Kristina, SA.. 2004. *Efek ekstrak etanol rimpang temu putih (Curcuma zedoria Rosc.) terhadap pertumbuhan tumor paru fase post inisiasi pada mencit betina diinduksi Benzo(a)piren*. Majalah Farmasi Indonesia, 15(1):7-12

Mullen, B. Nemzer, B. Ou, A. Stalmach, J. Hunter, M. N. Clifford, and E. Combet. 2011. *The Antioxidant and Chlorogenic Acid Profiles of Whole Coffee Fruits Are Influenced by the Extraction Procedures*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 :3754-3762

Muhaimin, R. 2013. *Imunologi dan Alergi Hipersensitif*. Universitas Brawijaya Press. Malang

Nanak, A. 2011. *Sinbiotik Antara Prebiotik dan Probiotik*. Fakultas Gizi Poltekkes Denpasar. Bali

Prastowo, B., E. Karmawati, Rubijo, Siswanto, C. Indrawanto, dan S. J. Munarso. 2012. *Budidaya dan Pasca Panen Kopi*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan Kemnetrian Pertanian. Jakarta.

Priyambodo. 2003. *Pengendalian Hama Tikus Terpadu*. Penebar Swadaya. Jakarta.

Portillo, F.G. 2000. *Moleculer and Celluler Biology of Salmonella Pathogenesis*. Techonomic Publishing Company, Inc. Cancaster, Pennsylvania, USA

Ralph, A. 2016. *Salmonella in Medical Microbiology*. 4th edition. University of Texas Medical Branch at Galveston

Rahmawati, F. 2009. Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Kloroform Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella Asiatica* (L) Urb) Serta Identifikasi Senyawa Aktifnya. Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang. Semarang

Russel, Widdowson MA, Roy SL, Jones JL, Griffin PM, 2011. *Foodborne illness acquired in the United States- -major pathogens*. Emerg Infect Dis. (1):7-15.

Schroder K, Hertzog P, Ravasi T and Hume DA. 2004. *Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions*. Institute for Molecular Bioscience, University of Queensland. Australia.

Susan M, 2012. *Pemakaian Antibiotika Pada Ternak Dan Dampaknya Pada Kesehatan Manusia*. Balai Penelitian Veteriner. Bogor.

Suhendra, U. 2019. *Aktivitas Antibakteri Senyawa Kimia Bunga Cengkeh (*Syzygium Aromaticum*) Terhadap Bakteri *Streptococcus Mutans**. Program Studi Farmasi, FMIPA, Universitas Pakuan. Bogor

Schrezenmeir J, and Vrese M. 2001. Probiotics, prebiotics and symbiotic approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition* 73: 361–364.

Somala, L. 2006. *Sifat Reproduksi Mencit (Mus Musculus) Betina Yang Mendapat Pakan Tambahan Kemangi (Ocimum Basilicum) Kering*. Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor [skripsi].

Seok YW, Jeong D, Young-Su Y. 2013. IRAK1/4-targeted antiinflammatory action of caffeic acid. Hindawi Publishing Corporation

Sindhan, V. 2019. *the characteristic of Balb/C mice*. <<https://www.reseagate.net>>

Diakses tanggal 10 Agustus 2019

Stetinova V, Smetanova L, Kvetina J, Svoboda Z, Zidek Z, Tlaskalova-Hogenova H. 2010. *Caco-2 cell monolayer integrity and effect of probiotic Escherichia coli Nissle 1917 components*. Neuro Endocrinol Lett.

Suprpto, B. 2009. *Pola Resistensi Salmonella Enterica Serotipe Typhi Departemen Ilmu Kesehatan Anak RSHS, Tahun 2006–2010*. Bandung : Universitas Padjajaran. Bandung

Skrowron, A. Agnieszka Zgoła-Grześkowiak and Tomasz G. 2016. *Analytical methods applied for the characterization and the determination of bioactive compounds in coffee*. European Research and Technology

Santana-Gálvez J, Cisneros-Zevallos L And Jacobo-Velázquez Da 2017. Chlorogenic Acid: Recent Advances On Its Dual Role As A Food Additive And A Nutraceutical Against Metabolic Syndrome. <[Www.Pubmed.Gov.Co.Id](http://www.Pubmed.Gov.Co.Id)>

Sourav Sen,* Akshat Vyas,+ Sunil Sanghi,# K Shanmuganandan,* Rm Gupta, Vasquer. 2001. Correlation Of Cd4+ T Cell Count With Total Lymphocyte Count, Haemoglobin And Erythrocyte Sedimentation Rate Levels In Human Immunodeficiency Virus Type-1 Disease

Takaya A, Suzuki M, Matsui H, Tomoyasu T, Sashinami H, Nakane A, Yamamo

T. 2003. *Lon, a stress-induced ATP-dependent protease, is critically important for systemic Salmonella entericaserovar typhimurium infection of mice*. Infect Immun. 71:690–696.

Tati dan Supar, 2008. *Antigenisitas Dan Immunogenisitas Salmonella Enterica: Implikasinya Dalam Diagnosis Dan Pengembangan Vaksin Isolat Lokal Untuk Unggas*. Balai Besar Penelitian Veteriner. Bogor

Tau and Rothman. 2014. *Biologic Functions Of The IFN- γ Receptors*. US National library of medicine.

Teo JW. 2009. *Development of a novel multiplex PCR for the detection and differentiation of Salmonella enterica serovars Typhi and Paratyphi A*. Res Microbiol 161:243–248

Tenorio, J. A. B., D. S. do Monte, T. M.G. da Silvaa, T. G. da Silva, and C. S. Ramos. 2016. *Solanum Paniculatum Root Extract Reduces Diarrhea In Rats*. Revista Brasileira de Farmacognosia 26:375–378.

Todar, K. 2008. *Salmonella and Salmonellosis*. *todar's Online Textbook of Bacteriology*. University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology

Torres AV, Carson JJ, Mastroeni P, Ischiopoulus H, Fang FC. 2000. *Antimicrobial action of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxidase synthase in experimental salmonellosis. Effect on microbial killing by activated peritoneal macrophages in vitro*. J Exp Med, 192(2) : 227-36

Umemura, M., Fujii, S., Asano, I., Hoshino, H. And Iino, H. 2004. *Effect Of Coffee Mix Drink Containing Mannooligosaccharides From Coffee Mannan On Defecation And Fecal Microbiota In Healthy Volunteers*. Food Science And Technology Research 10: 195–198

Viesturs Kreicbergs, Fredijs D, Velga.M and Ingmars Cinkmanis. 2011. *Biologically Active Compounds In Roasted Coffee*. Latvia University of Agriculture, Department of Chemistry. Latvia

Wu, J., C Omene, Bosland, M and Frenkel, K. 2011. *Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE), Derived From A Honeybee Product Propolis, Exhibits A Diversity Of Anti-Tumor Effects In Pre-Clinical Models Of Human Breast Cancer*. US National Library Medicine. USA

Wisnu, B. 2005. *Terapi Sinbiotik Terhadap Diare Akut Dengan Intoleransi Laktosa Sekunder*. Universitas Diponegoro Semarang

Xu, Y. Chen J, Yu X and Tao W. 2010. *Protective effects of chlorogenic acid on acute hepatotoxicity induced by lipopolysaccharide in mice*. Laboratory for Molecular and Medical Biotechnology, Nanjing Normal University Nanjing, China.





