

**Pengaruh Terapi Preventif Nira Siwalan Hasil Fermentasi
Lactobacillus casei terhadap Ekspresi *Interleukin-10*
dan Histopatologi Sekum pada Tikus Putih
(*Rattus norvegicus*) yang Diinfeksi
*Escherichia coli***

SKRIPSI

Oleh :

LINDA FEBRIANA

125130101111040



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2016**

**Pengaruh Terapi Preventif Nira Siwalan Hasil Fermentasi
Lactobacillus casei terhadap Ekspresi *Interleukin-10*
dan Histopatologi Sekum pada Tikus Putih
(*Rattus norvegicus*) yang Diinfeksi
*Escherichia coli***

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :

LINDA FEBRIANA

125130101111040



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2016**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Pengaruh Terapi Preventif Nira Siwalan Hasil Fermentasi *Lactobacillus casei* terhadap Ekspresi *Interleukin-10* dan Histopatologi Sekum pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinfeksi *Escherichia coli*

Oleh :

LINDA FEBRIANA
NIM. 125130101111040

Setelah dipertahankan didepan Majelis Penguji
pada tanggal 31 Oktober 2016
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Dra. Anna Rosdiana, M.App., Sc
NIP. 19580711 199203 2 002

Drh. Dyah Ayu OAP., M.Biotech
NIP. 19841026 200812 2 004

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Linda Febriana

NIM : 125130101111040

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulis Skripsi Berjudul :

Pengaruh Terapi Preventif Nira Siwalan Hasil Fermentasi *Lactobacillus casei* terhadap Ekspresi Interleukin-10 dan Histopatologi Sekum pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinfeksi *Echerichia coli*

Dengan ini menyatakan bahwa:

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

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 31 Oktober 2016

Yang Menyatakan,

(Linda Febriana)

NIM. 12130101111040

Pengaruh Terapi Preventif Nira Siwalan Hasil Fermentasi *Lactobacillus casei* terhadap Ekspresi *Interleukin-10* dan Histopatologi Sekum pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinfeksi *Escherichia coli*

Abstrak

Escherichia coli merupakan bakteri yang dapat merusak mukosa saluran pencernaan secara potensial. Nira Siwalan (*Borassus flabillifer*) mengandung gula yang merupakan sumber karbon dan nutrisi yang lengkap bagi pertumbuhan Bakteri Asam Laktat (BAL). Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh terapi preventif nira siwalan hasil fermentasi *L. casei* yang dapat memperbaiki kerusakan mukosa sekum tikus putih serta peningkatan respon imun IL-10. Penelitian ini dilakukan secara eksperimental *posttest control design only* menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Tikus yang digunakan adalah (*Rattus norvegicus*) jantan, sehat, dengan berat 150-250 gram yang dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kontrol negatif, kontrol positif yang diinfeksi 1 ml *E.coli* 10^6 cfu/ml selama 7 hari, dan kelompok perlakuan yang disuplementasi dengan probiotik nira siwalan dengan volume masing-masing kelompok 1,8 ml/ekor, 2,7 ml/ekor, dan 3,6 ml/ekor selama 16 hari kemudian diinfeksi bakteri *E.coli* 10^6 cfu/ml pada hari ke 10 selama 7 hari. Parameter yang diamati yaitu ekspresi interleukin-10 dan histopatologi sekum, yang diamati dengan metode imunohistokimia (IHK) dan pewarnaan *Hematoxylin Eosin*. Perubahan jaringan sekum diamati secara kualitatif, sedangkan analisa data aktivitas interleukin-10 menggunakan Analysis of Variance (ANOVA), $\alpha = 0,05$ untuk mengetahui adanya perbedaan pada kelompok perlakuan dan dilanjutkan dengan uji Tukey. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian terapi preventif nira siwalan pada tikus putih yang diinfeksi *E.coli* dapat menghambat kerusakan jaringan sekum dan secara signifikan ($p < 0,05$) dapat meningkatkan ekspresi IL-10 dengan volume efektif 3,6 ml/ekor.

Kata kunci : *E.coli*, IL-10, *Lactobacillus casei*, nira siwalan, sekum

The Effect of Nira Siwalan Fermented by *Lactobacillus casei* on Interleukin-10 ekspresion and Histopatologi Caecum to the White rat (*Rattus norvegicus*) Infected by *Escherichia coli*

Abstract

Escherichia coli can damage the gastrointestinal potentially. Siwalan contains of glucose as carbon source and complete nutrition for the growth of Lactid Acid Bacteria. This research was aimed to investigate the effect of Nira Siwalan fermented by *L. casei* which can prevent damaged *caecum mucosa* of rat and increase the immune antiinflation IL-10. The research conducted experimentally with post-test control design and used complete random. The rat used was *Rattus norvegicus*, male, health and the weight 150-250 gram which divided into 5 groups such as negative control, positive control infected by *E. coli* 10^6 cfu/ml during 7 days, and treatment group supplemented with probiotic of Nira Siwalan 10^8 cfu/ml, each volume per groups were 1,8 ml/rat, 2,7 ml/rat and 3,6 ml/rat for 16 days then infected by *E. coli* 10^6 cfu/ml for 7 days starting from 10th days. The parameters observed were IL-10 expression using IHC and caecum histopathology observed by HE staining. The expression of IL-10 analyzed in quantitative using ANOVA ($\alpha=0,05$) whereas histopatology of caecum analyzed desriptively. The results explained that preventive therapy of nira siwalan fermented by *L.casei* on white rats infected by *E. coli* can inhibit caecum damage and can increase significantly ($p <0.05$) IL-10 expression with an effective volume of 3.6 ml/rat.

Keyword : *Escherichia coli*, caecum, *Lactobacillus casei*, IL-10, nira siwalan

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur saya panjatkan kepada Tuhan yang Maha Esa atas berkat dan anugerahNya penulis dapat menyelesaikan penelitian dan menyusun laporan penelitian dengan judul **“Pengaruh Terapi Preventif Nira Siwalan Hasil Fermentasi *Lactobacillus casei* terhadap Ekspresi *Interleukin-10* dan Histopatologi Sekum pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinfeksi *Escherichia coli*”** sebagai tugas akhir/skripsi sebagai syarat kelulusan menjadi Sarjana Kedokteran Hewan

Laporan tugas akhir ini disusun berdasarkan diskusi dengan berbagai pihak serta literatur yang penulis baca dari beberapa referensi.

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada :

1. Dra. Anna Rosdiana, M.App., Sc dan drh. Dyah Ayu OAP., M.Biotech selaku dosen pembimbing yang telah menyisihkan waktunya untuk membimbing penulis pada saat penulisan tugas akhir ini.
2. Drh. Ajeng Aeka, M.Sc dan Dhita Evi Aryani, S.Farm, Apt selaku dosen penguji atas segala ilmu, dukungan serta saran dan masukan dalam penyempurnaan penulisan tugas akhir ini.
3. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
4. Keluarga tercinta, terutama kedua orang tua penulis Ibu Rusmiati dan Bapak Suprayitno yang selalu memberi kasih sayang, doa dan dorongan dukungan untuk menyelesaikan studi penulis serta perhatiannya akan kebutuhan penulis baik secara moril maupun materi.

5. Seluruh dosen yang telah membimbing dan memberikan ilmu selama menjalankan studi di Program Studi Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
6. Teman seperjuangan Baiq Nindi Puji R, Dewi Febriana, Meilia Kusuma dan Yanuriya Yala yang selalu setia menemani, bekerjasama, memberikan arahan dan semangat serta inspirasi dalam menyelesaikan penelitian ini.
7. Sahabat tercinta Dwi Nancy Permata S yang selalu memberikan semangat dan dukungan dalam penyelesaian tugas akhir ini.
8. Seluruh teman di Program Studi Pendidikan Dokter Hewan Universitas Brawijaya, khususnya kelas 2012-C dan teman-teman angkatan 2012 pada umumnya.
9. Ucapan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu.

Penulis sadar bahwa laporan ini jauh dari sempurna. Penulis berharap laporan ini dapat bermanfaat khususnya bagi penulis dan umumnya bagi pembaca untuk itu saran yang membangun sangat penulis harapkan.

Penulis



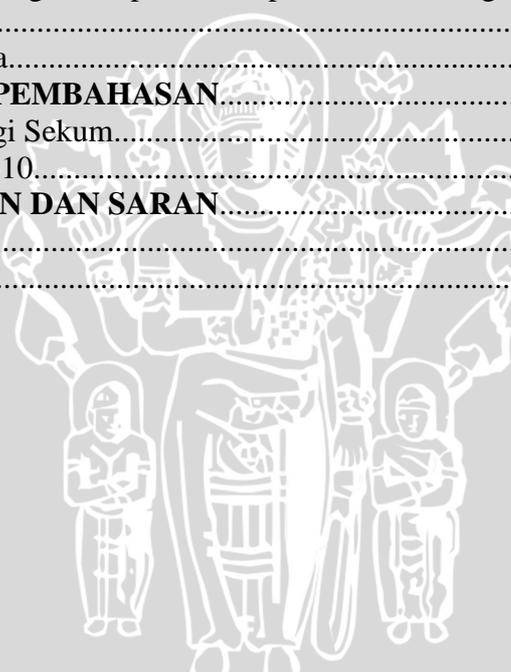
DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG	xiii
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 Tikus Putih	7
2.1.1 Klasifikasi Tikus Putih	7
2.1.2 Morfologi Tikus Putih.....	7
2.1.3 Sistem Pencernaan Tikus Putih	8
2.2 <i>Escherechia coli</i>	9
2.2.1 Morfologi	9
2.2.2 Patogenesitas <i>E.coli</i>	10
2.2.3 Mekanisme <i>E.coli</i> terhadap Imunitas.....	14
2.3 Bakteri Asam Laktat sebagai Probiotik	14
2.3.1 Pengertian Probiotik	14
2.3.2 Bakteri Asam Laktat	15
2.3.3 <i>Lactobacillus</i>	16
2.3.4 Mekanisme Kerja Probiotik terhadap Sistem Imun Usus	18
2.4 Nira Siwalan (<i>Borassus flabillifer</i>).....	20
2.5 Interleukin-10 (IL-10)	23
2.6 Fisiologi dan Histologi sekum.....	25
BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	28
3.1 Kerangka Konseptual	28
3.2 Hipotesis Penelitian	31
BAB 4. METODE PENELITIAN	32
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	32
4.2 Sampel Penelitian	32
4.3 Rancangan Penelitian	33
4.4 Variabel Penelitian	34

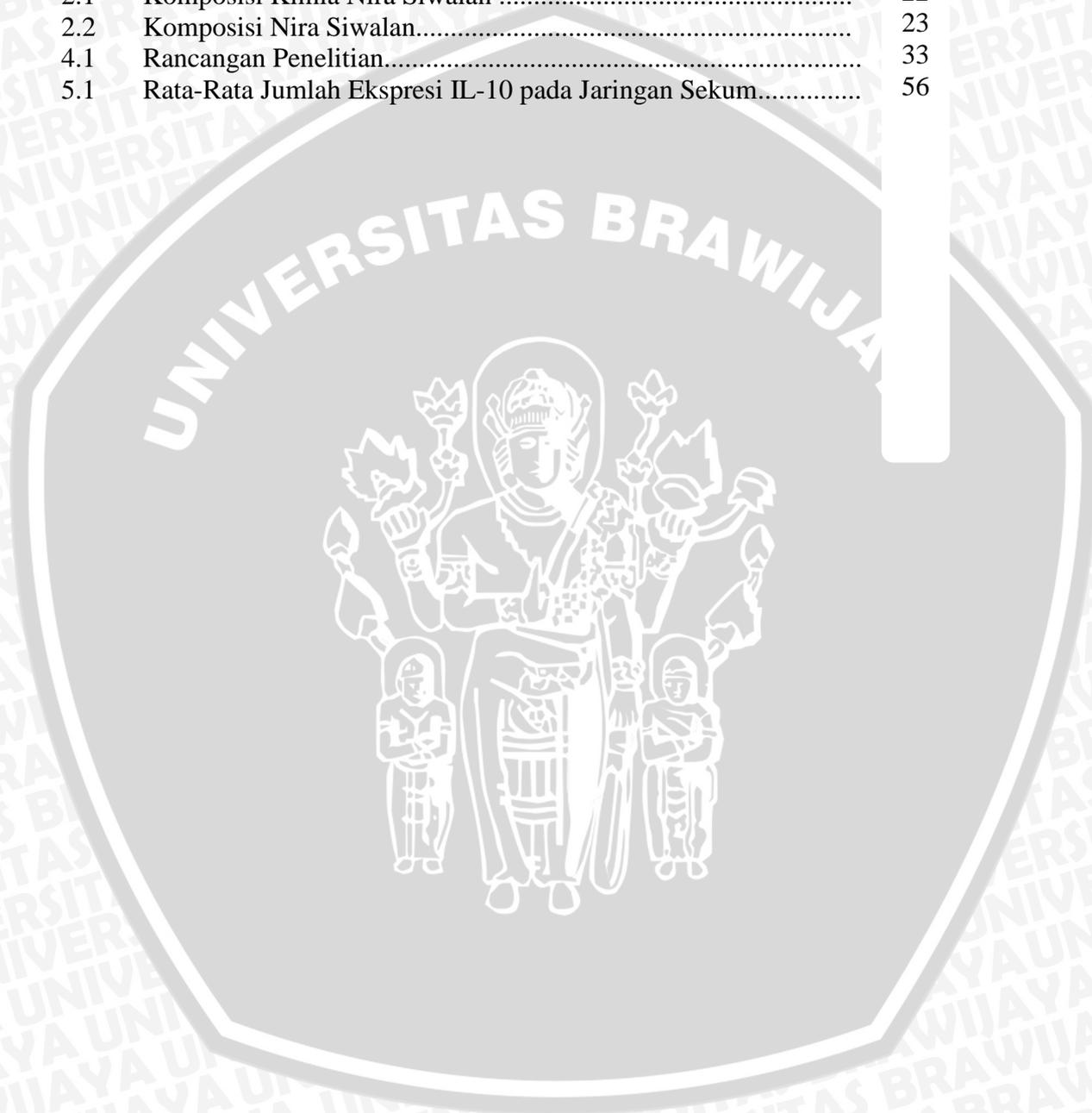


4.5 Materi Penelitian	34
4.5.1 Alat	34
4.5.2 Bahan	34
4.6 Tahapan Penelitian.....	35
4.6.1 Preparasi Hewan Coba	35
4.6.2 Pembuatan Fermentasi Nira Siwalan	35
4.6.3 Analisa Kualitatif Bahan Nira Siwalan.....	37
4.6.4 Analisa Kualitatif Fermentasi Nira Siwalan.....	38
4.6.5 Pemilihan Bakteri <i>E.coli</i>	39
4.6.6 Pemberian Suplementasi Fermentasi Nira Siwalan	39
4.6.7 Induksi <i>E. coli</i> pada Kelompok Tikus Perlakuan	40
4.6.8 Pembedahan Hewan Coba	40
4.6.9 Pembuatan Preparat Histopatologi Sekum dengan Pewarnaan HE	41
4.6.10 Perhitungan Respon IL-10 pada Sekum dengan Metode IHK	42
4.7 Analisa Data.....	43
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN	44
5.1 Histopatologi Sekum.....	44
5.2 Ekspresi IL-10.....	54
BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN	61
DAFTAR PUSTAKA	62
LAMPIRAN	67



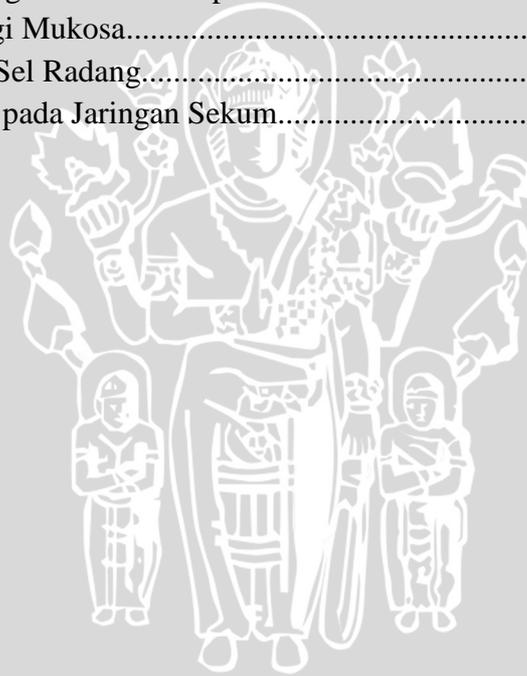
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Komposisi Kimia Nira Siwalan	22
2.2 Komposisi Nira Siwalan.....	23
4.1 Rancangan Penelitian.....	33
5.1 Rata-Rata Jumlah Ekspresi IL-10 pada Jaringan Sekum.....	56



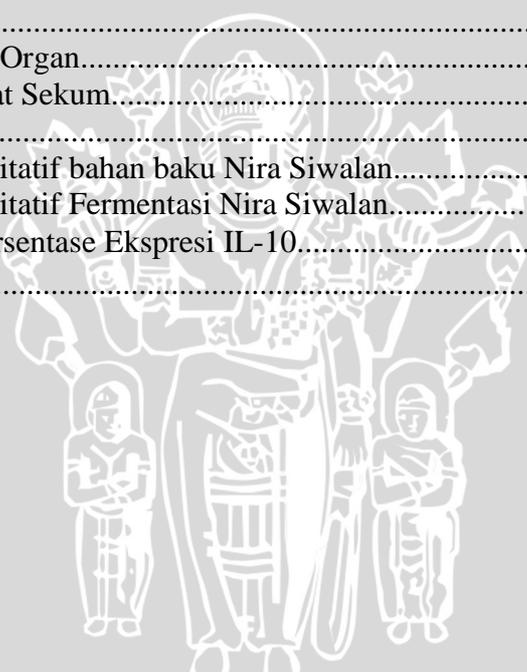
DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
2.1	Skema Pencernaan Tikus	8
2.2	Bunga dan Buah Lontar <i>Borassus flabellifer</i> L	21
2.3	Struktur Histologi Tunika Mukosa, Submukosa dan Muskularis Sekum Sapi Bali.....	27
2.4	Struktur Histologi Tunika Submukosa Sapi Bali	27
2.5	Struktur Histologi Tunika Serosa Sapi Bali	27
3.1	Kerangka Konseptual Penelitian	28
5.1	Gambaran Histopatologi Sekum.....	44
	5.1.1 Perbedaan Sel Epitel Mukosa Sekum.....	45
	5.1.2 Perbandingan Kondisi Kriptas.....	48
	5.1.3 Hemorragi Mukosa.....	49
	5.1.4 Infiltrasi Sel Radang.....	51
5.2	Ekspresi IL-10 pada Jaringan Sekum.....	55



