

**PENGARUH PREVENTIF KOMBINASI EKSTRAK KOPI
ROBUSTA LAMPUNG DAN *Lactobacillus acidophilus*
PADA MENCIT BALB-C YANG DIINDUKSI
Salmonella enterica TERHADAP
GAMBARAN HISTOPATOLOGI
SEKUM DAN JUMLAH
SOD HEPAR**

SKRIPSI

Oleh :

**DHYAS MEILANI
165130107111046**



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

2020

**PENGARUH PREVENTIF KOMBINASI EKSTRAK KOPI
ROBUSTA LAMPUNG DAN *Lactobacillus acidophilus*
PADA MENCIT BALB-C YANG DIINDUKSI
Salmonella enterica TERHADAP
GAMBARAN HISTOPATOLOGI
SEKUM DAN JUMLAH
SOD HEPAR**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :
DHYAS MEILANI
165130107111046



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

2020

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Pengaruh Preventif Kombinasi Ekstrak Kopi Robusta Lampung dan
Lactobacillus acidophilus Pada Mencit Balb-C yang diinduksi
Salmonella enterica terhadap Gambaran Histopatologi
Sekum dan Jumlah SOD Hepar**

Oleh :
DHYAS MEILANI
165130107111046

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 9 Januari 2020
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

drh. Indah Amalia Amri, M. Si.
NIP. 19870925 201932 011

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

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

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Dhyas Meilani

NIM : 165130107111046

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

Pengaruh Preventif Kombinasi Ekstrak Kopi Robusta Lampung dan *Lactobacillus acidophilus* Pada Mencit Balb-C yang diinduksi *Salmonella enterica* terhadap Gambaran Histopatologi Sekum dan Jumlah SOD Hepar

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 tercantum di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam 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, 9 Januari 2020

Yang menyatakan,

Dhyas Meilani

NIM. 165130107111046

Pengaruh Preventif Kombinasi Ekstrak Kopi Robusta Lampung dan *Lactobacillus acidophilus* Pada Mencit Balb-C yang diinduksi *Salmonella enterica* terhadap Gambaran Histopatologi Sekum dan Jumlah SOD Hepar

ABSTRAK

Salmonella enterica adalah bakteri gram negatif yang dapat menyebabkan penyakit Salmonellosis. Salmonellosis termasuk ke dalam penyakit *foodborn disease* yang dapat menyerang baik hewan atau manusia. Infeksi *S. enterica* dapat menimbulkan gastroenteritis. Proses fagositosis bakteri akan memicu timbulnya *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang dapat merusak mukosa intestine dan menurunkan kadar Superoksida Dismutase (SOD). Ekstrak Kopi Robusta Lampung mempunyai kandungan kafein, asam klorogenat, tannin, dan flavonoid yang berfungsi sebagai anti bakteri dan antioksidan, sedangkan *Lactobacillus acidophilus* bertindak sebagai probiotik dan imunomodulator. Penelitian ini bertujuan untuk melihat efek preventif dari kombinasi Ekstrak Kopi Robusta Lampung dan *L. acidophilus* pada mencit *Balb-c* yang diinduksi *S. enterica* terhadap gambaran histopatologi sekum dan jumlah SOD hepar. Penelitian ini bersifat eksperimental dengan hewan coba mencit *Balb-c* (*Mus musculus*) jantan umur 8-10 minggu dengan berat 20-25 gram. Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap terdiri dari 5 kelompok percobaan, yaitu : K- (sehat), K+ (diinduksi *S. enterica*), K Lac (diberi preventif *L. acidophilus* dan diinduksi *S. enterica*), P1, P2, dan P3 diberi preventif ekstrak Kopi Robusta Lampung dengan konsentrasi 250 mg/kg BB, 500 mg/kg BB, dan 750 mg/kg BB serta *L. acidophilus* dan diinduksi *S. enterica*. Histopatologi sekum dibuat dengan pewarnaan Hematoxylin Eosin kemudian dianalisa secara deskriptif dan dihitung jumlah sel goblet dengan metode skoring. Jumlah SOD hepar diukur dengan *flowcytometer* kemudian dianalisa menggunakan *One Way ANOVA* dengan tingkat kepercayaan $\alpha = 0.05$ dan dilanjutkan uji *Tukey*. Hasil penelitian menunjukkan pemberian preventif ekstrak Kopi Robusta Lampung 250 mg/kg BB dan *L. acidophilus* adalah dosis terbaik yang mampu mencegah kerusakan sekum, mencegah hipoplasia sel goblet, dan mampu meningkatkan produksi jumlah SOD hepar. Disimpulkan pemberian kombinasi ekstrak Kopi Robusta Lampung dan *L. acidophilus* dapat digunakan sebagai preventif terhadap penyakit salmonellosis.

Kata Kunci : Kopi Robusta Lampung, *Lactobacillus acidophilus*, *Salmonella enterica*, sekum, SOD.

**Effect Preventive of Combination of Lampung Robusta Coffee Extract
and *Lactobacillus acidophilus* in Balb-C Mice induced by *Salmonella*
enterica against the histopathological features of caecum
and levels of liver's SOD**

ABSTRACT

Salmonella enterica is a gram negative bacteri that can cause Salmonellosis. Salmonellosis is a foodborne disease which can cause disease either animal or human. *S. enterica* infection can cause gastroenteritis. The process of bacterial phagocytosis will trigger the onset of *Reactive Oxygen Species* (ROS) that can destroy inestine's mucosa and decrease Superoxyde dismutase's (SOD) levels. Ecstract Lampung Robusta Coffea contain caffeine, chlorogenat acid, tannin, and flavonoid which has function as antibacterial and antioxidant, meanwhile *Lactobacillus acidophilus* act as probiotic and imunomodulator. This study aims to know the preventive effect of the combination of extract Lampung Robusta Coffea and *L. acidophilus* to histopathology of caecum and the levels of SOD in liver. It is an experimental research that use male Balb-c mice that aged 8-10 weeks and weight 20-25 gram. The study used a Completely Randomized Design consisting of 5 experimental groups, namely: K- (healthy), K + (induced *S. enterica*), K Lac (given preventive *L. acidophilus* and induced *S. enterica*), P1, P2, and P3 were given preventive extract Lampung Robusta Coffee with concentration 250 mg/kg BW, 500 mg/kg BW, and 750 mg/kg BW and *L. acidophilus* and induced *S. enterica*. Histopathology of the cecum was made with Hematoxylin Eosin stain than analyzed descriptively and counting goblet cells with skoring method. Liver SOD levels were measured with a flowcytometer and then analyzed using One Way ANOVA with a confidence level $\alpha = 0.05$ and continued by the Tukey test. The result showed administration of Lampung Robusta Coffee extract 250 mg/ kg BW and *L. acidophilus* as preventive was the best dose that was able to prevent caecum damage, prevent goblet cells hypoplasia and was able to increase liver's SOD production. As a conclusion combination of Lampung Robusta Coffee extract and *L. acidophilus* can be used as a prevention against salmonellosis.

Kata Kunci : Robusta Lampung Coffea, *Lactobacillus acidophilus*, *Salmonella enterica*, caecum, SOD.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Tuhan Yang Maha Esa atas segala berkat yang telah dicurahkan-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul

“Pengaruh Preventif Kombinasi Ekstrak Kopi Robusta Lampung dan *Lactobacillus acidophilus* Pada Mencit *Balb-C* yang diinduksi *Salmonella enterica* terhadap Gambaran Histopatologi Sekum dan Jumlah SOD Hepar”

dengan baik. Selama proses pengerjaan skripsi ini penulis banyak mendapatkan bantuan dari orang di sekitar penulis. Oleh karena itu penulis menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya atas kepemimpinan untuk kemajuan bersama.
2. Penelitian payung drh. Dahliatul Qosimah, M. Kes, drh. Indah Amalia Amri, M. Si, dan drh. Dodik Prasetyo, M. Vet yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk bergabung dalam penelitian.
3. drh. Indah Amalia Amri, M. Si selaku dosen pembimbing yang telah meluangkan waktunya, memberi arahan, dan nasehat, dalam pengerjaan dan penyusunan skripsi ini.
4. drh. Dahliatul Qosimah, M. Kes selaku dosen penguji I dan drh. Dodik Prasetyo, M. Vet selaku dosen penguji II yang telah memberikan kritik dan saran saat penulisan skripsi.
5. Keluarga penulis atas segala kasih sayang, pengorbanan serta doa yang telah diberikan.
6. Teman-teman kelas 2016 D yang telah mengisi hari-hari penulis di perkuliahan dan memberikan dukungan saat penulisan skripsi ini.
7. Teman-teman asisten praktikum Lab Mikrobiologi dan Imunologi yang sudah memberikan dukungan secara moral.
8. Teman-teman penelitian Nuha, Dimas, Nanda, Kiki, dan Mas Irul yang telah menemani, membantu, dan menyukseskan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih belum sempurna dan banyak kekurangan. Oleh karena itu diharapkan kritik dan saran yang dapat membangun. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat dan menambah pengetahuan bagi kita semua.

Malang, 9 Januari 2020

Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI	iii
LEMBAR PERNYATAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Batasan Masalah	4
1.4 Tujuan Penelitian	6
1.5 Manfaat Penelitian	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Kopi Robusta	7
2.2 Lactobacillus acidophilus	9
2.3 Probiotik	10
2.4 Mencit Balb-c	11
2.5 Salmonella sp.	12
2.5.1 Morfologi dan Klasifikasi	12
2.5.2 Patogenesitas	13
2.5.3 Salmonellosis	14
2.5.4 Gejala Klinis	14
2.5.5 Pengobatan	15
2.6 Superoksida Dismutase (SOD)	15
2.7 Sekum	16
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	17
3.1 Kerangka Konsep	17
3.3 Hipotesis Penelitian	20
BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN	21
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	21
4.2 Alat dan Bahan	21
4.2.1 Alat	21
4.2.1 Bahan	22
4.3 Variabel Penelitian	22
4.4 Rencana Penelitian	22
4.5 Tahapan Penelitian	24
4.6 Prosedur Kerja	25

4.6.1 Pembuatan Ekstrak Kopi Robusta Lampung.....	25
4.6.2 Uji Fitokimia Kopi Robusta.....	25
4.6.3 Persiapan Hewan Coba.....	26
4.6.4 Persiapan Bakteri <i>Lactobacillus acidophilus</i>	27
4.6.5 Pemberian kombinasi pada mencit <i>Balb C</i>	28
4.6.6 Pemberian <i>Salmonella enterica</i> pada mencit <i>Balb C</i>	29
4.6.7 Nekropsi dan preparasi organ sekum dan hepar.....	29
4.6.8 Analisis SOD dengan flowcytometry organ hepar.....	30
4.6.7 Pembuatan Histopat Organ Sekum.....	30
4.6.9 Pengamatan Histopatologi Organ Sekum.....	31
4.7 Analisa Data.....	31
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN.....	33
5.1 Uji Sensitifitas <i>Lactobacillus acidophilus</i> terhadap Ekstrak Kopi Robusta Lampung.....	33
5.2 Pengaruh Pemberian Kombinasi Ekstrak Kopi Robusta Lampung dan Bakteri <i>Lactobacillus acidophilus</i> terhadap Kondisi Feses Mencit <i>Balb-C</i>	34
5.3 Pengaruh Pemberian Kombinasi Ekstrak Kopi Robusta Lampung dan Bakteri <i>Lactobacillus acidophilus</i> terhadap Gambaran Histopatologi Sekum.....	51
5.4 Pengaruh Pemberian Kombinasi Ekstrak Kopi Robusta Lampung dan Bakteri <i>Lactobacillus acidophilus</i> terhadap Jumlah Sel Goblet di Sekum.....	47
5.5 Pengaruh Pemberian Kombinasi Ekstrak Kopi Robusta Lampung dan Bakteri <i>Lactobacillus acidophilus</i> terhadap Jumlah SOD Hepar.....	50
BAB 6 PENUTUP.....	56
6.1 Kesimpulan.....	56
6.2 Saran.....	56
DAFTAR PUSTAKA.....	57
LAMPIRAN.....	61

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Komposisi Biji Kopi Robusta sebelum dan sesudah disangrai.....	22
4.1 Rancangan Penelitian “ <i>One Way Table</i> ”	37
5.1 Uji Sensitifitas <i>L. acidophilus</i> terhadap Ekstrak Kopi Robusta Lampung...	47
5.2 Hasil Pengamatan Feses Mencit <i>Balb-C</i>	49
5.3 Jumlah dan skoring sel goblet.....	62
5.4 Hasil Uji ANOVA dan Uji <i>Tukey</i> Jumlah SOD Hepar.....	65
5.5 Perbandingan jumlah SOD hepar terhadap K+.....	65

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Kopi Robusta.....	21
2.2 Mencit (<i>Mus musculus</i>).....	26
2.3 <i>Salmonella</i> sp. dengan menggunakan mikroskop elektron.....	27
5.1 Histopatologi sekum kelompok kontrol negatif.....	53
5.2 Histopatologi sekum kelompok kontrol positif.....	54
5.3 Histopatologi sekum kelompok kontrol Lacto.....	55
5.4 Histopatologi sekum kelompok perlakuan 1.....	56
5.5 Histopatologi sekum kelompok perlakuan 2.....	57
5.6 Histopatologi Sekum Kelompok Perlakuan 3.....	58
5.7 Grafik Jumlah SOD Hepar.....	67



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran

Halaman

1. Surat Keterangan <i>Free Pathogen</i>	76
2. Laik Etik Penelitian	77
3. Perhitungan Dosis Ekstrak Kopi	79
4. Kerangka Operasional	81
5. Statistika Jumlah SOD Hepar	82
6. Hasil <i>flowcytometri</i> SOD Hepar	85
7. Pengujian Fitokimia Kopi Robusta Lampung	97
8. Identifikasi Bakteri <i>Salmonella enterica</i>	104
9. Identifikasi Bakteri <i>Lactobacillus acidophilus</i>	105
10. Uji in vitro pengaruh Kopi robusta terhadap <i>Salmonella enterica</i>	106
11. Data Perhitungan Jumlah Sel Goblet	107



DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

ROS : *Reactive Oxygen Species*

SOD : *Superoxide Dismutase*

BSA : *Bismuth Sulfith Agar*

MRSA : *de Man Rogosa Sharpe Agar*

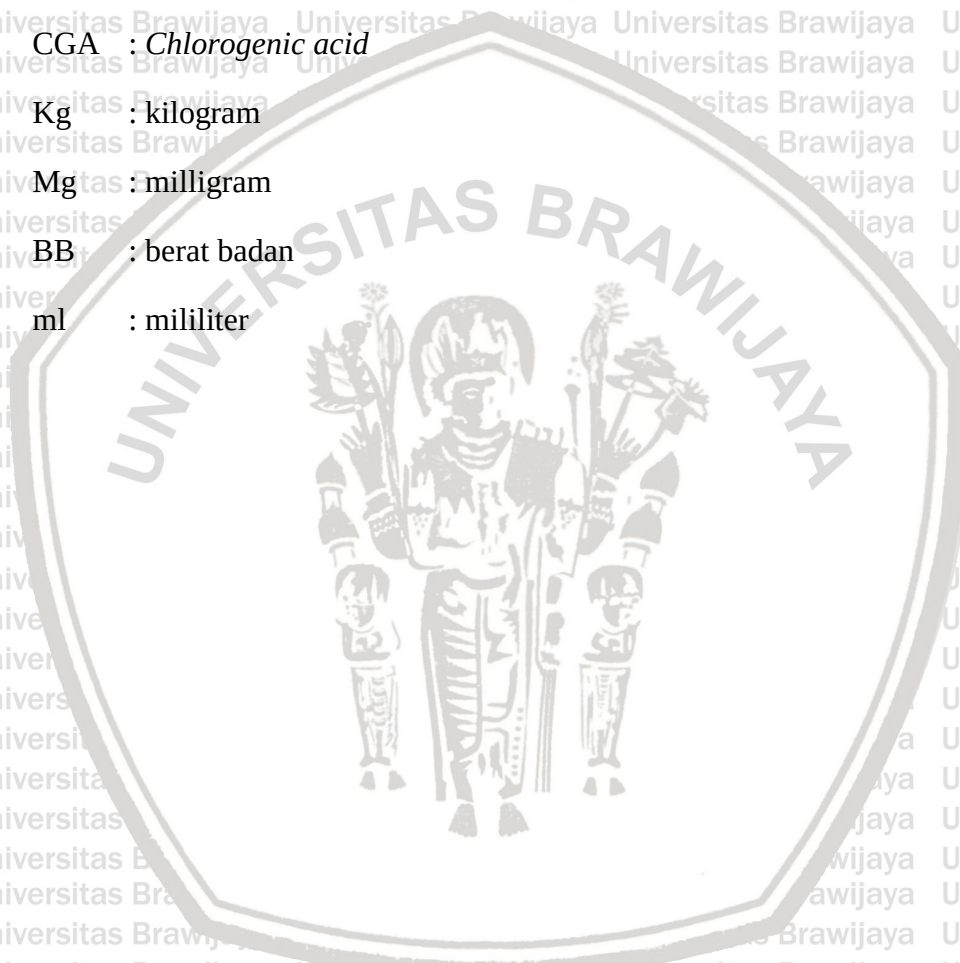
CGA : *Chlorogenic acid*

Kg : kilogram

Mg : milligram

BB : berat badan

ml : mililiter



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Bakteri *Salmonella enterica* adalah bakteri yang termasuk ke dalam famili Enterobacteriaceae. Bakteri ini menyebabkan penyakit *food-borne* gastroenteritis pada manusia salah satu serovar yang sering ditemukan adalah *Salmonella enteritidis* dan menyebabkan peningkatan kasus salmonellosis pada manusia. Bakteri *Salmonella enteritidis* menginfeksi tubuh melalui makanan atau minuman yang terkontaminasi kemudian tertelan sehingga menyebabkan gastroenteritis dengan gejala diare, kram perut, dan bakterimia (Asminarti, 2014).

Intestine terdiri dari *intestinum tenue* dan *intestinum crasum*. Infeksi *S. enteritidis* akan memicu timbulnya inflamasi di daerah intestinum salah satunya adalah bagian sekum yang merupakan bagian awal dari *intestinum crasum*, selain itu adanya antigen *S. enteritidis* juga akan merusak susunan struktur epitel vili intestine. Kerusakan epitel pada vili dan akan mengganggu proses penyerapan nutrisi. Proses inflamasi ini juga akan meningkatkan jumlah radikal bebas (ROS) sebagai hasil dari fagositosis bakteri. *Reactive Oxygen Species* (ROS) merupakan oksidan yang sangat reaktif dimana senyawa tersebut akan berusaha mencari pasangan komponen lain agar terjadi kesetimbangan. Saat proses mencari komponen tersebut, ROS akan merusak komponen sel sehingga sel akan kehilangan integritasnya dan apabila terjadi terus menerus akan menyebabkan kerusakan jaringan. ROS yang sudah terbentuk akan membuat reaksi berantai dan mengakibatkan stres oksidatif sampai ROS dapat dihilangkan oleh sistem antioksidan. Salah satu sistem antioksidan primer dari tubuh adalah Superoksida

dismutase (SOD). Superoksida dismutase bekerja dengan cara mendonorkan satu elektronnya ke senyawa yang bersifat oksidan sehingga senyawa tersebut menjadi stabil dan terhambat aktivitasnya (Wulandari, 2016). Menurut penjelasan di atas dapat diketahui SOD menjadi salah satu paramater terhadap adanya stres oksidatif sebagai hasil dari fagositosis makrofag terhadap *Salmonella enteritidis*.

Pengobatan terhadap infeksi yang ditimbulkan oleh *Salmonella enterica* selama ini dilakukan dengan menggunakan antibiotik sintesis namun penggunaannya dibatasi karena pada beberapa kasus pemberian antibiotik dapat menimbulkan hipersensitivitas lokal pada kulit, reaksi alergi, dan reaksi toksik, serta adanya resistensi bakteri terhadap antibiotik yang muncul akibat penggunaan antibiotik yang tidak tepat juga menjadi salah satu faktor kegagalan pengobatan (Asminarti, 2014). Oleh karena itu maka diperlukan adanya obat alternatif yang dapat mengatasi Salmonelosis.

Pada dewasa ini, penggunaan herbal untuk pencegahan dan pengobatan telah banyak digunakan, salah satu herbal yang sering digunakan adalah kopi. Kopi adalah salah satu komoditas perkebunan utama di Indonesia yang menjadi sumber mata pencaharian masyarakat. Kopi yang diproduksi di Indonesia diantaranya adalah kopi arabika dan kopi robusta (Lestari, 2018). Produksi kopi di Indonesia rata-rata sebesar 639 ribu ton per tahun berupa 72,84% kopi jenis robusta dan 27,16% kopi jenis arabika (Fahryl, 2019). Salah satu jenis kopi robusta yang ada di Indonesia adalah Kopi Robusta Lampung. Naeli dan Muchtaridi (2016) menyatakan bahwa, kopi robusta hijau atau kopi tanpa proses sangrai mempunyai

kandungan kafein dan asam klorogenat yang lebih banyak dari kopi arabika, dimana dua senyawa ini mempunyai khasiat sebagai anti bakteri dan antioksidan.

Kafein yang terkandung dalam kopi dapat merusak gugus asam amino bakteri sehingga bakteri akan lisis sedangkan asam klorogenat dapat merusak kepolaran dinding sel bakteri (Muhammad dan Mumun, 2015). Asam klorogenat sebagai anti oksidan dapat memotong reaksi oksidasi berantai dari radikal bebas sehingga radikal bebas tidak akan bereaksi dengan sel lain (Wulandari, 2016) dan merusak organ, namun kandungan kafein dalam kopi diketahui dapat meningkatkan produksi HCl di pencernaan. Produksi HCl yang tinggi akan mengiritasi mukosa sehingga terdapat resiko apabila mengonsumsi kopi yang berlebihan dapat menyebabkan tukak lambung dan tukak usus halus (Rizkiani, 2009) karena alasan tersebut maka sulit bagi kopi apabila digunakan secara tunggal, sehingga pada penelitian ini Kopi Robusta Lampung akan dikombinasikan dengan probiotik.

Probiotik adalah kumpulan bakteri yang mempunyai efek menguntungkan bagi inangnya dengan cara berkompetisi dengan bakteri patogen pada mukosa intestine. Bakteri probiotik diketahui efektif dalam mengontrol pertumbuhan mikroorganisme yang berpotensi patogen (Anggarini, 2011). Salah satu bakteri asam laktat yang dapat digunakan adalah *Lactobacillus acidophilus*, bakteri ini dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen seperti *Salmonella* karena mempunyai sifat anti mikroba, dapat memproduksi laktase, dan memproduksi vitamin K yang akan menghambat pelekatan maupun pertumbuhan bakteri patogen, serta adanya molekul koagregasi yang dapat menghambat penyebaran bakteri patogen (Senditya dkk, 2011). Bakteri *Lactobacillus acidophilus* juga

diketahui berfungsi sebagai imunomodulator (Galdeano et al, 2019). Kopi Robusta Lampung juga mempunyai kandungan oligosakarida (Grace, 2017) sebagai sumber nutrisi untuk bakteri *L. acidophilus* sehingga dapat meningkatkan kerja bakteri tersebut.