LAMPIRAN



Lampiran 1. Liek etik



Lampiran 3. Perhitungan dosis

A. Perhitungan Konversi dosis dan Penetapan Dosis Perlakuan

Rentan dosis ekstrak kopi robusta pada mencit yaitu 50-250 mg/Kg BB secara peroral (Haque *et al.*, 2013).

- Batas bawah (50 mg/Kg BB mencit 20 gr)

B. Perhitungan Pemberian *Lactobacillus acidophilus* Sebagai Pelarut Kopi Robusta Lampung

C. Perhitungan Volume Pemberian Ekstrak Kopi Robusta Lampung dan *Lactobacillus acidophilus*.

P1

$$\text{III (9)} = 250 \text{ mg/kg} \times \frac{23.5 \text{ kg}}{1000} = 5.87 \text{ mg} \rightarrow \frac{5.87 \text{ mg}}{6.6} \times 0.5 = 0.44 \text{ cc}$$

$$\text{IV (2)} = 250 \text{ mg/kg} \times \frac{29.5 \text{ kg}}{1000} = 7.37 \text{ mg} \rightarrow \frac{7.37 \text{ mg}}{6.6} \times 0.5 = 0.55 \text{ cc}$$

$$\text{IV (3)} = 250 \text{ mg/kg} \times \frac{27.5 \text{ kg}}{1000} = 6.87 \text{ mg} \rightarrow \frac{6.87 \text{ mg}}{6.6} \times 0.5 = 0.52 \text{ cc}$$

$$\text{IV (4)} = 250 \text{ mg/kg} \times \frac{25.5 \text{ kg}}{1000} = 6.37 \text{ mg} \rightarrow \frac{6.37 \text{ mg}}{6.6} \times 0.5 = 0.48 \text{ cc}$$

$$\text{IV (5)} = 250 \text{ mg/kg} \times \frac{25.2 \text{ kg}}{1000} = 6.3 \text{ mg} \rightarrow \frac{6.3 \text{ mg}}{6.6} \times 0.5 = 0.47 \text{ cc}$$

$$\text{IV (6)} = 250 \text{ mg/kg} \times \frac{26.5 \text{ kg}}{1000} = 6.7 \text{ mg} \rightarrow \frac{6.7 \text{ mg}}{6.6} \times 0.5 = 0.5 \text{ cc}$$

$$\text{IV (7)} = 250 \text{ mg/kg} \times \frac{28 \text{ kg}}{1000} = 7 \text{ mg} \rightarrow \frac{7 \text{ mg}}{6.6} \times 0.5 = 0.53 \text{ cc}$$

Keterangan:

Rata-rata=

P2

$$\text{IV (12)} = 500 \text{ mg/kg} \times \frac{27 \text{ kg}}{1000} = 13.5 \text{ mg} \rightarrow \frac{13.5 \text{ mg}}{13} \times 0.5 = 0.51 \text{ cc}$$

$$\text{IV (13)} = 500 \text{ mg/kg} \times \frac{26 \text{ kg}}{1000} = 13 \text{ mg} \rightarrow \frac{13 \text{ mg}}{13} \times 0.5 = 0.5 \text{ cc}$$

$$\text{IV (14)} = 500 \text{ mg/kg} \times \frac{25.5 \text{ kg}}{1000} = 12.75 \text{ mg} \rightarrow \frac{12.75 \text{ mg}}{13} \times 0.5 = 0.49 \text{ cc}$$



$$\text{IV (15)} = 500 \text{ mg/kg} \times \frac{26.4 \text{ kg}}{1000} = 13.2 \text{ mg} \rightarrow \frac{13.2 \text{ mg}}{13} \times 0.5 = 0.5 \text{ cc}$$

$$\text{IV (16)} = 500 \text{ mg/kg} \times \frac{28.8 \text{ kg}}{1000} = 14.4 \text{ mg} \rightarrow \frac{14.4 \text{ mg}}{13} \times 0.5 = 0.55 \text{ cc}$$

$$\text{IV (17)} = 500 \text{ mg/kg} \times \frac{26.6 \text{ kg}}{1000} = 13.3 \text{ mg} \rightarrow \frac{13.3 \text{ mg}}{13} \times 0.5 = 0.51 \text{ cc}$$

$$\text{IV (18)} = 500 \text{ mg/kg} \times \frac{27 \text{ kg}}{1000} = 13.5 \text{ mg} \rightarrow \frac{13.5 \text{ mg}}{13} \times 0.5 = 0.51 \text{ cc}$$

Keterangan :
Rata-rata
P3

$$\text{IV (8)} = 750 \text{ mg/kg} \times \frac{28.6 \text{ kg}}{1000} = 21.45 \text{ mg} \rightarrow \frac{21.45 \text{ mg}}{21} \times 0.5 = 0.51 \text{ cc}$$

$$\text{IV (9)} = 750 \text{ mg/kg} \times \frac{28 \text{ kg}}{1000} = 21 \text{ mg} \rightarrow \frac{21 \text{ mg}}{21} \times 0.5 = 0.5 \text{ cc}$$

$$\text{IV (19)} = 750 \text{ mg/kg} \times \frac{27 \text{ kg}}{1000} = 20.25 \text{ mg} \rightarrow \frac{20.25 \text{ mg}}{21} \times 0.5 = 0.48 \text{ cc}$$

$$\text{IV (20)} = 750 \text{ mg/kg} \times \frac{27.8 \text{ kg}}{1000} = 20.85 \text{ mg} \rightarrow \frac{20.85 \text{ mg}}{21} \times 0.5 = 0.49 \text{ cc}$$