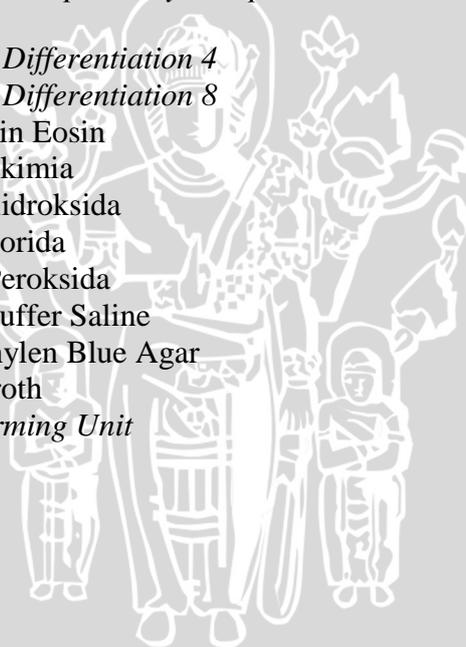
DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Sertifikat Laik Etik.....	67
2. Kerangka Operasional Penelitian.....	68
3. Perhitungan Dosis	69
4. Pembuatan Fermentasi Nira Siwalan.....	70
4.1 Pembuatan kultur induk.....	70
4.2 Pembuatan kultur antara.....	70
4.3 Pembuatan kultur kerja.....	70
4.4 Fermentasi Nira Siwalan.....	71
4.5 Perhitungan Total BAL pada Fermentasi Nira.....	73
5. Perhitungan Pembuatan Larutan.....	72
6. Pemilihan Bakteri <i>E. coli</i>	73
7. Analisa Total gula.....	74
8. Cara Pengambilan Organ.....	74
9. Pewarnaan Histopat Sekum.....	75
10. IHK Sekum.....	76
11. Hasil Analisa Kualitatif bahan baku Nira Siwalan.....	77
12. Hasil Analisa Kualitatif Fermentasi Nira Siwalan.....	78
13. Data Rata-Rata Persentase Ekspresi IL-10.....	80
14. Hasil Uji Statistik.....	81



DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

<i>E.coli</i>	: <i>Escherechia coli</i>
EPEC	: <i>Enteropatogenik Escherechia coli</i>
EHEC	: <i>Enterohemoragik Escherechia coli</i>
ETEC	: <i>Enterotoksigenik Escherechia coli</i>
BAL	: Bakteri Asam Laktat
<i>L.casei</i>	: <i>Lactobacillus casei</i>
IL-10	: interleukin-10
Lesi A/E	: lesi <i>Attaching and Effacing</i>
BFP	: <i>Bundle Forming Pilus</i>
Tir	: <i>Translocated Intimin Receptor</i>
LEE	: <i>Locus of Enterocyte Effacement</i>
MHC	: <i>Major Histocampatibility Complex</i>
Th	: T helper
CD 4	: <i>Clusters of Differentiation 4</i>
CD 8	: <i>Clusters of Differentiation 8</i>
HE	: Hematoxillin Eosin
IHK	: Imunohistokimia
NaOH	: Natrium Hiidroksida
NaCl	: Natrium Clorida
H2O2	: Hidrogen Peroksida
PBS	: Phospate Buffer Saline
EMBA	: Eosin Methylen Blue Agar
NB	: Nutrient Broth
CFU	: <i>Colony Forming Unit</i>



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Escherichia coli merupakan salah satu bakteri enterik dan anggota flora normal usus. Bakteri ini bersifat patogen apabila berada di luar usus atau di lokasi lain di mana flora normal jarang ditemukan (Matheos, 2013). Dalam kondisi dysbiosis (kondisi ketidakseimbangan antar populasi mikroflora dalam saluran gastrointestinal) mikroflora tersebut dapat menyebabkan munculnya berbagai gangguan kesehatan (Djunaedi, 2007). Di dalam saluran pencernaan, mikroorganisme patogen yang sering menyebabkan gangguan adalah *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC), yang dapat merusak mukosa saluran pencernaan secara potensial (Wresdiyati, 2013).

Secara normal *E. coli* terdapat pada saluran pencernaan baik manusia maupun hewan. *E. coli* O157 H:7 adalah bentuk mutan dari *E. coli* yang biasanya ditemukan di saluran pencernaan ternak sapi, domba, kambing, babi bahkan ayam. *E. coli* O157 H:7 selain dapat menyebabkan gangguan saluran pencernaan berupa diare juga dapat menyebabkan terjadinya *hemolytic uremic syndrome*, gagal ginjal bahkan kematian (Andriani, 2006). Angka prevalensi akibat infeksi *E. coli* ini mencapai 35-80% (Suwito, 2009). Infeksi *E. coli* atau koliseptikemia pada unggas dapat menyebabkan kolibasilosis. Pada ayam pedaging umur 4-8 minggu dan ayam petelur umur ± 20 minggu infeksi *E. coli* dapat terjadi septikemia akut dan menimbulkan kematian, yang didahului dengan hilangnya nafsu makan, malas bergerak/inaktif dan mengantuk (Tarmudji, 2003). Sedangkan pada anjing dan

kucing, enterotoksigenik *E.coli* dan enteropatogenik *E.coli* dapat menimbulkan gangguan pada gastrointestinal maupun extra intestinal (Beutin, 1998).

Pulendran *et al* (2001) dan Iskandar (2009) menemukan bahwa *E. coli* terhadap sistem pencernaan mencit dapat menyebabkan peningkatan respon imun proinflamasi yaitu respon imun Th1 dan Th17, serta penekanan pada respon imun anti inflamasi Th2. Sel Th1 membuat dan membebaskan sitokin tipe 1 meliputi IL-2, IL-12, IFN- γ dan tumor nekrosis faktor alfa (TNF- α). Sel Th2 membuat dan membebaskan sitokin tipe 2 antara lain IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, dan IL-10. Sitokin tipe 2 menghambat proliferasi sel Th1, sebaliknya sitokin tipe 1 menghambat produksi dan pembebasan sitokin tipe 2. Produksi IL-10 banyak disintesis di usus besar termasuk sekum sebagai reaksi terhadap colitis (Kole, 2014).

Keseimbangan mikroflora dan pertahanan sistem imun dalam saluran pencernaan dapat dilakukan dengan pemberian probiotik. Probiotik adalah minuman kesehatan yang mengandung bakteri asam laktat yang mampu bertahan hidup dalam keasaman lambung sehingga dapat menempati usus dalam kuantitas yang cukup besar, bakteri ini bersifat antagonis terhadap bakteri patogen, karena selama fermentasi bakteri asam laktat menghasilkan asam-asam organik dan senyawa bakteriocin yang mampu menghambat pertumbuhan mikroba patogenik dan mikroba pembusuk. Bakteri probiotik dapat memberikan berbagai efek positif terhadap kesehatan melalui berbagai mekanisme. Mekanisme probiotik dalam menjaga keseimbangan mikroflora saluran cerna adalah melalui kompetisi nutrisi, kompetisi reseptor untuk penempelan pada sel epitel, produksi anti mikrobia, dan stimulasi imunitas pada ekosistem endogenus (Sunaryanto, 2014).

Lactobacillus sebagai salah satu agen probiotik dapat memodulasi sistem imun untuk mencegah penyakit peradangan usus (Towoliu, 2013). Pemberian strain *Lactobacillus* menyebabkan penekanan pada respon imun Th1 dan Th17 yang berperan dalam menyebabkan inflamasi (Proborini, 2013).

Nira siwalan mengandung nutrisi yang cukup lengkap seperti sukrosa, glukosa, fruktosa, nitrogen dan mineral yang merupakan media yang baik untuk pertumbuhan mikroorganismne, seperti bakteri asam laktat. Nira siwalan dapat difermentasi berdasarkan pembuatan susu fermentasi yaitu dengan menggunakan bakteri asam laktat *Lactobacillus casei*. Menurut Suseno (2000) bahwa pemberian nira siwalan hasil fermentasi *L. casei* memiliki daya anti mikroba pada beberapa bakteri patogen secara in vitro, salah satunya terhadap *E.coli* dengan daya hambat sebesar 12,37-14,84 mm². *L. casei* memiliki keunggulan dalam menggunakan gula sebagai sumber karbon dalam jangka waktu yang cukup lama dibandingkan dengan kelompok bakteri probiotik yang lain, sehingga produk fermentasi nira siwalan memiliki umur simpan yang cukup lama. Selain itu, *L. casei* memiliki sifat tahan terhadap asam lambung dan asam empedu oleh karenanya perlu dilakukan percobaan secara in vivo. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa pemberian bakteri probiotik *L. casei* strain Shirota dalam susu dapat mencegah terjadinya diare akibat *E.coli* penghasil toksin pada kelinci yang masih bayi (Ogawa dkk, 2001). Pemberian susu fermentasi yang mengandung *L.casei* DN-114 001 dapat mengurangi gejala dan lama waktu diare tikus berumur 2-10 hari yang belum disapih karena rotavirus. Pemberian probiotik pada anak sapi dapat mengurangi jumlah *E. coli* O157:H7 (Sumaryati, 2009).

Penelitian ini diharapkan dapat mengetahui potensi nira siwalan hasil fermentasi *L. casei* sebagai kandidat prebiotik dalam menghambat kerusakan mukosa usus serta memodulasi sistem imun akibat infeksi *E. coli*. Penelitian ini dilakukan secara eksperimental dengan pemberian terapi preventif nira siwalan pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinfeksi *E. coli* kemudian kadar interleukin 10 diukur dengan metode Imunohistokimia (IHK) dan pembuatan preparat histopatologi sekum.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan masalah sebagai berikut :

1. Apakah pemberian nira siwalan hasil fermentasi *Lactobacillus casei* dapat menghambat kerusakan mukosa sekum tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinfeksi *Escherichia coli*?
2. Apakah pemberian nira siwalan hasil fermentasi *Lactobacillus casei* dapat meningkatkan ekspresi interleukin-10 tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinfeksi *Escherichia coli*?

1.3 Batasan Masalah

Batasan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Hewan coba yang digunakan yaitu tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) sejumlah 20 ekor yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang dengan umur 8-12

minggu dan berat badan 150-250 gram. Penggunaan hewan coba telah mendapatkan sertifikasi laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Muhammadiyah Malang No : E.5.a/47/KEPK-UMM/IV/2016.

2. *Lactobacillus casei* dalam sedian kultur media MRS-A dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang digunakan untuk pembuatan starter dalam susu skim 10% sebanyak 2 ose dan untuk mengetahui konsentrasi bakteri dilakukan perhitungan jumlah bakteri dengan metode TPC mulai jam ke-0 hingga jam ke-13 atau telah memenuhi syarat $>10^8$ cfu/ml. Selanjutnya starter difermentasikan dalam media nira siwalan dengan konsentrasi 0,5% (v/v) (Suseno, 2000).
3. Dosis pemberian *Escherichia coli* dalam sediaan kultur 10^6 CFU/ml (1 ml/hari dosis tunggal) yang diberikan secara oral selama 7 hari (Dewi dkk, 2014 ; Arif *et al*, 2008).
4. Nira siwalan hasil fermentasi *Lactobacillus casei* diberikan dengan volume masing-masing 1,8 ml/ekor, 2,7ml/ekor, 3,6 ml/ekor selama 16 hari yang diberikan secara per oral (PO) sesuai dengan kelompok perlakuan.
5. Parameter yang diamati yaitu histopatologi sekum yang diwarnai dengan pewarnaan Haematoksilin Eosin (HE) untuk mengetahui kerusakan mukosa sekum.
6. Ekspresi interleukin 10 dianalisa dengan metode IHK. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop dengan 5 lapang pandang.

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mengetahui pengaruh pemberian nira siwalan hasil fermentasi *Lactobacillus casei* dapat menghambat kerusakan mukosa sekum tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinfeksi *Escherichia coli*.
2. Untuk mengetahui pengaruh pemberian nira siwalan hasil fermentasi *Lactobacillus casei* dapat meningkatkan respon imun interleukin-10 tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinfeksi *Escherichia coli*.

1.5 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat yang diharapkan oleh penulis dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Penelitian ini dapat digunakan sebagai kajian ilmiah pemanfaatan nira siwalan hasil fermentasi *Lactobacillus casei* untuk menghambat kerusakan mukosa sekum dan peningkatan kadar interleukin-10 hasil infeksi *Escherecia coli*.
2. Penelitian ini dapat digunakan sebagai dasar informasi pemanfaatan nira siwalan hasil fermentasi *Lactobacillus casei* sebagai kandidat probiotik dalam dunia kedokteran hewan.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tikus Putih

2.1.1 Klasifikasi Tikus Putih

Tikus albino (tikus putih) banyak digunakan sebagai hewan percobaan di laboratorium. Menurut Akbar (2010) klasifikasi tikus putih adalah sebagai berikut :

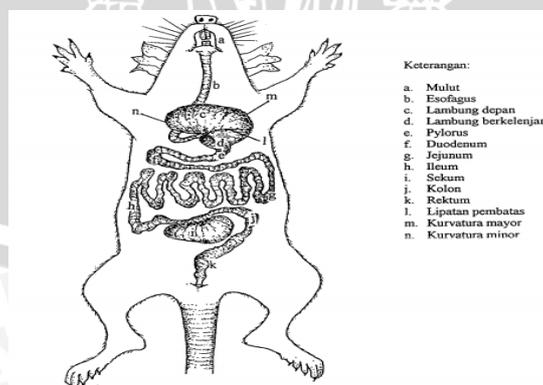
Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Subordo	: Odontoceti
Familia	: Muridae
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>

2.1.2 Morfologi Tikus Putih

Tikus putih yang digunakan untuk percobaan laboratorium yang dikenal ada tiga macam galur yaitu Sprague Dawley, Long Evans dan Wistar. Tikus putih memiliki beberapa sifat yang menguntungkan sebagai hewan uji penelitian di antaranya perkembangbiakan cepat, mempunyai ukuran yang lebih besar dari mencit, mudah dipelihara dalam jumlah yang banyak. Tikus putih juga memiliki ciri-ciri morfologis seperti albino, kepala kecil, dan ekor yang lebih panjang dibandingkan badannya, pertumbuhannya cepat, temperamennya baik, kemampuan laktasi tinggi, dan tahan terhadap arsenik tiroksid (Akbar, 2010).

2.1.3 Sistem Pencernaan Tikus Putih

Menurut *Bivin et al.* (1979) dalam Rita (2001) secara umum sistem pencernaan pada tikus hampir mirip sama dengan hewan mamalia lainnya. Alat pencernaan dimulai dari mulut, esofagus, lambung, usus halus dan berakhir di usus besar seperti pada **Gambar 2.1**. Esofagus memasuki lambung pada bagian kurvatura minor bersambung ke lipatan dari bagian peninggian yang membagi lambung menjadi lambung bagian depan dan lambung kelenjar. Lipatan tadi membuat tikus tidak dapat muntah. Usus halus terdiri atas duodenum, jejunum dan ileum. Panjang usus halus ini kira-kira lima kali panjang usus besar. Fungsi penyerapan pada masing-masing bagian usus halus tergantung pada jenis zat makanan yang akan diserap. Glukosa maksimum diserap di jejunum dan di bagian atas ileum, galaktosa di pertengahan dari ketiga usus halus, protein utuh dan albumin diserap di segmen paling ujung dari usus halus, sedangkan lemak diserap di jejunum. Usus besar terdiri dari sekum, kolon dan rektum. Menurut Hermita dkk (2008) Seekor tikus dewasa rata-rata mengonsumsi sekitar 5 gram pakan dan 5 ml air per 100 gram BB.



Gambar 2.1 Skema Pencernaan Tikus (*Bivin et al.*, 1979) dalam (Rita, 2001)

2.2 *Escherichia coli*

2.2.1 Morfologi

E. coli tergolong bakteri Gram Negatif, berbentuk batang yang tidak membentuk spora, tidak tahan asam dan ukurannya 2–3 x 0,6 µm. Bakteri ini dapat ditemukan pada berbagai infeksi pada hewan dan merupakan agen primer atau sekunder dari infeksi tersebut. Berdasarkan penyakit yang ditimbulkannya, dapat digolongkan menjadi dua kelompok. Pertama, *E. coli* yang bersifat oportunistik, artinya dapat menyebabkan penyakit dalam keadaan tertentu, misalnya kekurangan makanan atau mengikuti penyakit lain. Kedua, bersifat enteropatogenik/enterotoksigenik, *E. coli* yang mempunyai antigen perlekatan dan memproduksi enterotoksin sehingga dapat menimbulkan penyakit (Tarmudji, 2003).

Menurut Barnes dan Gross (1997) yang dikutip oleh Tarmudji (2003), Ada tiga macam struktur antigen yang penting dalam klasifikasi *E. coli* yaitu, antigen O (Somatik), antigen K (Kapsel) dan antigen H (Flagella). Determinan antigen (tempat aktif suatu antigen) O terletak pada bagian liposakarida, bersifat tahan panas dan dalam pengelompokannya diberi nomor 1,2,3 dan seterusnya. Antigen K merupakan polisakarida atau protein, bersifat tidak tahan panas dan berinterferensi dengan aglutinasi O, sedangkan antigen H mengandung protein, terdapat pada flagella yang bersifat termolabil. Pada saat ini telah diketahui ada 173 grup serotipe antigen O, 74 jenis antigen K dan 53 jenis antigen H.