Berdasarkan pemaparan diatas ada maka perlu dilakukan penelitian mengenai pengaruh pemberian kombinasi dari ekstrak Kopi Robusta Hijau Lampung dan *Lactobacillus acidophilus* terhadap mencit yang diinduksi *Salmonella enterica* dengan melihat gambaran histopatologi sekum, jumlah sel goblet sekum, dan jumlah SOD hepar

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh preventif kombinasi Ekstrak Kopi Robusta Lampung dan *Lactobacillus acidophilus* pada Mencit *Balb-c* yang diinduksi *Salmonella enterica* dalam mencegah kerusakan histopatologi sekum dan hipoplasia sel goblet di sekum?
2. Bagaimana pengaruh preventif kombinasi Ekstrak Kopi Robusta Lampung dan *Lactobacillus acidophilus* pada Mencit *Balb-c* yang diinduksi *Salmonella enterica* dalam meningkatkan jumlah SOD hepar?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan rumusan masalah yang telah disebutkan di atas, maka penelitian ini akan dibatasi pada :

1. Hewan coba yang akan digunakan adalah Mencit *Balb-c* berjenis kelamin jantan dengan berat 20-25 gram yang telah bersertifikat *Pathogen Free* (**Lampiran 1**) dari Laboratorium Fisiologi Hewan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Penggunaan hewan coba ini juga telah mendapatkan sertifikat Laik Etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya No 110-KEP-UB (**Lampiran 1**).
2. Parameter yang diamati adalah jumlah SOD hepar dengan metode *flowcytometry* dan histopatologi organ sekum dengan pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE) yang diamati dengan mikroskop perbesaran 100-400 x.
3. Ekstrak kopi yang digunakan berasal dari Kopi Robusta hijau Lampung yang diekstrak dengan metode maserasi dengan etanol 90%.
4. Bakteri *Lactobacillus acidophilus* 10^8 CFU/ml yang telah dikonfirmasi dengan menggunakan *Mc Farland* $0,5 \times 10^8$.
5. Dosis infeksi *Salmonella enterica* 10^8 CFU/ml yang telah dikonfirmasi dengan menggunakan *Mc Farland* $0,5 \times 10^8$ sebanyak 0,5 ml. Infeksi dilakukan selama 2 hari.
6. Dosis kombinasi yang digunakan adalah ekstrak kopi 250 mg/kg BB dan 0,5 ml *L. acidophilus*, ekstrak kopi 500 mg/kg BB dan 0,5 ml *L. acidophilus*, ekstrak kopi 750 mg/kg BB dan 0,5 ml *L. acidophilus*. Kombinasi diberikan peroral dengan sonde lambung selama 15 hari.

1.4 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui pengaruh preventif kombinasi ekstrak Kopi Robusta Lampung dan *Lactobacillus acidophilus* pada Mencit *Balb-C* yang diinduksi *Salmonella enterica* dalam mencegah kerusakan histopatologi sekum dan hipoplasia sel goblet di sekum.
2. Mengetahui pengaruh preventif kombinasi Ekstrak Kopi Robusta Lampung dan *Lactobacillus acidophilus* pada Mencit *Balb-c* yang diinduksi *Salmonella enterica* dalam meningkatkan jumlah SOD hepar.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah untuk memberikan informasi mengenai pemanfaatan kombinasi Ekstrak Kopi Robusta Hijau dan *Lactobacillus acidophilus* sebagai upaya pencegahan terhadap infeksi *Salmonella enterica*.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kopi Robusta

Kopi Robusta (**Gambar 2.1**) merupakan tanaman yang berasal dari Kongo dan dibawa ke Indonesia di masa kolonial Belanda. Kopi Robusta tumbuh ideal di ketinggian 400-800 meter dengan suhu 26°C. Tingkat keasaman tanah (pH) 5-6,5 dengan curah hujan 2000-3000 mm per tahun. Daun kopi berwarna hijau gelap mengilat dengan panjang 10-15 cm dan lebar 6 cm. Bunganya berwarna putih dan harum. Biji berbentuk oval dengan panjang kira-kira 1,5 cm, lengkungan biji lebih tebal dibandingkan kopi arabika dan garis tengah dari atas kebawah hampir rata.

Berikut adalah taksonomi dari Kopi Robusta (Lestari, 2018):

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Tracheophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Sub Kelas	: Astridae
Ordo	: Rubiaceae
Genus	: <i>Coffea</i>
Spesies	: <i>Coffea canephora</i>



Gambar 2.1 Kopi Robusta (Charlinia, 2016).

Komposisi yang terkandung di dalam biji kopi robusta sebelum dan sesudah disangrai tertera di dalam **Tabel 2.1** berikut (Charlinia, 2016) :

Tabel 2.1 Komposisi Biji Kopi Robusta sebelum dan sesudah disangrai.

Komponen	Sebelum disangrai	Sesudah disangrai
Mineral	4.0 -4.5	4.6 -5.0
Kafein	1.6-2.4	2.0
Trigonelline	0.6 -0.75	0.3 -0,6
Lemak	9.0-13.0	11.0 -16.0
Asam Alifatis	1.5 -1.2	1.0 -1.5
Asam Amino	-	-
Protein	-	13.0 -15.0
Humic Acid	-	16.0-17,0
Total chologenic acid	7.0-10.0	3,9 - 4,6
Oligosakarida		0-3,5

Kafein adalah suatu senyawa alkaloid putih dengan rumus senyawa kimia $C_8H_{10}N_4O_2$ dan struktur kimia 1,3,7 trimethylxanthine. Kafein bersifat hidrofobik atau larut dalam minyak, sehingga kafein mudah melewati membran plasma setelah dikonsumsi secara oral (Fahryl, 2019). Kafein di tubuh juga mudah melewati sawar darah otak sehingga dapat menstimulasi susunan syaraf pusat, relaksasi otot polos terutama otot polos bronkus dan stimulasi otot jantung (Charlinia, 2016). Gugus basa pada kafein apabila bersentuhan dengan bakteri akan bereaksi dengan senyawa asam amino yang menyusun dinding sel dan DNA.

bakteri yang mengakibatkan terjadinya perubahan struktur dan susunan asam amino di DNA. Kerusakan DNA pada inti sel bakteri ini akan mengakibatkan terjadinya lisis pada inti sel bakteri sehingga bakteri akan menjadi inaktif dan hancur (Muhammad dan Mumun, 2015).

Asam klorogenik atau *Chlorogenic acid* (CGA) merupakan senyawa fenolik golongan dari ester trans cinnamic acids dan quinic acid yang berfungsi sebagai antioksidan. Asam klorogenat diketahui mempunyai kemampuan untuk menghambat pembentukan sitokin pro inflamasi sehingga akan menurunkan produksi ROS (Liang and Kitts, 2014). Asam klorogenik yang terkandung di dalam kopi robusta lebih banyak daripada kopi arabika (Fahryl, 2019). Senyawa fenol, trigonelline dan asam klorogenik juga memiliki aktifitas antibakteri. Senyawa tersebut termasuk ke dalam golongan flavonoid dimana flavonoid mampu merusak dinding sel bakteri karena adanya perbedaan kepolaran antara lipid penyusun DNA dengan gugus alkohol pada senyawa flavonoid (Muhammad dan Mumun, 2015).

2.2 *Lactobacillus acidophilus*

Bakteri *Lactobacillus acidophilus* adalah bakteri yang berbentuk basil, gram positif, dan tidak mempunyai spora. *L. acidophilus* mempunyai sifat non motil, katalase negatif, anaerob fakultatif, dan dapat memproduksi asam laktat (hemofermentatif) sebanyak 0,3-1,9%. Berikut adalah taksonomi dari bakteri *L. acidophilus* (Wiyarti, 2013) :

Kingdom : Bacteria
Phylum : Firmicutes
Class : Bacilli
Order : Lactobacillales
Family : Lactobacillaceae
Genus : Lactobacillus
Species : *Lactobacillus acidophilus*

Bakteri *L. acidophilus* sering digunakan sebagai probiotik karena aman dan tidak menimbulkan risiko infeksi berupa bakterimia. *L. acidophilus* dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen seperti *Salmonella* karena mempunyai sifat anti mikroba, mampu memproduksi laktase, vitamin K. Bakteri ini akan membantu menjaga kondisi asam dalam intestine sehingga mencegah infeksi mikroba (Tambunan, 2016). Selain itu *L. acidophilus* juga mensekresikan senyawa metabolit biosurfaktan, bakteriosin, asam organik dan H_2O_2 yang akan menghambat pelekatan maupun pertumbuhan bakteri patogen, serta molekul koagregasi yang berfungsi menghambat penyebaran bakteri patogen (Senditya dkk, 2011).

2.3 Probiotik

Probiotik adalah kumpulan bakteri yang mempunyai efek menguntungkan bagi inangnya dengan cara berkompetisi dengan bakteri patogen pada mukosa intestine (Senditya dkk, 2014). Probiotik mempunyai 3 efek positif antara lain

nutrisi, fisiologi, dan antimikroba. Aspek nutrisi berupa kemampuan probiotik untuk membantu metabolisme laktosa dan vitamin, selain itu probiotik juga dapat menetralkan racun hasil metabolisme. Aspek fisiologis yaitu kemampuan probiotik untuk menjaga keseimbangan mikroorganisme di dalam pencernaan, sedangkan aspek antimikroba berupa efek probiotik yang dapat meningkatkan sistem imun dan mencegah kolonisasi bakteri di dinding pencernaan (Anggarini, 2011).

2.4 Mencit *Balb-c*

Hewan coba yang akan digunakan dalam penelitian kali ini adalah Mencit *Balb-c*. Mencit termasuk ke dalam hewan pengerat (Rodentia) klasifikasi lengkapnya adalah sebagai berikut (Priyanto, 2015) :

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordata
Sub Phylum	: Vertebrata
Class	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Sub Ordo	: Myomorpha
Family	: Muridae
Sub family	: Murinae
Genus	: <i>Mus</i>
Spesies	: <i>Musculus</i>

Mencit (**Gambar 2.2**) memiliki panjang tubuh sekitar 75-100 mm dengan berat badan sekitar 20 gram (Priyanto, 2015). Mencit mudah berkembang biak dan dengan tubuhnya yang kecil akan memudahkan dalam pemeliharaan. Mencit mempunyai variasi genetik yang luas serta struktur anatomi dan fisiologisnya terkarakteristik dengan baik sehingga cocok untuk dijadikan hewan model (Hasaaanah, 2009).



Gambar 2.2 Mencit (*Mus musculus*) (Hasaaanah, 2009).

2.5 *Salmonella* sp.

2.5.1 Morfologi dan Klasifikasi

Salmonella sp. adalah bakteri gram negatif berbentuk basil, motil yang mempunyai tipe flagel peritrik. *Salmonella* bersifat fakultatif anaerob, katalase positif, oksidase negatif, dan sebagian besar menghasilkan H_2S . *Salmonella* dapat tumbuh di media yang sederhana dan hampir tidak pernah memfermentasikan laktosa dan sukrosa.

Berikut adalah taksonomi dari *Salmonella* (Yuswananda, 2015) :

Kingdom : Bacteria

Divisi : Proteobacteria

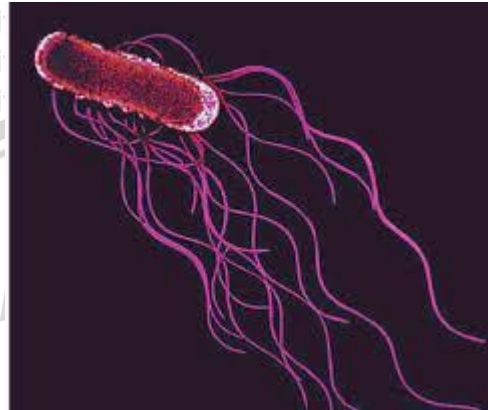
Kelas : Gamma proteobacteria

Ordo : Enterobacteria

Famili : Enterobacteriaceae

Genus : *Salmonella*

Spesies : *S. enteritica*, *S. typhi*, *S. paratyphi* A.



Gambar 2.3 *Salmonella* sp. dengan menggunakan mikroskop elektron (Yuswananda, 2015).

2.5.2 Patogenesitas

Bakteri *Salmonella* sp. mempunyai habitat di saluran pencernaan baik manusia maupun hewan sehingga rute penularannya adalah melalui makanan atau minuman yang tercemar oleh bakteri. *Salmonella* sp. yang sudah masuk akan menginvasi bagian mukosa intestine, berkembang (kolonisasi) di epitel. Enterotoksin berupa *thermolabile enterotoxin* dari bakteri akan menyebabkan inflamasi lokal di daerah intestine sehingga sekresi air dan elektrolit akan terganggu (Darmawan, 2017). *Salmonella* sp. mempunyai beberapa struktur antigen yaitu antigen somatik (O), antigen flagela (H), dan antigen kapsul (Vi).

Antigen O mudah bermutasi dengan perantara bakteriofag dan bersifat bersifat hidropobik terhadap lingkungan sel mikroba itu berada.

Antigen H terdapat di flagela yang berfungsi untuk proteksi bakteri dari sel imun hospes. Antigen Vi berfungsi sebagai *exportation polisaccharide* sehingga dapat membentuk antigen kompleks lipopolisakarida (Tati dan Supar, 2008).

2.5.3 Salmonellosis

Salmonellosis adalah suatu penyakit yang diakibatkan oleh makanan atau minuman (*re-emerging foodborn disease*) yang tercemar *Salmonella sp.* Secara klinis *Salmonella sp.* dibagi menjadi dua tipe yaitu *Salmonella* tifoid dan non tifoid. Tipe tifoid akan menyebabkan demam enterik atau demam tifoid contohnya *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A*, *B*, dan *C*. *Salmonella* non tifoid akan menyebabkan gastroenteritis (Yuswananda, 2015).

2.5.4 Gejala Klinis

Salmonellosis menunjukkan tiga gejala klinis yang menciri yaitu yaitu septikemia, radang intestine akut yang akan berlanjut menjadi radang intestine kronis. Pada kejadian akut penderita akan menunjukkan gejala demam tinggi, diare profuse, disertai mulas yang hebat. Feses akan berbau amis dan berlendir terkadang disertai selaput membran intestine atau darah. *Salmonella* dapat mengakibatkan pembengkakan hati, pembendungan pembuluh darah, serta degenerasi sel hati (Darmawan, 2017).

2.5.5 Pengobatan

Pengobatan yang dapat dilakukan berupa pemberian antibiotik seperti Ampicillin, Amoxillin, dan Cloramphenicol disertai dengan terapi cairan untuk mengembalikan cairan yang keluar karena diare (Yuswananda, 2015). Pada ayam dapat digunakan vaksin *S. enteritidis* phage tipe 4 (SEPT 4) (Tati dan Supar, 2008).

2.6 Superoksida Dismutase (SOD)

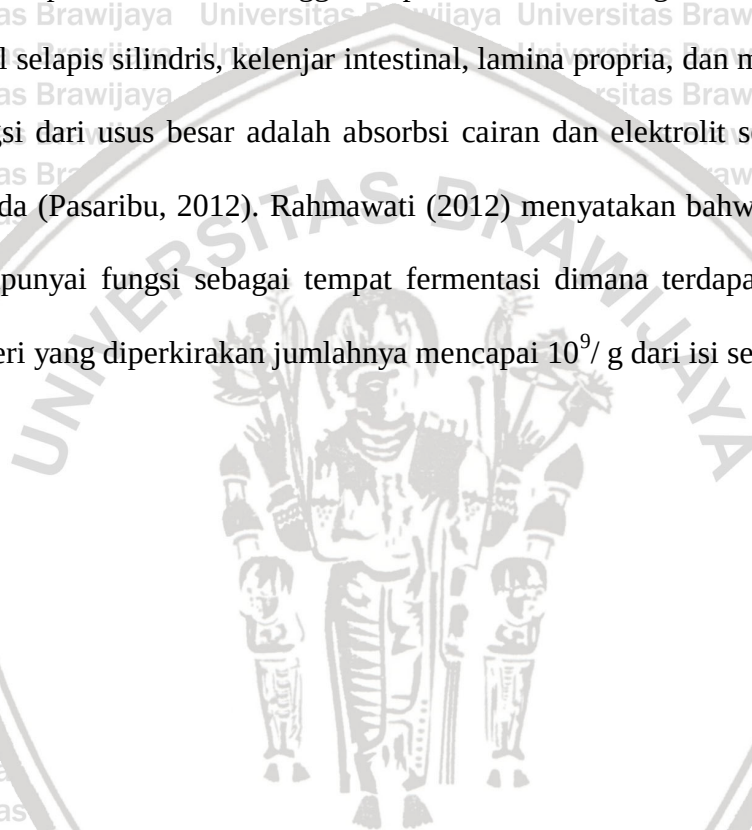
Superoksida dismutase (SOD) adalah salah satu dari tiga bentuk antioksidan yang ada di dalam tubuh. Antioksidan sendiri bekerja dengan cara mendonorkan satu elektronnya ke senyawa yang bersifat oksidan sehingga senyawa tersebut menjadi stabil dan terhambat aktivitasnya. SOD termasuk ke dalam antioksidan primer atau antioksidan enzimatis karena SOD bekerja dengan cara mengkonversi anion superoksida menjadi komponen lain yang kurang berbahaya, yaitu hidrogen peroksida dengan cepat. Hidrogen peroksida di dalam mitokondria akan mengalami detoksifikasi oleh enzim katalase menjadi senyawa H_2O dan O_2 , sedangkan H_2O_2 yang berdifusi ke dalam sitosol akan didetoksifikasi oleh enzim glutathion peroksidase. Berikut adalah reaksi SOD terhadap senyawa oksidan (Wulandari, 2016).



2.7 Sekum

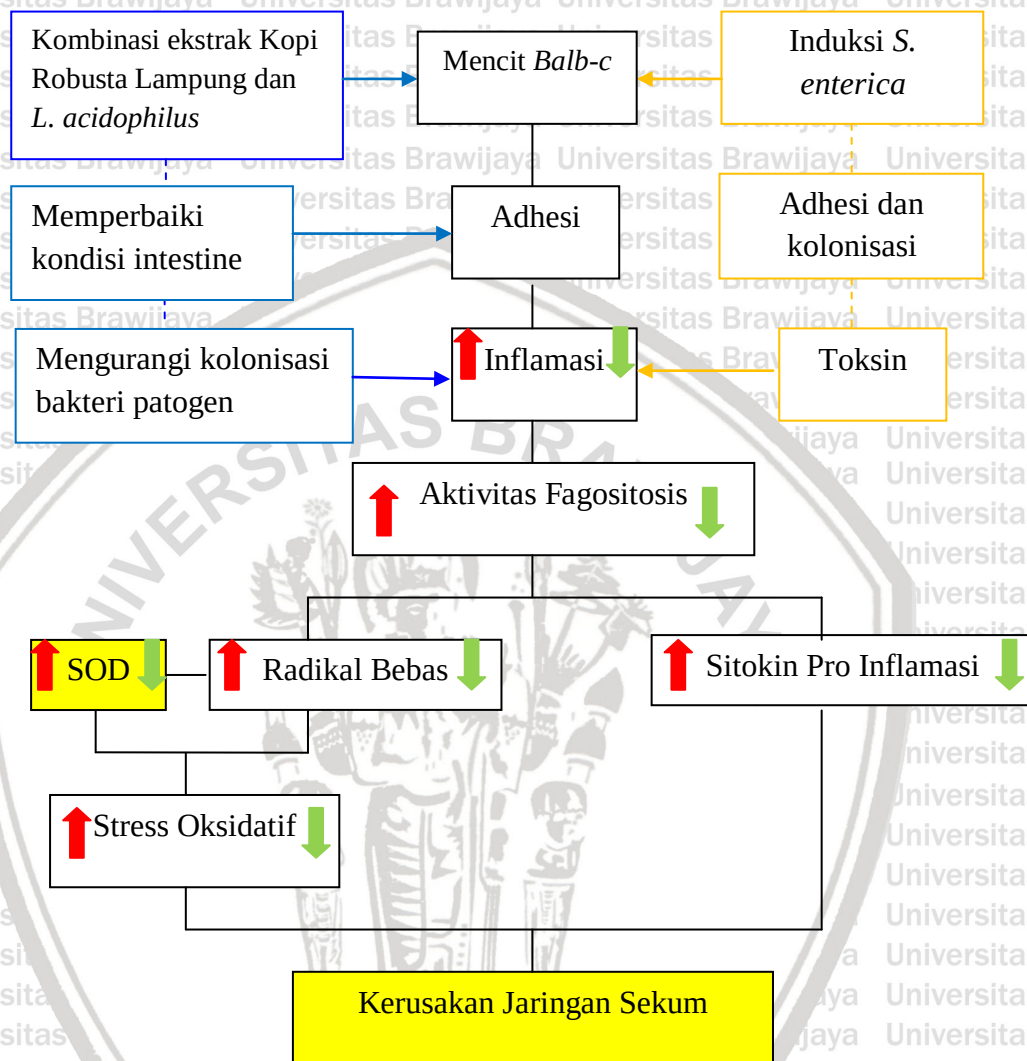
Sekum merupakan bagian pertama dari usus besar yang kemudian akan dilanjutkan bagian kolon lalu rektum. Dindingnya terdiri dari 4 lapisan dari dalam ke luar yaitu mukosa, sub mukosa, muskularis eksterna, dan serosa. Struktur dari usus besar sedikit berbeda dari usus halus dimana usus besar tidak mempunyai struktur plika dan vili sehingga tampak lebih datar. Bagian mukosa tersusun atas epitel selapis silindris, kelenjar intestinal, lamina propria, dan muskularis mukosa.

Fungsi dari usus besar adalah absorpsi cairan dan elektrolit seperti natrium dan klorida (Pasaribu, 2012). Rahmawati (2012) menyatakan bahwa, sekum pada itik mempunyai fungsi sebagai tempat fermentasi dimana terdapat berbagai macam bakteri yang diperkirakan jumlahnya mencapai 10^9 /g dari isi sekum.



BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan :



: Variabel yang diamati



: Perlakuan *S. enterica*



: Efek Infeksi *S. enterica*



: Efek induksi Ekstrak Kopi Robusta dan *L. acidophilus*



: Perlakuan Ekstrak Kopi Robusta dan *L. acidophilus*

Mencit pertama-tama diberikan kombinasi Ekstrak Kopi Robusta Lampung dan *L. acidophilus* dimana bakteri *L. acidophilus* akan menyelimuti bagian mukosa intestine dan akan membantu proses penyerapan nutrisi, fermentasi bahan makanan, dan lain sebagainya didukung dengan kandungan oligosakarida dalam ekstrak kopi sebagai sumber nutrisi bagi *L. acidophilus*. Kandungan anti bakteri dalam kopi akan mematikan bakteri patogen yang mungkin ada di dalam intestine sehingga pemberian kombinasi akan membantu memperbaiki kondisi intestine.

Induksi *Salmonella enterica* akan menyebabkan infeksi pada tubuh dimana bakteri akan berkolonisasi di daerah mukosa intestine. Adanya *L. acidophilus* yang menempel di daerah mukosa intestine akan mensekresikan senyawa metabolit biosurfaktan, bakteriosin, asam organik dan H_2O_2 akan menghambat pelekatan maupun pertumbuhan bakteri *S. enterica*, serta molekul koagregasi akan menghambat penyebaran bakteri tersebut.

Kafein yang terkandung di dalam ekstrak kopi akan bereaksi dengan senyawa asam amino yang menyusun dinding sel dan DNA bakteri yang mengakibatkan terjadinya perubahan struktur dan susunan asam amino di DNA. Ketika inti dari bakteri sudah rusak maka bakteri akan ikut lisis. Senyawa fenol, trigonelline dan asam klorogenat juga bersifat anti bakteri karena 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 (Muhammad dan Mumun, 2015).

Bakteri *S. enterica* yang masih bertahan dan berkolonisasi di epitel intestine akan mengeluarkan enterotoksin berupa *thermolabile enterotoxin* yang

menginduksi inflamasi lokal dan akan menginduksi respon imun tubuh. Sitokin pro inflamasi (IL-1, IL-6, TNF α) akan mengaktifkan sel fagosit seperti makrofag, monosit, dan neutrofil. Makrofag akan melakukan proses kemotaksis dan terjadi proses opsonisasi yaitu pelapisan antigen/bakteri dengan komplemen dan antibodi. Setelah antigen masuk ke dalam makrofag maka terjadi proses fagositosis. Makrofag sebagai fagosit dapat membunuh bakteri melalui proses oksidatif dimana terjadi peningkatan penggunaan oksigen (*respiratory burst*).

Respiratory burst dimulai dari perubahan O_2 menjadi O_2^- oleh NADPH oksidase sehingga akan menghasilkan *reactive oxygen species* (ROS) seperti superoksida, hidrogen peroksida, dan NO melalui jalur *Reactive Oxygen Intermediates* (ROI). ROS yang sangat reaktif dapat merusak komponen sel bakteri dan bakteri akan terbunuh. Bakteri yang telah disintegrasi tersebut akan dicerna oleh enzim lisosom dan produk ROS akan dikatalis oleh superoksida dismutase (SOD) (Surati, 2012).