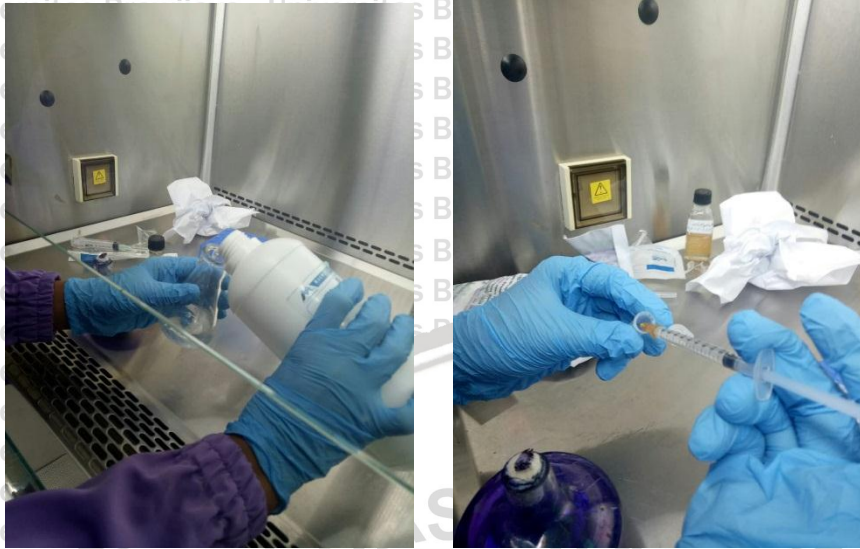
$$\text{IV (21)} = 750 \text{ mg/kg} \times \frac{26.8 \text{ kg}}{1000} = 20.1 \text{ mg} \rightarrow \frac{20.1 \text{ mg}}{21} \times 0.5 = 0.47 \text{ cc}$$

$$\text{IV (22)} = 750 \text{ mg/kg} \times \frac{28.5 \text{ kg}}{1000} = 21.37 \text{ mg} \rightarrow \frac{21.37 \text{ mg}}{21} \times 0.5 = 0.5 \text{ cc}$$

$$\text{IV (23)} = 750 \text{ mg/kg} \times \frac{28.7 \text{ kg}}{1000} = 21.52 \text{ mg} \rightarrow \frac{21.52 \text{ mg}}{21} \times 0.5 = 0.51 \text{ cc}$$



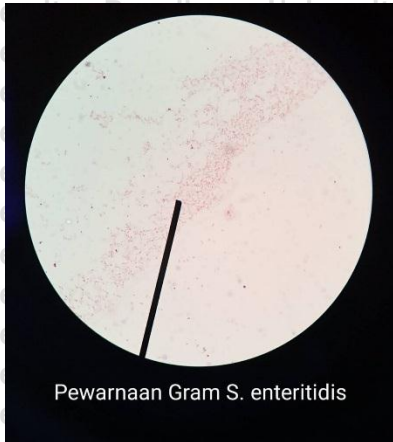
Lampiran 4. Pembuatan Suspensi Sinbiotik



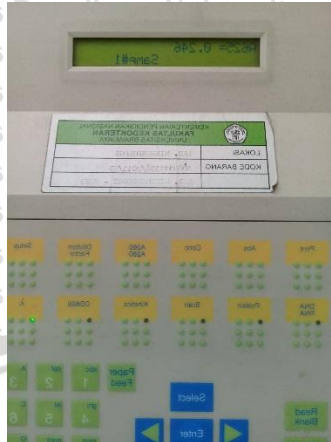
Lampiran 5. Pembuatan Ekstraksi Kopi robusta



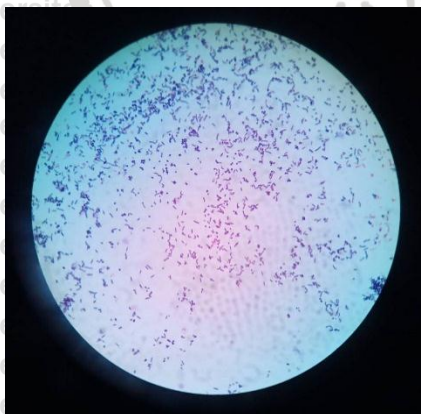
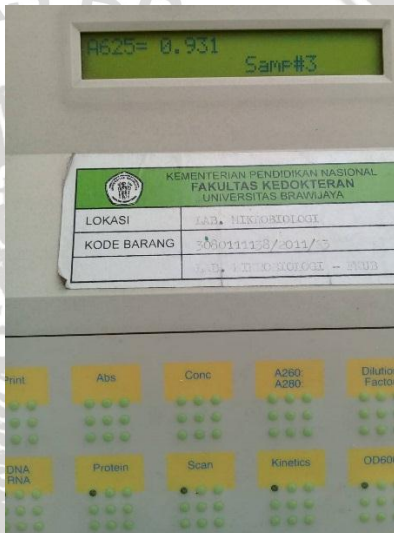
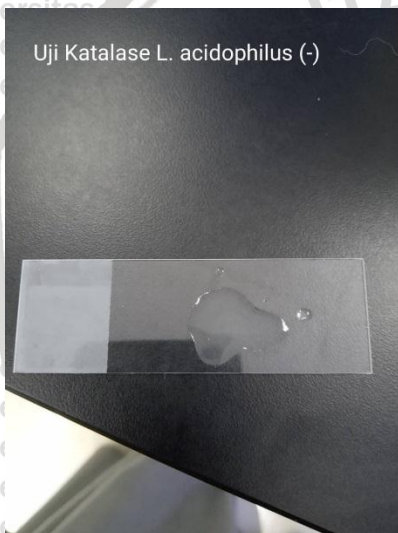
Lampiran 6. Identifikasi Bakteri *Salmonella enterica*



Pewarnaan Gram *S. enteritidis*



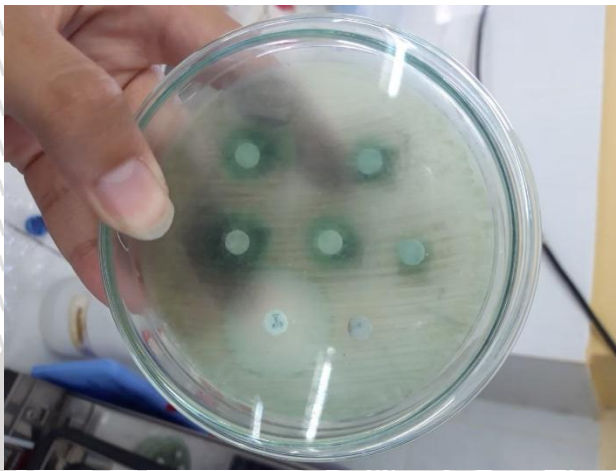
Lampiran 7. Identifikasi Bakteri *Lactobacillus acidophilus*



Lampiran 8. Uji in vitro pengaruh Kopi robusta terhadap Lactobacillus acidophilus

2. Lactobacillus Acidophilus

Media	Ulangan ke	(+) (Genta)	Ekstrak 10%	Ekstrak 20%	Ekstrak 30%	Ekstrak 40%	Ekstrak 50%
MHA	1	TIDAK TUMBUH					
	2						
MRSA	1	0,8 cm	-	-	-	-	-
	2	0,8 cm	-	-	-	-	-



Lampiran 9. Proses Flowcytometri



Lampiran 10. Uji TFC dan LC-MS Kopi robusta

Rekapitulasi Perhitungan TFC

NO	NAMA SAMPEL	Hasil
1	Total Flavonoid Content (µg/g)	11,815.33
2	Alkaloid (Kualitatif)	Positive
3	Tanin (Kualitatif)	Positive
3	Saponin (Kualitatif)	Positive