2.2.2 Patogenesitas *E.coli* terhadap Kerusakan Usus

1. EPEC

EPEC merupakan salah satu serotipe *E. coli* patogen yang dapat membentuk koloni di permukaan sel epitel mukosa usus dan menyebabkan kerusakan pada vili usus. Menurut Dewi,dkk (2014) dalam penelitiannya paparan EPEC selama tujuh hari berturut-turut mampu menyebabkan kerusakan lapisan mukosa usus. Kerusakan yang terlihat berupa terjadinya erosi vili dari lapisan mukosa usus halus. Erosi vili merupakan kehilangan sebagian epitel pada lapisan mukosa usus halus. Erosi vili mengakibatkan ketebalan lapisan mukosa usus halus menjadi lebih rendah. Sedangkan menurut Arif *et al* (2010) *E. coli enteropatogenik* (EPEC) merupakan salah satu strain dari *E. coli* yang menyebabkan diare jika dikonsumsi pada dosis 10^5 - 10^{10} cfu/ml. Populasi EPEC penyebab diare dapat diberikan sebesar 10^6 cfu/ml sebanyak 1 ml per ekor tikus percobaan per hari berdasarkan pada dosis infeksi EPEC yang dapat menyebabkan diare, yaitu minimal 10^5 cfu/ml (Oyetayo, 2004). Berdasarkan penelitian Towoliu, dkk (2013) juga menyatakan bahwa tikus yang diberi *E.coli* 10^6 CFU (1ml) selama 7 hari menyebabkan epitel usus mengalami erosi (sel epitel denudasi), terjadinya pelebaran pembuluh darah kapiler dan banyak limosit pada lamina propia dan muskularis mukosa sampai submukosa. Menurut Yousif *et al.*, (2013) LD50 dari *E.coli* yaitu 10^{10} cfu yang menimbulkan kematian pada mencit sebanyak 50%, sedangkan *E.coli* yang diberikan dengan dosis 10^9 cfu menyebabkan kematian sebanyak 17%.

Bakteri EPEC yang dipaparkan pada mencit dapat melekat dengan baik pada mukosa usus halus mencit. Hal ini dapat terjadi karena pada mukosa usus halus mengandung senyawa yang dapat memediasi perlekatan EPEC. Umumnya perlekatan bakteri pada sel epitel inang berguna untuk mencegah tersapunya bakteri oleh mukus yang membasahi permukaan jaringan. Mukus ini terbentuk dari mucin yang merupakan glikoprotein yang menyusun mukus tersebut. Perlekatan EPEC pada mukosa usus halus diduga juga disebabkan oleh enzim yang dihasilkan oleh EPEC. Enzim ini berguna untuk memperantarai proses perlekatan EPEC dengan mukosa usus halus sehingga EPEC dapat melekat kuat. EPEC menghasilkan enzim protease ekstraseluler yang dapat mendegradasi mucin pada mukosa usus halus sehingga dapat melekat. Perlekatan EPEC menyebabkan kerusakan pada lapisan mukosa usus halus (Dewi dkk., 2014).

Sumber lain juga menambahkan bahwa mekanisme patogenitas EPEC pada hewan coba terjadi melalui jalur *cell signaling*. Patogenitas EPEC diawali dengan penempelan pada sel epitel usus halus dan membentuk lesi *attaching and effacing* (A/E). Ciri dari patogenitas A/E terletak pada tumpuannya di permukaan sel inang dan menyebabkan kerusakan pada mikrovili usus halus. Perlekatan EPEC diduga bukan hanya karena adanya enzim protease ekstraseluler, tetapi juga dipengaruhi oleh hidrofobilitas dan muatan ion di permukaan, pengikatan molekul pada bakteri (ligand) dan interaksi reseptor dengan sel inang. Interaksi antara bakteri dengan sel inang dibantu oleh molekul permukaan spesifik. EPEC mempunyai sifat perlekatan ke sel usus halus yang diperantarai oleh pilus. Tahap awal penempelan EPEC pada sel epitel diperantarai oleh *bundle-forming pilus*

(BFP). Setelah pelekatan awal, mikrovili usus halus diganggu dan EPEC mensekresikan beberapa faktor virulen seperti reseptor Tir (*Translocated Intimin Receptor*) ke dalam sel inang. EPEC kemudian mengikat Tir melalui protein membran luar, intimin. Transduksi sinyal terjadi dalam sel inang, termasuk aktivasi protein kinase C (PKC), inositol triphosphate (IP3), dan pelepasan Ca^{2+} . EPEC memiliki *locus of enterocyte effacement* (LEE), yang membantu (menginduksi) perkembangan lesi A/E. LEE terdiri dari gen *eae* yang mengkode intimin, protein membran terluar yang berikatan dengan protein di dalam membran inang, sehingga dapat membentuk lesi A/E. Hal ini menunjukkan bahwa EPEC mampu menginduksi perubahan transport elektrolit ke sel inang (Dewi dkk., 2014).

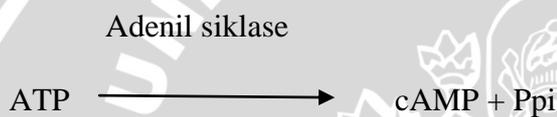
2. EHEC

Enterohemoragik *E. coli* (EHEC) memiliki beberapa factor virulen yang membantu bakteri menyerang induk semangnya yaitu saluran pencernaan. *Shiga like toxin* (SLT) atau *shiga toxin* yaitu Stx1 dan Stx2 adalah salah satu factor virulen dari EHEC utama. Toksin yang dihasilkan dalam lumen usus dapat masuk ke lapisan usus bagian lebih dalam, akibat adanya factor virulen yang lain yaitu intimin. Faktor virulen intimin dapat menyebabkan munculnya *attaching dan effacing lesions* sehingga terjadi *locus of enterocyte effacement* (LEE). Setelah bakteri EHEC berhasil menempel pada epitel usus dan menimbulkan lesi maka bakteri dan toxin yang telah dihasilkan dalam lumen usus dapat menembus ke bagian lapisan yang lebih dalam dan menembus lapisan endotel sehingga masuk ke dalam aliran darah sehingga menyebabkan efek sistemik (Andriani, 2006).

3. ETEC

E.coli memproduksi enterotoksin, yang disebut *E.coli* enterotoksigenik, ada dua jenis toksin yang berbeda yaitu toksin yang tahan panas (ST) dan yang labil terhadap panas (LT). Toksin LT rusak dengan pemanasan 65⁰C selama 30 menit. Kedua toksin ini menyebabkan diare (Volk dan Wheeler, 1988).

Toksin LT hasil pemurnian identik dengan toksin kolera. Toksin LT merangsang aktivitas siklase adenil yang terikat membran. Hal ini mengakibatkan perubahan ATP menjadi AMP siklik (cAMP), seperti terlihat di bawah ini :



(Sumber : Volk dan Wheeler, 1988).

Penumpukan cyclic-AMP pada sel mukosa usus akan memblok absorpsi air pada bagian vilus dan merangsang sekresi cairan tubuh dan garam elektrolit pada bagian kripta usus. Sekresi lebih besar dari absorpsi sehingga hewan menjadi diare dan dehidrasi (Supar, 1997).

Toksin ST, protein kecil, akan mempertahankan toksisitasnya setelah dipanaskan sampai 100⁰C selama 30 menit. Protein ini telah dibuktikan merangsang kegiatan siklase guanilat dalam sel-sel epitel usus. Enzim ini membentuk monofosfat guanosin siklik (cGMP) dan GIP dalam reaksi analog dengan yang telah digunakan untuk pembentukan cAMP. Toksin ST tidak mengubah taraf cAMP, dan kelihatannya cGMP bertindak sebagai penengah intrasel untuk perubahan pengangkutan ion dengan menghambat penyerapan Cl⁻, yang menyebabkan kehilangan cairan dari usus (Volk dan Wheeler, 1988).

2.2.3 Mekanisme *E.coli* terhadap Imunitas

Profil imunologis pada awal perjalanan alamiah paparan patogen akan mengubah keseimbangan imunologis sel Th1-Tregulator-Th2-Th17, dimana akan terjadi peningkatan respon Th1 dan Th17, sedangkan respon Th2 dan Tregulator akan menurun. Hal serupa di dapatkan pada penelitian Pulendran *et al* (2001) dan Iskandar (2009) yang menemukan bahwa respon imun terhadap paparan LPS *E. coli* akan menyebabkan peningkatan respon imun proinflamasi yaitu respon imun Th1 dan Th17, serta penekanan pada respon imun Th2. Athiyyah dkk, (2012) juga berpendapat bahwa pemberian LPS sebagai model infeksi (dari bakteri gram negatif) pada mencit sehat menimbulkan peningkatan respon Th1 dan penurunan respon Th2. Secara profil keseimbangan imunologis menunjukkan dominasi respon Th1.

2.3 Bakteri Asam Laktat sebagai Probiotik

2.3.1 Pengertian Probiotik

Bakteri probiotik merupakan mikroorganisme non patogen, yang jika dikonsumsi memberikan pengaruh positif terhadap fisiologi dan kesehatan inangnya. Berbagai senyawa hasil metabolismenya seperti asam laktat, H_2O_2 , bakteriosin yang bersifat antimikroba dan berbagai enzim yang dimilikinya seperti laktase (membantu mengatasi intoleransi terhadap laktosa) serta *bile salt hydrolase* (membantu menurunkan kolesterol) serta adanya aktivitas antikarsinogenik dan stimulasi imun sistem terhadap fisiologi dan kesehatan inangnya (Yulinery dkk., 2006).

Bakteri probiotik dapat memberikan berbagai efek positif terhadap kesehatan melalui berbagai mekanisme. Dari berbagai efek yang muncul, efek yang paling utama adalah menjaga keseimbangan mikroflora pada intestin dan memiliki efek anti diare akibat patogen enterik. Mekanisme probiotik di dalam mikroflora yang seimbang adalah melalui kompetisi nutrisi, kompetisi reseptor untuk penempelan pada sel epitel, produksi anti mikroba, dan stimulasi imunitas pada ekosistem endogenus (Sunaryanto dkk., 2014).

2.3.2 Bakteri Asam laktat

Bakteri asam laktat (BAL) didefinisikan sebagai bakteri yang mampu menghasilkan asam laktat dari sumber karbohidrat yang dapat difermentasi. Bakteri asam laktat bersifat gram positif, tidak membentuk spora, dapat berbentuk bulat atau batang, umumnya bersifat katalase negatif. Pertumbuhan BAL membutuhkan karbohidrat yang dapat difermentasi. Klasifikasi bakteri asam laktat meliputi genus *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Pedicoccus*, *Tetragenococcus* dan *Aerococcus* dan *Leuconostoc* (Kusumawati, 2000).

Menurut Sunaryanto (2014) Syarat utama strain BAL yang dapat digunakan sebagai agensia probiotik adalah memiliki resistensi terhadap asam dan empedu sehingga dapat mencapai intestin dan memiliki kemampuan menempel pada mukosa intestin. Syarat lain yang perlu dimiliki oleh bakteri probiotik adalah kemampuannya menghasilkan substansi antimikrobia sehingga mampu menekan pertumbuhan bakteri patogen enterik. Berbagai jenis substansi antimikrobia yang

dihasilkan oleh bakteri probiotik adalah asam organik, hidrogen peroksida, diasetil dan diperkirakan juga bakteriosin yaitu protein atau polipeptida yang memiliki sifat anti bakteri. Syarat lain mikrobia probiotik adalah tumbuh baik secara *in vitro*, memiliki stabilitas dan viabilitas yang tinggi dan aman. Dari berbagai persyaratan yang diperlukan *Lactobacillus* dan *Bifidobakteria* yang merupakan penghuni alami jalur intestin merupakan bakteri yang banyak digunakan sebagai agensia probiotik. Bakteri ini ditemukan pada membran mukosa. Sejumlah *Lactobacillus* mampu menghasilkan komponen antimikroba yang disebut bakteriosin misalnya asidolin, asidofilin maupun laktosidin.

2.3.3 *Lactobacillus*

Genus *Lactobacillus* mempunyai beberapa kelebihan yang berpotensi untuk digunakan sebagai agen probiotik, diantaranya adalah mampu bertahan pada pH rendah, tahan terhadap garam empedu, memproduksi antimikrobia dan daya antagonistik terhadap patogen enterik, mampu mengasimilasi serum kolesterol dan mendekongugasi garam empedu serta dapat tumbuh baik pada medium sederhana. Berdasarkan produk fermentasinya *Lactobacillus* dibagi menjadi dua yaitu homofermentatif jika memfermentasikan gula menjadi asam laktat sebagai produk utama dan sebagian kecil asam asetat serta karbondioksida, dan heterofermentatif jika produk fermentasinya berupa alkohol dan asam laktat (Rahayu, 2001).

Lactobacillus casei yang digunakan sebagai starter pada produk minuman probiotik termasuk jenis bakteri asam laktat homofermentatif, yaitu bakteri yang

memfermentasi glukosa menjadi asam laktat dalam jumlah yang besar (90 persen). Selain asam laktat juga dihasilkan asam sitrat, malat, suksinat, asetaldehid, diasetil dan asetoin dalam jumlah yang kecil, yang mempengaruhi cita rasa minuman probiotik. Berdasarkan morfologinya, *L. casei* berbentuk batang pendek dalam koloni tunggal maupun berantai. dengan ukuran panjang 1.5 - 5,0 mm dan lebar 0.6 - 0,7 mm. Bakteri ini bersifat Gram positif, katalase negatif, tidak membentuk endospora maupun kapsul, tidak mempunyai flagela dan tumbuh dengan baik pada kondisi anaeroh fakultatif. Berdasarkan suhu pertumbuhannya, bakteri ini termasuk bakteri mesofil yang dapat hidup pada suhu 15-41°C dan pada pH 3,5 atau lebih, sedangkan kondisi optimum pertumbuhannya adalah pada suhu 37°C dan pH 6.8 (Suseno, 2000).

Hasil percobaan secara *ex vivo*, diketahui bahwa *L. casei* mampu hidup pada kisaran pH 3,0 sampai 7,0 bakteri ini memiliki sifat tahan terhadap asam lambung dan asam empedu. Selain itu, *L. casei* memiliki keunggulan dalam menggunakan gula sebagai sumber karbon dalam jangka waktu yang cukup lama dibandingkan dengan kelompok bakteri probiotik yang lain, sehingga produk memiliki umur simpan yang cukup lama (Suseno, 2000).

Menurut Suseno (2000) dalam penelitiannya konsumsi yakult yang mengandung *L. casei* secara teratur setiap hari dapat meningkatkan jumlah kelompok bakteri *Lactobacillus*, dan sebaliknya dapat menekan bakteri *E.coli*. Jumlah bakteri *E.coli* akan menurun dari $8,0 \times 10^7$ koloni/rnl hingga di bawah $1,0 \times 10^7$ koloni/ml jika dikonsumsi yakult selama 9 hari. Akan tetapi ketika konsumsi yakult dihentikan, jumlah bakteri *L. casei* akan menurun. Sebaliknya

bakteri *E.coli* jumlahnya akan meningkat hingga $6,0 \times 10^7$ koloni ml dalam waktu 9 hari setelah konsumsi yakult dihentikan.

Berdasarkan penelitian Mirzaei *et al* (2012) mengenai efek konsumsi fermentasi susu dengan *Latobacillus casei* dan *L. plantarum* pada mencit yang diinfeksi *E.coli* 0157:H7, diketahui bahwa pemberian *Latobacillus casei* sebanyak 0,5 ml selama 7 hari dapat menurunkan koloni *E. coli* pada usus besar tikus sebanyak $12 \pm 0,42 \times 10^5$ dari $170 \pm 0,14 \times 10^6$. *Lactobacillus casei* strain shirota dapat mencegah perlekatan bakteri pada permukaan intestine. Efek penghambatan perlekatan tersebut (>30%) dilakukan terhadap *E.coli* dan *S. typhimurium*. McFarland and Elmer (2006) menyatakan bahwa untuk memberikan efek yang baik bagi tubuh, dosis rekomendasi probiotik yaitu 10^8 - 10^{10} cfu/hari. Sedangkan pada penelitian tentang toksisitas probiotok, diketahui bahwa pemberian *Latobacillus* dengan dosis tinggi 10^{12} CFU/ml tidak menyebabkan kematian pada mencit atau tikus. Menurut Pawartha dkk (2015) pemberian enkapsulasi *Latobacillus casei* pada tikus dengan dosis 10^9 cfu/g dapat meningkatkan total bakteri asam laktat dan mengurangi total bakteri *E.coli* pada sistem digesti tikus.

2.3.4 Mekanisme Kerja Probiotik terhadap Sistem Imun Usus

Cara kerja bakteri probiotik dalam mendesak pertumbuhan bakteri penyebab penyakit nampaknya diawali dari pengaruh kerjanya terhadap sistem imun. Sekitar 80% dari total sel yang memproduksi imunoglobulin dalam tubuh berada dalam lamina propria usus. Enterosit (*intestinal epithelial cells*, IEC) merupakan sel imunokompeten yang berperan pada berbagai reaksi lokal terhadap

mikroorganisme patogen. Interaksi enterosit dengan faktor-faktor sekitar selain mengaktifasi proses enzimatik terhadap antigen makanan juga mengaktifasi ekspresi molekul adesi, MHC kelas I dan II, presentasi antigen terhadap limfosit, produksi sitokin, transportasi sIg (*secretory immunoglobulins*) dan kompleks imun dengan sIgA. Sel imunokompeten yang lain adalah makrofag dan sel dendrit yang memegang peran penting dalam melindungi tubuh terhadap antigen di tingkat mukosa. Ini berarti, sistem imun seluler yang teraktivasi oleh kehadiran mikroorganisme probiotik akan meningkatkan produksi IgA (imunoglobulin A) yang berperan pada sistem imun mukosa. Sintesis IgA tergantung pada sel T dan sitokin yang diproduksi oleh limfosit yang teraktivasi (Djunaedi, 2007). *Lactobacillus* dapat memodulasi sistem imun untuk mencegah penyakit peradangan usus (Towoliu, 2013). Pemberian strain *Lactobacillus* menyebabkan penekanan pada respon imun Th1 dan Th17 yang berperan dalam menyebabkan inflamasi (Proborini, 2013). Beberapa peneliti juga melaporkan manfaat probiotik *Lactobacillus* dan *Bifidobacteriae* terbukti mampu menginduksi pembentukan sitokin antiinflamasi IL-10 yang berperan dalam mekanisme downregulating, yaitu dengan menghambat pembentukan IL-4 dan IL-5 agar kerja tidak berlebihan. Interleukin-10 merupakan *cytokine synthesis inhibitory factor*, dan bersama TGF- β dapat meningkatkan produksi IgA oleh sel B (Qodriani dan Setiani, 2010). Seperti halnya pendapat Moore *et al.*, (2001) dalam Delcenserie *et al.*, (2010) probiotik dapat meningkatkan produksi IL-10, yang merupakan sitokin yang diproduksi oleh banyak sel termasuk sel Th2, monosit, sel B, keratinosit dan sel T regulator. IL-10 memiliki efek antiinflamasi dan menghambat respon Th1.