SOD sebagai antioksidan primer akan mengkonversi anion superoksida menjadi komponen lain yang sifatnya kurang berbahaya, yaitu hidrogen peroksida. Hidrogen peroksida kemudian akan didetoksifikasi oleh enzim katalase di dalam mitokondria menjadi senyawa H_2O dan O_2 , sedangkan H_2O_2 yang berdifusi ke dalam sitosol akan didetoksifikasi oleh enzim *glutathion peroksidase* (Wulandari, 2016).

Peningkatan proses fagositosis yang terus menerus akan berdampak pada peningkatan jumlah ROS sehingga menyebabkan stres oksidatif. Hal ini disebabkan oleh jumlah ROS yang meningkat tidak sebanding dengan

kemampuan SOD sebagai pertahanan pertama. Pada kondisi stres oksidatif, radikal bebas akan menyebabkan peroksidasi lipid membran sel dan merusak organisasi membran sel. Radikal bebas atau ROS yang tidak terhambat peningkatannya akan mulai merusak jaringan disekitarnya.

Asam klorogenat (CGA) yang terkandung di dalam kopi merupakan antioksidan sekunder dimana asam klorogenat dapat digunakan sebagai pertahanan preventif. Asam klorogenat akan memotong reaksi oksidasi berantai dari radikal bebas atau menangkap radikal bebas (*scavenger free radical*), sehingga radikal bebas tidak akan bereaksi dengan komponen seluler (Wulandari, 2016). Asam klorogenat juga dapat menghambat pembentukan sitokin pro inflamasi sehingga akan menurunkan produksi ROS dan mengurangi kerusakan sel sehingga kerusakan jaringan sekum juga dapat terhambat (Liang and Kitts, 2014). Adanya penambahan ekstrak kopi yang mengandung asam klorogenat diharapkan akan membantu kerja dari SOD.

3.3 Hipotesis Penelitian

1. Kombinasi Ekstrak Kopi Robusta Lampung dan *Lactobacillus acidophilus* dapat mencegah kerusakan histopatologi sekum dan hipoplasia sel goblet di sekum pada mencit *Balb-C* yang diinduksi *Salmonella enterica*.
2. Kombinasi Ekstrak Kopi Robusta Lampung dan *Lactobacillus acidophilus* dapat meningkatkan jumlah SOD hepar pada mencit *Balb-C* yang diinduksi *Salmonella enterica*.

BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Mei-Juni 2019. Penelitian dilakukan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk pembuatan ekstrak Kopi Robusta Lampung, Laboratorium Hewan Coba Farmakologi Fakultas Kedokteran untuk pemeliharaan, pemberian kombinasi dan infeksi mencit, Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya untuk persiapan kombinasi dan bakteri, Laboratorium Kimia Analisis Instrumentasi Politeknik Negeri Malang untuk uji fitokimia dan determinasi senyawa aktif LC-MS dari ekstrak Kopi Robusta Lampung, Pengujian *flowcytometry* dilakukan di Fakultas MIPA (Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam) Universitas Brawijaya, dan pembuatan histopatologi di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.2 Alat dan Bahan

4.2.1 Alat

Alat pemeliharaan hewan coba berupa kandang dari kotak plastik, tutup kandang dari anyaman kawat, tempat minum, dan sekam. Alat untuk mempersiapkan ekstrak Kopi Robusta Lampung dan *L. acidophilus* antara lain *Laminar Air Flow* (LAF), neraca analitik, spuit 1 ml, *eppendorf*, bunsen, aluminium foil, spatula, vortex, tabung falcon, inkubator, *ice box*, *ice packed*. Alat untuk pembedahan mencit terdiri dari 1 set *dissecting set*, spuit 5 ml, cawan petri, pot organ, alas gabus, jarum pentul. Sedangkan alat pada pengujian *flow*

cytometry terdiri dari kuvet, *ependorf*, *BD FACS Calibur™* flowcytometer, *Micro tube* 1,5 mL, *FCM tube*, dan mikropipet.

4.2.1 Bahan

Bahan yang dibutuhkan untuk penelitian ini adalah ekstrak Kopi Robusta Hijau Lampung, bakteri *L. acidophilus*, bakteri *S. enterica*, media *Bismuth Sulfith Agar (BSA)*, media *de Man Rogosa Sharpe Agar (MRSA)*, mencit *Balb-C*, pakan mencit, alkohol 70%, formalin, *Phospat Buffer Saline (PBS)*, organ sekum dan hepar, antibodi ekstraselular SOD.

4.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas : konsentrasi Ekstrak Kopi Robusta Hijau, jumlah pemberian *L. acidophilus* dan *S. enterica*

Variabel terikat : jumlah SOD dan histopatologi jaringan sekum

Variabel kontrol : Mencit *Balb-C* jantan berat 20-25 gram, suhu, kelembaban, pakan, minum, kandang.

4.4 Rencana Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Mencit *Balb-C* dibagi ke dalam 6 kelompok perlakuan dengan masing-masing berisi 4 ekor mencit yang dibagi secara acak.

Berikut estimasi jumlah sampel yang dibutuhkan :

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

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

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3,5$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

t = Jumlah kelompok perlakuan

n = Jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan tersebut maka dibutuhkan mencit sejumlah 24 ekor yang sudah mendapatkan sertifikat laik etik dalam penggunaannya. Rancangan untuk penelitian dapat dilihat pada **Tabel 4.1** berikut :

Tabel 4.1. Rancangan Penelitian “One Way Table”

Perlakuan	Ulangan				Total	Rata-rata
	1	2	3	4		
K(-)						
K(+)						
P1						
P2						
P3						

Keterangan :

K- = Mencit sehat tanpa diberi perlakuan.

K+ = Mencit *Balb-C* yang diinfeksi *Salmonella enterica* 10^8 CFU/mL sebanyak 0,5 ml setiap ulangan secara per oral selama 2 hari.

K *Lac* = Mencit *Balb-C* yang diberikan *Latobacillus acidophilus* saja selama 15 hari dan diinfeksi *Salmonella enterica* selama 2 hari.

P1 = Mencit *Balb-C* yang diberikan kombinasi ekstrak kopi robusta hijau 250 mg/kg BB dan *L. acidophilus* selama 15 hari dan diinfeksi *Salmonella enterica* selama 2 hari.

P2 = Mencit *Balb-C* yang diberikan kombinasi ekstrak kopi robusta hijau 500 mg/kg BB dan *L. acidophilus* selama 15 hari dan diinfeksi *Salmonella enterica* selama 2 hari.

P3 = Mencit *Balb C* yang diberikan kombinasi ekstrak kopi robusta hijau 750 mg/kg BB dan *L. acidophilus* selama 15 hari dan diinfeksi *Salmonella enterica* selama 2 hari.

4.5 Tahapan Penelitian

1. Pembuatan Ekstrak Kopi Robusta Lampung.
2. Uji fitokimia kopi robusta.
3. Persiapan hewan coba.
4. Persiapan bakteri *Lactobacillus acidophilus*.
5. Pemberian kombinasi pada mencit *Balb-C*.
6. Pemberian *Salmonella enterica* pada mencit *Balb-C*.
7. Nekropsi dan preparasi organ sekum dan hepar.
8. Analisis SOD dengan *flowcitometry* organ hepar.
9. Pembuatan histopatologi organ sekum.

4.6 Prosedur Kerja

4.6.1 Pembuatan Ekstrak Kopi Robusta Lampung

Kopi Robusta Hijau Lampung dibuat ekstrak di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembuatan dilakukan dengan metode maserasi. Bubuk kopi ditimbang 100 gram dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer lalu ditambahkan etanol 90% sebanyak 900 ml. Larutan dikocok 30 menit dan direndam semalaman kemudian diambil lapisan bagian atas yang merupakan campuran bahan aktif dan pelarut, prosedur ini diulang 3 kali. Larutan kemudian dimasukkan ke labu evaporator dan dievaporasi dengan *water bath* bersuhu 90°C selama 1,5-2 jam. Ekstrak yang didapatkan dioven dan ditimbang berkali-kali sampai didapatkan berat ekstrak yang tetap selama 30-60 menit (Juliantari dkk, 2018).

4.6.2 Uji Fitokimia Kopi Robusta

a. Uji Alkaloid

Sampel ekstrak sejumlah 4 g ditambahkan Kloroform secukupnya kemudian ditambahkan 10 ml amoniak dan Kloroform. Campuran larutan tersebut disaring dan hasil saringnya ditambahkan 10 tetes H_2SO_4 2N. Larutan dikocok dan didiamkan sampai terbentuk 2 lapisan. Diambil lapisan atas kemudian diberikan pereaksi Mayer dan Wagner di 2 tabung reaksi yang terpisah. Hasil positif terlihat dari terbentuk endapan putih (pereaksi Mayer) dan endapan merah kecoklatan (pereaksi Wagner).

b. Uji Saponin

Sampel ekstrak sejumlah 200 gram dicampur dengan air suling sampai terendam. Campuran tersebut kemudian dididihkan selama 2-3 menit. Larutan didinginkan kemudian dikocok kuat-kuat dan ditambahkan HCl 2 tetes. Diperhatikan larutan apabila terbentuk buih yang tetap maka positif mengandung saponin. Prosedur ini sudah sesuai menurut literatur (Wigati dkk, 2018).

c. Uji Tannin

Sampel ekstrak sejumlah 200 gram dicampur dengan ethanol sampai terendam. Larutan tersebut kemudian diambil 1 ml dan dicampurkan dengan 2-3 tetes FeCl_3 1%. Hasil positif larutan akan berubah warna menjadi biru tua atau hitam kehijauan.

d. Analisa *Total Flavonoid Content*

Sampel ditambahkan 0,5 ml methanol, 2,5 ml aquades, dan 2,5 ml Folin 50%. Campuran larutan tersebut didiamkan 5 menit kemudian ditambahkan dengan natrium karbonat 7,5% 2 ml dan di vortex. Larutan tersebut kemudian diinkubasi selama 15 menit pada suhu 45°C dan diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 765 nm.

4.6.3 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan adalah Mencit *Balb-C* berjenis kelamin jantan yang didapatkan dari Laboratorium Fisiologi Hewan Universitas Indonesia Maulana Malik Ibrahim Malang yang

bersertifikat *Pathogen Free (Salmonella)* yang dapat dilihat pada

Lampiran 1. Mencit sudah mendapatkan sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya yang dapat dilihat pada

Lampiran 2.

Mencit sejumlah 24 ekor dibagi dalam 6 kandang dan diaklimatisasi selama 7 hari. Mencit yang telah memenuhi standar BB kemudian diberikan pakan BR-1 yang dibuat seperti bola dan diletakkan di atas tutup kandang. Minum diberikan *ad libitum* dan diganti setiap hari.

4.6.4 Persiapan Bakteri *Lactobacillus acidophilus*

Bakteri *Lactobacillus acidophilus* yang didapatkan dari Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dibiakkan di media MRSA yang ditambahkan CaCO_3 1%. Penambahan CaCO_3 1% dilakukan dengan cara setelah media MRSA disterilkan ditambahkan CaCO_3 1% yang telah dilarutkan dengan aquades kemudian dicampurkan. Bakteri kemudian dilakukan uji konfirmasi berupa pewarnaan gram dengan larutan kristal violet, lugol, aceton alkohol, dan safranin didapatkan hasil bakteri berbentuk basil gram positif, serta uji katalase dengan cara meneteskan bakteri di gelas objek dan diberikan larutan H_2O_2 , didapatkan hasil negatif tidak terbentuk gelembung dimana *L. acidophilus* tidak mempunyai enzim katalase. Bakteri yang telah terkonfirmasi kemudian diperbanyak di media *Nutrient broth*. Tingkat

kekeruhan dikonfirmasi menggunakan *Mc Farland* $0,5 \times 10^8$ untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml.

4.6.5 Pemberian kombinasi pada mencit *Balb-C*

Mencit ditimbang sebelum dilakukan perlakuan, dicatat beratnya, dan diberi tanda kontrol atau perlakuan. Dosis ekstrak kopi terbagi menjadi 3 yaitu 250 mg/kg BB, 500 mg/kg BB, dan 750 mg/kg BB.

Mencit diberikan ekstrak kopi dengan perhitungan dosis dapat dilihat pada **Lampiran 3** setelah didapatkan hasil masing-masing mencit per perlakuan, ditimbang kebutuhan ekstrak kopi setiap perlakuan dengan timbangan analitik kemudian dilarutkan menggunakan *L. acidophilus*.

Larutan ekstrak kopi dan *L. acidophilus* kemudian dipindahkan ke dalam eppendorf menggunakan spuit 1 ml sesuai dengan dosis masing-masing mencit dan diberi tanda. Semua proses ini dilakukan setiap hari selama pemberian kombinasi dan dilakukan di *Laminar Air Flow* yang ada di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya untuk meminimalisir kontaminasi.

Eppendorf tersebut kemudian disimpan di dalam *ice box* agar tidak rusak kemudian dilakukan pemberian pada mencit di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan menggunakan sonde lambung. Kombinasi ekstrak kopi dan *L. acidophilus* diberikan setiap hari selama 15 hari. Mencit kemudian

ditimbang BBnya setiap 7 hari dan dosisnya dihitung ulang untuk menyesuaikan dengan berat mencit.

4.6.6 Pemberian *Salmonella enterica* pada mencit Balb C

Bakteri *Salmonella enterica* didapatkan dari Balai Besar Veteriner Wates, Yogyakarta kemudian ditanam di media BSA dan diinkubasi di suhu 37°C, koloni *S. enterica* akan tampak coklat kehitaman.

Bakteri kemudian diuji konfirmasi berupa pewarnaan gram dengan larutan kristal violet, lugol, aceton alkohol, dan safranin didapatkan hasil bakteri berbentuk basil gram negatif. Bakteri kemudian diperbanyak dengan ditanam di media *Nutrient broth*. Bakteri kemudian diuji menggunakan *Mc Farland* $0,5 \times 10^8$ untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml. *S. enterica* diberikan sebanyak 0,5 ml dengan menggunakan sonde lambung selama 2 hari dan sebelum pemberian mencit dipuaskan terlebih dahulu.

4.6.7 Nekropsi dan preparasi organ sekum dan hepar

Mencit terlebih dahulu ditimbang, kemudian dilakukan dislokasi *cervical*. Mencit diletakkan di alas gabus dan difiksasi keempat ekstremitasnya dengan menggunakan jarum. Bagian abdomen dibuat lubang dengan gunting tata kemudian dilanjutkan kulitnya dibuka ke arah lateral menggunakan gunting tatu. Dibuka organ di cavum

abdomen kemudian diambil organ hepar untuk nantinya dilakukan *flowcytometri* dan analisa SOD serta organ sekum untuk dibuat histopatologi.

4.6.8 Analisis SOD dengan *flowcytometry* organ hepar

Organ hepar yang telah didapatkan dicuci dengan NaCl fisiologis kemudian diletakkan di cawan petri yang berisi 5 ml NaCl dan dilakukan penggerusan sampai hancur. Kemudian dimasukkan cairan hasil gerusan ke dalam *eppendorf* dan disentrifus 2500 rpm selama 5 menit dengan suhu 4°C. Supernatan dibuang dan pelet ditambahkan antibodi ekstraselular SOD lalu pelet dimasukkan ke dalam kuvet *flowcytometri* dan *dirunning* (Rifa'i, 2011).

4.6.7 Pembuatan Histopat Organ Sekum

Organ sekum yang akan dibuat histopat dibersihkan dengan NaCl fisiologis kemudian disimpan di dalam pot organ yang telah berisi formalin 10% untuk fiksasi organ dan disimpan minimal 24 jam. Kemudian dilakukan proses dehidrasi dengan alkohol 50-95% masing-masing 15 menit. Tahapan *clearing* berfungsi mengeluarkan alkohol dari dalam organ menggunakan cairan toluol maksimal 120 menit. Kemudian tahap *Embedding* dengan cara memanaskan parafin di suhu 56-62°C 1,2,3,4 masing-masing 15 menit. Tahap *Blocking* dilakukan dengan dengan organ diblok parafin dan dibiarkan mengeras agar bisa dipotong menggunakan mikrotom dengan ketebalan 6µm. Potongan

diletakkan di *water bath* dan ditempelkan di gelas objek menggunakan putih telur. Gelas objek dimasukkan ke larutan xylol 1,2,3 sebagai proses deparafinisasi dan direhidrasi dengan alkohol 100%, 90%,80%,70% masing-masing 5 menit. Gelas objek dicelupkan di hematoxilin 5-20 menit, dicelupkan asam alkohol 3 kali, dicuci air mengalir 10-20 menit, kemudian direndam alkohol bertingkat dan xylol lagi. Diberi canada balsam lalu tutup dengan cover glass (Prahanarendra, 2015).

4.6.9 Pengamatan Histopatologi Organ Sekum

Histopatologi diamati menggunakan *optilab* dan mikroskop *Olympus* perbesaran 100-400 kali. Pengamatan yang dilakukan untuk melihat tanda-tanda inflamasi seperti kerusakan vili dan epitel, infiltrasi sel radang, dan hipoplasia sel goblet.

4.7 Analisa Data

Analisa data jumlah SOD dilakukan secara kuantitatif dan dianalisa dengan menggunakan *One Way Analysis of Varians* (ANOVA) dengan kepercayaan 95% untuk mengetahui adanya perbedaan pada data dan dilanjutkan uji *Tukey* untuk mengetahui perbedaan dari setiap perlakuan yang ada apabila didapatkan hasil ANOVA berbeda nyata dengan menggunakan *software* SPSS. Histopatologi sekum dianalisa dengan cara deskriptif kualitatif dengan mikroskop CX31 dan diambil fotonya menggunakan *optilab* di perbesaran 100-400x. Jumlah sel goblet

dihitung dengan cara mengambil foto histopat menggunakan *optilab* di perbesaran 400 kali sebanyak 5 lapang pandang/ulangan, jumlah total yang didapatkan kemudian di rata-rata dan dilakukan skoring (Stecher et al, 2005).



BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Uji Sensitifitas *Lactobacillus acidophilus* terhadap Ekstrak Kopi Robusta

Lampung

Uji sensitifitas *L. acidophilus* terhadap ekstrak Kopi Robusta Lampung dilakukan sebelum pemberian kombinasi untuk mengetahui efek antibakteri ekstrak kopi pada *L. acidophilus*. Uji sensitifitas dilakukan dengan cara menanam bakteri *L. acidophilus* di media MRSA yang ditambahkan CaCO_3 1% dengan metode *streak* penuh. Menurut Amaliah dkk (2018), penambahan CaCO_3 1% berfungsi untuk memudahkan dalam melihat koloni bakteri karena *L. acidophilus* akan membentuk zona bening di sekitar bakteri akibat CaCO_3 yang terhidrolisis oleh bakteri *L. acidophilus*. *Blank disc* kemudian diisi dengan 20 mikrolit ekstrak Kopi Robusta Lampung dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, dan 50% kemudian ditempelkan pada media ditambahkan dengan *disc* Gentamycin sebagai kontrol positif dan *blank disc* yang diisi dengan aquades 20 mikrolit sebagai kontrol negatif. Media kemudian diinkubasi 24 jam dan dihitung diameter zona hambat yang terbentuk. Hasil uji sensitifitas dapat dilihat pada **Tabel 5.1** berikut :

Tabel 5.1 Uji Sensitifitas *L. acidophilus* terhadap Ekstrak Kopi Robusta Lampung

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

Keterangan (-) : tidak ada zona hambat

Hasil uji sensitifitas menunjukkan terbentuk daya hambat berdiameter 0,8 cm pada media yang diberikan *disc* Gentamycin dimana antibiotik ini bersifat *broad spectrum* sehingga dapat membunuh atau membentuk daya hambat disekitar *disc* sedangkan pada semua konsentrasi ekstrak Kopi Robusta Lampung tidak terbentuk daya hambat disekitar *disc* yang menandakan *L. acidophilus* tidak terpengaruh oleh sifat antibakteri yang dimiliki ekstrak kopi dan masih dapat tumbuh. Hal ini sesuai dengan pendapat Klangpetch (2017) yang menyatakan bahwa, kandungan karbohidrat, kafein, galaktomannans, protein, dan fenol di dalam kopi dapat dimanfaatkan dengan baik oleh bakteri probiotik untuk menunjang pertumbuhan di intestine, sehingga bakteri *L. acidophilus* tidak terpengaruh oleh sifat anti bakteri dari ekstrak kopi.

5.2 Pengaruh Pemberian Kombinasi Ekstrak Kopi Robusta Lampung dan Bakteri *Lactobacillus acidophilus* terhadap Kondisi Feses Mencit *Balb-C*

Salah satu gejala klinis yang tampak ketika infeksi *S. enterica* adalah diare yang disebabkan oleh vili intestine yang tidak dapat bekerja secara maksimal karena rusak atau produksi mukus oleh sel goblet yang lebih banyak dari biasanya sehingga tampak berlendir (Kusumaningsih, 2011). Hasil pengamatan terhadap bentuk feses mencit *Balb-c* dapat dilihat pada **Tabel 5.2.**

Astawan dkk (2012) memaparkan bahwa, kriteria diare pada tikus dibagi menjadi lima kategori yaitu (1) Feses dengan ciri-ciri berbentuk bulat atau lonjong, berwarna hitam, dan keras yang merupakan tanda feses normal atau sehat, (2) feses mempunyai ciri-ciri berbentuk bulat atau lonjong, berwarna hitam, dengan tekstur sedikit lembek, (3) feses mempunyai ciri-ciri berbentuk bulat atau

lonjong, berwarna hitam, dengan tekstur lembek, (4) feses tidak berbentuk bulat atau lonjong, berwarna sedikit coklat, sangat lembek dan bisa disertai mukus, (5) feses mempunyai ciri-ciri tidak berbentuk dengan tekstur cair, berwarna coklat dan bisa disertai mukus. Kategori feses yang termasuk diare dimulai dari kategori 3 sampai 5.

Tabel 5.2 Hasil Pengamatan Feses Mencit *Balb-C*

Perlakuan	Tampilan Feses	Kriteria Diare	Keterangan
Kontrol Negatif	- Berbentuk Lonjong - Warna Hitam - Solid	Feses Normal	Normal
Kontrol Positif	- bentuk tidak lonjong, tidak bulat - warna coklat mentah - lembek, berlendir	Feses Kategori 4	Diare
Kontrol <i>L. acidophilus</i>	- bentuk agak bulat, - warna coklat - lembek	Feses kategori 3	Diare
Perlakuan 1	- berbentuk lonjong, - warna coklat tua. - Tidak terlalu keras	feeses kategori 2	Normal
Perlakuan 2	- bentuk lonjong, - warna coklat - agak lembek	Feses kategori 3	Diare
Perlakuan 3	- bentuk lonjong, - warna coklat - agak lembek	Feses kategori 3	Diare

Penampakan feses pada kelompok kontrol negatif tergolong ke dalam feses normal dimana kelompok ini tidak diberikan perlakuan apapun dan dalam kondisi sehat sehingga tidak ada perubahan pada penampakan feses. Hal ini berbanding

terbalik dengan kelompok kontrol positif yang mempunyai penampakan feses kategori 4 yang berarti diare. Diare pada kelompok kontrol positif disebabkan oleh infeksi *S. enterica* sesuai dengan pernyataan Kusumaningsih (2011), bahwa mencit yang diinduksi dengan *S. enteritidis* akan muncul gejala diare. Menurut Zein dkk (2004), Salmonella akan menginvasi bagian membran basolateral sel epitel, bermutiplikasi di fagosom, dan menyebar di epitel yang lain sehingga menginduksi sel radang menuju ke sumber infeksi. ROS yang dihasilkan saat proses fagositosis bakteri akan merusak vili intestine sehingga mengganggu penyerapan glukosa dan merusak pompa Na^+ dan K^+ terjadi malabsorpsi cairan yang mengakibatkan konsistensi feses menjadi cair (Akbar, 2016). Feses yang tampak berlendir diakibatkan oleh adanya infeksi *S. enterica* yang menginduksi sel goblet untuk mengeluarkan mukus lebih banyak sebagai bentuk respon imunitas tubuh, mukus kemudian akan keluar bersama feses (Songhet et al, 2011).