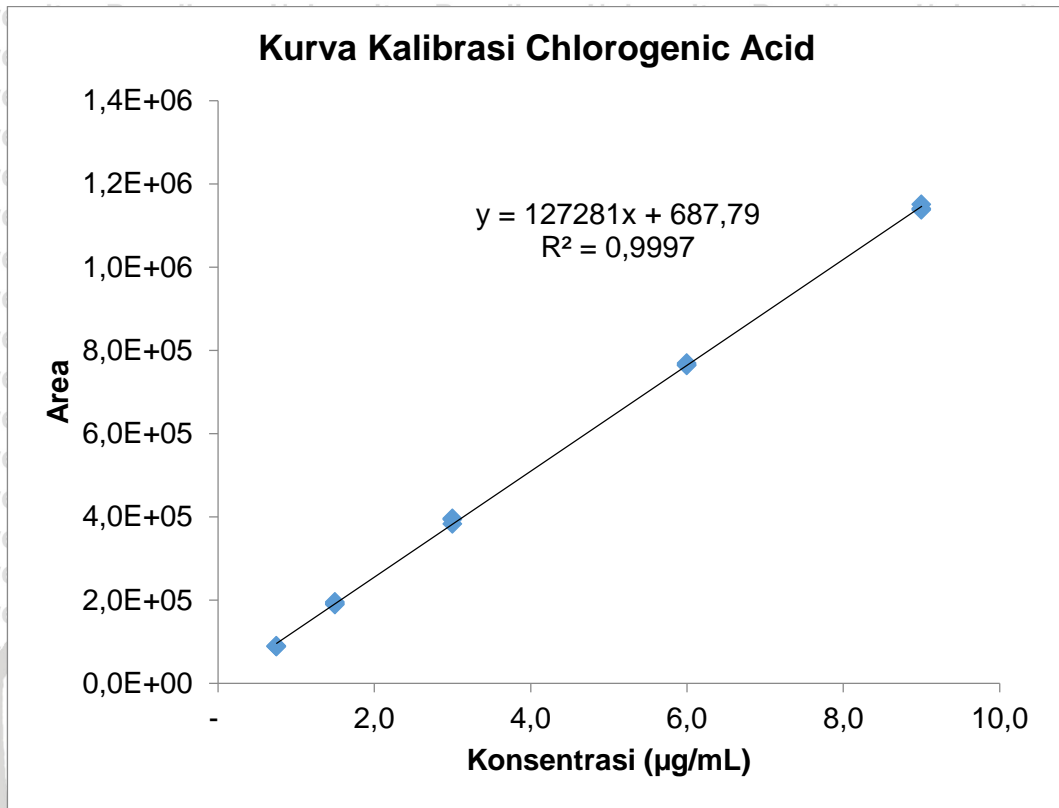
REKAPITULASI PERHITUNGAN STANDARD CHLOROGENIC ACID

No	Nama STANDARD	Kons. (µg/mL)	(Area)	KONS. THT (µg/mL)	%Ratio
1	nd_CGA_Std_41	0.75	90,094.32	0.71	95.10
	nd_CGA_Std_42	0.75	88,287.94	0.70	93.21
	nd_CGA_Std_43	0.75	88,200.36	0.70	93.11
2	nd_CGA_Std_51	1.50	195,247.80	1.54	102.63
	nd_CGA_Std_52	1.50	192,531.38	1.52	101.20
	nd_CGA_Std_53	1.50	189,199.46	1.49	99.46
3	nd_CGA_Std_61	3.00	393,625.59	3.10	103.27
	nd_CGA_Std_62	3.00	383,088.47	3.02	100.51
	nd_CGA_Std_63	3.00	395,696.87	3.11	103.81
4	nd_CGA_Std_71	6.00	763,591.88	6.00	100.08
	nd_CGA_Std_72	6.00	769,446.06	6.05	100.84
	nd_CGA_Std_73	6.00	765,172.72	6.02	100.28
5	nd_CGA_Std_81	9.00	1,137,225.89	8.94	99.34
	nd_CGA_Std_82	9.00	1,150,663.98	9.05	100.51
	nd_CGA_Std_83	9.00	1,140,542.25	8.97	99.62





Kurva Kalibrasi Chlorogenic Acid



LAMPIRAN 11. HASIL CD4

Case Processing Summary

	kelompok	Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
cd4	K-	4	100,0%	0	0,0%	4	100,0%
	K+	4	100,0%	0	0,0%	4	100,0%
	KL	4	100,0%	0	0,0%	4	100,0%
	P1	4	100,0%	0	0,0%	4	100,0%
	P2	4	100,0%	0	0,0%	4	100,0%
	P3	4	100,0%	0	0,0%	4	100,0%

Tests of Normality

	kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
cd4	K-	,279	4	.	,860	4	,259
	K+	,298	4	.	,848	4	,220
	KL	,279	4	.	,938	4	,642
	P1	,213	4	.	,979	4	,898
	P2	,311	4	.	,915	4	,511
	P3	,299	4	.	,917	4	,523

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

cd4			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5,818	5	18	,002



ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	218,972	5	43,794	5,322	,004
Within Groups	148,133	18	8,230		
Total	367,106	23			

cd4

Tukey HSD^a

kelompok	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
P3	4	14,0475	
P2	4	14,2450	
K+	4	15,5550	
KL	4	17,1825	17,1825
P1	4	20,4000	20,4000
K-	4		22,0100
Sig.		,055	,215

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,000.



LAMPIRAN 13. CD4 HASILKAN IFN- γ

Case Processing Summary

	KELOMPOK	Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
CD4IFN	K-	4	100,0%	0	0,0%	4	100,0%
	K+	4	100,0%	0	0,0%	4	100,0%
	KL	4	100,0%	0	0,0%	4	100,0%
	P1	4	100,0%	0	0,0%	4	100,0%
	P2	4	100,0%	0	0,0%	4	100,0%
	P3	4	100,0%	0	0,0%	4	100,0%

Tests of Normality

	KELOMPOK	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
CD4IFN	K-	,394	4	.	,773	4	,062
	K+	,365	4	.	,837	4	,188
	KL	,306	4	.	,779	4	,070
	P1	,258	4	.	,917	4	,519
	P2	,408	4	.	,700	4	,012
	P3	,257	4	.	,945	4	,682

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

CD4IFN			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,308	5	18	,087



ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3,602	5	,720	7,440	,001
Within Groups	1,743	18	,097		
Total	5,345	23			

CD4IFN

Tukey HSD^a

KELOMPOK	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
P1	4	,2075	
K-	4	,3100	
KL	4	,7600	,7600
P2	4		1,0975
K+	4		1,0975
P3	4		1,1675
Sig.		,173	,460

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,000.