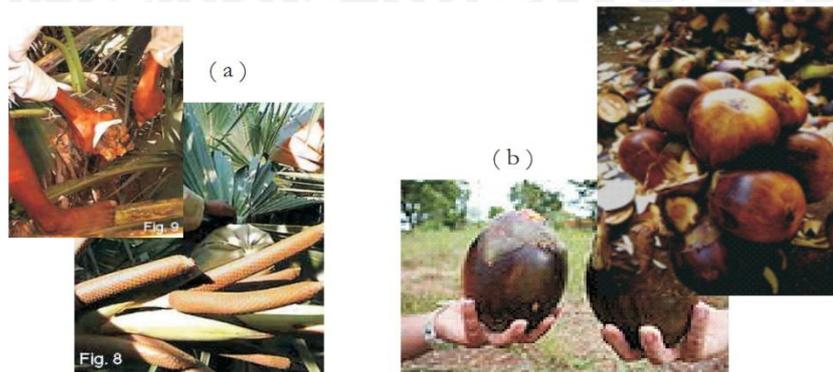
Efek antiinflamasi dari probiotik yaitu akibat adanya penekanan pada sitokin proinflamasi IL-12, IFN- γ dan TNF- α yang di hasilkan di peyer patch.

2.4 Nira Siwalan (*Borassus flabelifer*)

Tanaman siwalan (*Borassus flabelifer*) merupakan jenis tanaman palem-paleman yang tumbuh melimpah di sepanjang Teluk Persia sampai Asia Tenggara, tidak terkecuali di Kabupaten Tuban Jawa Timur. Di Indonesia tanaman ini memiliki beberapa nama lain diantaranya lontar atau tal. Pohon ini terutama tumbuh di daerah-daerah kering. Tingginya sekitar 20-40 meter dengan 30-40 tangkai bunga setiap pohonnya. Siwalan banyak tumbuh di sebelah timur pantai pulau Jawa, Madura, Bali, Nusa Tenggara Barat, dan Nusa Tenggara Timur (Mubin dan Zubaidah, 2016).

Klasifikasi tanaman siwalan menurut Davis and Johnson (1987) adalah :

Kingdom	: Plantae
Diviso	: Magnoliophyta
Klas	: Liliopsida
Ordo	: Arecales
Famili	: Arecaceae
Genus	: <i>Borassus</i>
Spesies	: <i>Borassus flabellifer</i>



Gambar 2.2 Bunga (a) dan Buah (b) Lontar *Borassus flabellifer* L (Tambunan, 2010).

Nira siwalan pada keadaan segar rasanya manis, berbau harum, jernih dan tak benwarna. Rasa manis nira disebabkan oleh tingginya kadar gula (kurang lebih 12%). Nira mengandung karbohidrat yang terdiri dari sukrosa, glukosa dan fruktosa (Suseno, 2000).

Nira siwalan merupakan cairan yang diperoleh dengan cara menyadap tangkai bunga tanaman siwalan yang dipotong seperti pada **Gambar 2.2**. Nira siwalan mengandung nutrisi yang cukup lengkap yaitu kadar gula total yang cukup tinggi $\pm 13\%$ (sukrosa, glukosa dan fruktosa) dan senyawa mikroesensial lain, seperti nitrogen dan mineral seperti yang diuraikan pada **Tabel 2.1** dan **Tabel 2.2** (Suprijono dkk, 2003). Kandungan nutrisi yang cukup lengkap dalam nira siwalan menyebabkan nira siwalan dalam keadaan segar mudah terfermentasi secara spontan. Mikroba yang dapat tumbuh pada fermentasi spontan nira siwalan adalah golongan khamir, bakteri asam laktat, bakteri asam asetat. Pada fermentasi spontan nira siwalan selama 24 jam, pertumbuhan mikroba didominasi oleh bakteri asam laktat (BAL).

Legen (nira siwalan) yang disimpan pada suhu kamar akan mengalami proses fermentasi atau peragian gula karena adanya proses enzimatik. Bahan baku energi yang paling banyak digunakan adalah glukosa. Metabolisme tipe anaerobik menghasilkan sejumlah kecil energi, karbondioksida, air, dan produk akhir metabolik organik lain, seperti asam laktat, asam asetat, dan etanol. Glukosa yang terkandung dalam nira menunjang pertumbuhan aktif organisme-organisme fermentatif. Nira siwalan yang sudah mengalami fermentasi ini biasa disebut dengan legen atau tuak. Proses fermentasi pada nira siwalan, yang pertama adalah fermentasi gula yang terkandung dalam nira menjadi alkohol oleh mikroorganisme yang merupakan suatu cemaran pada minuman ini, selain pembentukan alkohol juga terjadi proses oksidasi alkohol tersebut menjadi asam asetat dimana kedua proses ini terjadi secara bersamaan (Sholikhah, 2010).

Nira segar tidak tahan disimpan, hanya beberapa jam (24 - 36 jam) sejak disadap, nira siwalan akan mengalami perubahan, yaitu ditandai dengan timbulnya gelembung dan rasanya seperti tuak atau asam (Suseno, 2000). Nira siwalan mengalami fermentasi dengan adanya mikroorganisme yang mengubah sukrosa menjadi alkohol, dan berlanjut menjadi asam.

Tabel 2.1 Komposisi Kimia Nira Siwalan (tiap 100 gram bahan)
sumber : (Suseno, 2000)

Komponen	Komposisi
Air (g)	86,1
Protein (g)	0,3
Lemak (g)	0,02
Karbohidrat (g)	13,54
Abu (g)	0,04

Tabel 2.2 Komposisi Nira Siwalan Sumber : (Davis and Johnson, 1987)

Karakteristik	Jumlah
Berat Jenis	1,076
pH	6,7 – 6,9
Nitrogen (g/100cc)	0,056
Protein (g/100cc)	0,35
Total gula (g/100cc)	10 – 15
Gula reduksi (g/100cc)	0,96
Mineral sebagai abu (g/100cc)	0,54
Kalsium	Sedikit
Fosfor (g/100cc)	0,14
Besi (g/100cc)	0,4
Vitamin C (mg/100cc)	13,25
Vitamin B1 (IU)	3,9
Vitamin kompleks	Diabaikan

2.5 Interleukin-10 (IL-10)

Saluran usus mamalia mengandung bakteri tertinggi dalam tubuh, terutama usus besar, yang mencapai hingga 10^{14} bakteri per gram konten fekal. Sistem kekebalan tubuh usus terlibat dalam dialog yang konstan dan dinamis dengan mikrobiota usus untuk mempertahankan keadaan homeostatis usus. IL-10 memainkan peran penting dalam mencegah immunopathology terhadap mikroflora komensal. Berdasarkan penelitian, IL-10 pada tikus dikembangkan secara spontan terhadap enterocolitis pada sekum, kolon ascenden, colon transversal, kolon descenden, dan rektum dan akhirnya juga mempengaruhi usus kecil. Intrleukin (IL)-10 diidentifikasi sebagai faktor yang disekresikan oleh CD4+ sel T helper tipe 2 (Th2), dengan kemampuan yang kuat dalam menghambat sekresi dari sel Th1. IL-10 bertindak tidak hanya untuk mengontrol fungsi sel Th1, tetapi juga untuk menekan kegiatan proinflammatory dari berbagai jenis sel lain (Kole, 2014).

Interleukin 10 atau *cytokines synthesis inhibitory factor*, merupakan protein yang larut dan terdiri dari 160 asam amino dengan berat molekul sekitar 18 kD. IL-10 terdiri dari dua ikatan disulfide intra molekul dan bersifat labil. Sekresi sitokin ini berasal dari sel T, sel B, monosit, makrofag, sel mast, sel eosinofil, keratinosit, hepatosit, sel epitel dan lain-lain (Soeroso, 2007). Sedangkan menurut Islam (2007) Interleukin 10 (IL-10) atau disebut juga *cytokine synthesis inhibitory factor* (CSIF) adalah suatu sitokin yang diproduksi oleh TH0 dan TH2 subset dari sel helper CD4- (*cluster of differentiation 4*-). Sitokin tersebut paling banyak diproduksi oleh sel makrofag teraktivasi, monosit dan juga oleh tipe sel nonlimfositik seperti keratinosit. IL-10 mempunyai dua aktivitas utama: pertama menghambat TNF- α , IL-1, kemokin, dan IL-12 yang diproduksi oleh makrofag; kedua, berfungsi paling banyak menghambat berbagai fungsi makrofag teraktivasi melalui aktivasi sel T dan merupakan umpan balik negatif. Penghambatan fungsi tambahan tersebut terjadi melalui pengurangan ekspresi molekul *major histocompatibility complex* (MHC) tipe II dan mengalami pengurangan ekspresi kostimulator tertentu.

IL-10 akhir-akhir ini diidentifikasi sebagai sitokin yang diproduksi oleh subpopulasi sel T yaitu sel T helper 2 yang menghambat sintesis sitokin imunostimulatori yang diproduksi oleh sel T helper 1. IL-10 merupakan sitokin yang diproduksi oleh karena aktivasi makrofag dan sel-sel T helper. Fungsi utama IL-10 adalah menghambat aktifitas makrofag dan memainkan peran penting dalam homeostasis yang diperantarai oleh sel-sel imun. Dua fungsi utama IL-10 adalah menghambat produksi beberapa jenis sitokin lain (TNF, IL-1,

chemokine, dan IL-12), dan menghambat fungsi makrofag dalam membantu aktivasi sel T. Hambatan fungsi makrofag terjadi karena IL-10 menekan ekspresi molekul MHC kelas II pada makrofag dan mengurangi ekspresi kostimulator sel B dan sel mastosit pada mukosa (Roffi, 2006).

2.5 Fisiologi dan Histologi Sekum

Usus besar terdiri dari sekum, kolon dan rektum. Sekum berbentuk kantung silinder yang berlokasi pada bagian proksimal akhir kolon. Fungsi utama dari usus besar adalah absorpsi air, cairan elektrolit dan nutrisi yang diproduksi oleh bakteri fermentasi. Dinding usus besar terdiri dari empat lapis yang merupakan karakteristik dari saluran pencernaan (Xu dan Cranwell, 2003). Ditinjau dari struktur histologinya, usus besar saluran pencernaan tersusun atas : Tunika mukosa (lamina epitel, propria, dan muskularis mukosa), tunika submukosa (jaringan ikat longgar, pembuluh darah dan saraf), Tunika muskularis (stratum sirkulare dan longitudinal), dan Tunika serosa (Junqueira dan Carneiro, 1982; Rumessen, et al., 2001).

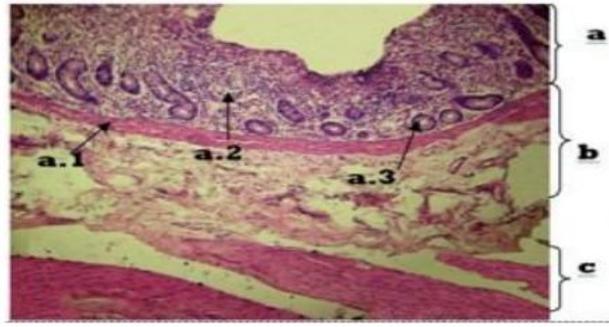
Mukosa usus besar tidak memiliki vili namun mengandung kelenjar tubular yang banyak. Permukaan lumen dan kelenjar tubular dilapisi oleh sel epitel silindris yang secara umum menghasilkan enterosit dari usus halus. Brush border pada permukaan apikal enterosit usus besar lebih kecil daripada enterosit usus halus. Pada usus besar terdapat sel goblet yang mensekresikan mukus dan sel endokrin juga ditemukan pada kelenjar tubular. Walaupun sebagian besar penyerapan nutrisi dilakukan oleh usus halus, namun untuk penyerapan beberapa

nutrien juga dilakukan oleh usus besar. Daerah lumen usus besar merupakan tempat bagi milyaran mikroorganisme (Xu and Cranwell, 2003).

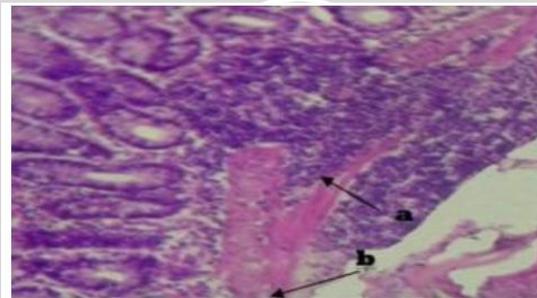
Tunika mukosa sekum memiliki ketebalan $29,7 \pm 5,0$ mm yang tersusun atas lamina epitel silindris sebaris (epitel kolumner simplek), lamina muskularis, dan lamina propria seperti pada **Gambar 2.3**. Pada lamina propria terdapat kelenjar, sama halnya seperti lamina propria pada usus halus. Pada sekum biasanya tidak dijumpai sel paneth, tidak memiliki plika maupun villi, sehingga epitelnya tampak lebih rata jika dibandingkan dengan usus halus. Jenis sel epitel yang ditemukan pada lamina epitelialisnya identik dengan yang ditemukan pada usus halus, hanya saja jumlah sel goblet yang ditemukan lebih banyak (Suwiti, 2010).

Tunika sub mukosa sekum banyak mengandung nodulus limfatikus (peyer patche's) yang tersebar luas (**Gambar 2.4**) dan jaringan ikat longgar, dengan ketebalan $54,8 \pm 8,8$ mm. Lamina muskularis submukosa berkembang baik, tetapi tidak teratur atau terputus-putus karena ditempati oleh nodulus limfatikus, sehingga dengan pewarnaan Hematoxillin Eosin (HE), terlihat memberi aspek lebih gelap/biru ungu.

Tunika muskularis sekum terdiri dari stratum sirkuler dan longitudinal. Lapisan muskularis longitudinal bukan merupakan lapisan utuh tetapi membentuk pita memanjang, dengan taenia ceci (Suwiti, 2010).

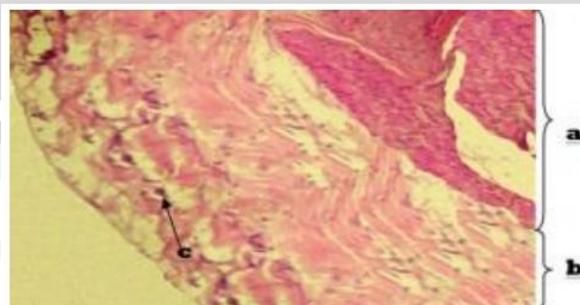


Gambar 2.3 Struktur Histologi Tunika Mukosa, Submukosa dan Muskularis Sekum Sapi Bali. a. Tunika mukosa, (lamina muskularis mukosa (a.1) Lamina Propria (a.2) Kelenjar intestinal (kripta lieberkuhn) (a.3) b. Tunika submukosa, c. Tunika muskularis longitudinal (Suwiti, 2010).



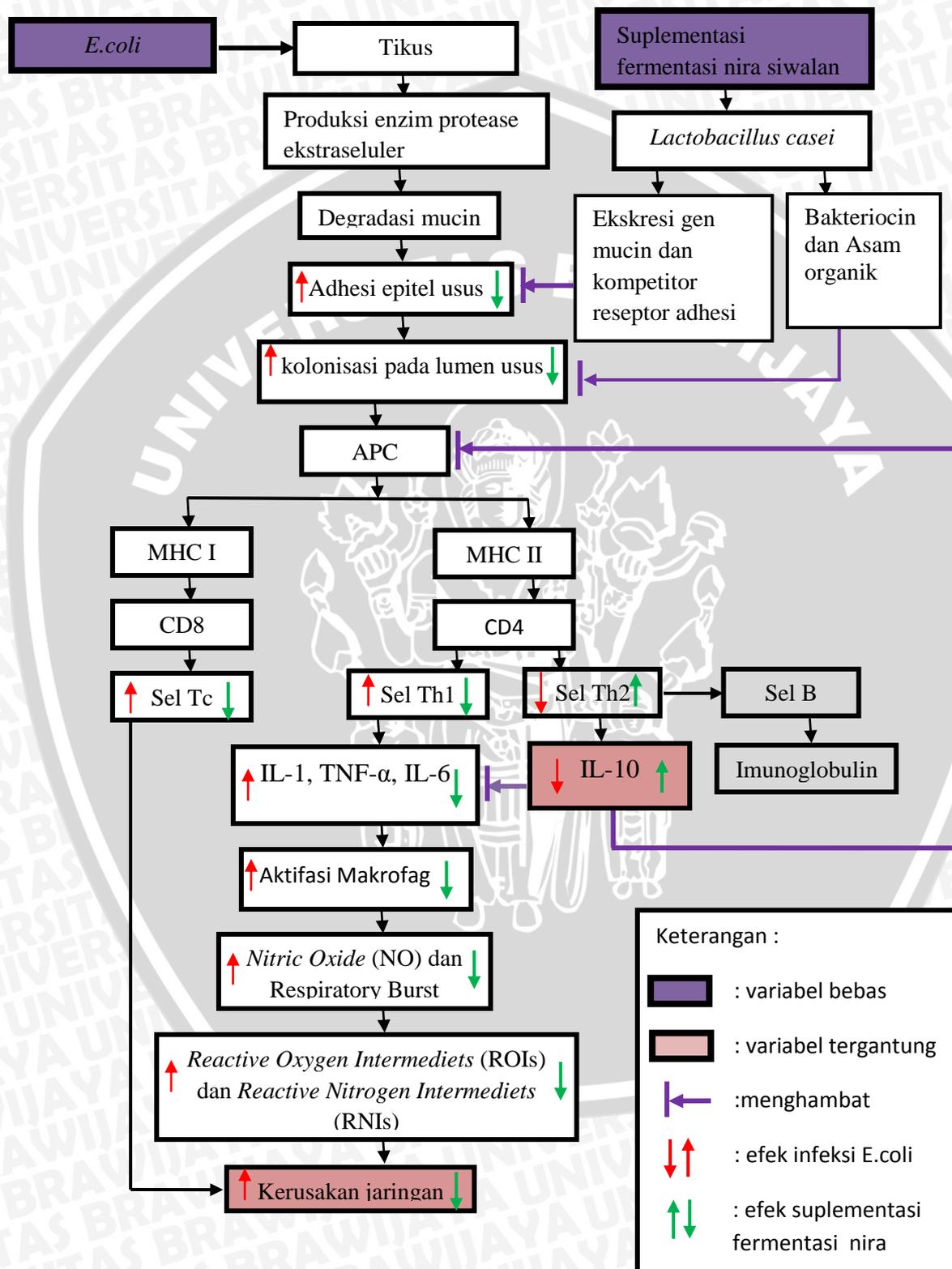
Gambar 2.4 Struktur Histologi Tunika Submukosa Sapi Bali. Jaringan limfatikus(peyer patches) (a) Lamina muskularis mukosa (b) (Suwiti, 2010)

Tunika serosa sekum tersusun oleh jaringan ikat longgar yang mengandung serabut kolagen dan elastik serta ditemukan pembuluh darah dan lemak seperti pada **Gambar 2.5**.