Kelompok perlakuan kontrol *L. acidophilus* juga terlihat diare walaupun masih tergolong dalam kategori 3, sehingga masih lebih baik dibandingkan kelompok perlakuan positif. Hal ini disebabkan oleh pemberian *L. acidophilus* secara tunggal yang tidak dapat mencegah adhesi dan invasi dari *S. enterica* sehingga masih muncul gejala klinis berupa diare. Hal ini sesuai dengan pendapat Rachmawati (2016) yang mengatakan bahwa, pemberian *L. acidophilus* pada mencit yang ditantang EPEC hanya mampu mengurangi tingkat keparahan diare apabila dibandingkan dengan mencit yang ditantang EPEC tanpa pemberian *L. acidophilus*. Infeksi *S. enterica* yang tinggi juga dapat mengganggu penyerapan

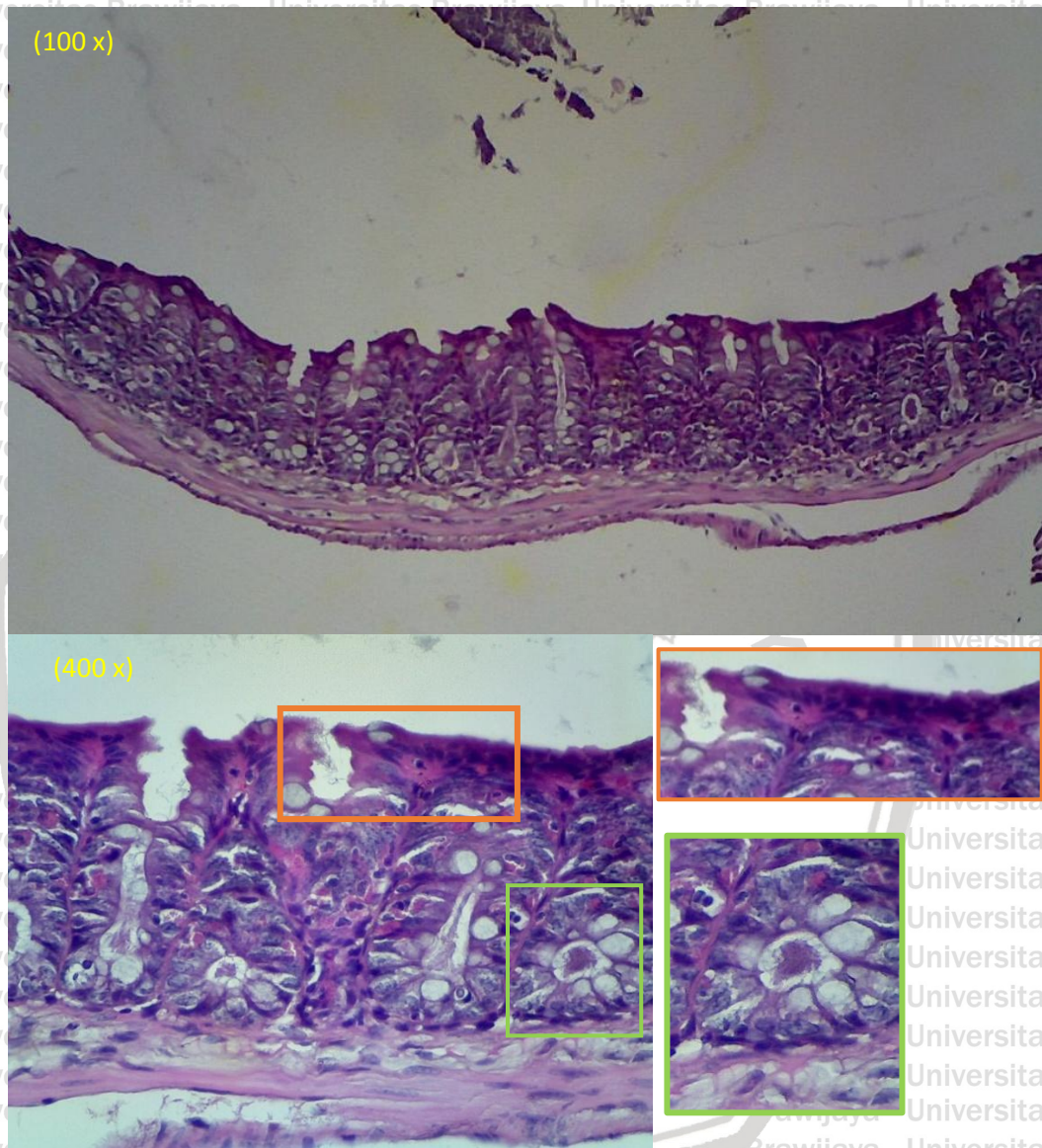
garam empedu di intestine. Garam empedu yang tinggi ini dapat menurunkan jumlah *L. acidophilus* di intestine (Arguello et al, 2017).

Kelompok perlakuan 1 yang diberikan kombinasi ekstrak Kopi Robusta Lampung 250 mg/kg BB dan *L. acidophilus* mempunyai penampakan feses kategori 2 yang tergolong ke dalam feses normal, sedangkan pada perlakuan 2 dan 3 yang juga diberikan kombinasi ekstrak Kopi Robusta Lampung dan *L. acidophilus* dengan jumlah ekstrak 500 mg/kg BB dan 750 mg/kg BB mempunyai penampakan feses kategori 3 yang tergolong ke dalam diare. Hal ini diakibatkan oleh jumlah ekstrak kopi pada perlakuan 2 dan 3 yang lebih banyak daripada perlakuan 1, sehingga mempengaruhi kinerja kombinasi. Pemberian ekstrak kopi yang lebih tinggi akan merangsang terbentuknya asam lambung dan meningkatnya gerakan peristaltik akibat kandungan kafein yang tinggi dan mengiritasi mukosa intestine (Ilham dkk, 2019). Perlakuan 2 dan 3 didapatkan feses dengan kategori 3 yang tidak separah kontrol positif sehingga dapat diketahui kombinasi ekstrak Kopi Robusta Lampung dan *L. acidophilus* juga sudah bekerja dalam mengurangi adhesi dan invasi dari *S. enterica* walaupun tidak seefektif perlakuan 1 yang mempunyai penampakan feses kategori 2.

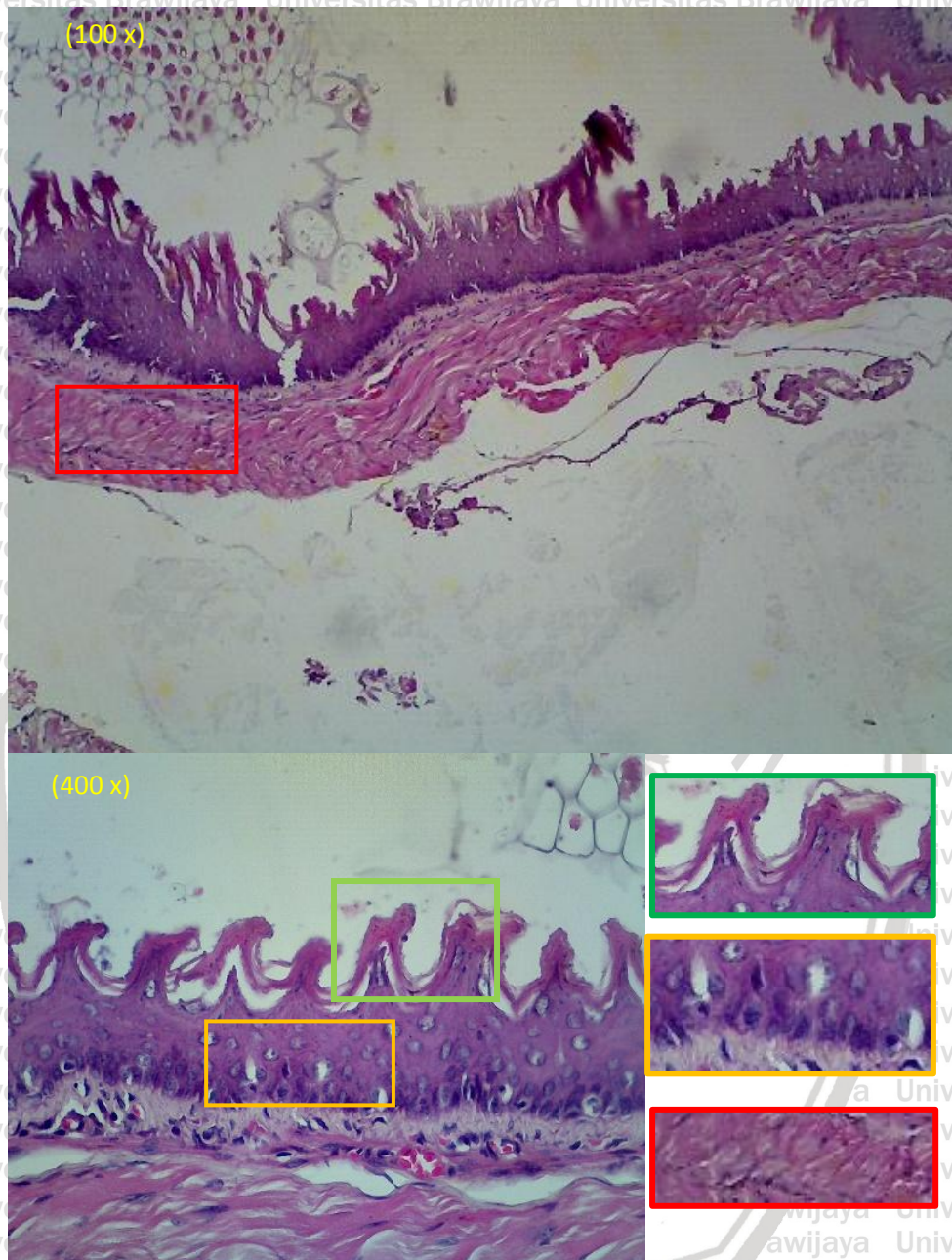
5.3 Pengaruh Pemberian Kombinasi Ekstrak Kopi Robusta Lampung dan Bakteri *Lactobacillus acidophilus* terhadap Gambaran Histopatologi Sekum

Parameter lain yang digunakan dalam penelitian ini adalah histopatologi organ sekum yang diwarnai dengan *Hematoxylin Eosin* untuk melihat efek

pemberian kombinasi ekstrak Kopi Robusta Lampung dan *L. acidophilus* dalam mencegah kerusakan sekum.

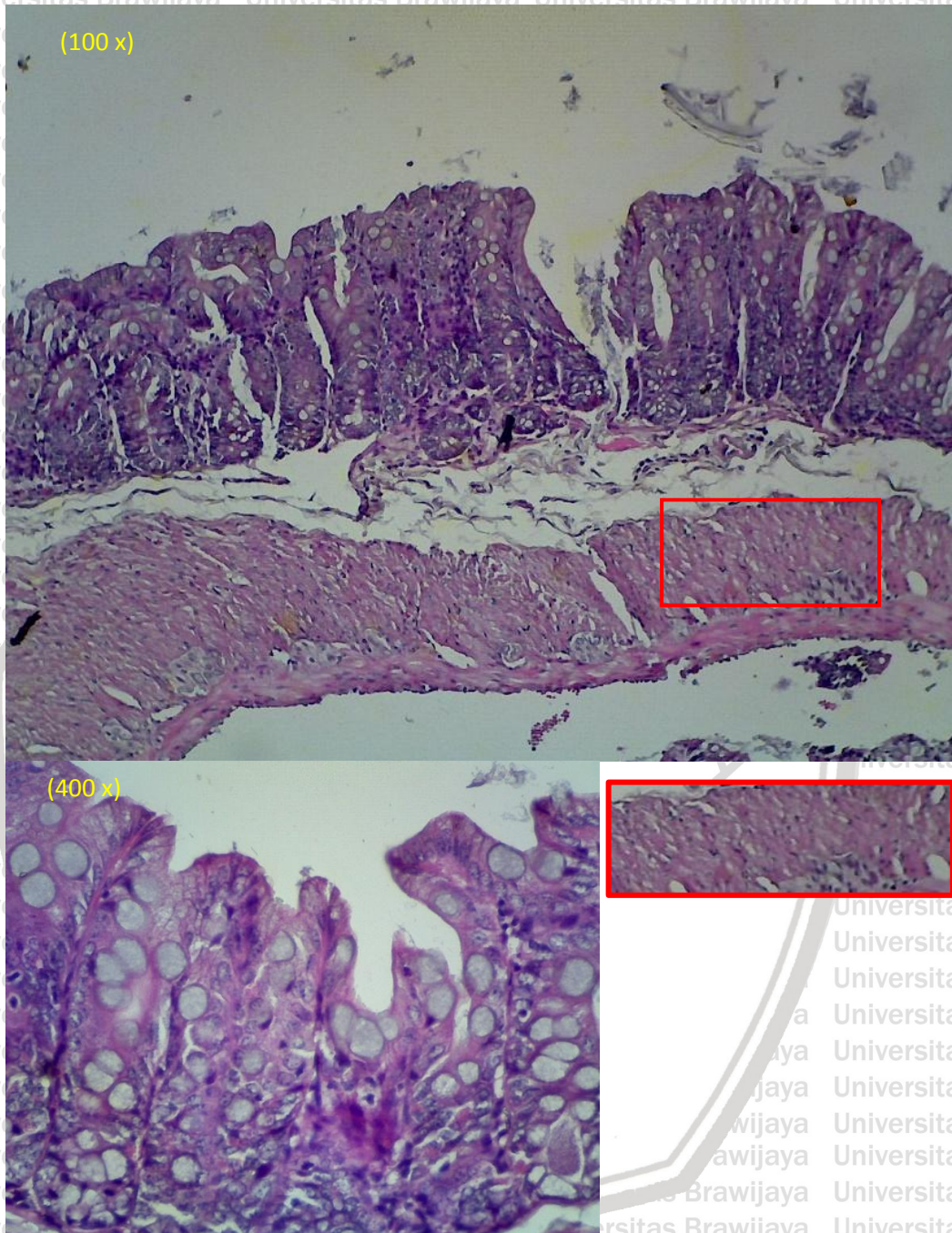


Gambar 5.1 Histopatologi sekum kelompok kontrol negatif. Epitel tampak normal (kotak oranye). Sel goblet normal (kotak hijau).

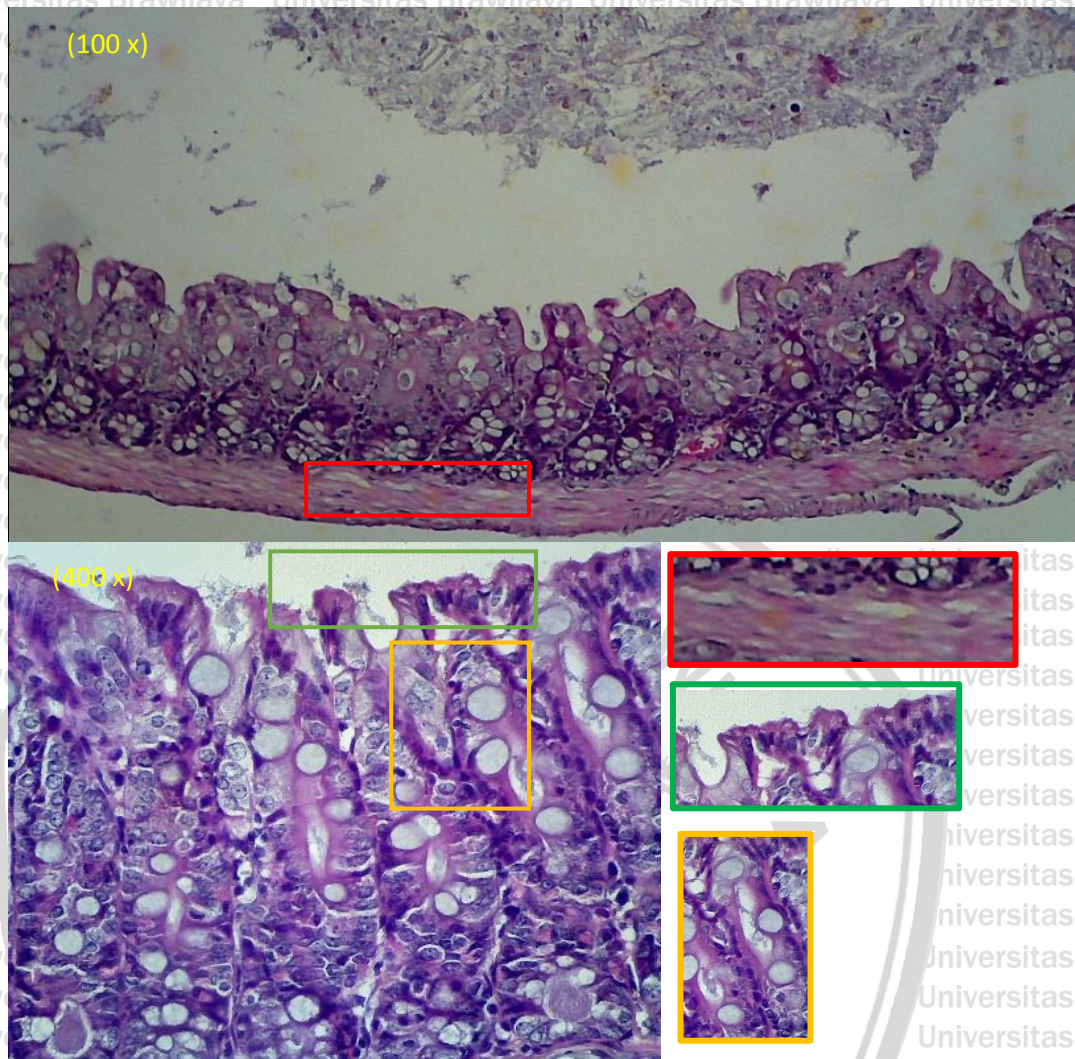


Gambar 5.2 Histopatologi sekum kelompok kontrol positif.

Tampak edema submukosa (kotak merah), hipoplasia sel goblet (kotak oranye), epitel rusak ditandai hilangnya sel kolumner epitel (kotak hijau).

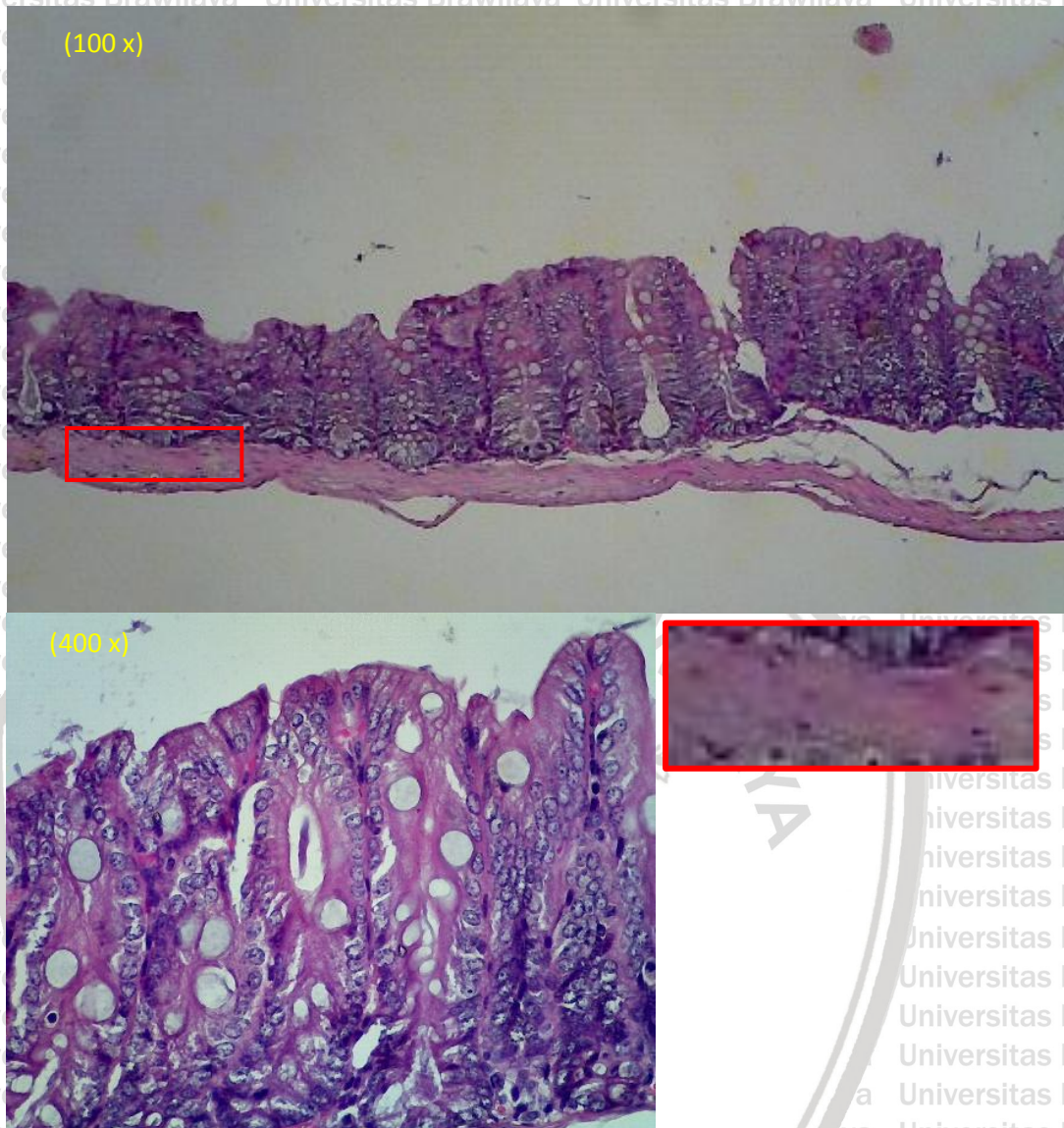


Gambar 5.3 Histopatologi sekum kelompok kontrol Lacto.
Tampak edema submukosa (kotak merah).

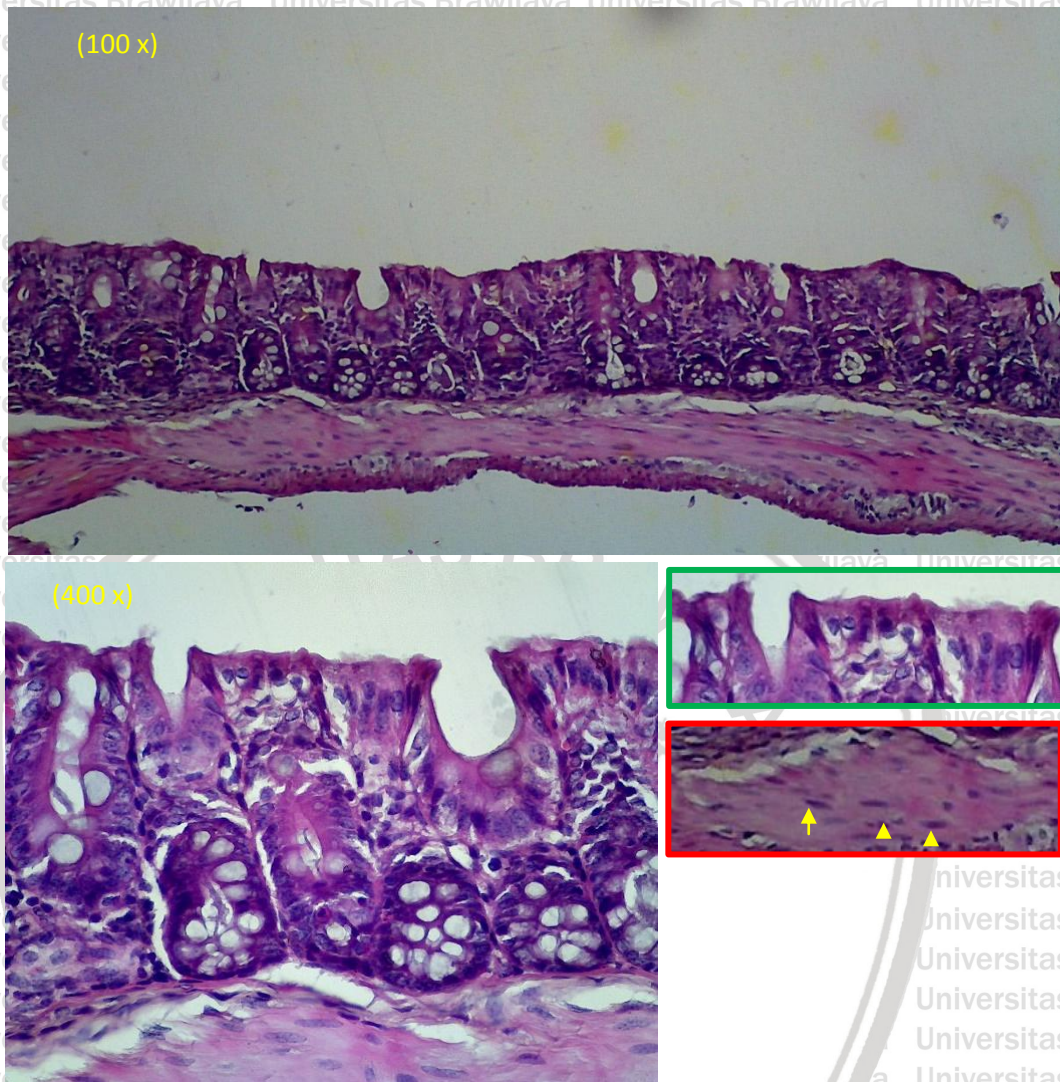


Gambar 5.4 Histopatologi sekum kelompok perlakuan 1.