Lampiran 13. Hasil Uji korelasi IFN-γ

Correlations

		KELOMPOK	IFN
KELOMPOK	Pearson Correlation	1	,902**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	12	12
IFN	Pearson Correlation	,902**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	12	12

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

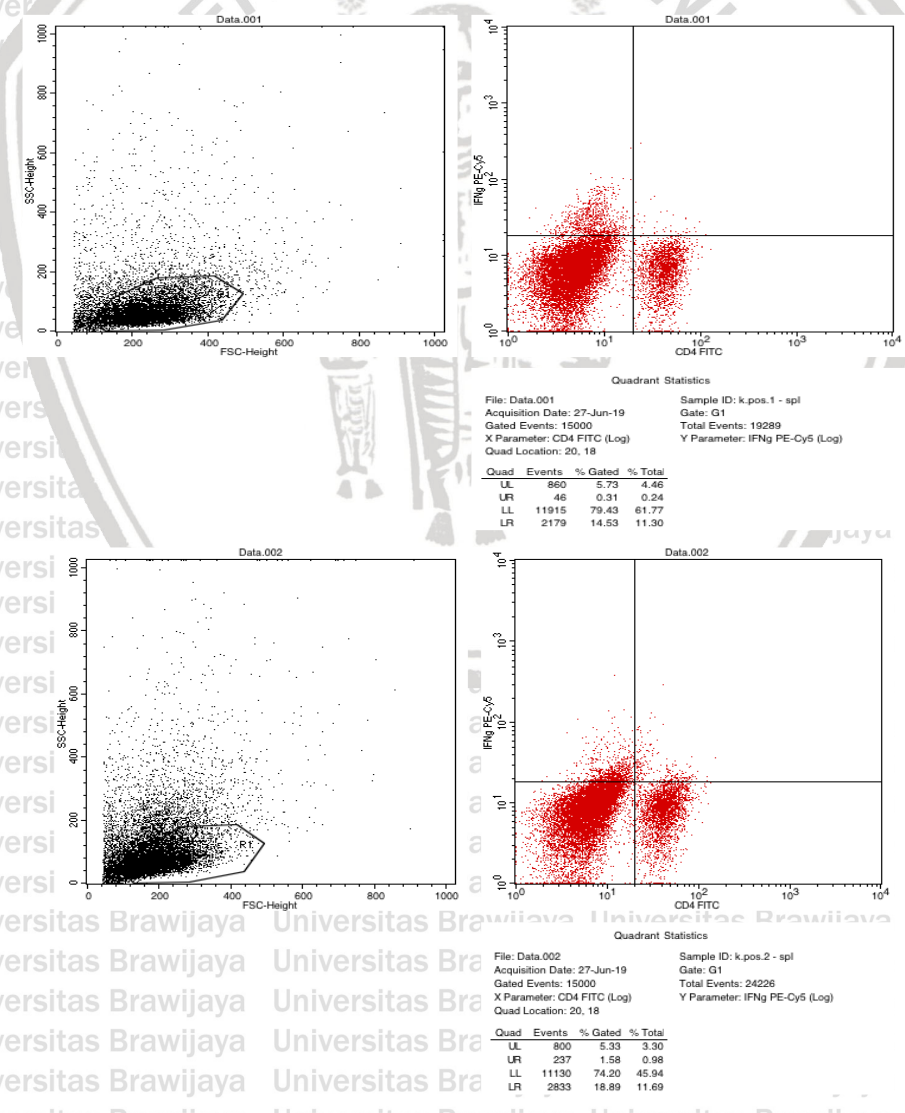


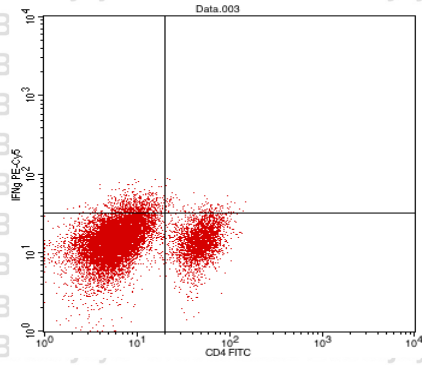
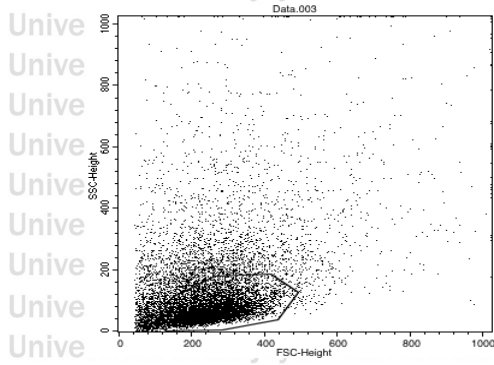
Lampiran 14. Hasil Uji korelasi CD4- IFN- γ

Correlations			
		kelompok	IFNCD4
kelompok	Pearson Correlation	1	.731**
	Sig. (2-tailed)		.007
	N	12	12
IFNCD4	Pearson Correlation	.731**	1
	Sig. (2-tailed)	.007	
	N	12	12

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Lampiran 15. Hasil Flowcytometri (K+)

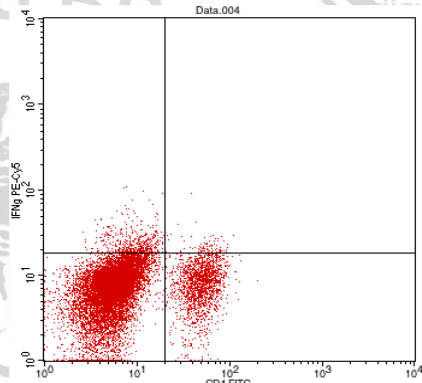
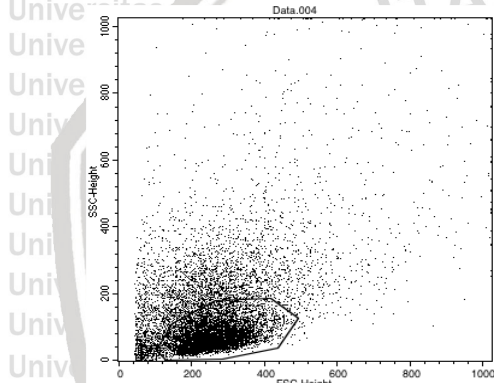




Quadrant Statistics

File: Data.003 Sample ID: k.pos.3 - spl
 Acquisition Date: 27-Jun-19 Gate: G1
 Gated Events: 15000 Total Events: 22930
 X Parameter: CD4 FITC (Log) Y Parameter: IFNg PE-Cy5 (Log)
 Quad Location: 20, 32

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	659	4.39	2.87
UR	122	0.81	0.53
LL	11393	75.95	49.69
LR	2826	18.84	12.32