Gambar 2.5 Struktur Histologi Tunika Serosa Sapi Bali. tunika muskularis longitudinal (a) Tunika serosa (b) Jaringan ikat longgar (c) (Suwiti, 2010).

BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS



3.1 Kerangka Konsep

E.coli menghasilkan enzim protease ekstraseluler yang dapat mendegradasi mucin pada mukosa usus sehingga dapat adhesi dan membentuk kolonisasi. Setelah *E.coli* berhasil menempel pada epitel usus dan menimbulkan lesi maka bakteri dan atau toksin yang dihasilkan dalam lumen usus akan invasi ke bagian lapisan yang lebih dalam. Adanya bakteri tersebut akan direspon dan dipresentasikan melalui media APC (*Antigen Presenting Cell*) yaitu MHC I dan MHC II kepada sel T efektor. Sel T efektor dibagi menjadi sel T sitotoksik yang memiliki molekul permukaan CD8+ yang akan mengikat antigen yang dipresentasikan oleh MHC I atau sel T helper yang memiliki molekul CD4+ pada permukaannya dan mengikat antigen yang dipresentasikan MHC II. Sel T CD8+ melakukan killing terhadap sel target yang terinfeksi dengan cara melepas lytic granula (perforin, granzymes) yang melalui ikatan dengan reseptornya memulai suatu kaskade bunuh diri sel menuju apoptosis sel sasaran. Sel T CD4+ dapat berdiferensiasi menjadi 2 tipe sel efektor yaitu Th1 dan Th2, tergantung pada pola pelepasan sitokin. Sel Th1 mensekresi sitokin *macrophage-activating primer*, yang meliputi IL-1, IL-6 dan TNF- α . Setelah makrofag teraktifasi oleh sitokin Th1 maka akan memulai fagositosis melalui mekanisme non-oksidatif, dengan memakan sel bakteri tersebut. Bakteri yang berada dalam fagosom akan mengadakan fusi dengan kompartemen lisosom membentuk fagolisosom, kemudian bakteri akan dipecah menjadi fragmen peptida kecil oleh enzim asal lisosom. Pemusnahan sel bakteri selanjutnya terjadi melalui mekanisme oksidatif. Mekanisme oksidatif dimediasi oleh produksi *reactive oxygen intermediates*

(ROIs) dan *reactive nitrogen intermediates* (RNIs). Jalur produksi RNI dimulai dari proses perubahan L-arginin menjadi L-citrulin dengan bantuan enzim nitric oxide syntase (NOS). Proses ini menghasilkan NO yang dapat teroksidasi menjadi senyawa RNI. Sedangkan respiratory burst seperti NADPH oksidase mengkatalis molekul O_2 menjadi O_2^- (superoksida) yang dapat dimetabolisir menjadi ROI seperti H_2O_2 yang sangat toksik. Respon proinflamatori yang berlebihan akan mengakibatkan kerusakan jaringan yang tidak terkontrol. Tubuh mempunyai suatu mekanisme untuk menetralkan aksi mikrobisidal berlebih yang dimediasi Th1 ini, yaitu dengan respons Th2. Sel Th2 mensekresi IL-4, IL-5, dan IL-10, yang lebih bersifat antiinflamatory. Sitokin Th2 merupakan sitokin penghambat yang penting karena dapat mengurangi oxidative burst dan NO agar jaringan normal terlindung dari kerusakan yang disebabkan ROIs serta RNIs yang toksik. IL-10 juga memiliki fungsi penghambatan dan pembebasan terhadap sitokin Th1 serta menghambat fungsi makrofag teraktivasi melalui aktivasi sel T dan merupakan umpan balik negatif. Penghambatan fungsi tambahan tersebut terjadi melalui pengurangan ekspresi *Major Histocompatibility Complex* (MHC) tipe 2.

Probiotik dapat memodulasi sistem imun untuk mencegah penyakit peradangan usus. Bakteri ini juga berperan sebagai bakteri kompetitor bagi bakteri patogen pada reseptor adhesi sehingga bakteri patogen tidak mampu lagi untuk membentuk koloni dan akhirnya dapat mencegah timbulnya inflamasi atau kerusakan mukosa usus. Selain itu probiotik mempunyai efek pada ekskresi gen mucin yang akan menstimulasi produksi mukus dari mukosa usus sehingga fungsi barrier mukosa usus makin meningkat. Probiotik juga menghasilkan substansi yang

dikenal sebagai bakteriosin, suatu protein yang dimetabolisme secara aktif dan berperan menghancurkan mikroorganisme yang merugikan, serta menghasilkan asam organik seperti asam laktat dan asam asetat. Dengan adanya asam organik seperti asam asetat dan asam laktat akan menyebabkan penurunan pH sehingga menghambat pertumbuhan bakteri patogen yang optimum pada pH 6-7. Probiotik juga dilaporkan dapat menyebabkan penekanan pada respon imun Th1 yang berperan dalam proses inflamasi dengan cara meningkatkan kerja dari Th2.

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah ada, maka hipotesis yang dapat diajukan adalah sebagai berikut : Pemberian nira siwalan hasil fermentasi *Lactobacillus casei* sebagai kandidat probiotik dapat menghambat kerusakan mukosa sekum dan meningkatkan ekspresi interleukin-10 yang ditimbulkan oleh infeksi *Escherecia coli*.

BAB IV METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei-juli 2016. Pemaparan bakteri *E. coli*, pemberian suplementasi fermentasi Nira Siwalan pada hewan coba, dan pengoleksian sampel dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang, analisis kualitatif bahan nira siwalan dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang, preprasi bakteri *E.coli* dan pembuatan fermentasi nira siwalan dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya, pembuatan preparat histopatologi sekum dan pewarnaan imunohistokimia interleukin-10 dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Kesima Medika Rumah Sakit Islam Aisyah Malang.

4.2 Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang terdiri dari 5 kelompok perlakuan. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008) :

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

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

t = jumlah kelompok

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk perlakuan sejumlah 5 macam diperlukan jumlah ulangan minimal 4 kali dalam setiap kelompok. Sehingga total tikus yang dibutuhkan adalah 20 ekor.

4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara *eksperimental post test control design only* menggunakan model Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan membagi hewan coba menjadi 5 kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif (KN), kelompok kontrol positif (KP), kelompok perlakuan 1 (P1), kelompok perlakuan 2 (P2), dan kelompok perlakuan 3 (P3) pada **tabel 4.1** :

Tabel 4.1 Rancangan Penelitian

Kelompok	Keterangan
Kontrol Negatif	Kontrol, tikus hanya diberikan pakan dan minum ad libitum selama 16 hari tanpa perlakuan
Kontrol Positif	Tikus putih yang diberikan perlakuan induksi bakteri <i>Escherechia coli</i> dengan dosis 10^6 CFU/ml pada hari ke 10 selama 7 hari berturut-turut sampai hari ke 16
Perlakuan 1	Tikus putih diberikan fermentasi nira siwalan dengan volume 1,8 ml/ekor selama 16 hari dilanjutkan dengan pemaparan bakteri <i>E.coli</i> dengan dosis 10^6 CFU/ml pada hari ke 10 selama 7 hari dan dilakukan pembedahan pada hari ke 17
Perlakuan 2	Tikus putih diberikan fermentasi nira siwalan dengan volume 2,7 ml/ekor selama 16 hari dilanjutkan dengan pemaparan bakteri <i>E.coli</i> dengan dosis 10^6 CFU/ml pada hari ke 10 selama 7 hari dan dilakukan pembedahan pada hari ke 17
Perlakuan 3	Tikus putih diberikan fermentasi nira siwalan dengan volume 3,6 ml/ekor selama 16 hari dilanjutkan dengan pemaparan bakteri <i>E.coli</i> dengan dosis 10^6 CFU/ml pada hari ke 10 selama 7 hari dan dilakukan pembedahan pada hari ke 17

4.4. Variabel Penelitian

Variabel yang diamati pada penelitian ini yaitu :

Variabel bebas : Pemaparan bakteri *E.coli* dan pemberian nira siwalan hasil fermentasi *Lactobacillus casei*

Variabel tergantung : Ekspresi interleukin-10 dan histopatologi sekum

Variabel kendali : Tikus jantan dengan berat badan 150-250 gram, dengan umur 8-12 minggu, suhu, kelembaban.

4.5 Materi Penelitian

4.5.1 Alat

Alat yang dipakai dalam penelitian ini yaitu bak pemeliharaan hewan coba, tempat makan dan minum tikus, box paparan, sonde, seperangkat alat bedah, cawan petri, gelas objek, pot sampel, refrigerator, tabung reaksi, sentrifugator, pipet tetes, gelas ukur, inkubator, colony counter, laminar air flow, autoclave.

4.5.2 Bahan

Bahan-bahan yang dipakai dalam penelitian ini adalah nira siwalan yang diperoleh dari perkebunan rakyat Desa Dempel Kecamatan Plumpang Kabupaten Tuban Jawa Timur, kultur bakteri *Lactobacillus casei*, susu skim 10%, glukosa 3%, NaOH, kultur bakteri *E.coli*, media EMBA, NB, MRS-A, larutan standar mc farland, etanol (70%, 80%, 90%, 100%), formalin 10%, NaCl fisiologis, aquades, xylol I, II, III, H₂O₂, antibodi deteksi, hydrofobic marker, 3,3-diaminobenzidine, 0,01 M phosphate buffer saline (PBS) pH 7,4, medium perekat Entellan dan aquades.

4.6 Tahapan Penelitian

4.6.1 Preparasi Hewan Coba

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar umur 8-12 minggu berjenis kelamin jantan hasil pengembangbiakan yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang dan telah mendapatkan sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Muhammadiyah Malang, dengan bobot badan awal berkisar 150–250 gram. Kandang yang digunakan adalah kandang individu yang berukuran 17,5 x 23,75 x 17,5 cm. Suhu ruangan diatur pada 22-24⁰C dengan kelembaban udara 60%–70%. Ransum diberikan sebanyak 20 gram per ekor per hari. Air minum diberikan ad libitum. Aklimatisasi tikus terhadap lingkungan selama 7 hari dilakukan pada awal penelitian dengan pemberian ransum standar (Arief *et al.*, 2008). Kandang tikus berlokasi pada tempat yang bebas dari suara ribut dan terjaga dari asap industri serta polutan lainnya. Lantai kandang mudah dibersihkan dan disanitasi.

4.6.2 Pembuatan Fermentasi Nira Siwalan

a. Persiapan Starter

Starter untuk pembuatan probiotik dipersiapkan dengan menginokulasikan kultur *L. casei* sebanyak kurang lebih 2 ose dari media MRS-A ke dalam susu skim 10% steril. Kemudian diinkubasi suhu 37⁰C hingga terdapat koloni bakteri >10⁸ CFU dengan waktu inkubasi sesuai dengan fase pertumbuhan bakteri *L. casei*, dapat dilihat pada **Lampiran 12**. Untuk mengetahui fase pertumbuhan *L.*

casei dilakukan pembuatan kurva baku pertumbuhan *L.casei*. Pembuatan kurva dilakukan dengan menghitung jumlah koloni menggunakan metode TPC *pour plate* dengan interval waktu 1 jam selama 13 jam. Kemudian kurva dibuat berdasarkan persamaan jumlah bakteri terhadap usia bakteri. Pembuatan kultur antara dilakukan dengan menginokulasi *L. casei* sebanyak 0,1% (v/v) sebanyak 0,1 ml dari kultur induk ke dalam susu skim 10%. Setelah inokulasi, kemudian diinkubasi pada suhu dan waktu yang sama dengan sebelumnya. Selanjutnya dilakukan pembuatan kultur kerja, 0,5 % (v/v) kultur antara ditumbuhkan kembali di dalam campuran 10% susu skim dan 3% glukosa yang telah disterilisasi. Apabila jumlah *L. casei* memenuhi syarat lebih dari 10^8 mikroba/ml, maka kultur kerja ini siap diinokulasikan ke dalam nira siwalan yang telah dipersiapkan untuk minuman probiotik, sebanyak 0,5% (v/v).

b. Fermentasi Nira Siwalan

Nira siwalan dipasteurisasi pada suhu 80°C selama 30 menit kemudian didinginkan terlebih dahulu. Setelah itu ditambahkan susu bubuk skim 9% dan diaduk. Kemudian ditambahkan gelatin 20% sebanyak 5 ml lalu didinginkan. Setelah itu, baru diinokulasikan kultur kerja *L. casei* 0,5% (v/v) sebanyak 5 ml ke dalamnya kemudian diinkubasi hingga mencapai pH 3,7 dan terdapat koloni bakteri $>10^8$ CFU. Hal ini berdasarkan dari total bakteri dan pH yang sesuai dengan standar minuman probiotik, yaitu lebih dari 10^7 cfu/ml dan pH 4,3-4,4 (Codec Alimentarius Comite, 2003 dalam Chairunnisa dkk, 2006).

4.6.3 Analisa Kualitatif Bahan Baku Nira Siwalan

a. Pengaturan pH

pH bahan baku nira siwalan diukur dengan menggunakan pH meter. Menurut Mubin dan Zubaidah (2016) pH nira siwalan yaitu sebesar 6,7-6,9. Elektroda pH meter sebelumnya dikalibrasi ke dalam larutan buffer pH 4. Setelah dilakukan kalibrasi, Elektroda pH meter dicelupkan ke dalam sampel kemudian ditunggu hingga menunjukkan angka konstan dan pH sampel dapat dibaca. Apabila diperoleh pH kurang atau lebih dari 6,7-6,9 maka dapat dilakukan pengaturan pH dengan penambahan NaOH atau HCl (Mubin dan Zubaidah, 2016). Hasil pengukuran pH awal terhadap nira siwalan dapat dilihat pada

Lampiran 11.

b. Analisa Total Gula

Analisa total gula pada nira siwalan dilakukan dengan metode *Luff-schroll* di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang sesuai yang dijelaskan pada **Lampiran 11**. Analisa total gula digunakan untuk mengetahui kandungan gula dalam nira siwalan, menurut Mubin dan Zubaidah (2016), total gula pada nira siwalan yaitu sebesar 10-15gram/100ml. Dengan diketahui persentase kandungan gula dalam nira segar dapat menentukan konsentrasi skim yang akan ditambahkan dalam pembuatan probiotik nira siwalan, hal ini berkaitan dengan ketersediaan sumber carbon bagi *L.casei* dalam proses fermentasinya. Metode *Luff-schroll* dapat dilihat pada **Lampiran 7**.

4.6.4 Analisa Kualitatif Fermentasi Nira Siwalan

a. Total Bakteri Asam Laktat dengan Metode TPC

Sebanyak 1 ml sampel ditambah dengan 9 ml larutan garam fisiologis steril. Dari campuran tersebut didapat larutan pengenceran 10^{-1} . Campuran kemudian dihomogenkan dan diambil 1 ml larutan dari tabung pertama dan dimasukkan ke tabung reaksi kedua yang juga berisi 9 ml larutan garam fisiologis sehingga diperoleh pengenceran 10^{-2} dan seterusnya sampai diperoleh pengenceran yang diinginkan. Dari pengenceran yang dikehendaki diambil dengan pipet 1ml sampel lalu dimasukkan ke dalam cawan petri steril, lalu ditambahkan kira-kira 10-15 ml media MRS Agar steril. Cawan yang telah berisi media dan sampel ini diratakan dengan cara menggerakkan secara vertikal membentuk angka 8 dan biarkan hingga membeku, kemudian cawan diinkubasi dengan posisi terbalik pada suhu 37°C selama 24 jam dan dihitung koloni yang tumbuh dengan alat penghitung koloni (*colony counter*). Total koloni yang dihitung harus memenuhi standar “International Commision Microbiology Food” (ICMF) yaitu antara 30-300 koloni per cawan petri (Mubin dan Zubaidah, 2016).

$$\text{Total BAL (cfu/ml)} = \text{jumlah koloni terhitung} \times \frac{1}{\text{Faktor pengenceran}}$$

b. Pengukuran pH Fermentasi Nira Siwalan

pH nira siwalan hasil fermentasi *L. casei* diukur dengan menggunakan pH meter hingga diperoleh pH 3,7 (Suseno, 2000). Elektroda pH meter sebelumnya dikalibrasi ke dalam larutan buffer pH 4. Setelah dilakukan kalibrasi, elektroda

pH meter dicelupkan ke dalam sampel kemudian ditunggu hingga menunjukkan angka konstan dan pH sampel dapat dibaca (Mubin dan Zubaidah, 2016). Hasil pengukuran pH fermentasi nira siwalan dapat dilihat pada **Lampiran 12**.