Tampak sedikit edema submukosa (kotak merah), sel goblet tampak normal (kotak oranye), epitel tampak normal (kotak hijau).



Gambar 5.5 Histopatologi sekum kelompok perlakuan 2.
Tampak sedikit edema submukosa (kotak merah).



Gambar 5.6 Histopatologi Sekum Kelompok Perlakuan 3.
Tampak edema submukosa yang nyata (kotak merah), epitel normal (kotak hijau). Adanya infiltrasi Makrofag (panah kuning).

Hasil histopatologi di kelompok kontrol negatif yang sehat dan tidak diberikan perlakuan apapun mempunyai gambaran sekum normal dimana sel epitel (kolumner selapis) terlihat jelas dan tidak terjadi kerusakan. Sel goblet normal tidak tampak adanya hipoplasia (**Gambar 5.2**). Ukuran vili baik lebar dan panjangnya secara makros terlihat sama tanpa adanya pelebaran karena infiltrasi sel radang. Histopatologi dari kelompok ini akan dijadikan pembandingan dengan kelompok perlakuan lainnya.

Histopatologi kelompok kontrol positif terlihat vili sudah kehilangan bentuk aslinya yang disebabkan oleh parahnya erosi atau ruptur vili yang terjadi, sehingga tidak tampak sel kolumner penyusun epitel, sel goblet hampir tidak ditemukan atau mengalami hipoplasia, edema submukosa, dan ukuran vili mengecil (**Gambar 5.3**). Hal ini disebabkan oleh infeksi *S. enterica* yang mempunyai LPS dan antigen Vi, H, dan O yang akan menginduksi munculnya sel radang ke sumber infeksi salah satunya makrofag. Makrofag akan memproduksi ROS sebagai salah satu sistem pertahanan tubuh untuk menghancurkan bakteri. Peningkatan ROS yang merupakan oksidan secara terus menerus dapat merusak susunan membran lipid epitel, sehingga lama kelamaan struktur vili akan rusak.

Faktor adanya endotoksin dan enterotoksin yang dilepaskan oleh bakteri *S. enterica* juga bisa menyebabkan kerusakan pada vili. Menurut Marchelletta et al (2014), pada mencit model streptomycin infeksi *S. enterica* akan menyebabkan edema submukosa, edema sekum, hipoplasia sel goblet, dan kerusakan epitel sekum. Edema submukosa terjadi karena peningkatan permeabilitas yang diakibatkan infiltrasi sel radang menuju tempat infeksi, sedangkan hipoplasia sel

goblet diakibatkan adanya infeksi oleh *S. enterica*, sehingga sel goblet di intestine akan merespon dengan mengeluarkan mukus dari sel goblet secara terus menerus sehingga sel goblet akan kosong, mengecil, kemudian tampak menghilang di pewarnaan HE (Songhet et al, 2011).

Kelompok kontrol lacto menunjukkan hasil yang kurang baik dimana terlihat kerusakan vili seperti adanya erosi di sebagian epitel, adanya fusi vili, dan edema submukosa tetapi terlihat adanya peningkatan jumlah sel goblet atau hiperplasia sehingga kondisi vili masih lebih baik apabila dibandingkan kontrol positif (**Gambar 5.4**). Hiperplasia sel goblet yang tampak pada histopat disebabkan oleh adanya induksi *L. acidophilus* sebagai preventif yang diketahui fungsinya sebagai imunomodulator terutama IgA, sehingga adanya peningkatan IgA akan menginduksi produksi mukus. Galdeano et al (2019) menyatakan bahwa, mukus bertindak sebagai pertahanan pertama terhadap adanya antigen dengan cara berikatan dengan Ig A dan membentuk “*immune exclusion*” lalu menangkap dan membunuh bakteri sehingga bakteri tidak dapat melakukan adhesi ke vili intestine. Kerusakan vili yang ditemukan pada histopat disebabkan oleh pemberian *L. acidophilus* secara tunggal tidak cukup kuat untuk mencegah adhesi dan invasi *S. enterica*. Arguello et al (2017) menyatakan bahwa, pada pemberian dosis Salmonella yang tinggi inflamasi yang terjadi dapat menurunkan ekspresi gen yang mengkode transport asam empedu sehingga mengganggu penyerapan garam empedu di intestine. Garam empedu yang tinggi di intestine ini dapat menurunkan jumlah *L. acidophilus* di intestine.

Kelompok perlakuan 1, 2, dan 3 yang diberikan kombinasi ekstrak Kopi Robusta Lampung dan *L. acidophilus* tampak tidak berbeda nyata. Histopatologi ketiga kelompok ini tidak menunjukkan adanya kerusakan vili seperti pada kontrol positif maupun kontrol lacto hal ini disebabkan oleh adanya pemberian kombinasi ekstrak Kopi Robusta Lampung dan *L. acidophilus*. Bakteri *L. acidophilus* berfungsi sebagai imunomodulator dan meningkatkan produksi mukus di intestine sehingga bakteri akan ditangkap oleh mukus (Galdeano et al, 2019), serta adanya kompetisi antara bakteri *L. acidophilus* dengan *S. enterica* akan mengurangi kesempatan *S. enterica* untuk beradhesi di vili.

Ekstrak Kopi Robusta Lampung yang digunakan dalam penelitian telah diuji fitokimia dan LC-MS (**Lampiran 7**) dan diketahui estrak kopi mempunyai kandungan alkaloid salah satunya kafein, asam klorogenat, flavonoid, tannin, dan saponnin. Kandungan alkaloid, asam klorogenat, flavonoid, dan tannin dalam ekstrak kopi dapat membantu efisiensi sistem imunitas tubuh karena sifat antibakterinya yang bekerja mengurangi jumlah *S. enterica* yang masuk. Asam klorogenat yang juga bersifat antioksidan akan menetralkan ROS yang bersifat oksidan sehingga kerusakan vili dapat dicegah (Wulandari, 2016). Apabila dibandingkan histopatologi sekum perlakuan 1,2 dan 3 yang tampak mendekati histopatologi normal (Kontrol negatif) dimana tidak ada bentuk kerusakan seperti erosi maupun ruptur vili, mukosa tampak utuh dengan bentuk seperti ibu jari, dan tidak ada perubahan pada sel goblet adalah P1 (**Gambar 5.5**). Histopatologi pada kelompok perlakuan 2 (**Gambar 5.6**) dan perlakuan 3 (**Gambar 5.7**) juga terlihat baik terbukti dari sel epitel yang masih utuh tidak tampak adanya erosi dan ruptur

akan tetapi pada perlakuan 2 tampak edema submukosa dengan bentuk vili yang tidak teratur, sedangkan di perlakuan 3 terlihat edema submukosa dan infiltrasi monosit yang lebih nyata. Penampang histopatologi ini menunjukkan pemberian kombinasi P1 yaitu ekstrak Kopi Robusta Lampung 250 mg/kg BB dan *L. acidophilus* mempunyai efek paling baik untuk mencegah kerusakan sekum karena memiliki tampilan histopat mendekati kontrol negatif.

5.4 Pengaruh Pemberian Kombinasi Ekstrak Kopi Robusta Lampung dan Bakteri *Lactobacillus acidophilus* terhadap Jumlah Sel Goblet di Sekum

Salah satu ciri dari infeksi *S. enterica* adalah hipoplasia pada sel goblet (Songhet et al, 2011), sehingga pada penelitian ini dilakukan perhitungan sel goblet dengan mengambil 5 lapang pandang/ulangan kemudian dirata-rata dimana data perhitungan jumlah sel goblet dapat dilihat di **Lampiran 11**. Sel goblet atau sel piala adalah sel sekretori yang dapat ditemukan di intestinal dimana jumlahnya akan meningkat di bagian *intestinum crasum* terutama di kolon distal dan rektum. Sel goblet mempunyai fungsi penting untuk sintesis dan sekresi mukus ke lumen intestine. Mukus ini akan melubrikasi bagian lumen, sebagai pertahanan terhadap bakteri patogen, sebagai substrat dan sebagai tempat bagi bakteri komensal untuk berkolonisasi (Bergstrom et al, 2008).

Perhitungan jumlah sel goblet menurut Stecher et al (2005) dibagi menjadi 4 kategori yaitu (0) rata-rata jumlah sel goblet lebih dari 28 sel/ lapang pandang, (1) rata-rata jumlah sel goblet 11-28 sel/ lapang pandang, (2) rata-rata jumlah sel goblet 1-10 sel/ lapang pandang, dan (3) rata-rata jumlah sel kurang dari 1 sel/

lapang pandang. Perhitungan jumlah sel goblet dapat dilihat pada **Tabel 5.3** berikut :

Tabel 5.3 Jumlah dan skoring sel goblet

Perlakuan	Rata-rata Jumlah Sel Goblet	Skoring	Keterangan (sel/lapang pandang)
K-	29,2	0	< 28
K+	22,25	1	11-28
KLac	28	1	11-28
P1	26,73	1	11-28
P2	24,05	1	11-28
P3	24,06	1	11-28

Rata-rata jumlah sel goblet pada kelompok kontrol negatif sejumlah 29,2 tergolong ke dalam skoring 0. Hasil ini didapat dikarenakan mencit pada kelompok ini sehat dan tidak diberikan perlakuan apapun, hal ini juga didukung oleh pendapat Stecher et al (2005) yang mengatakan bahwa, rata-rata jumlah sel goblet normal pada mencit SPF adalah 28 sel/lapang pandang. Jumlah sel goblet pada kontrol positif memiliki angka paling rendah walaupun masih tergolong skoring 1. Menurut Mansson et al (2012), infeksi dari *S. enterica* dapat menyebabkan kerusakan epitel dan proliferasi yang akan berlanjut pada menipisnya atau berkurangnya sel goblet. Kelompok perlakuan kontrol positif mempunyai jumlah sel goblet yang paling rendah dikarenakan tidak ada pemberian kombinasi Ekstrak Kopi Robusta Lampung dan *L. acidophilus* yang

dapat mencegah *S. enterica* untuk adhesi dan invasi di mukosa intestine. Infeksi dari *S. enterica* akan menginduksi keluarnya mukus dari sel goblet sehingga lama kelamaan sel goblet akan kosong dan mengecil, sehingga tampak hilang saat dilakukan pewarnaan HE (Songhet et al, 2011). Sel goblet pada kontrol positif mempunyai jumlah paling sedikit akan tetapi masih termasuk ke dalam skoring 1, penurunan yang tidak signifikan ini disebabkan oleh infeksi *Salmonella* yang berfokus menyerang *Payer patches* yang dominan ada di ileum (Santos et al, 2003), sehingga sekum yang tidak mempunyai *Payer patches* mempunyai kerusakan yang tidak begitu parah terlihat dari jumlah sel goblet yang masih masuk ke dalam skoring 1.

Kelompok perlakuan *L. acidophilus* menunjukkan skoring 1 tetapi jumlah sel goblet menunjukkan angka 28 sel/lapang pandang dimana angka ini normal pada mencit SPF (Stecher et al, 2005). Hasil ini berbeda nyata dengan kontrol positif karena adanya pemberian *L. acidophilus* yang bersifat sebagai imunomodulator terutama IgA yang nantinya akan berikatan dengan mukus sehingga akan menginduksi hiperplasia sel goblet (Galdeano et al, 2019). Liu et al (2019) juga menyatakan bahwa, pemberian campuran *Lactobacillus* dan *Bacillus* pada babi yang diinfeksi *S. infantis* dapat meningkatkan sel goblet karena sifatnya sebagai probiotik dapat meningkatkan integritas barrier dari intestine dan melindungi intestine dari kerusakan akibat invasi *Salmonella*.

Kelompok perlakuan 1, 2, dan 3 mempunyai hasil skoring 1 dengan jumlah sel goblet masing-masing 26,73 sel/lapang pandang, 24,05 sel/lapang pandang, dan 24,06 sel/lapang pandang. Angka ini menunjukkan hasil yang lebih tinggi

apabila dibandingkan dengan kelompok perlakuan kontrol positif karena adanya pemberian kombinasi Ekstrak Kopi Robusta Lampung dan *L. acidophilus*. Ekstrak Kopi Robusta Lampung mempunyai kandungan kafein, asam klorogenat, tanin, dan flavonoid yang bersifat anti bakteri sehingga dapat membunuh bakteri *S. enterica* dan mengurangi jumlah *S. enterica* yang masuk, serta kandungan oligosakarida dapat menjadi sumber nutrisi dan mendukung pertumbuhan *L. acidophilus*. *L. acidophilus* sendiri juga berperan sebagai probiotik dan imunomodulator yang dapat mengurangi adhesi dari *S. enterica* serta memperkuat barier perlindungan di intestine, sehingga kombinasi Ekstrak Kopi Robusta Lampung dan *L. acidophilus* dapat mengurangi kerusakan dari sel goblet akibat invasi *S. enterica*. Perbandingan hasil jumlah sel goblet pada Perlakuan 1,2, dan 3 didapatkan hasil perlakuan 1 mempunyai jumlah sel goblet paling tinggi, sehingga dapat diketahui kombinasi Ekstrak Kopi Robusta Lampung 250 mg/kg BB dan *L. acidophilus* paling efektif dalam mencegah hipoplasia sel goblet.

5.5 Pengaruh Pemberian Kombinasi Ekstrak Kopi Robusta Lampung dan Bakteri *Lactobacillus acidophilus* terhadap Jumlah SOD Hepar

Data hasil *flowcytometri* SOD hepar yang didapatkan diuji normalitas serta homogenitasnya dan didapatkan data yang telah terdistribusi normal. Data tersebut kemudian dilanjutkan dengan uji ANOVA dan uji *Tukey* untuk melihat apakah ada perbedaan yang signifikan pada jumlah SOD hepar antar perlakuan yang dapat dilihat di **Tabel 5.4** dan **Gambar 5.8**

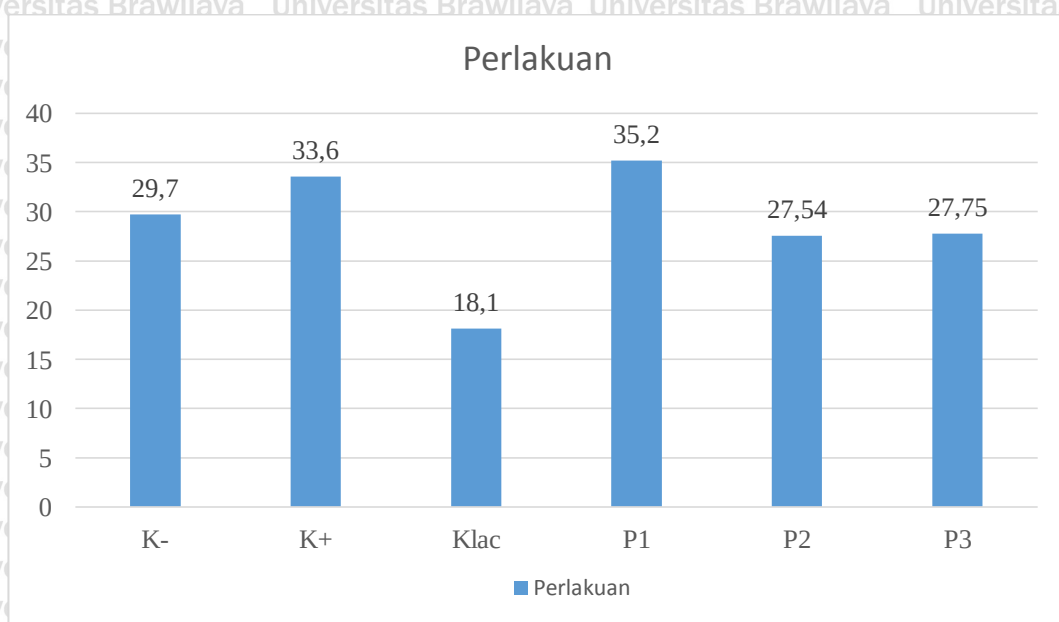
Tabel 5.4 Hasil Uji ANOVA dan Uji *Tukey* Jumlah SOD Hepar

Perlakuan	Ulangan				Total	Rata-rata
	1	2	3	4		
K-	26.01	33.76	28.53	30.75	194,29	29,7±3,29 ^b
K+	32.49	30.84	26.84	44.35	134,52	33,6±7,53 ^b
KLac	16.69	21.10	17.63	17.22	72,64	18,1±1,99 ^a
P1	31.91	37.54	29.34	42.37	141,6	35,2±5,83 ^b
P2	26.21	28.08	26.25	29.63	110,17	27,54±1,64 ^{ab}
P3	26.18	26.95	26.69	31.19	111,28	27,75±6,8 ^{ab}

ket : Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan setiap perlakuan ($p < 0,05$)

Tabel 5.5 Perbandingan jumlah SOD hepar terhadap K+

Perlakuan	Rata-rata	Peningkatan terhadap K+	Penurunan terhadap K+
K-	29,7±3,29 ^b	-	3,9%
K+	33,6±7,53 ^b	-	-
KLac	18,1±1,99 ^a	-	85,6%
P1	35,2±5,83 ^b	4,5%	-
P2	27,54±1,64 ^{ab}	-	22%
P3	27,75±6,8 ^{ab}	-	21,08%



Gambar 5.7 Grafik Jumlah SOD Hepar

Superoksida dismutase (SOD) merupakan sistem antioksidan primer yang dikeluarkan oleh tubuh sebagai respon terhadap adanya antioksidan seperti ROS saat proses fagositosis oleh makrofag. Hepar merupakan salah satu organ mempunyai aktivitas SOD paling besar dan mempunyai pertahanan terhadap oksidan yang lebih efektif apabila dibandingkan dengan organ lainnya (Utami, 2011). Hasil kontrol negatif yang tidak diberi perlakuan mempunyai angka 29,7 dimana angka ini tinggi karena SOD ada di dalam tubuh secara normal atau dalam kondisi sehat untuk mempersiapkan tubuh apabila terdapat antigen yang masuk ke dalam tubuh. Angka dari kontrol negatif ini akan digunakan sebagai parameter pembandingan dengan kelompok perlakuan lainnya.

Kelompok perlakuan positif mempunyai jumlah SOD yang lebih tinggi daripada kontrol negatif. Hasil ini berbeda dengan penelitian Fowa et al (2019) yang menyatakan bahwa tikus yang diinfeksi salmonella mengalami penurunan SOD di semua organ, sedangkan pada penelitian ini justru mengalami

peningkatan. Hal ini dikarenakan kelompok kontrol positif tidak diberikan kombinasi Ekstrak Kopi Robusta Lampung dan *L. acidophilus* kemudian diinfeksi dengan *S. enterica* sehingga tubuh akan merespon dengan menstimulasi sitokin pro inflamasi untuk mendatangkan sel fagosit, salah satunya makrofag. Makrofag akan membunuh bakteri secara langsung dengan cara *respiratory burst* yang akan menghasilkan ROS. Jumlah ROS yang meningkat akan menginduksi SOD sebagai antioksidan primer dalam tubuh untuk menetralisir ROS, sehingga pada saat fase awal inflamasi jumlah SOD akan naik (Dey dan Bishayi, 2016).

Kelompok kontrol lacto menunjukkan hasil SOD hepar paling rendah dimana hal ini bisa disebabkan oleh pemberian *L. acidophilus* secara tunggal tidak dapat mencegah adhesi dan invasi dari *S. enterica*. *L. acidophilus* di dalam tubuh mampu menginduksi produksi mukus dan juga Ig A. Galdeano et al (2019) menyatakan bahwa mukus bertindak sebagai pertahanan pertama terhadap adanya antigen dengan cara berikatan dengan Ig A dan membentuk “*immune exclusion*” lalu menangkap dan membunuh bakteri tanpa melibatkan proses inflamasi. Tanpa adanya proses inflamasi yang menghasilkan produk berupa ROS maka SOD dalam tubuh tidak akan terinduksi sehingga jumlah SOD hepar yang ditemukan hanya sedikit.

Kelompok perlakuan 1 menunjukkan jumlah SOD hepar yang paling tinggi dibandingkan kelompok perlakuan lainnya yaitu sejumlah 35,2. Hal ini disebabkan oleh pemberian kombinasi Ekstrak Kopi Robusta Lampung 250 mg/kg BB dan *L. acidophilus* yang mempunyai efek sinergis dalam menghambat adhesi maupun invasi dari *S. enterica*. Ekstrak Kopi Robusta Lampung yang

mengandung kafein (alkaloid), tannin, asam klorogenat, dan flavonoid dapat membunuh bakteri yang masuk. Asam klorogenat juga bekerja sebagai antioksidan yang dapat membantu kerja SOD, selain itu asam klorogenat juga dapat meningkatkan produksi SOD, katalase, dan GPx. Asam klorogenat yang masuk akan meningkatkan ekspresi Nuclear factor E2-related factor 2 (Nfr2) sehingga SOD akan terekspresi lebih banyak (Ma, 2011). Hasil SOD dari perlakuan 2 dan perlakuan 3 adalah 27,54 dan 28,7 dimana hasil tidak berbeda nyata dengan kontrol negatif. Hal ini disebabkan oleh pemberian kombinasi ekstrak Kopi Robusta Lampung yang lebih tinggi pada perlakuan 2 dan 3 menyebabkan peningkatan asam lambung dan gerak peristaltik di intestine akibat tingginya kandungan kafein (Ilham dkk, 2019), sehingga pada perlakuan 2 dan 3 pemberian kombinasi hanya mampu untuk mempertahankan jumlah SOD hepar tanpa bisa meningkatkan jumlah SOD hepar seperti perlakuan 1 (Utami, 2011), sehingga dari hasil yang ada dapat diketahui bahwa perlakuan 1 yaitu kombinasi ekstrak Kopi Robusta Lampung 250 mg/kg BB dan *L. acidophilus* paling efektif dalam mencegah salmonellosis apabila dilihat dari jumlah SOD hepar.

Hubungan dari keempat parameter penelitian yaitu hasil pemeriksaan feses, tingkat kerusakan histopatologi sekum, jumlah sel goblet, dan jumlah SOD hepar menunjukkan hasil yang linier. Hasil pemeriksaan feses Perlakuan 1 mempunyai tampilan feses kategori 2 atau normal. Histopatologi sekum Perlakuan 1 juga menunjukkan tidak adanya kerusakan vili diikuti dengan jumlah sel goblet pada Perlakuan 1 yang mempunyai jumlah mendekati normal sehingga tidak terjadi proses kerusakan vili dan hipoplasia sel goblet akibat infeksi *S. enterica*. Hasil

jumlah SOD hepar pada Perlakuan 1 juga mempunyai jumlah paling tinggi, sehingga dapat diketahui bahwa pemberian preventif kombinasi ekstrak Kopi Robusta Lampung 250 mg/kg BB dan *L. acidophilus* merupakan dosis terbaik dalam mencegah infeksi *Salmonella enterica*.



BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan analisa dalam penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. Pemberian kombinasi ekstrak Kopi Robusta Lampung (*Coffea canephora*) dan *Lactobacillus acidophilus* dapat mencegah kerusakan sekum dan hipoplasia sel goblet pada mencit yang diinduksi *Salmonella enterica* dengan dosis terbaik yaitu ekstrak Kopi Robusta Lampung 250 mg/kg BB.
2. Pemberian kombinasi ekstrak Kopi Robusta Lampung (*Coffea canephora*) dan *Lactobacillus acidophilus* dapat menaikkan jumlah SOD hepar pada mencit yang diinduksi *Salmonella enterica* dengan dosis terbaik yaitu ekstrak Kopi Robusta Lampung 250 mg/kg BB.

6.2 Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya antara lain :

1. Dilakukan uji konfirmasi ulang bakteri *Salmonella enterica* untuk mengetahui serovar spesifik dari bakteri tersebut.
2. Dilakukan penelitian mengenai aplikasi ekstrak Kopi Robusta Lampung (*Coffea canephora*) pada hewan lain seperti unggas untuk mencegah salmonellosis.

DAFTAR PUSTAKA

Akbar, C. 2016. Pengaruh Pemberian Es Krim Dadih sebagai Proteksi terhadap Infiltrasi Limfosit dan Kerusakan Mukosa Usus Mencit (Mus Musculus) Strain Balb/C yang Diinfeksi dengan Salmonella Typhimurium. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Andalas.

Amaliah, Z. Z. N. dkk. 2018. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat dari Limbah Cair Rendaman Kacang Kedelai. *JFFI*. 5(1): 253-257.

Anggarini, W. 2011. *Pengaruh Pemberian Yogurt Kombinasi Berbasis Probiotik Indigenus terhadap Profil Histologi dan Kandungan Immunoglobulin A (Ig A) Intestine Halus Tikus percobaan*. [Skripsi]. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor.

Arguello, H. et al. 2017. Early Salmonella Typhimurium Infection in Pigs Disrupts Microbiome Composition and Functionality Principally at The Ileum Mucosa. *Scientific Reports*. 8.

Asminarti. 2014. *Pengaruh Berbagai Konsentrasi Ekstrak Daun dan Kulit Buah Manggis (Garcinia mangostana L.) terhadap Zona Hambat Pertumbuhan Bakteri Salmonella enteritidis secara In Vitro*. [Skripsi]. Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Muhammadiyah Malang.

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

Bergstrom, K. S. B. et al. 2008. Modulation of Intestinal Goblet Cell Function during Infection by an Attaching and Effacing Bacterial Pathogen. *Infection and Immunity*. 7: 796–811.

Chalinia, W. 2016. *Pengaruh Penambahan Buah Mengkudu (Morinda citrifolia L.) Terhadap Aktivitas Antioksidan dan Kadar Kafein Biji Kopi Robusta (Coffea canephora)*. [Skripsi]. Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan. Universitas Bengkulu.

Darmawan, A. 2017. *Identifikasi Salmonella sp. pada Daging Ayam Broiler di Pasar Tradisional Kota Makassar*. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Hasanuddin.

Dey, S. dan Bishayi, B. 2016. Riboflavin Along With Antibiotics Balances Reactive Oxygen Species and Inflammatory Cytokines and Controls Staphylococcus aureus Infection by Boosting Murine Macrophage Function and Regulates Inflammation. *Journal of Inflammation*. 13.

Fahryl, N. 2019. *Pengaruh Pemberian Kopi Robusta (Coffea canephora var. Robusta) dengan Tingkat Sangrai Terhadap Penurunan Kadar Glukosa Darah*. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Lampung.

Fowa, A. B. et al. 2019. Antityphoid and antioxidant activities of Hydroethanolic Leaf Extract of *Adenia lobata* Jacq. (Passifloraceae) on *Salmonella typhi* Infected Wistar Rats. *Journal of Medicinal Plants Studies*.7(1): 13-22.

Galdeano, C.M., Cazrola, S.I., Dumit, J.M.L., et al. 2019. Beneficial Effects of Probiotic Consumption on the Immune System. *Ann Nutr Metab*. Vol. 74:115–124.

Grace, H. A. 2017. Inventarisasi Organoleptik, Kandungan Kafein, dan Asam Klorogenat pada Kopi Bubuk Robusta (*Coffea Canephora* L.) di Kabupaten Tanggamus. [Skripsi]. Fakultas Pertanian. Universitas Lampung.

Hasaanah, I. W. 2009. *Pengaruh Ekstrak Daun Pegagan (Centella asiatica) Terhadap Spermatogenesis Mencit (Mus musculus)*. [Skripsi]. Fakultas Sains dan Teknologi. UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

Ilham, M. I. dkk. 2019. Hubungan Pola Konsumsi Kopi terhadap Kejadian Gastritis pada Mahasiswa Muhammadiyah Parepare. *Jurnal Ilmiah Manusia dan Kesehatan*. 2(3).

Juliantari dkk. 2018. Karakteristik Ekstrak Ampas Kopi Bubuk Robusta (*Coffea Canephora*) Pada Perlakuan Konsentrasi Pelarut Etanol Dan Suhu Maserasi. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*. 6(3): 243-249.

Kusumaningsih, A. 2011. Patogenisitas *Salmonella enteritica* Serotipe enteritidis Isolat Lokal pada Anak Ayam dan Mencit. *Berita Biologi*. 10(4).

Klangpetch, W. 2017. Evaluation of antioxidant, anti-pathogenic and probiotic growth stimulatory activities of spent coffee ground polyphenol extracts. *International Food Research Journal*. 24(5): 2246-2252.

Lestari, D. J. T. 2018. *Pengaruh Pemberian Kopi Robusta Lampung terhadap Gambaran Histopatologi Arteri Koronaria Tikus Putih (Rattus norvegicus) Jantan Galur Sprague Dawey*. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Lampung.

Liang, N., and D. D. Kitts. 2014. Role of Chlorogenic Acid in Controlling Oxidative and Inflammatory Stress Conditions. *Nutrients*. 8(1): 8-16.

Liu, X et al. 2019. Oral Administration of a Select Mixture of *Lactobacillus* and *Bacillus* Alleviates Inflammation and Maintains Mucosal Barrier Integrity in the Ileum of Pigs Challenged with *Salmonella* *Infantis*. *Microorganisms*. 7(135).

- Ma, Q. 2011. Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 53 :401–426.
- Mangiwa S. dan Maryuni A. E. 2019. Skrining Fitokimia dan Uji Antioksidan Ekstrak Biji Kopi Sangrai Jenis Arabika (*Coffea arabica*) Asal Wamena dan Moanemani, Papua. *Jurnal Biologi Papua*. 11(2): 103–109.
- Marchelletta, R. R. et al. 2014. Salmonella-induced Diarrhea Occurs in the Absence of IL-8 Receptor (CXCR2)-Dependent Neutrophilic Inflammation. *Journal of Infectious Diseases*.
- Mansson, L. E. 2012. MyD88 Signaling Promotes Both Mucosal Homeostatic and Fibrotic Responses during Salmonella induced colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 303: G311-G323.
- Muhammad A. Y. dan Mumun N. 2015. Pengaruh Ekstrak Kopi Robusta (*Coffea robusta*) sebagai Penghambat Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. *Seminar Nasional XII Pendidikan Biologi FKIP UNS*.
- Naeli F. dan Muchtaridi. 2016. Tinjauan Kimia dan Aspek Farmakologi Senyawa Asam Klorengat pada Biji Kopi : Review. *Farmaka*. 14 (1).
- Pasaribu, N. 2012. *Karakteristik Penderita Ileus Obstruktif yang Dirawat Inap di RSUD dr. Pirngadi Medan Tahun 2007-2010*. [Skripsi]. Fakultas Kesehatan Masyarakat. Universitas Sumatera Utara.
- Priyanto, T. 2015. *Uji Imunomodulator Polisakarida Hasil Ekstraksi dari Jinten Hitam (Nigella sativa L.) Terhadap Total Leukosit, Jumlah Limfosit dan Monosit, serta Interleukin 1 β pada Mencit Balb/C*. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan. UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.
- Rachmawati, F. 2016. *Efek Anti Diare Berbagai Komposisi Probiotik pada Mencit yang Diinduksi Diare*. . [Skripsi]. Fakultas Farmasi. Universitas Airlangga.
- Rahmawati, D. 2012. Uji Daya Hambat Isolat Bakteri Usus Itik (*Anas domestica*) terhadap Bakteri Gram Positif dan Pertumbuhan Isolat Bakteri Usus Itik pada Media rs Broth. [Skripsi]. Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Lampung.
- Rifa'i M. 2011. *Autoimun dan Bioregulator*. UB Press. Malang. Hal 29-164.
- Rizkiani, I. 2009. *Pengaruh Pemberian Kopi Dosis Bertingkat Peroral Selama 30 Hari Terhadap Gambaran Histologi Lambung Tikus Wistar*. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Semarang.
- Santos, R. I. et al. 2003. Pathogenesis of Salmonella-induced enteritis. *Brazilian journal of medical and biological research*. 36: 3-12.

Senditya dkk. 2011. Efek Probiotik dan dan Kombinasi Simplisia Daun Cincau Hitam (*Mesona palustris* BL) secara In Vivo: Kajian Pustaka. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 2(3): 141-151.

Songhet, P. et al. 2011. Stromal IFN- γ -Signaling Modulates Goblet Cell Function During *Salmonella* Typhimurium Infection. *PLoS ONE*. 6(7).

Stecher et al. 2005. Comparison of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Colitis in Germfree Mice and Mice Pretreated with Streptomycin. *Infection and Immunity*. 73(6): 3228–3241.

Surati. 2012. *Pengaruh Ekstrak Daun Salam (Syzygium polyanthum) terhadap Aktivitas Makrofag pada Mencit Balb/c yang Diinfeksi Salmonella Typhimurium*. [Tesis]. Program Pasca Sarjana. Universitas Diponegoro.

Tambunan, A. R. 2016. *Karakteristik Probiotik Berbagai Jenis Bakteri Asam Laktat (BAL) pada Minuman Fermentasi Laktat Sari Buah Nanas*. [Skripsi]. Fakultas Pertanian. Universitas Lampung.

Tati, A. dan Supar. 2008. Antigenesitas dan Immunogenesitas *Salmonella enteritidis*: Implikasinya dalam Diagnosis dan Pengembangan Vaksin Isolat Lokal untuk Unggas. *WARTAZOA*. 18(4).

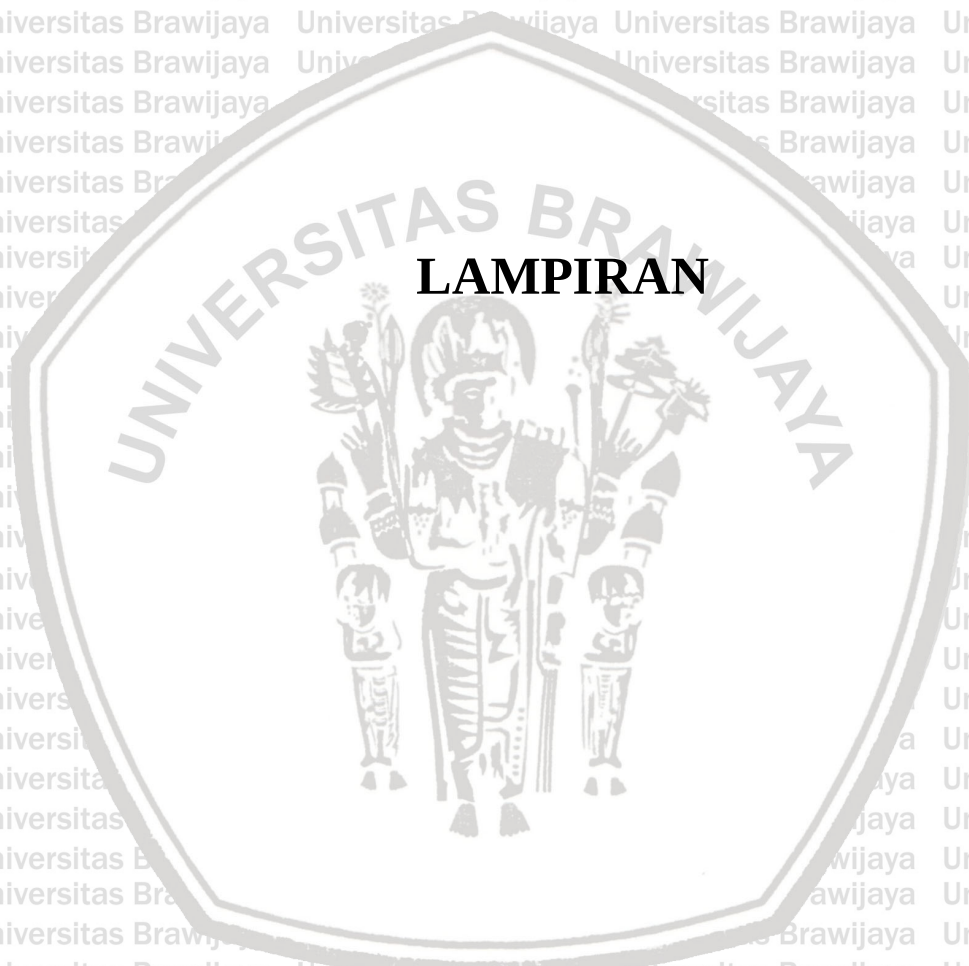
Utami, F. F. 2011. Efek Probiotik Indigenus Pada Profil Immunohistokimia Antioksidan Superoksida Dismutase (Sod) Di Hati Tikus Yang Dipapar Enteropathogenic *Escherichia Coli* (Epec). [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. IPB.

Wigati dkk. 2018. Uji Karakteristik Fitokimia Dan Aktivitas Antioksidan Biji Kopi Robusta (*Coffea Canephora* Pierre) Dari Bogor, Bandung Dan Garut Dengan Metode DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl). *Fitofarmaka*. 18(1).

Wiyarti, D. 2013. *Aktivitas Antibakteri Fraksi Metanol Ekstrak Etanol Daun Teh Hijau (Camellia sinensis (L.) terhadap Streptococcus mutans dan Lactobacillus acidophilus serta Bioautografinya*. [Skripsi]. Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta.

Wulandari, E. 2016. *Efek Ekstrak Kulit Buah Rambutan terhadap Kadar MDA dan SOD Tikus yang Dipapar Asap Rokok*. [Skripsi]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Negeri Semarang.

Yuswananda, N. P. 2015. *Identifikasi Bakteri Salmonella sp. pada Makanan di Jajanan Masjid Fatullah Ciputat Tahun 2015*. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan. UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.



Lampiran 1. Surat Keterangan Free Pathogen



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
LABORATORIUM JURUSAN BIOLOGI
Jl. Gajayana 50 Malang, telp. (0341) 558933

SURAT KETERANGAN PEMBELIAN HEWAN COBA

NOMOR : 006/HC/5/2019

Dengan ini menerangkan bahwa:

Nama : Nuha Rufaidah

Status : Mahasiswa Fakultas Kedokteran Hewan

Hp/ Telp. : 0877-8795-8008

telah membeli mencit Balb/C dengan kriteria sebagai berikut:

Jenis Kelamin : Jantan

Kondisi Hewan : Sehat (*Free Pathogen*)

Jumlah Hewan : 35 ekor

Umur Hewan : 2 Bulan

Berat badan rata-rata : 20-25 gr

Digunakan untuk : Penelitian

Asal Hewan : Lab. Fisiologi Hewan UIN Maulana Malik Ibrahim Malang

Demikian surat keterangan kami buat untuk dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Malang, 10 Mei 2019



M. Basyaruddin, M.Si

Lampiran 2. Laik Etik Penelitian



**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARENCE"**

No: 1110-KEP-UB

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:**

PENELITIAN BERJUDUL : PENGARUH KOMBINASI NANO PARTIKEL KOPI
LOKAL DAN PROBIOTIK *Lactobacillus Sp* SEBAGAI
IMUNOMODULATOR PADA MENCIT Balb C YANG
DIINFEKSI *Salmonella enteritidis*

PENELITI : DAHLIATUL QOSIMAH

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 20 Maret 2019
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya



Prof. Dr. Oet. Aulianis'am, DES.
NIP. 19600903 198802 2 001

NB: Nama yang terdapat pada sertifikat ini merupakan anggota peneliti

No	Nama	NIDN
1	INDAH AMALIA AMRI	0025098701
2	DODIK PRASETYO	2013048702131001
No	Nama	NIM
1	DIMAS AZMI YUNIARTA	165130101111066
2	FERNANDA SEPTI	165130100111004
3	M ZULIONO D. R. P	165130100111015
4	NUHA RUFADAH AL ANSHORIYYAH	165130107111044
5	DHYAS MEILANI	165130107111046

Lampiran 3. Perhitungan Dosis Ekstrak Kopi

Dosis P1 = 250 mg/kg BB; P2 = 500 mg/kg BB; P3 = 750 mg/kg BB

Konsentrasi = 1 gr/ml = 1000 mg/ml

Pelarut = 0,5 ml *Lactobacillus acidophilus*

Maka,

Perhitungan dosis

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

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

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

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

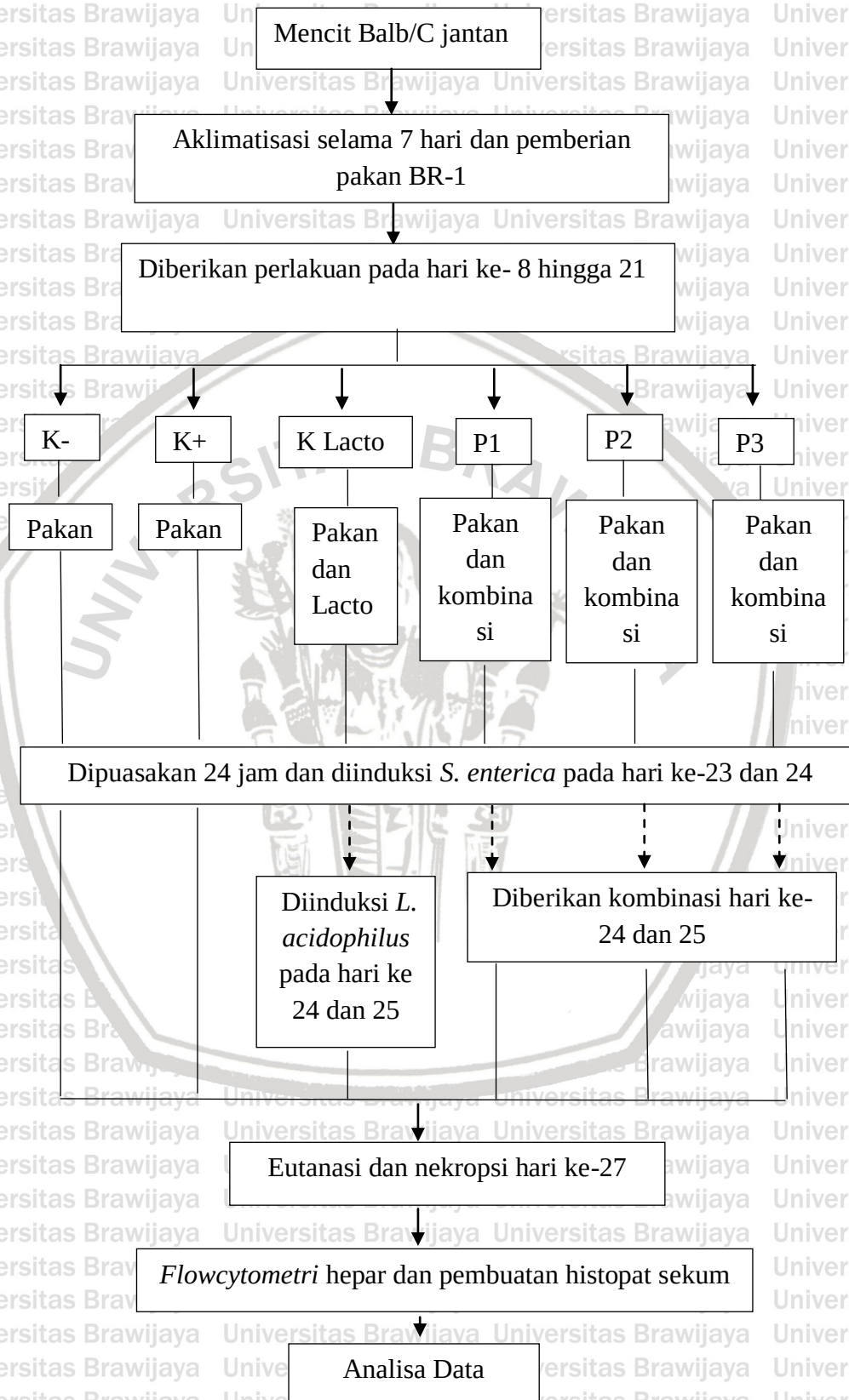
$$\text{IV(20)} = 750 \text{ mg/kg} \times \frac{27.8 \text{ kg}}{1000} = 20.85 \text{ mg} \rightarrow \frac{20.85 \text{ mg}}{21} \times 0.5 = 0.49 \text{ cc}$$

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

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

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

Lampiran 4. Kerangka Operasional



Lampiran 5. Statistika Jumlah SOD Hepar

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Unstandardized Residual
N		24
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	.0000000
	Std. Deviation	6.79647376
	Absolute	.158
Most Extreme Differences	Positive	.143
	Negative	-.158
Kolmogorov-Smirnov Z		.772
Asymp. Sig. (2-tailed)		.590

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Descriptives

SOD

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Maks
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol Negatif	4	29.7625	3.29421	1.64711	24.5207	35.0043	26.01	33.76
Kontrol Positif	4	33.6300	7.53008	3.76504	21.6480	45.6120	26.84	44.35
Kontrol Lacto	4	18.1600	1.99741	.99871	14.9817	21.3383	16.69	21.10
Perlakuan 1	4	35.2900	5.83140	2.91570	26.0109	44.5691	29.34	42.37
Perlakuan 2	4	27.5425	1.64242	.82121	24.9290	30.1560	26.21	29.63
Perlakuan 3	4	27.7525	2.31388	1.15694	24.0706	31.4344	26.18	31.19
Total	24	28.6896	6.81929	1.39198	25.8100	31.5691	16.69	44.35

Test of Homogeneity of Variances

SOD

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.538	5	18	.066

ANOVA

SOD

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	728.762	5	145.752	7.698	.001
Within Groups	340.801	18	18.933		
Total	1069.563	23			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: SOD

Tukey HSD

(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol Negatif	Kontrol Positif	-3.86750	3.07680	.803	-13.6457	5.9107
	Kontrol Lacto	11.60250 [*]	3.07680	.015	1.8243	21.3807
	Perlakuan 1	-5.52750	3.07680	.492	-15.3057	4.2507
	Perlakuan 2	2.22000	3.07680	.977	-7.5582	11.9982
	Perlakuan 3	2.01000	3.07680	.985	-7.7682	11.7882
Kontrol Positif	Kontrol Negatif	3.86750	3.07680	.803	-5.9107	13.6457
	Kontrol Lacto	15.47000 [*]	3.07680	.001	5.6918	25.2482
	Perlakuan 1	-1.66000	3.07680	.994	-11.4382	8.1182
	Perlakuan 2	6.08750	3.07680	.391	-3.6907	15.8657
	Perlakuan 3	5.87750	3.07680	.428	-3.9007	15.6557
Kontrol Lacto	Kontrol Negatif	-11.60250 [*]	3.07680	.015	-21.3807	-1.8243
	Kontrol Positif	-15.47000 [*]	3.07680	.001	-25.2482	-5.6918
	Perlakuan 1	-17.13000 [*]	3.07680	.000	-26.9082	-7.3518
	Perlakuan 2	-9.38250	3.07680	.064	-19.1607	.3957
	Perlakuan 3	-9.59250	3.07680	.056	-19.3707	.1857
Perlakuan 1	Kontrol Negatif	5.52750	3.07680	.492	-4.2507	15.3057
	Kontrol Positif	1.66000	3.07680	.994	-8.1182	11.4382
	Kontrol Lacto	17.13000 [*]	3.07680	.000	7.3518	26.9082
	Perlakuan 2	7.74750	3.07680	.170	-2.0307	17.5257
	Perlakuan 3	7.53750	3.07680	.191	-2.2407	17.3157
Perlakuan 2	Kontrol Negatif	-2.22000	3.07680	.977	-11.9982	7.5582
	Kontrol Positif	-6.08750	3.07680	.391	-15.8657	3.6907
	Kontrol Lacto	9.38250	3.07680	.064	-.3957	19.1607
	Perlakuan 1	-7.74750	3.07680	.170	-17.5257	2.0307
	Perlakuan 3	-.21000	3.07680	1.000	-9.9882	9.5682
Perlakuan 3	Kontrol Negatif	-2.01000	3.07680	.985	-11.7882	7.7682
	Kontrol Positif	-5.87750	3.07680	.428	-15.6557	3.9007
	Kontrol Lacto	9.59250	3.07680	.056	-.1857	19.3707
	Perlakuan 1	-7.53750	3.07680	.191	-17.3157	2.2407
	Perlakuan 2	.21000	3.07680	1.000	-9.5682	9.9882