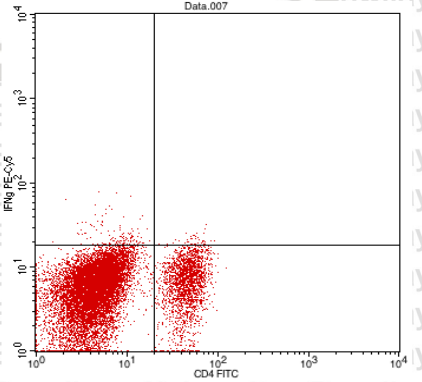
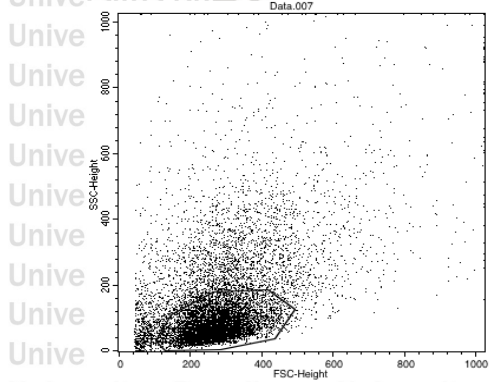


Quadrant Statistics

File: Data.004 Sample ID: k.pos.4 - spl
 Acquisition Date: 27-Jun-19 Gate: G1
 Gated Events: 15000 Total Events: 22784
 X Parameter: CD4 FITC (Log) Y Parameter: IFNg PE-Cy5 (Log)
 Quad Location: 20, 18

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	507	3.38	2.23
UR	82	0.55	0.36
LL	12430	82.87	54.56
LR	1981	13.21	8.69

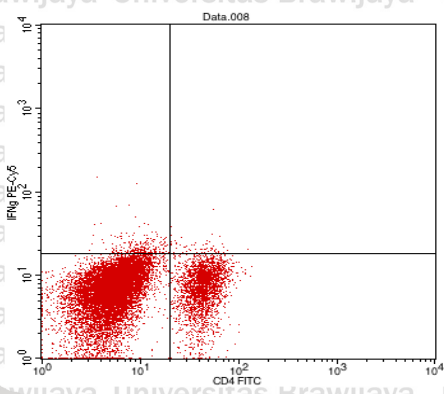
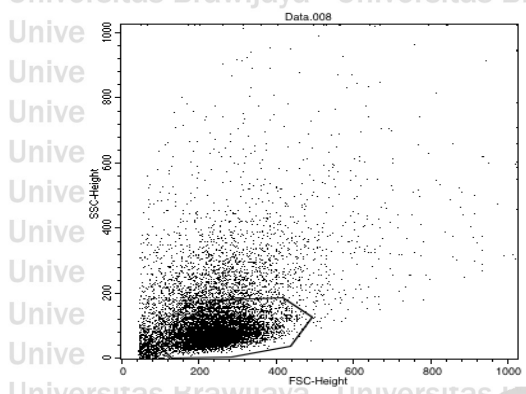
(K-)



Quadrant Statistics

File: Data.007 Sample ID: k.neg.2 - spl
 Acquisition Date: 27-Jun-19 Gate: G1
 Gated Events: 15000 Total Events: 22367
 X Parameter: CD4 FITC (Log) Y Parameter: IFNg PE-Cy5 (Log)
 Quad Location: 20, 18

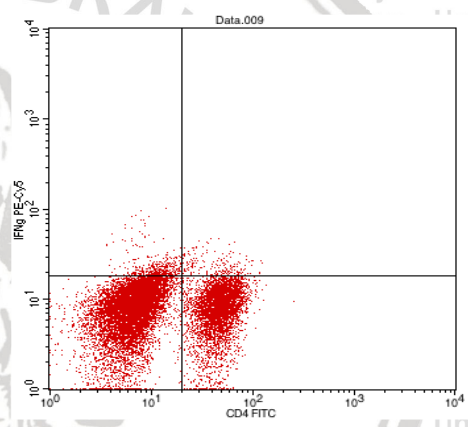
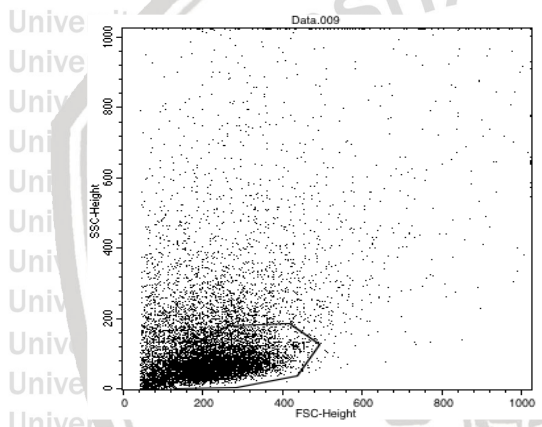
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	128	0.85	0.57
UR	42	0.28	0.19
LL	12553	83.69	56.12
LR	2277	15.18	10.18



File: Data.008
 Acquisition Date: 27-Jun-19
 Gated Events: 15000
 X Parameter: CD4 FITC (Log)
 Quad Location: 20, 18

Sample ID: k.neg.3 - spl
 Gate: G1
 Total Events: 22092
 Y Parameter: IFNg PE-Cy5 (Log)

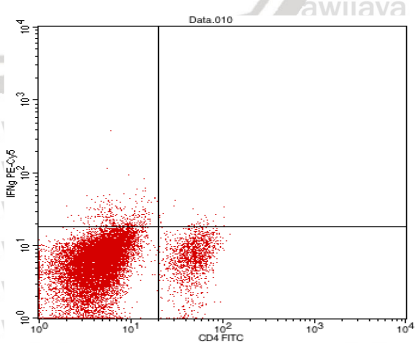
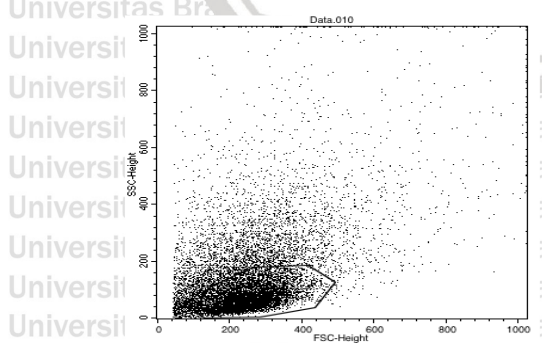
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	246	1.64	1.11
UR	65	0.43	0.29
LL	11929	79.53	54.00
LR	2760	18.40	12.49



File: Data.009
 Acquisition Date: 27-Jun-19
 Gated Events: 15000
 X Parameter: CD4 FITC (Log)
 Quad Location: 20, 18

Sample ID: k.neg.4 - spl
 Gate: G1
 Total Events: 23824
 Y Parameter: IFNg PE-Cy5 (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	406	2.71	1.70
UR	196	1.31	0.82
LL	9855	65.70	41.37
LR	4543	30.29	19.07