4.6.5 Pemilihan Bakteri *E.coli*

Bakteri *E. coli* yang digunakan dalam penelitian ini merupakan kultur yang diperoleh dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang hasil isolasi dari saluran pencernaan manusia positif diare. Bakteri *E.coli* diseleksi dengan media *eosin methylene blue agar (EMBA)* dan diinkubasi selama 48 jam yang selanjutnya disimpan pada suhu 4°C sebagai kultur induk. Selanjutnya, koloni *E.coli* dari kultur induk diperkaya pada media nutrient broth (NB) selama 24 jam inkubasi pada suhu 37°C hingga mencapai populasi setara dengan larutan Mc. Farland Standar No. 2 yaitu setara dengan $6,0 \times 10^8$ CFU, dengan menyamakan kekeruhannya, kultur ini disebut sebagai kultur kerja. *E.coli* yang dicekakkan ke tikus percobaan disiapkan dengan cara mengencerkan kultur kerja pada media NaCl fisiologis hingga mencapai 10^6 cfu/ml.

4.6.6 Pemberian Suplementasi Probiotik Nira Siwalan

Dosis batas aman pemberian susu fermentasi yang dianjurkan menurut Reid (2001) yang dikutip oleh Yuniastuti (2004) adalah $10^6 - 10^{10}$ cfu bakteri hidup. Dalam bentuk susu fermentasi dosis yang dianjurkan pada manusia sebesar 100-200 ml, selanjutnya dikonversi pada dosis hewan percobaan. Dalam hal ini

konversi berat badan tikus 200 gram dengan berat manusia rata-rata 70 kg menurut Laurance, 1964 (dalam Yuniastuti, 2004) adalah 0,018, seperti yang dijelaskan pada **Lampiran 3**. Sehingga Suplementasi Probiotik Nira Siwalan diberikan pada penelitian ini yaitu dengan volume sebanyak 1,8 ml, 2,7 ml dan 3,6 ml yang diberikan selama 16 hari sesuai dengan masing-masing kelompok perlakuan. Pemberian dilakukan secara per oral menggunakan sonde lambung.

4.6.7 Induksi Bakteri *E.coli* pada kelompok Tikus Perlakuan

Kultur *E. coli* diberikan sebanyak 1 ml dengan populasi 10^6 CFU/ml per ekor tikus percobaan per hari selama tujuh hari. *E. coli* diberikan pada tikus percobaan secara per oral menggunakan sonde lambung (Arief *et al.*, 2010).

4.6.8 Pembedahan Hewan Coba

Setiap ekor tikus dieuthanasi menggunakan metode dislokasi leher kemudian dilakukan pembedahan pada cavum abdomen dengan melakukan insisi pada linea alba tikus karena daerah tersebut yang paling sedikit terdapat pembuluh darah. Perut tikus yang telah diinsisi dibuka perlahan untuk melihat posisi saluran pencernaan. Usus yang ditemukan masing-masing dipisahkan. Kemudian dibersihkan dari isinya dengan cara menyiram akuades steril hingga permukaan mukosa nampak jelas. Selanjutnya usus (sekum) disimpan dalam formalin 10% untuk pembuatan preparat histopatologi dan pewarnaan imunohistokimia (Andiarsa, 2014).

4.6.9 Pembuatan Preparat Histopatologi Sekum dengan Pewarnaan HE

Setelah tikus dieuthanasi sekum diambil, sekum dimasukkan masing-masing kedalam kantong plastik/pot organ dan direndam dalam formalin 10%. Setelah 24 jam, sekum dipotong 0.5 cm dibagian distal, diletakkan dalam tissue cassette kemudian didehidrasi dengan etanol konsentrasi bertingkat 70%, 80%, 90% dan etanol absolut masing-masing selama 2 jam, dijernihkan dengan xylol I dan II dan dilakukan embedding dalam parafin. Blok parafin dipotong 0.4µm dengan mikrotom, sayatan diletakkan di atas gelas objek. Disimpan dalam inkubator 40⁰C. Sediaan kemudian diwarnai dengan pewarnaan hematoksilin dan eosin / HE (Yellita, 2011). Pewarnaan HE dilakukan dengan cara deparafinasi dengan dimasukkan ke dalam larutan xylol I dan II masing-masing selama 3 menit, kemudian dimasukkan kedalam etanol absolut I dan II masing-masing 3 menit, selanjutnya dimasukkan ke dalam etanol 90% dan 80% masing-masing 3 menit, setelah itu dibilas dengan air mengalir selama 1 menit. Dichelupkan ke pewarna hematoksilin selama 6-7 menit dan dibilas dengan air mengalir selama 1 menit. Dilarutkan lagi ke larutan hematoksilin selama 1 menit dan dibilas dengan air keran 1 menit. Selanjutnya dicelupkan dalam larutan eosin selama 1-5 menit dan dibilas dengan air mengalir 1 menit. Dichelupkan dalam larutan etanol 80% dan 90% dan etanol absolut masing-masing 10 kali celupan, kemudian dicelupkan ke etanol absolut 1 menit. Dichelupkan dalam xylol I, II dan III masing-masing 3 menit. Preparat diangkat dari lautan terakhir dalam keadaan basah, diberi 1 tetes cairan perekat selanjutnya ditutup dengan cover glass (Muntiha, 2001).

Pengamatan meliputi perubahan pada lapisan mukosa dan deskumasi epitel dengan pembesaran 100x dan 400x.

4.6.10 Perhitungan Ekspresi IL-10 pada Sekum dengan Metode IHK

Untuk menentukan ekspresi IL-10 dilakukan pemeriksaan imunohistokimia. Langkah dari imunohistokimia adalah preparat sekum direndam ke dalam xylol I, xylol II, alkohol bertingkat (100%, 90%, 80%, 70%), aquadest masing-masing selama 1x5 menit kemudian preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit selanjutnya preparat ditetesi 3% H₂O₂ selama 20 menit. Dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali dan diblok dengan BSA 1% dalam PBS selama 30 menit pada suhu ruang. Preparat kemudian direaksikan dengan antibodi primer rat anti IL-10 selama 24 jam dengan suhu 40C kemudian dilakukan pencucian kembali pada preparat dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali. Selanjutnya preparat diinkubasi dengan antibodi sekunder biotin (rabbit anti rat IgG biotin labeled) selama 1 jam dengan suhu ruang. Dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali.

Preparat ditetesi SA-HRP (Strep Avidin Horse Radish Peroksidase) selama 40 menit dengan suhu ruang. Kemudian preparat dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 3 kali dan ditetesi dengan DaB (Diamino Benzidine) selama 10 menit dengan suhu ruang. Kemudian preparat dicuci dengan PBS 7,4 selama 5 menit 3 kali. Selanjutnya dilakukan counterstaining menggunakan Mayor Hematoxylen selama 5 menit dan dicuci dengan air mengalir. Selanjutnya dibilas dengan aquades dan dikeringkan. Tahapan terakhir di mounting dengan entellan dan

ditutup dengan cover glass. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop perbesaran 400x. Hasil pengamatan kemudian difoto pada 5 bidang pandang. Hasil foto mikroskop kemudian diproses menggunakan software immunoratio untuk menghitung ekspresi dari IL-10 yang ditandai dengan sel yang terekspresi berwarna kecoklatan.

4.7 Analisis Data

Perubahan jaringan usus sekum diamati secara kualitatif melalui pengamatan terhadap perubahan lapisan mukosa, submukosa, muskularis dan serosa. Sedangkan analisa data aktivitas interleukin-10 menggunakan Analysis Of Variance (ANOVA). Jika ada perbedaan maka akan diuji menggunakan uji Turkey menggunakan software SPSS for windows version 16.0 dengan tingkat signifikansi 5%.

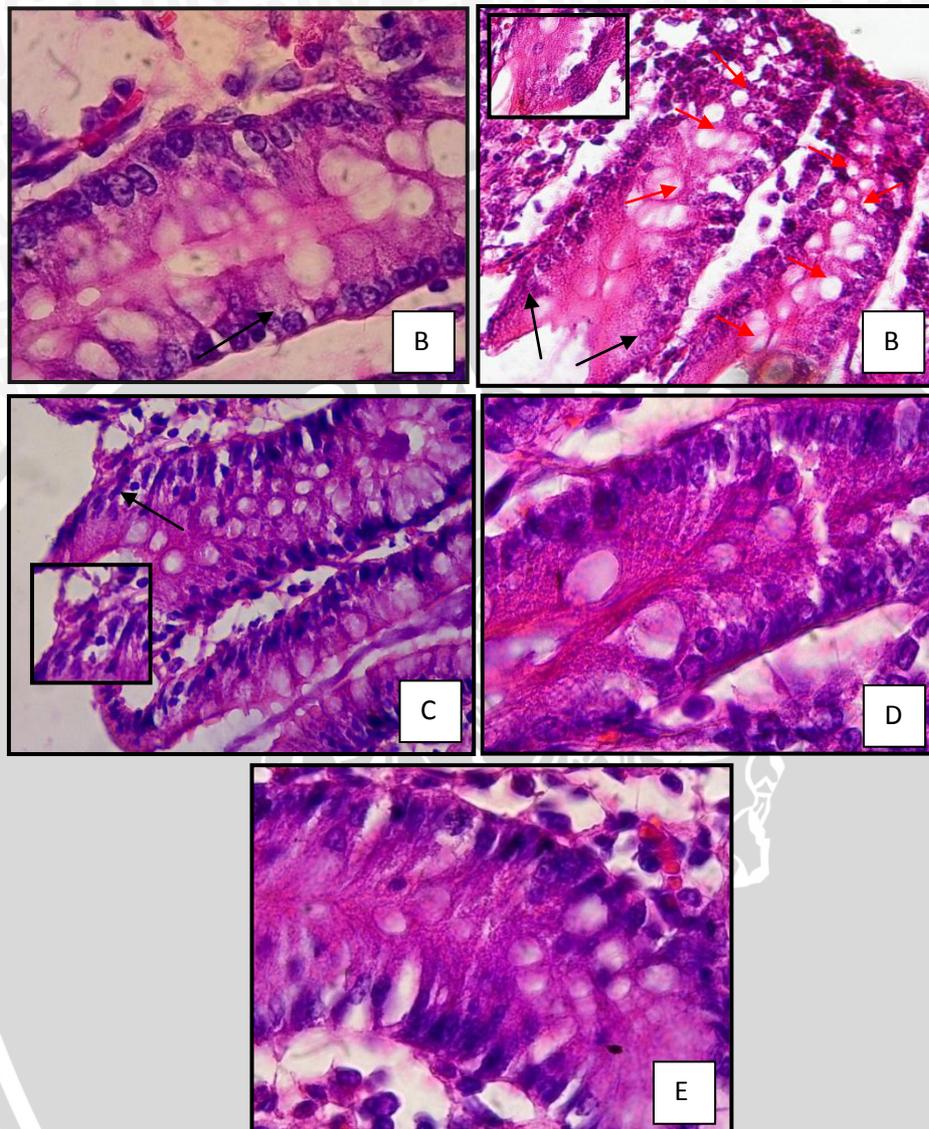
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Pemberian Nira Siwalan Hasil Fermentasi *Lactobacillus casei* terhadap Histopatologi Sekum Tikus yang Diinfeksi *Escherichia coli*

Gambaran histopatologi sekum dapat dilihat melalui pewarnaan Hematoksin-Eosin (HE). Pengamatan jaringan sekum diamati secara kualitatif dengan mikroskop perbesaran 100-400x.

Hasil penelitian terhadap perubahan histologi lapisan mukosa sekum tikus pada berbagai perlakuan menunjukkan bahwa paparan *Escherichia coli* selama tujuh hari berturut-turut mampu menyebabkan kerusakan lapisan mukosa sekum. Kerusakan yang terlihat berupa terjadinya erosi kriptal dari lapisan mukosa sekum, deskuamasi epitel, kongesti dan hemoragi serta infiltrasi sel radang. Selanjutnya pemberian suplementasi nira siwalan hasil fermentasi *Lactobacillus casei* mampu menghambat kerusakan sekum akibat infeksi *E.coli*.





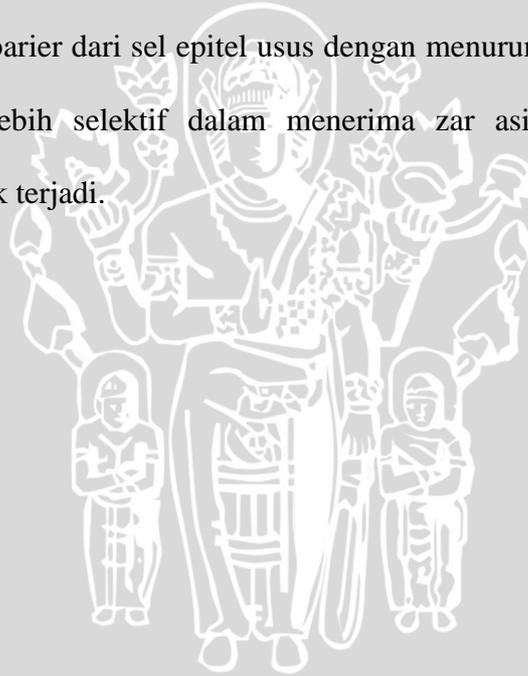
Gambar 5.1. Perbedaan Sel Epitel Mukosa Sekum (Pewarnaan HE, 400x)
 A. Kontrol negatif B. Kontrol positif C. Perlakuan 1 D. Perlakuan 2 E. perlakuan 3

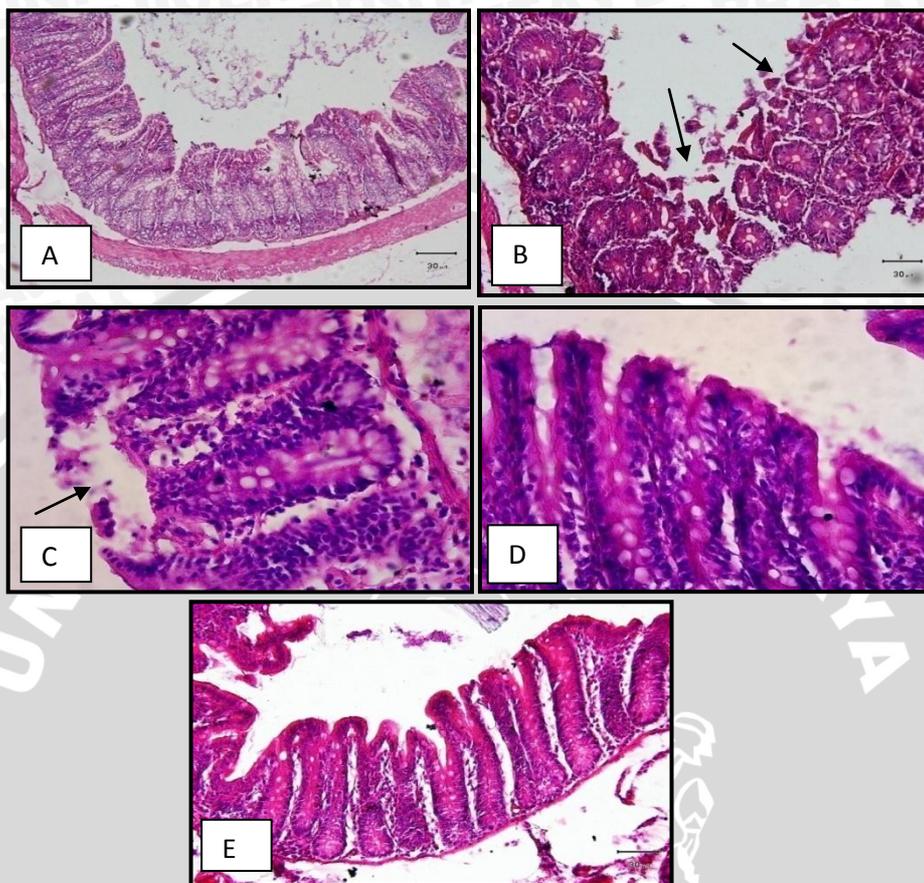
Keterangan : (panah hitam) menunjukkan deskuamasi sel epitel, inti sel nekrosis (kariolisis pada gambar B dan karioreksis pada gambar C), hiperplasia sel goblet (panah merah)

Berdasarkan **Gambar 5.1** Pada kelompok kontrol positif (Gambar B) ditemukan adanya deskuamasi epitel dengan derajat kerusakan paling berat yang ditandai dengan susunan epitel tidak teratur akibat meningkatnya permeabilitas,

inti sel mengalami nekrosis kariolisis serta jumlah sel goblet meningkat dari kondisi normal (hiperplasia). Adanya perlekatan *E.coli* akan meningkatkan produksi sitokin pro inflamatory (IL-1, IL-6 dan TNF- α) yang dengan cepat akan meningkatkan pengaturan ekspresi gen mucin (MUC) dan merangsang pelepasan mucin oleh sel goblet. Apabila dibanding dengan kelompok kontrol negatif (Gambar A) yang tidak mendapatkan perlakuan apapun atau dalam kondisi normal dimana memiliki struktur epitel berbentuk columner simplek dengan inti yang utuh berada di basal dan jumlah sel goblet yang ditemukan juga berjumlah banyak (Suwiti, 2010). Deskuamasi epitel merupakan lepasnya lapisan epitel pada mukosa jaringan. Epitel yang lepas terdiri dari kumpulan sel-sel yang telah mati (nekrosa). Hal ini terjadi karena sel-sel epitel tersebut tidak dapat dipertahankan lagi pada permukaan mukosa. Adanya deskuamasi epitel diduga disebabkan oleh adanya enzim ekstraseluler protease yang dihasilkan *E.coli* yang mampu medegradasi mukus pada mukosa sekum sehingga dapat membantu perlekatan dan kolonisasi *E.coli* pada epitel mukosa dan menyebabkan kerusakan (Dewi dkk,2014). Sedangkan untuk kelompok perlakuan yang mendapatkan suplemetasi nira siwalan sebelum dan selama diinfeksi *E.coli* dapat diketahui bahwa kelompok perlakuan 1 (Gambar C) mengalami deskuamasi epitel dengan tingkat kerusakan ringan. Untuk kelompok perlakuan 2 dan 3 (Gambar D dan E) tampak tidak mengalami kerusakan epitel, sel terlihat normal berbentuk silindris sebaris dengan inti utuh dan juga sel goblet bertambah banyak. Hal ini disebabkan efek pemberian nira siwalan hasil fermentasi *L. casei* pada kelompok perlakuan. *L. casei* berperan sebagai bakteri kompetitor bagi bakteri patogen pada reseptor

adhesi. Karakteristik adhesi yaitu berupa situs pengikatan manosa pada sel epitel usus menyebabkan bakteri patogen tidak mampu lagi untuk adhesi dan membentuk koloni, akhirnya dapat mencegah timbulnya kerusakan mukosa. Selain itu, *Lactobacillus casei* mempunyai efek dapat menginduksi ekskresi gen mucin (MUC2 dan MUC3) yang akan menstimulasi produksi mukus dari sel goblet sehingga fungsi barier mukosa usus makin meningkat (Amalia dkk, 2013). Yoon (2011) dan Ohlan (2009) mengatakan bahwa pemberian probiotik pada kondisi inflamasi dapat membantu kestabilan tight junction (TJs) dan meningkatkan fungsi barier dari sel epitel usus dengan menurunkan permeabilitas epitel sehingga sel lebih selektif dalam menerima zat asing dari luar dan deskuamasi epitel tidak terjadi.