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

SOD

Tukey HSD^a

kelompok	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Kontrol Lacto	4	18.1600	
Perlakuan 2	4	27.5425	27.5425
Perlakuan 3	4	27.7525	27.7525
Kontrol Negatif	4		29.7625
Kontrol Positif	4		33.6300
Perlakuan 1	4		35.2900
Sig.		.056	.170

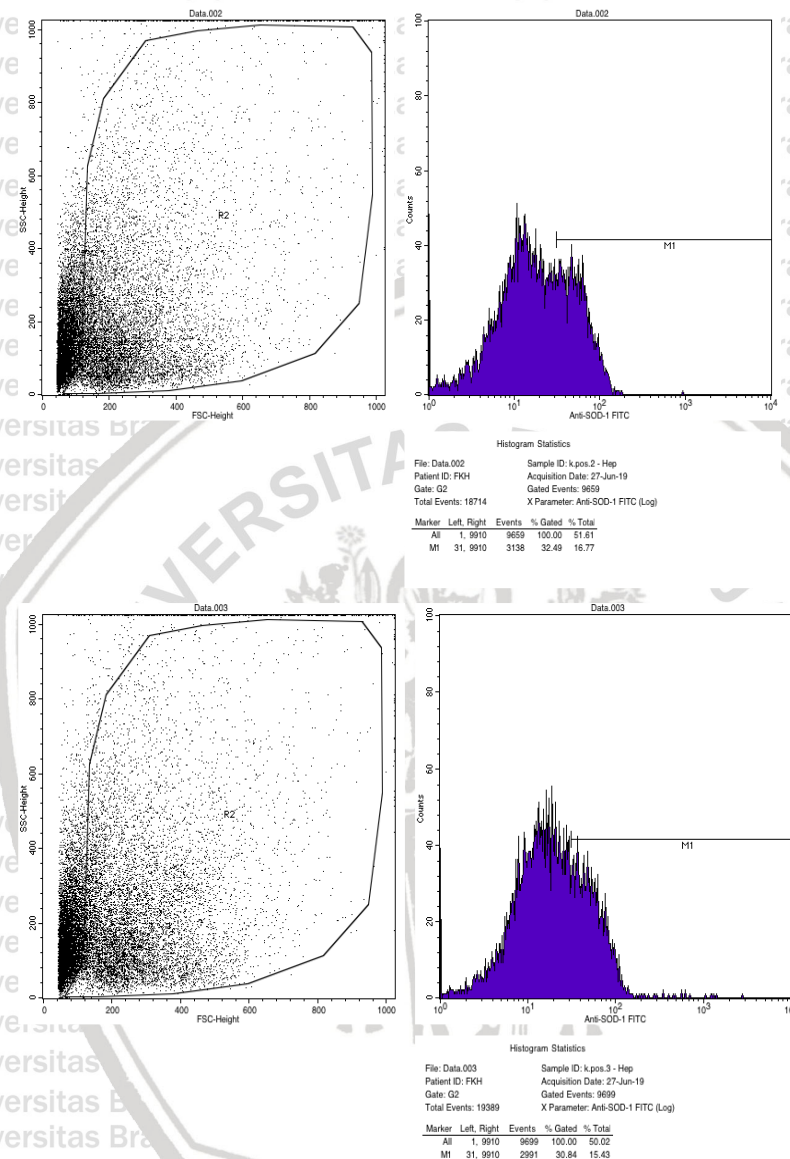
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

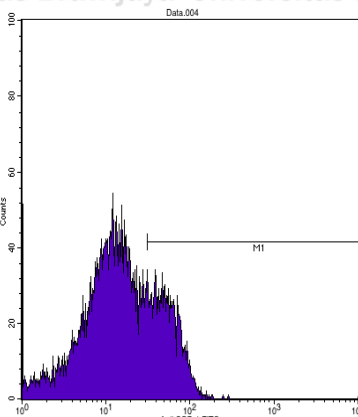
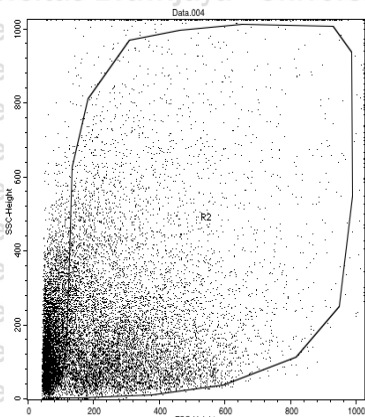
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.



Lampiran 6. Hasil *flowcytometri* SOD Hepar

Kontrol Positif

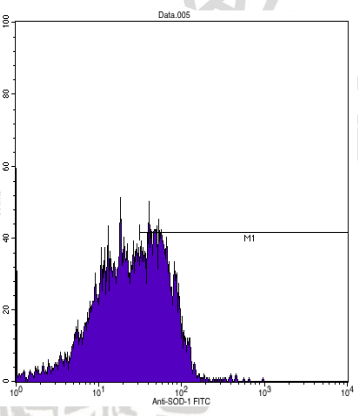
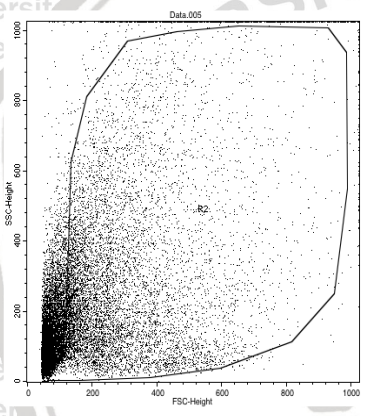




Histogram Statistics

File: Data.004 Sample ID: k.pos.4 - Hep
 Patient ID: FK01 Acquisition Date: 27-Jun-19
 Gate: G2 Gated Events: 9722
 Total Events: 16032 X Parameter: Anti-SOD-1 FITC (Log)

Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total
All	1	9910	9722	100.00	60.64
M1	31	9910	2609	26.84	16.27

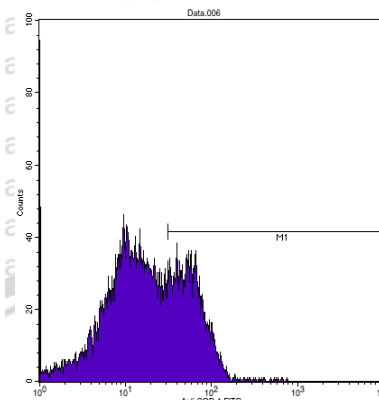
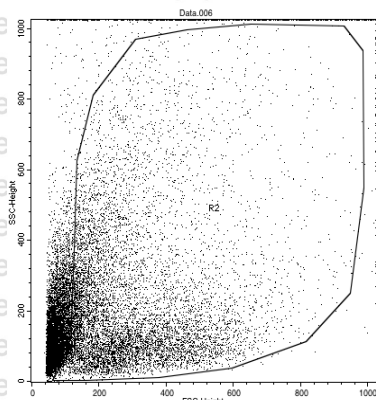


Histogram Statistics

File: Data.005 Sample ID: k.pos.5 - Hep
 Patient ID: FK01 Acquisition Date: 27-Jun-19
 Gate: G2 Gated Events: 9500
 Total Events: 19774 X Parameter: Anti-SOD-1 FITC (Log)

Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total
All	1	9910	9500	100.00	48.04
M1	31	9910	4213	44.35	21.31

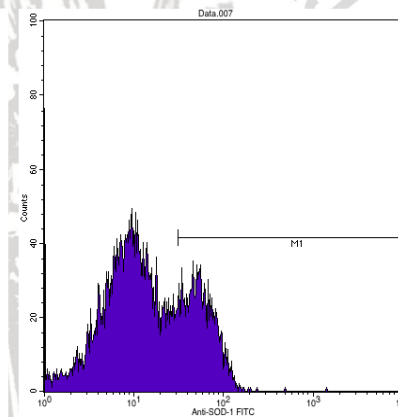
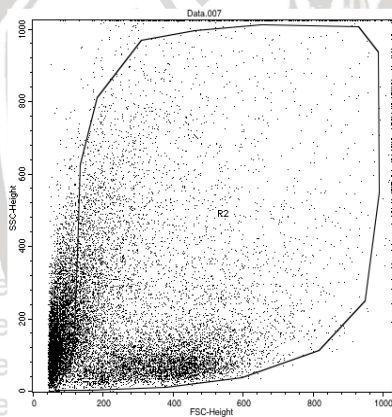
Kontrol Negatif



Histogram Statistics

File: Data.006 Sample ID: k.neg.1 - Hep
Patient ID: FKJ Acquisition Date: 27-Jun-19
Gate: G2 Gated Events: 9522
Total Events: 19393 X Parameter: Anti-SOD-1 FITC (Log)

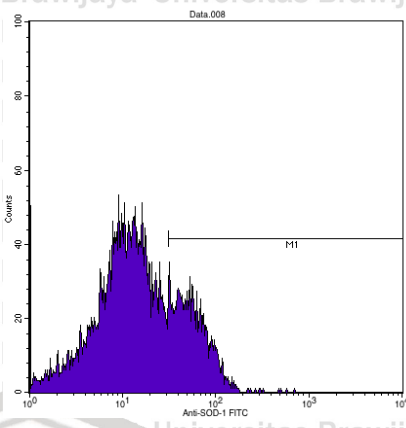
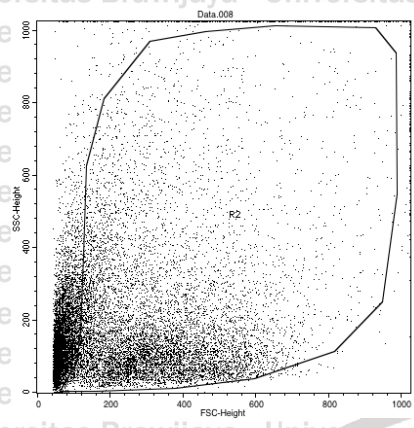
Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total
All	1	9910	9522	100.00	49.19
M1	31	9910	3215	33.76	16.58



Histogram Statistics

File: Data.007 Sample ID: k.neg.2 - Hep
Patient ID: FKJ Acquisition Date: 27-Jun-19
Gate: G2 Gated Events: 9775
Total Events: 16445 X Parameter: Anti-SOD-1 FITC (Log)

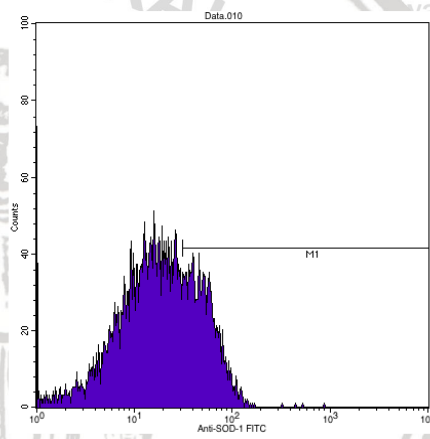
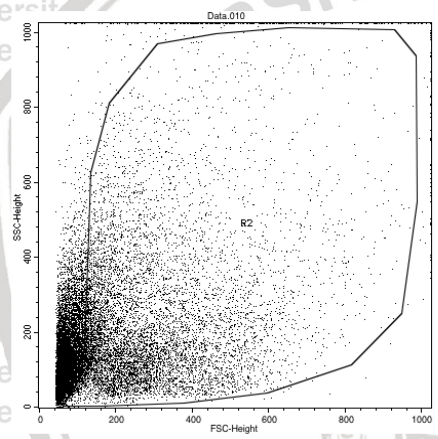
Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total
All	1	9910	9775	100.00	59.44
M1	31	9910	2789	28.53	16.96



File: Data.008
Patient ID: FKX
Gate: G2
Total Events: 16735

Sample ID: k.neg.3 - Hep
Acquisition Date: 27-Jun-19
Gated Events: 9755
X Parameter: Anti-SOD-1 FITC (Log)

Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total
All	1	9910	9755	100.00	58.29
M1	31	9910	2537	26.01	15.16



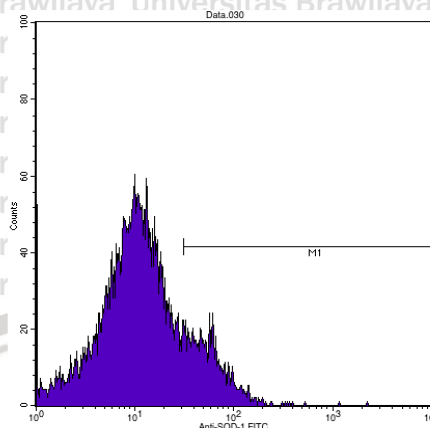
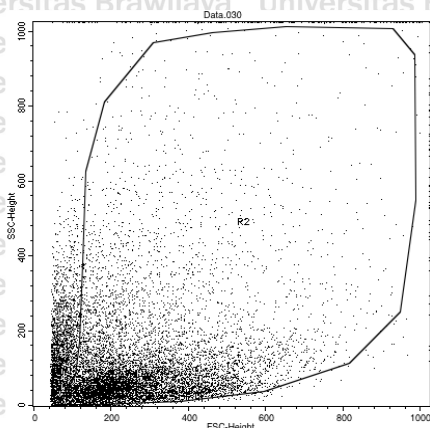
File: Data.010
Patient ID: FKX
Gate: G2
Total Events: 21263

Sample ID: k.neg.5 - Hep
Acquisition Date: 27-Jun-19
Gated Events: 9473
X Parameter: Anti-SOD-1 FITC (Log)

Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total
All	1	9910	9473	100.00	44.55
M1	31	9910	2913	30.75	13.70

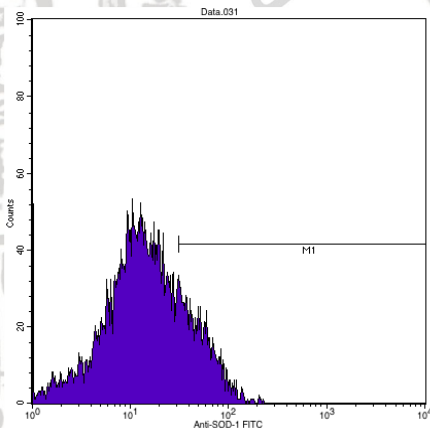
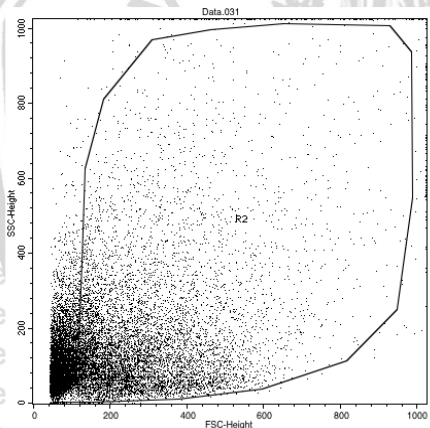


Kontrol *Lactobacillus acidophilus*



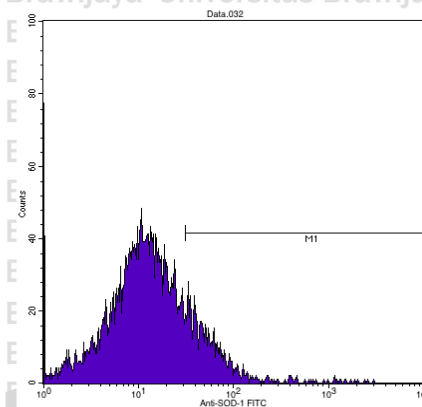
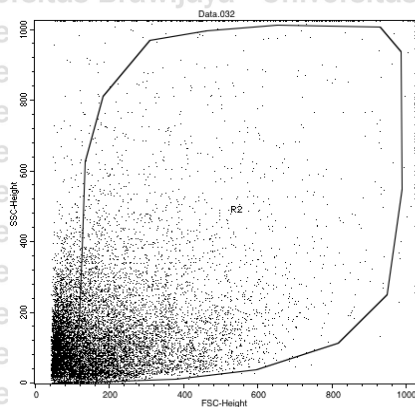
File: Data.030 Sample ID: k.Lacto.1 - Hep
 Patient ID: FKX Acquisition Date: 27-Jun-19
 Gate: G2 Gated Events: 9859
 Total Events: 13135 X Parameter: Anti-SOD-1 FITC (Log)

Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total
All	1	9910	9859	100.00	75.06
M1	31	9910	1645	16.69	12.52



File: Data.031 Sample ID: k.Lacto.2 - Hep
 Patient ID: FKX Acquisition Date: 27-Jun-19
 Gate: G2 Gated Events: 9446
 Total Events: 18008 X Parameter: Anti-SOD-1 FITC (Log)

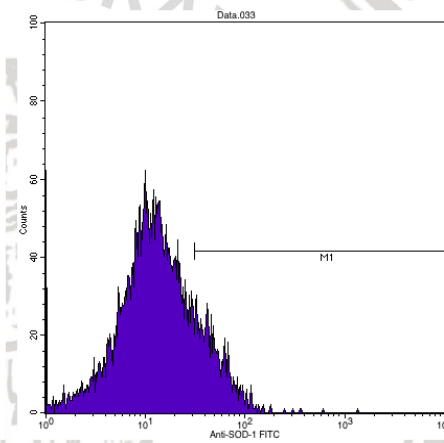
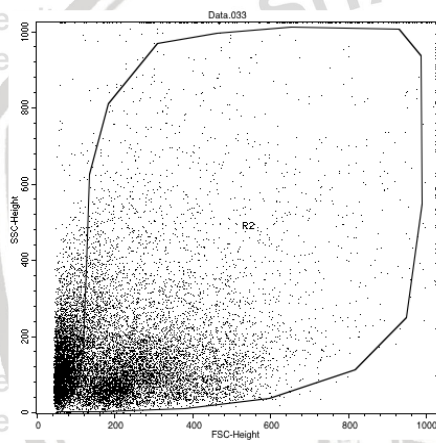
Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total
All	1	9910	9446	100.00	52.45
M1	31	9910	1993	21.10	11.07



File: Data.032
Patient ID: FKH
Gate: G2
Total Events: 12975

Sample ID: k.Lacto.3 - Hep
Acquisition Date: 27-Jun-19
Gated Events: 7948
X Parameter: Anti-SOD-1 FITC (Log)

Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total
All	1	9910	7948	100.00	61.26
M1	31	9910	1401	17.63	10.80

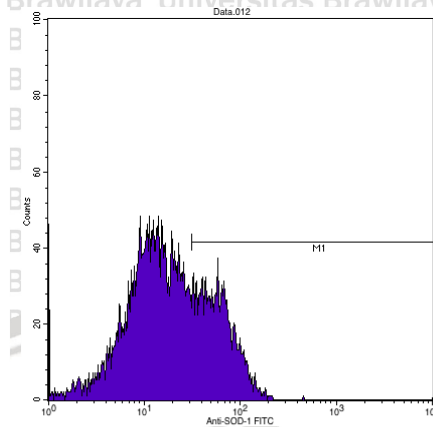
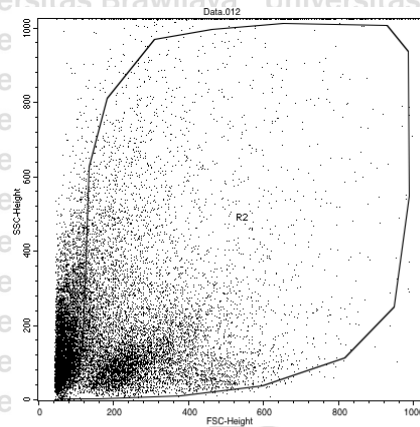


File: Data.033
Patient ID: FKH
Gate: G2
Total Events: 15813

Sample ID: k.Lacto.4 - Hep
Acquisition Date: 27-Jun-19
Gated Events: 9683
X Parameter: Anti-SOD-1 FITC (Log)

Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total
All	1	9910	9683	100.00	61.23
M1	31	9910	1667	17.22	10.54

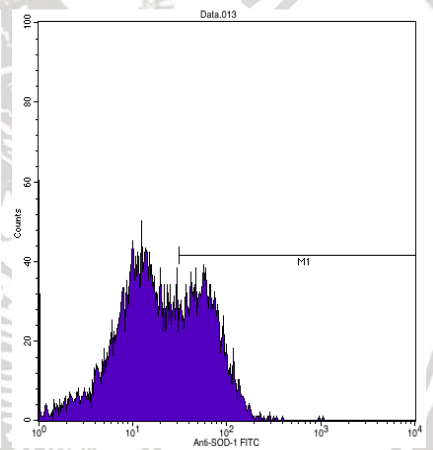
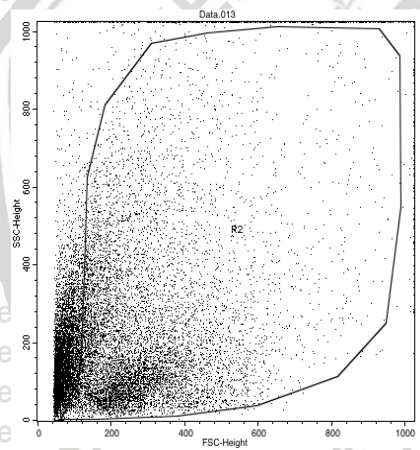
Perlakuan 1



File: Data 012
Patient ID: FKH
Gate: G2
Total Events: 18214

Sample ID: P1.2 - Hep
Acquisition Date: 27-Jun-19
Gated Events: 9694
X Parameter: Anti-SOD-1 FITC (Log)

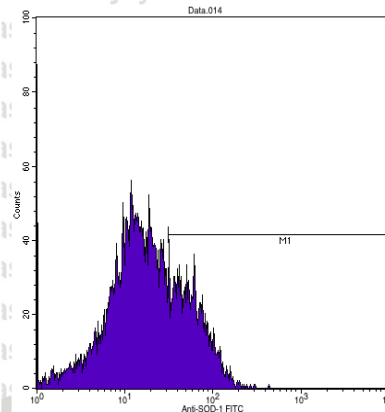
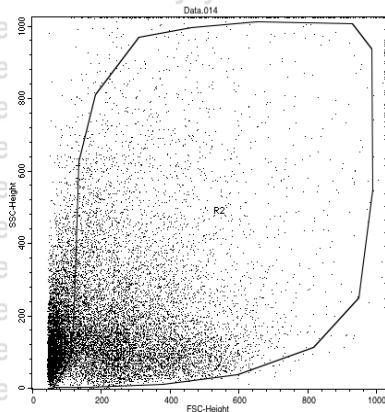
Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total
All	1	9910	9694	100.00	53.22
M1	31	9910	3093	31.91	16.98



File: Data 013
Patient ID: FKH
Gate: G2
Total Events: 17025

Sample ID: P1.3 - Hep
Acquisition Date: 27-Jun-19
Gated Events: 9734
X Parameter: Anti-SOD-1 FITC (Log)

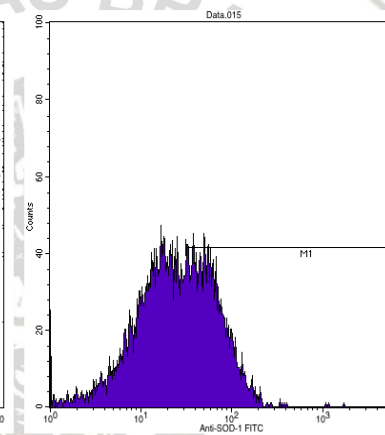
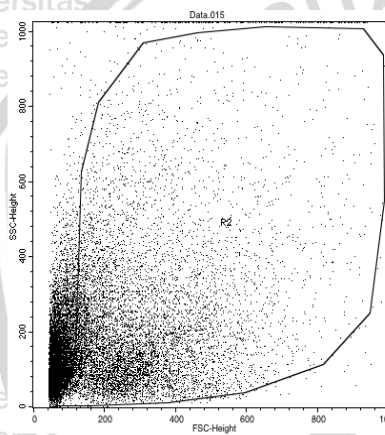
Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total
All	1	9910	9734	100.00	57.17
M1	31	9910	3654	37.54	21.46