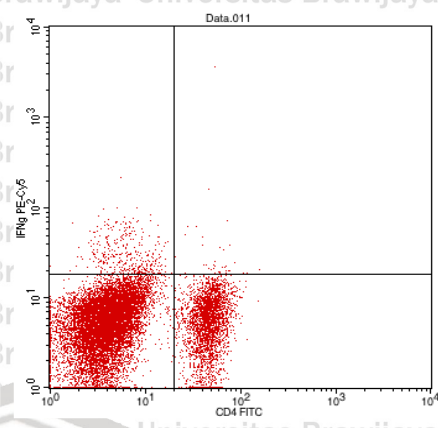
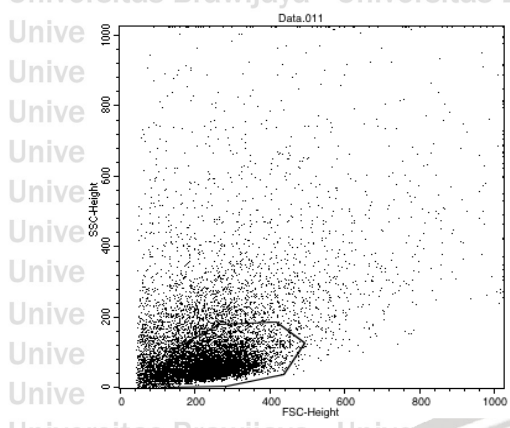
File: Data.010
 Acquisition Date: 27-Jun-19
 Gated Events: 15000
 X Parameter: CD4 FITC (Log)
 Quad Location: 20, 18

Sample ID: k.neg.5 - spl
 Gate: G1
 Total Events: 24467
 Y Parameter: IFNg PE-Cy5 (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	315	2.10	1.29
UR	38	0.25	0.16
LL	13199	87.99	53.95
LR	1448	9.65	5.92



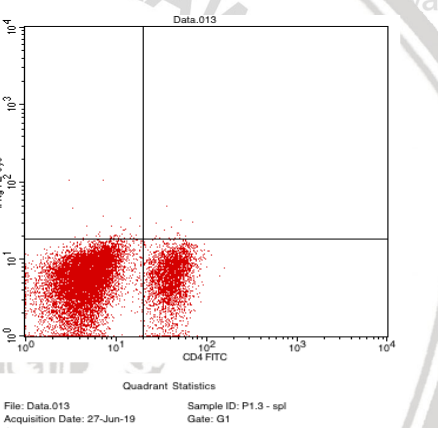
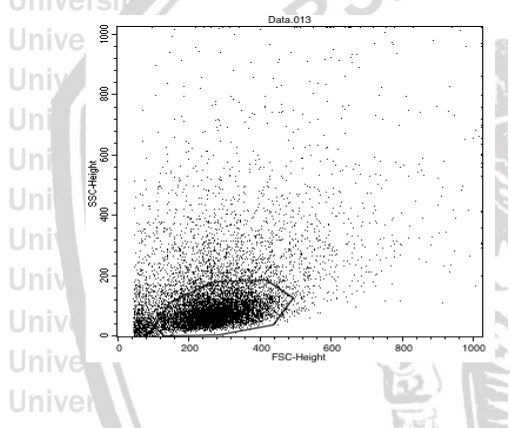
Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya



(P1)

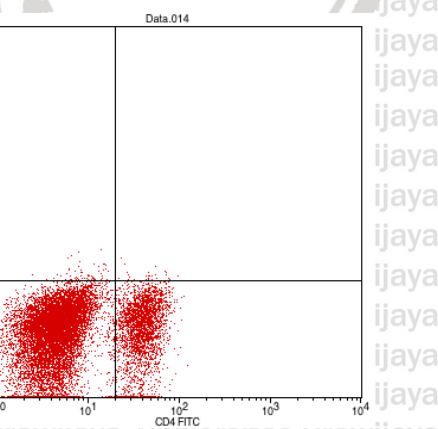
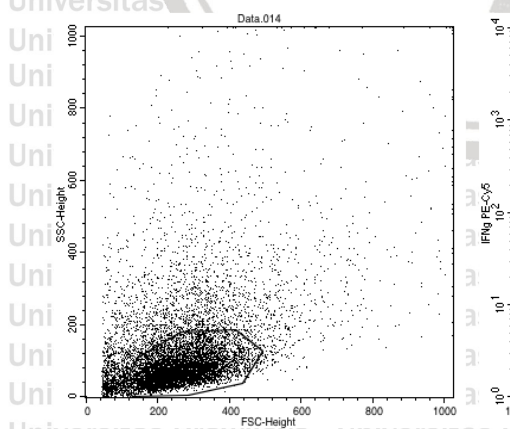
File: Data.011
Acquisition Date: 27-Jun-19
Gated Events: 15000
X Parameter: CD4 FITC (Log)
Quad Location: 20, 18
Sample ID: P1.1 - spl
Gate: G1
Total Events: 22735
Y Parameter: IFNg PE-Cy5 (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	358	2.39	1.57
UR	36	0.24	0.16
LL	11689	77.93	51.41
LR	2917	19.45	12.83



File: Data.013
Acquisition Date: 27-Jun-19
Gated Events: 15000
X Parameter: CD4 FITC (Log)
Quad Location: 20, 18
Sample ID: P1.3 - spl
Gate: G1
Total Events: 21518
Y Parameter: IFNg PE-Cy5 (Log)

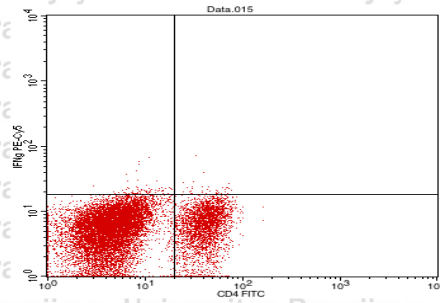
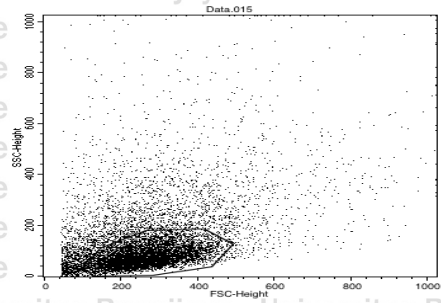
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	41	0.27	0.19
UR	22	0.15	0.10
LL	11740	78.27	54.56
LR	3197	21.31	14.86



File: Data.014
Acquisition Date: 27-Jun-19
Gated Events: 15000
X Parameter: CD4 FITC (Log)
Quad Location: 20, 18
Sample ID: P1.4 - spl
Gate: G1
Total Events: 21719
Y Parameter: IFNg PE-Cy5 (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	62	0.41	0.29
UR	29	0.19	0.13
LL	11860	79.07	54.61
LR	3049	20.33	14.04

Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

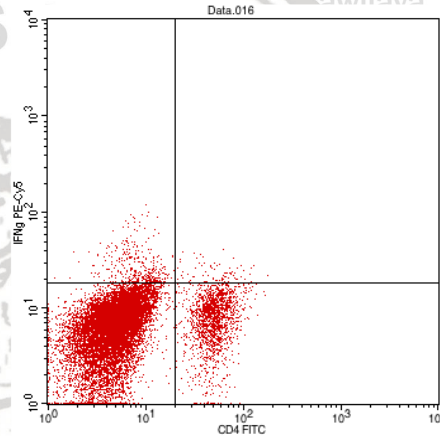
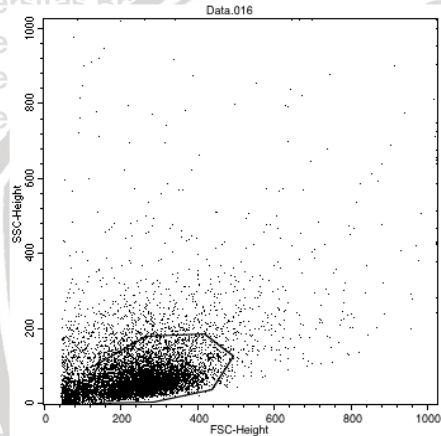


File: Data.015
 Acquisition Date: 27-Jun-19
 Gated Events: 15000
 X Parameter: CD4 FITC (Log)
 Y Parameter: IFNg PE-Cy5 (Log)
 Quad Location: 20, 18

Sample ID: P1.5 - spl
 Gate: G1
 Total Events: 22147

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	73	0.49	0.33
UR	38	0.25	0.17
LL	11812	78.75	53.33
LR	3077	20.51	13.89

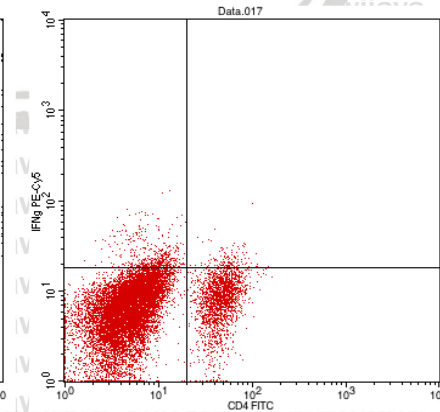
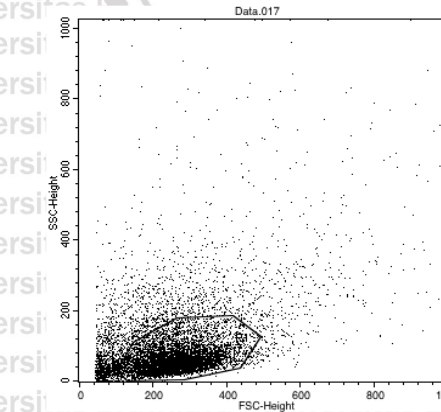
(P2)



File: Data.016
 Acquisition Date: 27-Jun-19
 Gated Events: 15000
 X Parameter: CD4 FITC (Log)
 Y Parameter: IFNg PE-Cy5 (Log)
 Quad Location: 20, 18

Sample ID: P2.1 - spl
 Gate: G1
 Total Events: 19433

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	373	2.49	1.92
UR	87	0.58	0.45
LL	12867	85.78	66.21
LR	1673	11.15	8.61

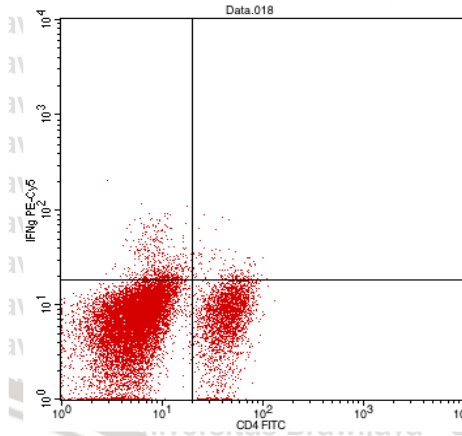
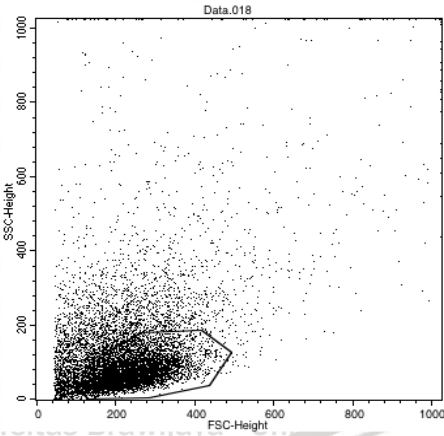


File: Data.017
 Acquisition Date: 27-Jun-19
 Gated Events: 15000
 X Parameter: CD4 FITC (Log)
 Y Parameter: IFNg PE-Cy5 (Log)
 Quad Location: 20, 18

Sample ID: P2.2 - spl
 Gate: G1
 Total Events: 20201

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	480	3.20	2.38
UR	132	0.88	0.65
LL	12305	82.03	60.91
LR	2083	13.89	10.31

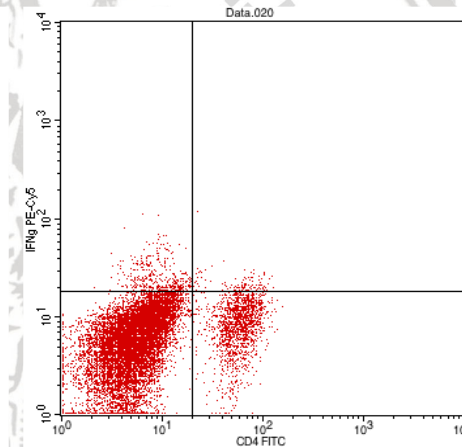
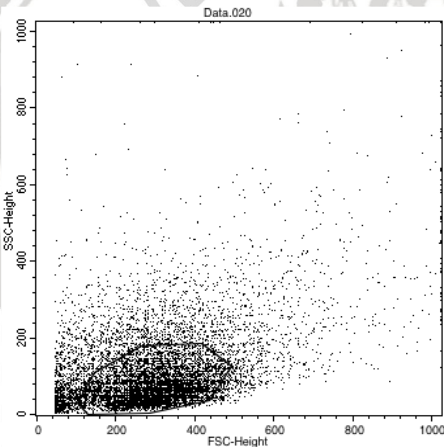




File: Data.018
Acquisition Date: 27-Jun-19
Gated Events: 15000
X Parameter: CD4 FITC (Log)
Quad Location: 20, 18

Sample ID: P2.3 - spl
Gate: G1
Total Events: 22403
Y Parameter: IFNg PE-Cy5 (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	511	3.41	2.28
UR	138	0.92	0.62
LL	11676	77.84	52.12
LR	2675	17.83	11.94



File: Data.020
Acquisition Date: 27-Jun-19
Gated Events: 15000
X Parameter: CD4 FITC (Log)
Quad Location: 20, 18

Sample ID: P2.5 - spl
Gate: G1
Total Events: 22275
Y Parameter: IFNg PE-Cy5 (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	395	2.63	1.77
UR	126	0.84	0.57
LL	12833	85.55	57.61
LR	1646	10.97	7.39