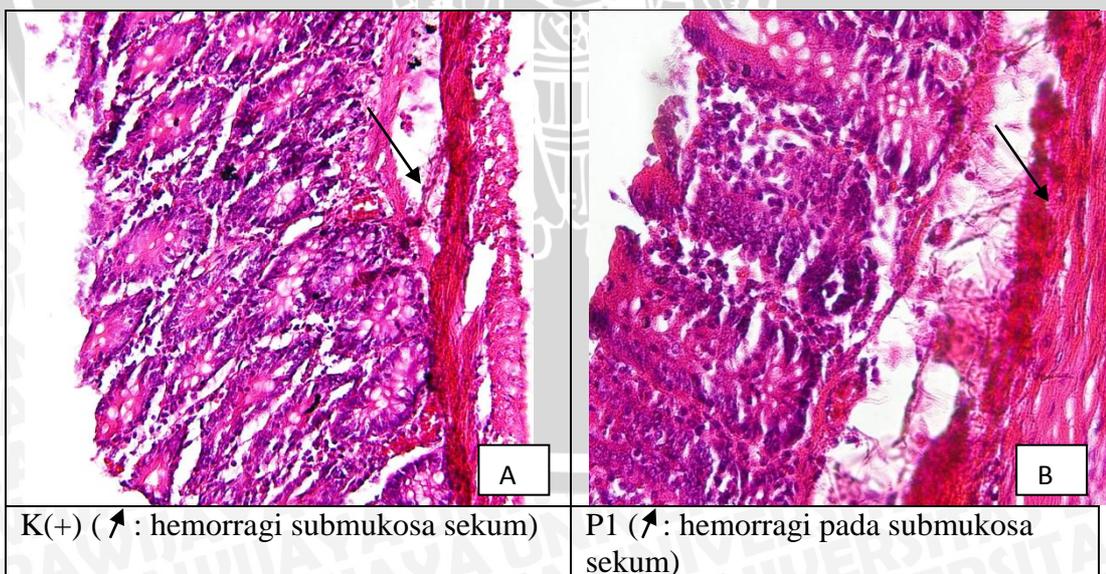




Gambar 5.2. Perbandingan kondisi kript sekum (Pewarnaan HE, 200x)
A. Kontrol negatif **B.** Kontrol positif **C.** Perlakuan 1 **D.** Perlakuan 2
E. perlakuan 3 (↗: erosi kript)

Berdasarkan **Gambar 5.2** dapat dilihat pada kontrol negatif (Gambar A) kript liberkhun menunjukkan kondisi yang normal dengan kelenjar tubuler yang banyak dan dilapisi oleh sel epitel silindris yang secara umum menghasilkan enterosit (Xu and Cranwell, 2003). Sedangkan pada kontrol positif (Gambar B) terlihat adanya erosi kript dengan derajat kerusakan berat yang ditandai dengan hilangnya lapisan pada permukaan mukosa sekum dan hanya tersisa kejejat tubuler seperti yang ditunjukkan anak panah. Erosi kript liberkhun merupakan kehilangan atau terlepasnya sebagian kript sekum pada lapisan mukosa

disebabkan karena sel epitel mengalami nekrosis. Hal ini dapat mengurangi ketebalan kriptas sehingga mengurangi daerah penyerapan pada usus besar dan akan menyebabkan diare (Khor *et al.*, 2012). Pada kelompok perlakuan 1 (Gambar C) terlihat adanya erosi namun dengan derajat kerusakan ringan, hal ini dikarenakan adanya kompetisi antara bakteri *L. casei* dengan bakteri patogen untuk memperoleh reseptor adhesi pada permukaan mukosa sehingga kerusakan pada kriptas tidak begitu berat. Sedangkan pada perlakuan 2 dan 3 (Gambar D dan E) kriptas lenterkhun tidak mengalami perubahan struktur ditandai dengan tidak ada bagian yang mengalami erosi. Pemberian nira siwalan hasil fermentasi *L. casei* dengan konsentrasi lebih tinggi menyebabkan total populasi *L. casei* pada usus lebih banyak sehingga dapat memblokir *E. coli* pada reseptor adhesinya akibatnya *E. coli* tidak mampu menimbulkan kerusakan.



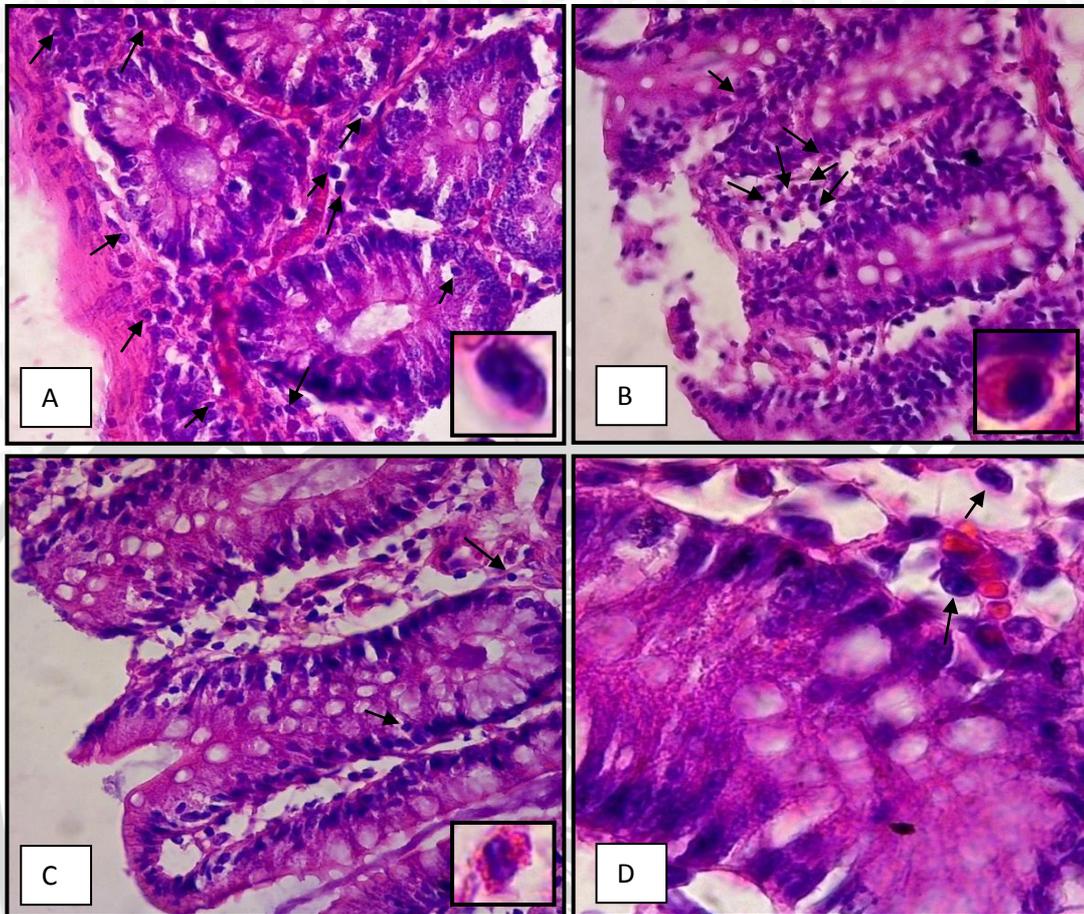
(↗ : hemorragi submukosa sekum)

(↗ : hemorragi pada submukosa sekum)

Gambar 5.3. Hemorragi pada lapisan submukosa sekum (Pewarnaan HE, 400x)

A. Kontrol positif B. Perlakuan 1

Berdasarkan **Gambar 5.3** Pada kontrol positif (gambar A) terjadi hemorragi pada lapisan muskularis mukosa hingga submukosa. Hemorragi merupakan keluarnya darah dari pembuluh darah baik keluar tubuh maupun di jaringan atau rongga tubuh (Smith, 1972 dalam Wuragil, 2007). Perdarahan diduga terjadi karena adanya peradangan akibat infeksi bakteri *E. coli* yang menyebabkan hilangnya integritas dinding pembuluh darah yang memungkinkan darah keluar. Bakteri dan atau toksin yang dihasilkannya dapat meningkatkan pelepasan mediator inflamasi yang dapat menyebabkan dilatasi dan permeabilitas pembuluh darah meningkat sehingga sel darah akan keluar dari pembuluh darah. Perubahan warna jaringan disebabkan oleh darah yang terkumpul dalam ruang interstisial jaringan yang terkena trauma. Darah yang keluar dari pembuluh ini dipecah dengan cepat oleh makrofag yang ada sebagai bagian kesatuan dari respon peradangan. Pada saat hemoglobin eritrosit dimetabolisme dalam sel makrofag, terbentuk suatu kompleks yang mengandung besi ke dalam jaringan dinamakan hemosiderin, bersama pula dengan terbentuknya zat yang tidak mengandung besi disebut hematoidin. Komplek hemosiderin dan hematoidin akan berpengaruh pada perubahan warna jaringan. Sedangkan pada kelompok perlakuan 1 (Gambar B) juga ditemukan hal serupa yaitu adanya hemorragi pada lapisan submukosa sekum.



Gambar 5.4. Infiltrasi Sel Radang pada Mukosa Sekum (Pewarnaan HE, 400x)

A. Kontrol (+) : tikus diinfeksi *E.coli* **B.** Perlakuan 1 : tikus diberi suplementasi nira siwalan 1,8 ml + infeksi *E.coli* **C.** Perlakuan 2: tikus diberi suplementasi nira siwalan hasil 2,7 ml + infeksi *E.coli* **D.** perlakuan 3 : tikus diberi suplementasi nira siwalan 3,6 ml + infeksi *E.coli*

Berdasarkan **Gambar 5.4** pada Gambar A kontrol positif menunjukkan adanya akumulasi sel-sel radang baik sel MN maupun PMN. Infiltrasi sel radang tersebut ditemukan pada lapisan mukosa sekum mulai dari lamina propria, kelenjar tubuler hingga lapisan muskularis mukosa. Adanya invasi *E.coli* pada mukosa sekum memacu respon imun dan sinyal inflamasi sehingga bakteri mudah diserang oleh berbagai sel efektor. Sinyal inflamasi memacu sel fagosit seperti

monosit dan neutrofil berikatan dengan dinding pembuluh darah, keluar dari pembuluh darah, bergerak ke jaringan atau tempat inflamasi dan memulai aktifitas fagositosis. Sehingga semakin tinggi invasi sel bakteri maka semakin tinggi pula infiltrasi sel radang ke dalam jaringan. Sedangkan untuk kelompok perlakuan yang diberikan suplementasi nira siwalan sebelum dan selama pemaparan *E.coli* juga tampak adanya infiltrasi sel radang namun dengan jumlah yang lebih sedikit dari kelompok yang hanya diinfeksi dengan *E.coli*. hal ini disebabkan oleh kemampuan nira siwalan hasil fermentasi *L.casei* yang memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan mikroba patogen seperti *E.coli*. *L. casei* mampu menghasilkan berbagai senyawa organik seperti asam laktat, asam piruvat, asam asetat dan H_2O_2 yang mana asam tersebut mampu menurunkan pH pencernaan hingga dibawah pH optimum bakteri patogen. Selain itu *L.casei* juga menghasilkan senyawa antibakteri bakteriocin. Sehingga nira siwalan hasil fermentasi *L.casei* mampu menghambat pertumbuhan dan menurunkan populasi *E.coli* dalam mukosa pencernaan. Oleh karena itu pelepasan sel-sel imunitas ke tempat inflamasi semakin sedikit. Pada kelompok perlakuan 3 (Gambar C) infiltrasi sel radang lebih sedikit dari kelompok perlakuan 2 (Gambar B) dan perlakuan 1 (Gambar A).

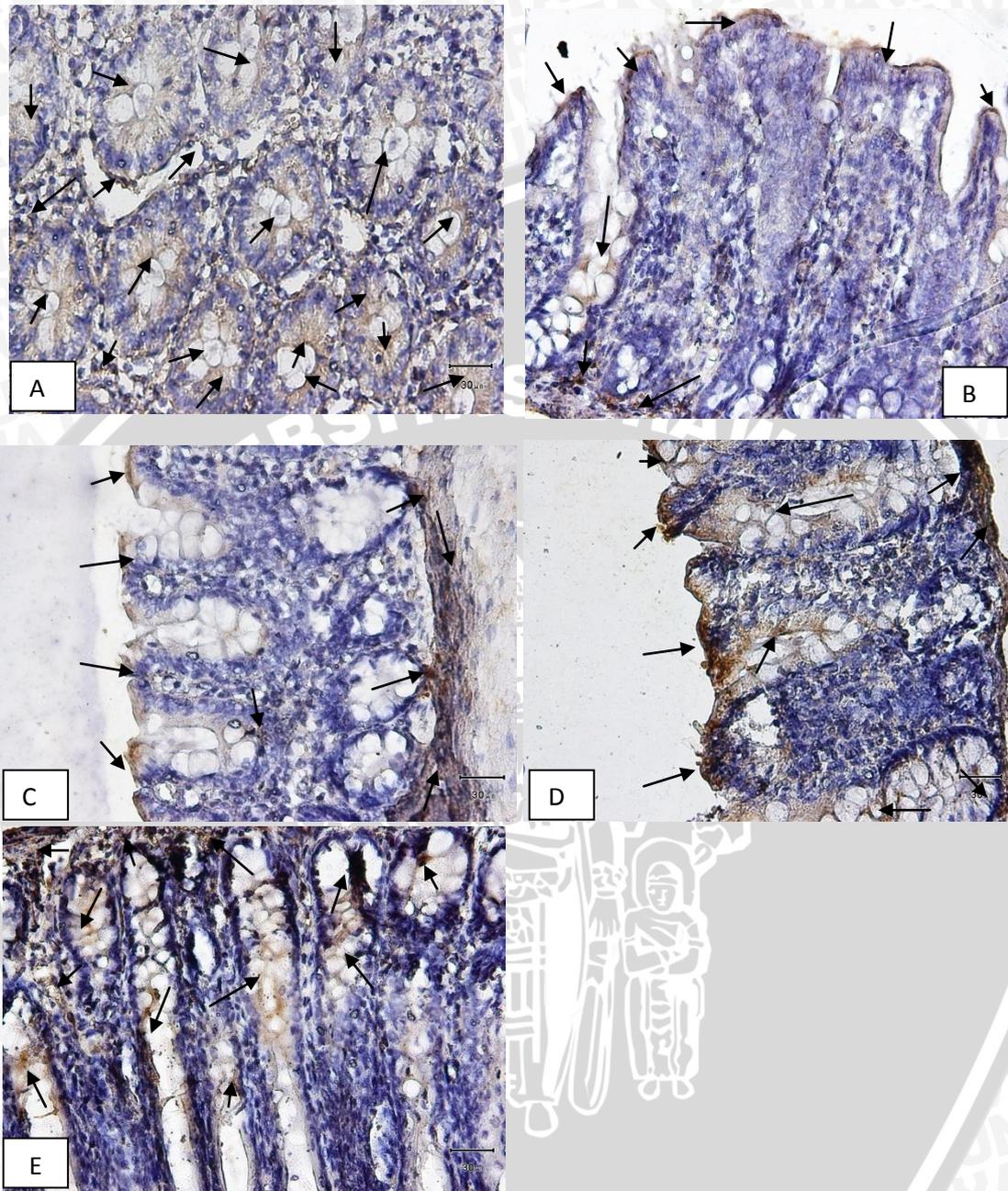
Pemberian *E.coli* pada penelitian ini menyebabkan perubahan-perubahan mikroskopis pada jaringan sekum. Kelompok tikus yang diberikan *E.coli* selama 7 hari (kontrol positif) memiliki sekum yang pada bagian mukosanya mengalami kerusakan seperti erosi kripta, deskuamasi epitel dan banyak akumulasi sel radang pada lamina propia, muskularis mukosa sampai submukosa serta hemorragi dan

pelebaran pembuluh darah kapiler. Gambaran mikroskopis sekum yang berbeda ditemukan pada tikus yang mendapat perlakuan *E.coli* dan nira siwalan hasil fermentasi *L.casei* secara bersama-sama (kelompok perlakuan 1, 2, dan 3). Berdasarkan hasil penelitian, pemberian nira siwalan hasil fermentasi *L. casei* (P1, P2, dan P3) mampu menghambat kerusakan lapisan sekum yang berbeda nyata dengan kelompok kontrol positif. Tingkat penghambatan kerusakan sekum akibat infeksi *E. coli* pada kelompok perlakuan disebabkan oleh semakin tingginya dosis nira siwalan yang diberikan. Kemampuan nira siwalan hasil fermentasi *L.casei* dalam menghambat kerusakan sekum akibat paparan *E. coli* yaitu melalui keseimbangan flora normal usus dengan beberapa mekanisme seperti kompetitor bagi bakteri patogen, menghasilkan berbagai senyawa organik seperti asam laktat, H₂O₂ dan senyawa antimikroba bakteriocin serta memodulasi sistem imun untuk mencegah penyakit peradangan usus.