File: Data.014
 Patient ID: FKX
 Gate: G2
 Total Events: 16275

Sample ID: P1.4 - Hep
 Acquisition Date: 27-Jun-19
 Gated Events: 9759
 X Parameter: Anti-SOD-1 FITC (Log)

Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total
All	1	9910	9759	100.00	59.96
M1	31	9910	2963	29.34	17.59

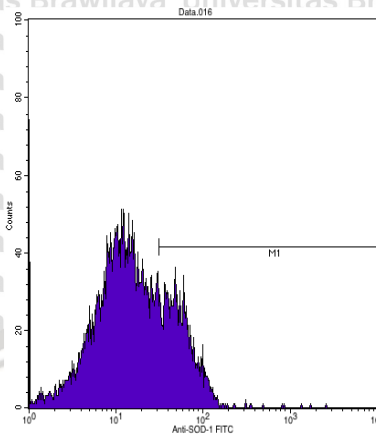
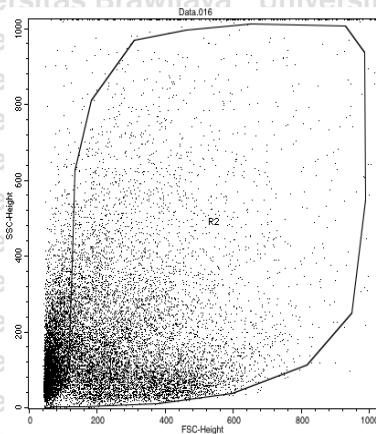


File: Data.015
 Patient ID: FKX
 Gate: G2
 Total Events: 20154

Sample ID: P1.5 - Hep
 Acquisition Date: 27-Jun-19
 Gated Events: 9549
 X Parameter: Anti-SOD-1 FITC (Log)

Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total
All	1	9910	9549	100.00	47.38
M1	31	9910	4046	42.37	20.08

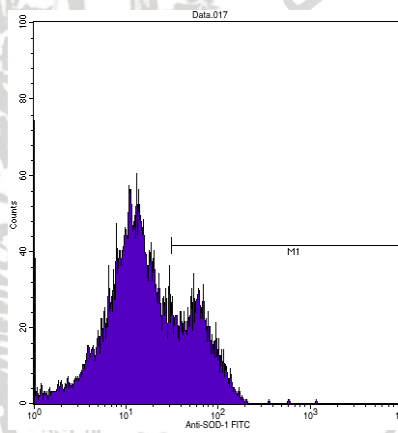
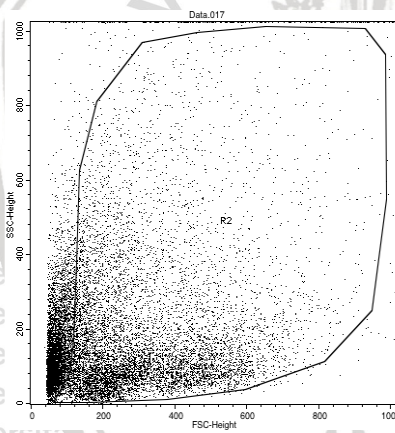
Perlakuan 2



Histogram Statistics

File: Data.016 Sample ID: P2.1 - Hep
 Patient ID: FK4 Acquisition Date: 27-Jun-19
 Gate: G2 Gated Events: 9733
 Total Events: 15887 X Parameter: Anti-SOD-1 FITC (Log)

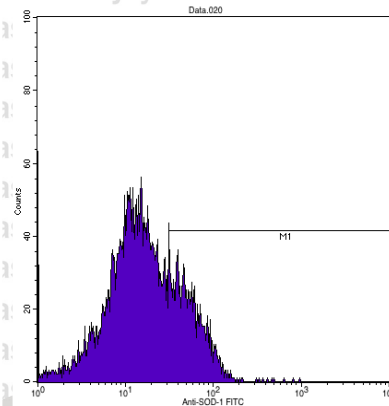
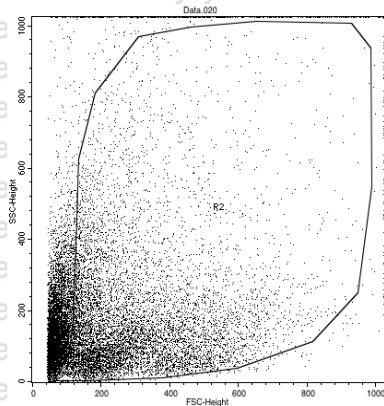
Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total
All	1	9910	9733	100.00	61.26
M1	31	9910	2551	26.21	16.06



Histogram Statistics

File: Data.017 Sample ID: P2.1 - Hep
 Patient ID: FK4 Acquisition Date: 27-Jun-19
 Gate: G2 Gated Events: 9760
 Total Events: 15777 X Parameter: Anti-SOD-1 FITC (Log)

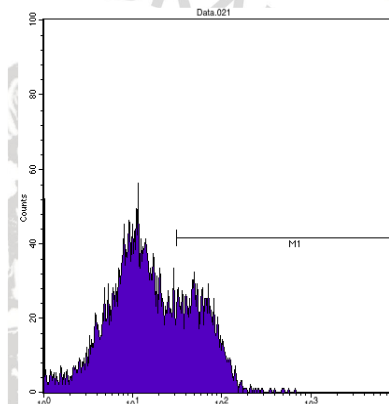
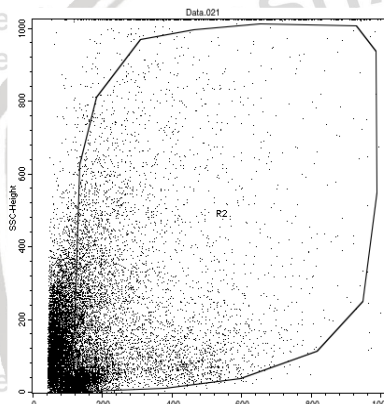
Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total
All	1	9910	9760	100.00	61.86
M1	31	9910	2741	28.08	17.37



Histogram Statistics

File: Data.020 Sample ID: P2.5 - Hep
 Patient ID: FKH Acquisition Date: 27-Jun-19
 Gate: G2 Gated Events: 9660
 Total Events: 17586 X Parameter: Anti-SOD-1 FITC (Log)

Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total
All	1	9910	9660	100.00	54.93
M1	31	9910	2536	26.25	14.42

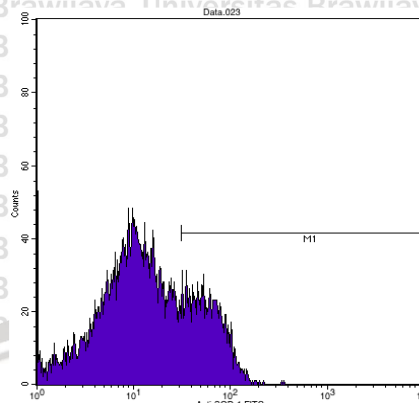
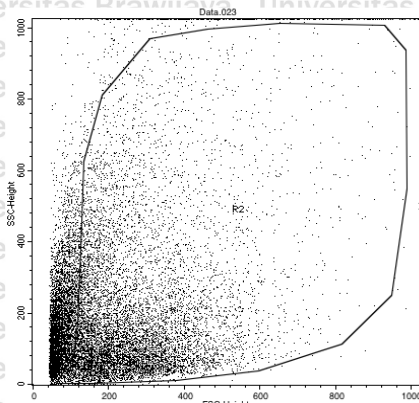


Histogram Statistics

File: Data.021 Sample ID: P2.6 - Hep
 Patient ID: FKH Acquisition Date: 27-Jun-19
 Gate: G2 Gated Events: 9685
 Total Events: 18840 X Parameter: Anti-SOD-1 FITC (Log)

Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total
All	1	9910	9685	100.00	50.88
M1	31	9910	2840	29.63	15.07

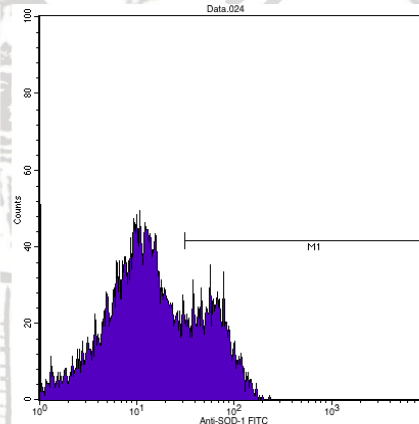
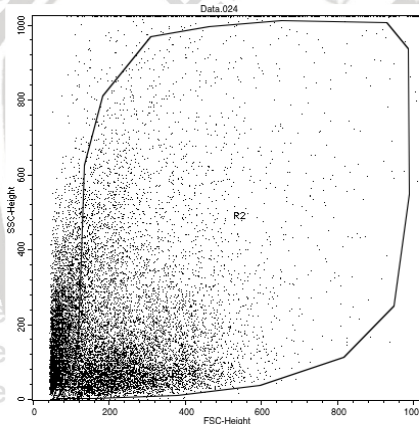
Perlakuan 3



File: Data.023
Patient ID: FKH
Gate: G2
Total Events: 16013

Sample ID: P3.1 - Hep
Acquisition Date: 27-Jun-19
Gated Events: 9767
X Parameter: Anti-SOD-1 FITC (Log)

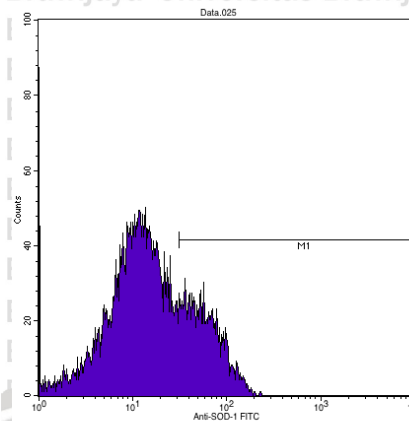
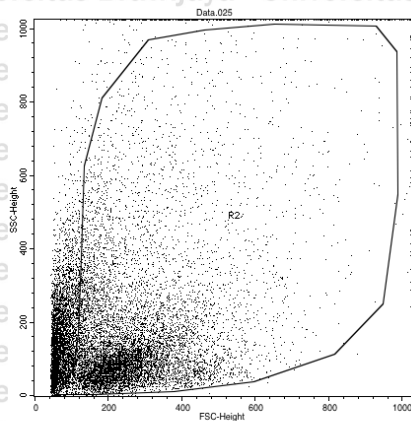
Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total
All	1	9910	9767	100.00	60.99
M1	31	9910	2557	26.18	15.97



File: Data.024
Patient ID: FKH
Gate: G2
Total Events: 15787

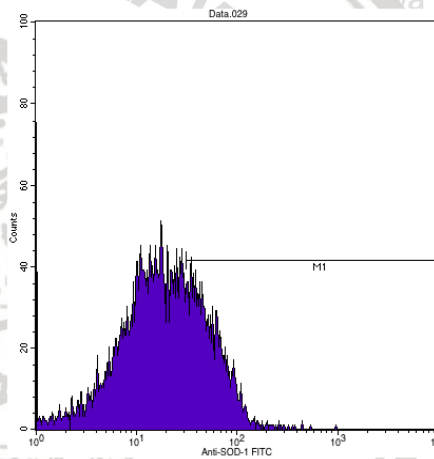
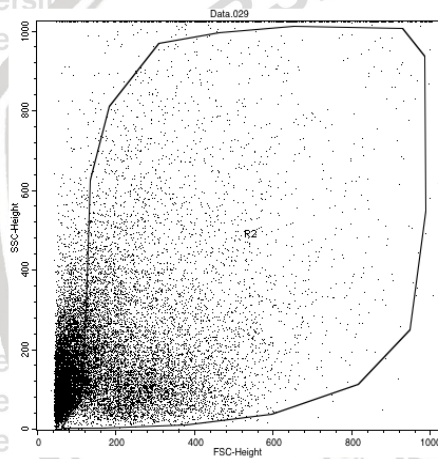
Sample ID: P3.2 - Hep
Acquisition Date: 27-Jun-19
Gated Events: 9780
X Parameter: Anti-SOD-1 FITC (Log)

Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total
All	1	9910	9780	100.00	61.95
M1	31	9910	2636	26.95	16.70



File: Data.025 Sample ID: P3.3 - Hep
 Patient ID: FKH Acquisition Date: 27-Jun-19
 Gate: G2 Gated Events: 9765
 Total Events: 15079 X Parameter: Anti-SOD-1 FITC (Log)

Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total
All	1	9910	9765	100.00	64.78
M1	31	9910	2606	26.69	17.29



File: Data.029 Sample ID: P3.7 - Hep
 Patient ID: FKH Acquisition Date: 27-Jun-19
 Gate: G2 Gated Events: 9492
 Total Events: 20370 X Parameter: Anti-SOD-1 FITC (Log)

Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total
All	1	9910	9492	100.00	46.60
M1	31	9910	2961	31.19	14.54

Lampiran 7. Pengujian Fitokimia Kopi Robusta Lampung

Instrument Method: SRM_CHLOROGENIC_ACID.meth

Acacia Instrument Method

Creator: Quantum
Last modified: 7/23/2019 by Quantum
Summary: (none)

Acacia AS Method:

Reservoir 1:
Reservoir 2:
Reservoir 3:
Reservoir 4:
Wash Bottle:
Injection volume (ul) 2.000
Flush volume (ul): 400
Flush/Wash source is bottle.
Needle height from bottom(mm): 2.000
Wash volume (ul): 0
Flush speed (ul/s): 100.000
Post-Injection Valve switch time (min): 0.000
Syringe speed (ul/s): 8.000
Injection mode is partial loop
Tray temp control is on. Temp (C): 20.000
Column oven control is on. Temp (C): 35.000

Sample Preparation:

Tuesday, July 23, 2019 6:06:59 PM

Page 1 of 4



Tuesday, July 23, 2019 6:06:59 PM

Page 2 of 4

Timed Event:

Accela Instrument Method

Instrument Method: SRM_CHLOROGENIC_ACID.meth

Instrument Method: SRM_CHLOROGENIC_ACID.meth

750 Quantum Instrument Method

Test modified: 7/23/2019 10:35:13 AM by Quantum

TSG MS Method Settings:

[illegible]

MS Run Time (min) : 5.50

Background

Scan Event 1

Segment 1:

Chrom Affair:
23 Jan 1999

Syllabus Page:

12 = 0.57M M₁

935.000
958.000

353.000
967.000

367.000
367.000367.000
407.000497.000
515.000529.000
540.000

529.000

Stylingen pump in

Divert Valves:

10

10

10

10

Tuesday, July 23,

a
a
a
aU
U
U
Ua
a
a
a

av
av
av
av

THE

reposit

Tuesday, July 23, 2019 6:06:59 PM

Page 3 of 4



Tuesday, July 23, 2019 6:06:59 PM

Page 4 of 4

Method creator:		Quantum			
Last modified:		7/23/2019 6:06:54 PM by Quantum			
Instrument:		Accela 1250 Pump			
Common settings:					
Pressure units:	bar				
Pressure stability:	10.00				
Pump 1 settings:					
Name:					
Comment:					
Solvent A:	0.1% FA in Water				
Solvent B:	0.1% FA in Acetonitrile				
Solvent C:					
Solvent D:	0.1% FA in Methanol				
Start settings:	Accela AS Injection Logic				
Method finalizing:	First line conditions				
Operating mode:	Low pressure (0.-7000 PSI)				
Min pressure:	0.00				
Max pressure:	1250.00				
Pump 1 gradient table:					
No. Time	AS	BS	CS	DS	UI/min
0	0.00	95.0	5.0	0.0	300.0
1	0.60	95.0	5.0	0.0	300.0
2	3.00	25.0	75.0	0.0	300.0
3	3.50	25.0	75.0	0.0	300.0
4	4.00	95.0	5.0	0.0	300.0
5	5.50	95.0	5.0	0.0	300.0

LABORATORIUM KIMIA ANALISIS DAN INSTRUMENTASI**JURUSAN TEKNIK KIMIA POLITEKNIK NEGERI MALANG****JL. SOEKARNO HATTA NO. 09 PO. BOX 04 MALANG 65141****REKAPITULASI PERHITUNGAN TFC (QUERCETIN
EQUIVALENT)**

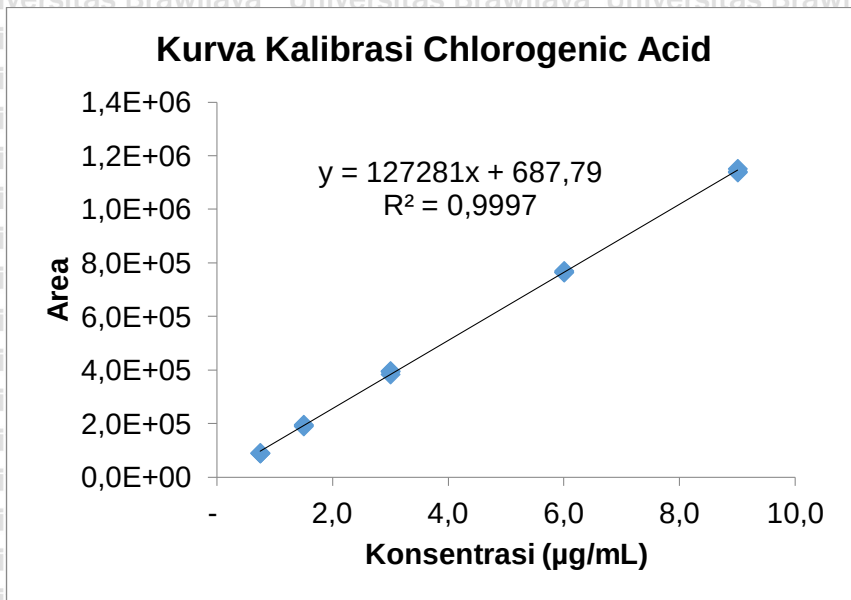
NAMA SAMPEL	Hasil
Total Flavonoid Content ($\mu\text{g/g}$)	11,815.33
Alkaloid (Kualitatif)	Positive
Tanin (Kualitatif)	Positive
Saponin (Kualitatif)	Positive

Malang, 22 Juli 2019
Pelaksana,

Kaliawan

LABORATORIUM KIMIA ANALISIS INSTRUMENTASI**JURUSAN TEKNIK KIMIA POLITEKNIK NEGERI
MALANG****REKAPITULASI PERHITUNGAN STANDARD CHLOROGENIC ACID**

No	Nama STANDARD	Kons. ($\mu\text{g/mL}$)	(Area)	KONS. THT ($\mu\text{g/mL}$)	%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

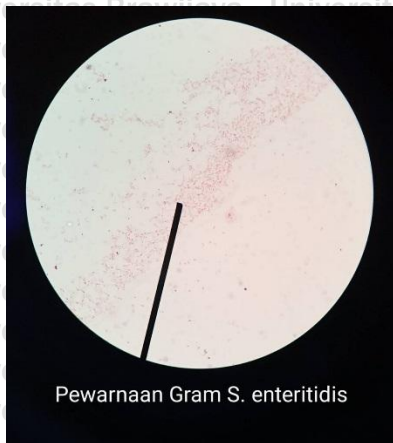


Malang, Maret
2018

Pelaksana,

Kaliawan

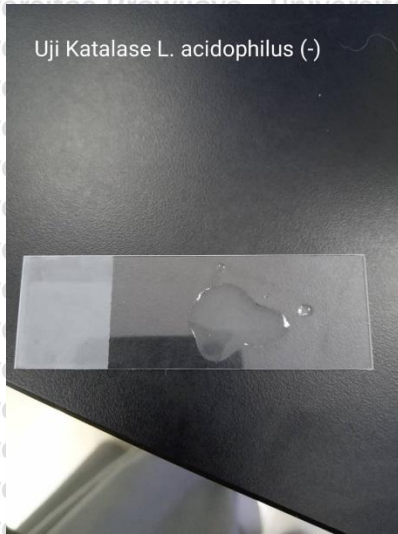
Lampiran 8. Identifikasi Bakteri *Salmonella enterica*



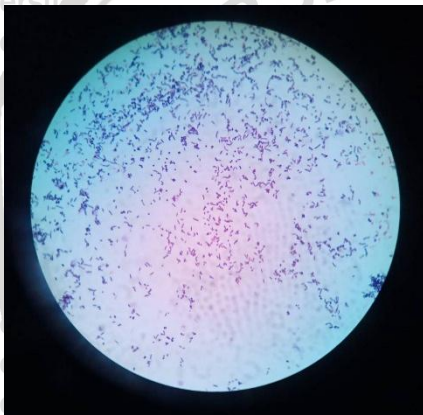
Hasil pewarnaan gram ditemukan bakteri basil gram negatif (Perbesaran 1000x)



Lampiran 9. Identifikasi Bakteri *Lactobacillus acidophilus*



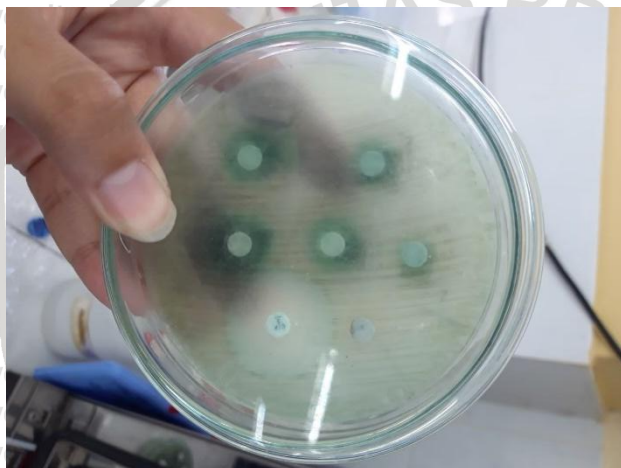
Hasil Uji katalase tidak ada gelembung



Hasil pewarnaan gram ditemukan bakteri basil gram positif (Perbesaran 1000x)

Lampiran 10. Uji in vitro pengaruh Kopi robusta terhadap *Salmonella enterica*

Media	Ulangan	Ciprofloxacin	Ekstrak kopi 10%	Ekstrak Kopi 20%	Ekstrak Kopi 30%	Ekstrak Kopi 40%	Ekstrak Kopi 50%
BSA	1	1,4 cm	-	-	0,7 cm	0,8 cm	0,9 cm
	2	1,4 cm	-	-	0,7 cm	0,8 cm	0,85 cm
Rata-rata		1,4 cm	-	-	0,7 cm	0,8 cm	0,85 cm



Lampiran 11. Data Perhitungan Jumlah Sel Goblet

Perlakuan	Ulangan	Lapang Pandang					Total	Rata-Rata	Nilai Sel Goblet
		1	2	3	4	5			
K-	1	42	48	34	23	22	169	33,8	29,2
	2	31	33	13	21	20	118	23,6	
	3	6	13	18	29	23	89	17,8	
	4	35	38	54	48	33	208	41,6	
K+	1	32	30	38	26	21	147	29,4	22,25
	2	0	0	0	0	5	5	1	
	3	24	26	29	31	27	137	27,4	
	4	17	48	30	38	23	156	31,2	
KLac	1	48	50	48	36	30	212	42,4	28
	2	21	23	29	20	19	112	22,4	
	3	19	24	30	6	12	91	18,2	
	4	26	16	26	30	47	145	29	
P1	1	19	24	24	38	15	120	24	26,7333
	2	29	29	25	18	31	132	26,4	
	3	39	41	30	17	20	147	29,4	
	4	28	14	16	29	35	122	24,4	
P2	1	24	54	33	26	27	164	32,8	24,05
	2	20	20	31	40	19	130	26	
	3	14	17	20	18	20	89	17,8	
	4	14	18	17	29	20	98	19,6	
P3	1	17	16	10	18	24	85	17	24,0667
	2	16	17	11	21	23	88	17,6	
	3	29	26	26	14	23	118	23,6	
	4	20	30	39	46	20	155	31	