5.2 Pengaruh Pemberian Nira Siwalan Hasil Fermentasi *Lactobacillus casei* terhadap Ekspresi Interleukin 10 (IL-10) pada Jaringan Sekum Tikus

Pengaruh terapi preventif nira siwalan hasil fermentasi *L.casei* pada tikus putih yang diinfeksi *E.coli* terhadap ekspresi IL-10 sekum diamati menggunakan metode imunohistokimia. Ekspresi IL-10 ditandai dengan warna kecoklatan pada inti sel yang muncul sebagai akibat adanya reaksi antigen dan antibodi. Antigen yang terdapat pada jaringan sekum akan mengikat antibodi primer (anti rat IL-10 IgG biotin labeled) yang selanjutnya akan berikatan dengan antibodi sekunder (rabbit anti rat) yang telah dilabel dengan enzim SA-HRP (*Strep Avidin Horse Radish Peroxidase*). Enzim tersebut yang kemudian akan memecah substrat berupa kromagen DAB (*Diamino benzidine*) menghasilkan produk berwarna coklat. Sehingga warna coklat yang muncul pada preparat sekum menandakan bahwa jaringan tersebut mengekspresikan antigen IL-10.

Hasil ekspresi IL-10 diperoleh dari data kuantitatif dengan perhitungan rata-rata persentase area dari 5 lapang pandang yang diamati dengan mikroskop perbesaran 400x dan hasilnya dianalisa menggunakan software immunoratio. Persentase area yang mengekspresikan IL-10 pada jaringan sekum dapat dilihat pada **Tabel 5.1**



Gambar 5.5 Imunohistokimia Ekspresi IL-10 pada Jaringan Sekum

- A. Sekum KN ; tikus sehat ; jumlah ekspresi IL-10 normal. B. Sekum KP ; jumlah ekspresi IL-10 menurun. C. Sekum kelompok P1 ; jumlah ekspresi IL-10 meningkat. D. Sekum kelompok P2 ; jumlah ekspresi IL-10 meningkat. E. Sekum kelompok P3 ; jumlah ekspresi IL-10 meningkat. (↗) menunjukkan gambar ekspresi IL-10 pada mukosa sekum.

Tabel 5.1 Rata-Rata Jumlah Ekspresi IL-10 pada Jaringan Sekum

Kelompok	Rata-rata ekspresi IL-10 \pm SD	Peningkatan terhadap kontrol positif	Penurunan terhadap kontrol negatif
Kontrol Negatif (KN)	22,00 \pm 4,41 ^c	-	-
Kontrol Positif (KP)	8,53 \pm 3,23 ^a	-	157,9%
Perlakuan 1 (P1)	13,54 \pm 2,37 ^b	58,7%	-
Perlakuan 2 (P2)	18,14 \pm 3,40 ^{bc}	112,6%	-
Perlakuan 3 (P3)	21,04 \pm 3,30 ^c	146,6%	-

Keterangan : Notasi yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($p < 0,05$)

Hasil uji statistik menggunakan uji ANOVA dan uji lanjutan menggunakan uji Tukey ($p < 0,050$) secara lengkap dijelaskan pada **Lampiran 13**. Hasil ANOVA ekspresi IL-10 pada **Tabel 5.1** menunjukkan bahwa kelompok P1 dengan P2, kelompok P2 dengan P3 dan kelompok KN dengan P2 dan P3 memiliki perbedaan yang tidak signifikan ($p > 0,05$). Sedangkan kelompok perlakuan KN dengan KP, kelompok KP dengan P1, P2 dan P3, kelompok KN dengan P1 dan kelompok P1 dengan P3 memiliki perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$). Perbedaan yang signifikan antara kelompok KP dengan P1, P2 dan P3 menunjukkan bahwa pemberian terapi preventif nira siwalan dapat meningkatkan ekspresi IL-10 secara signifikan jika dibandingkan dengan kelompok KP.

Pada kelompok KN menunjukkan ekspresi IL-10 paling tinggi yaitu (22,0 \pm 4,41)% luas area. Hal ini sesuai dengan **Gambar 5.5 A** menunjukkan bahwa warna coklat yang menandakan adanya ekspresi IL-10 pada jaringan tersebar secara merata dan banyak pada mukosa sekum. IL-10 ditemukan pada jaringan secara normal, karena IL-10 tetap diekspresikan untuk menjaga agar kadar sitokin

proinflamasi tidak berlebihan. Sehingga keberadaan sitokin IL-10 dalam kondisi normal berguna untuk mengimbangi kondisi dari sitokin proinflamasi, oleh karenanya dapat bersifat protektif.

Pada kelompok KP ($8,53 \pm 3,23\%$) ekspresi IL-10 menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) terhadap kelompok KN, ditandai dengan penurunan IL-10 sebesar 157,9%, sesuai dengan **Gambar 5.5 B** bahwa warna coklat yang muncul sebagai ekspresi dari IL-10 jauh lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok KN. Hal tersebut dikarenakan tikus pada kelompok KP telah diinfeksi dengan bakteri *E.coli* dengan dosis 10^7 cfu/ml selama 7 hari. Bakteri *E.coli* dan atau toksin yang dihasilkan dalam lumen usus tikus dapat menginvasi mukosa dan menembus ke lapisan usus yang lebih dalam sehingga dapat mempengaruhi permeabilitas vaskuler dan pelepasan sel-sel imunitas yang akan menetralkan bakteri patogen tersebut (Andriani, 2006). LPS yang merupakan endotoksin dari *E.coli* mampu merangsang produksi sitokin proinflamasi (TNF, IL-1, IL-6) oleh sel makrofag di jaringan. Fungsi fisiologis yang utama dari sitokin yang dihasilkan oleh makrofag tersebut untuk merangsang inflamasi non-spesifik yaitu menginduksi adhesi neutrofil dan monosit pada endotel vaskular ke tempat infeksi serta meningkatkan aktivasi limfosit spesifik (limfosit T). Sitokin proinflamasi dalam jumlah besar dapat menyebabkan kerusakan jaringan sebagai manifestasi klinis infeksi bakteri yang tidak terkontrol (Pediatri, 2001). Sedangkan menurut penelitian Atthiyah (2012) Pemberian LPS bakteri *E.coli* dapat meningkatkan respons inflamasi spesifik, merangsang pembentukan sitokin proinflamasi, dan menstimulasi keseimbangan ke arah respons sel Th1. Reaksi

inflamasi akibat adanya patogen dapat menyebabkan ketidakseimbangan respons Th1 dan Th2. Secara profil keseimbangan imunologis menunjukkan dominasi respons Th1 dan penekanan terhadap sitokin Th2 (IL-10).

Pemberian terapi preventif nira siwalan hasil fermentasi *L.casei* pada tikus yang diinfeksi *E.coli* berdasarkan **Tabel 5.1** diketahui bahwa pada kelompok P1 ($13,54 \pm 2,37$)% ekspresi IL-10 yang diberikakan terapi preventif nira siwalan dengan volume 1,8 ml memiliki perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) dengan kelompok KP dan KN, ditandai dengan peningkatan IL-10 sebesar 58,7%. Pada **Gambar 5.5 C** menunjukkan intensitas penyebaran warna coklat pada jaringan sekum tampak lebih banyak dibandingkan dengan kelompok KP namun lebih sedikit dari kelompok KN. Menurut McFarland and Elmer (2006) dosis rekomendasi probiotik untuk memberikan efek yang baik bagi tubuh yaitu 10^8 - 10^{10} cfu bakteri hidup. Oleh karena itu, pada penelitian ini digunakan dosis dengan konsentrasi 10^{10} untuk menghasilkan efek yang maksimal. Sehingga volume nira siwalan yang diberikan akan mempengaruhi konsentrasi bakteri *L.casei* dalam melawan bakteri patogen. Meskipun ekspresi IL-10 meningkat pada kelompok yang diberikan nira siwalan hasil fermentasi *L. casei* sebanyak 1,8 ml bila dibandingkan dengan kelompok KP, namun ekspresi IL-10 masih berbeda secara signifikan dengan kondisi normal (kelompok KN). Hal ini membuktikan bahwa volume nira siwalan 1,8 ml yang diberikan ke tikus masih belum memiliki hasil yang maksimal.

Pada kelompok P2 ($18,14 \pm 3,4$)% dan P3 ($21,04 \pm 3,3$)% ekspresi IL-10 menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) terhadap kelompok KP. Hal ini

ditandai dengan peningkatan ekspresi IL-10 sebesar 112,6% dan 146,6%. Ekspresi IL-10 pada **Gambar 5.5 D dan E** menunjukkan warna coklat yang muncul lebih banyak dari kelompok P1 dan KP serta tersebar secara merata pada kripta sekum. Peningkatan tersebut merupakan peningkatan yang tertinggi yang mendekati kondisi normal (Kelompok KN) sehingga perbedaan ekspresi IL-10 yang dimunculkan sebagai akibat pemberian nira siwalan dengan volume 2,7 ml dan 3,6 ml tidak signifikan atau sudah mencapai kondisi normal.

Adanya peningkatan ekspresi IL-10 dikarenakan efek yang ditimbulkan oleh *L.casei* dalam nira siwalan yang mampu menghasilkan senyawa antimikroba bakteriocin sehingga dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E.coli* dalam usus. Selain itu *L.casei* yang terdapat dalam nira siwalan mampu menghasilkan berbagai senyawa asam organik seperti asam laktat yang dapat menurunkan pH usus dibawah pH optimum pertumbuhan bakteri *E.coli* sehingga pertumbuhan *E.coli* akan terhambat. Dengan dihambatnya pertumbuhan *E.coli* akan menurunkan aktivasi sel makrofag yang berperan sebagai APC sehingga semakin sedikit antigen bakteri yang dipresentasikan ke sel limfosit. Sehingga produksi sitokin inflamatory yang dimediasi oleh limfosit Th1 akan ditekan dan bergeser ke arah sel Th2. Hal ini sesuai dengan pendapat Atthiyah (2012) Pemberian bakteri komensal seperti *L.casei* dapat memodulasi imunitas mukosa pencernaan. Salah satu mekanisme yang penting dalam homeostasis sistem imun mukosa yang diduga dipengaruhi oleh probiotik adalah keseimbangan dari sitokin yang dihasilkan oleh sel Th1 dan Th2, dimana sitokin ini penting dalam pengaturan imun untuk mencegah inflamasi mukosa yang berlebihan dan reaksi autoimun.

Adanya peningkatan ekspresi IL-10 dapat melindungi permukaan mukosa terhadap respons inflamasi yang destruktif. Defisiensi sitokin ini menyebabkan inflamasi yang tidak terkontrol di permukaan mukosa. IL-10 menghambat ekspresi chemokine (monocyte chemoattractant protein-1, macrophage inflammatory protein-1 alpha) dan sitokin proinflamasi (IL-1, IL-1 β , TNF- α). Sehingga IL-10 memegang peran penting pada fase infiltrasi neutrofil dan makrofag. Dampak akhir dari aktivasi IL-10 adalah hambatan reaksi inflamasi non spesifik maupun spesifik yang diperantarai oleh sel T, karena itu meningkatnya IL-10 untuk mencapai keseimbangan Th1 dengan Th2 dapat menghambat kerusakan jaringan sekum (Roffi, 2006)

Selain itu pemberian probiotik berpengaruh langsung terhadap fungsi imun mukosa usus melalui modulasi sintesis imunoglobulin A (IgA). Peyer patch dalam lamina propia usus merupakan kumpulan sel yang memproduksi IgA oleh sel B yang dimodulasi sel Th2. IgA ini mampu melawan epitop kuman patogen atau komponennya seperti endotoksin atau eksotoksin dalam lumen maupun mukosa usus. IgA juga dapat berfungsi sebagai opsonin, karena neutrofil, monosit dan makrofag memiliki reseptor untuk Fc α sehingga dapat meningkatkan efek bakteriolitik komplemen dan menetralkan toksin (Qodriani, 2010).

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah disampaikan dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Pemberian terapi preventif nira siwalan hasil fermentasi *Lactobacillus casei* pada tikus putih yang diinfeksi *Escherechia coli* dapat menghambat kerusakan jaringan sekum yang ditandai dengan kriptas dan sel epitel mukosa yang masih utuh dengan volume efektif $3,6 \text{ ml} \times 10^{10} \text{ cfu}$.
2. Pemberian terapi preventif nira siwalan hasil fermentasi *Lactobacillus casei* pada tikus putih yang diinfeksi *Escherechia coli* dapat meningkatkan ekspresi interleukin 10 secara signifikan pada jaringan sekum mencapai kondisi normal dengan volume efektif $3,6 \text{ ml} \times 10^{10} \text{ cfu}$.

6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pemanfaatan nira siwalan sebagai agensia probiotik yang memiliki kemampuan sebagai antibakteri dalam menangkal berbagai penyakit infeksi lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Akbar, B. 2010. *Tumbuhan dengan Kandungan Senyawa Aktif yang Berpotensi sebagai Bahan Antifertilitas*. Edisi 1. Adabia Press : Jakarta
- Amalia, N., L. Prayitno., H. Oswari dan Abinawanto. 2013. *Potensi Lactobacillus plantarum dalam Mencegah Translokasi Bakteri*. Departemen Biologi. FMIPA UI.
- Andiarsa, D., S, Hidayat., D.E, Setyaningtyas., dan S, Sudarman. 2014. Gambaran Kerusakan Mukosa Usus Mencit (*Mus musculus*) pada Infeksi *Escherichia coli*. *Jurnal Vektor Penyakit, Vol. 8 No. 2, 2014 : 53 - 60*
- Andriani. 2006. *Escherichia Coli O157 H:7 sebagai Penyebab Penyakit Zoonosis. Lokakarya Nasional Penyakit Zoonosis*
- Arief, I.I., B.S.L, Jenie., M, Astawan., dan A.B, Witarto. 2010. Efektivitas Probiotik *Lactobacillus Plantarum 2C12* dan *Lactobacillus Acidophilus 2B4* sebagai Pencegah Diare pada Tikus Percobaan. *Media Peternakan Vol. 33 No. 3*
- Atthiyah, A.F., A. Setiawati, A. Darma, dan A. Endaryanto. 2012. Proteksi Probiotik pada Mukosa Ileum Mencit yang Terpapar Lipopolisakarida *Escherichia coli*. *Media Medica Indonesia Vol. 46 No.2*
- Beutin, L. 1998. *Escherichia Coli as a Pathogen in Dogs and Cats. Vet. Res. 30 (1999) 285-298*
- Chairunnisa, H., R.L. Balia, dan G.L. Utama. 2006. Penggunaan Starter Bakteri Asam Laktat pada Produk Susu Fermentasi "Lifihomi". *Jurnal Ilmu Ternak Vol.6 No.2, 102-107*
- Davis, T.A and Johns, D.V. 1987. Current Utilization and Further Development of Palmyra (*Borassus flabellifer* L., Arecaceae) in Tamil Nadu State. *Economic Botany. India 41(2):47-266*
- Delcenserie, V., D. Martel., M. Lamoureux., J. Amiot., Y. Boutin and D. Roy. 2010. Immunomodulatory Effect of Probiotics in the Intestinal Tract. *Curr. Issues Mol. Biol. 10 : 37-54*
- Dewi, E., W, Sari., dan Khairil. 2014. Analisis Potensi Antibakteri Teh Rosella terhadap Histopatologi Usus Halus Akibat Paparan Enteropatogenik *Escherichia coli* (EPEC). *Sains Riset Volume 4 – No. 1*
- Djunaedi, D. 2007. Pengaruh Probiotik pada Respon Imun. *Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. XXIII, No. 1*

- Hermita dan M. Radji. 2008. *Buku Ajar Analisis Hayati Edisi 3*. Penerbit Buku Kedokteran EGC : Jakarta
- Iskandar D. 2009. Pengaruh Pemberian Probiotik terhadap Keseimbangan Sel Th1, Th2 dan Treg pada Respon Imun Mukosa Usus. [Tesis]. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Islam, A.A. 2007. Rasio TNF- α /IL-10 Serum Awal sebagai Prediktor Luaran pada Operasi Epidural Hematom. *Maj Kedokt Indon*, *Volum: 57, Nomor: 12*
- Junqueira, LC. dan J. Carneiro. 1982. *Histologi Dasar*. Alih Bahasa Adji Dharma. 1990. EGC Penerbit Buku Kedokteran. Hal. 123-132.
- Khor, T. S., H. Fujita, K. Nagata. 2012. Biopsy Interpretation of Colonic Biopsies When Inflammatory Bowel Disease is Excluded. *Jurnal Gastroenterol*
- Kole, A and K.J Maloy. *Control of Intestinal Inflammation by Interleukin-10*. 2014. School of Pathology, University of Oxford
- Kusriningrum. 2008. *Perancangan Percobaan*. Airlangga University Press, Surabaya
- Kusumawati, N. 2000. Peranan Bakteri Asam Laktat dalam Menghambat *Listeria monocytogenes* pada Bahan Pangan. *Jurnal Teknologi Pangan dan Gizi Volume 1 Nomor 1*
- Matheos, C., P. Lintong, dan C. Kairupan. 2013. Gambaran Histologik Jaringan Limpa Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) yang Diinfeksi *Escherichia Coli* dan Diberi Madu. *Jurnal e-Biomedik (eBM)*, *Volume 1, Nomor 2*
- Mc. Farland, L.V and G.W. Elmer. 2006. *Properties of Evidence-Based Probiotics for Human Health*. Di dalam : Goktepe I, Jujena VK, Ahmedna M, editor. *Probiotics in Food Safety and Human Health*. New York: CRC. Hlm, 109-137
- Mirzei, H., H. Shahirfar and H. Mobaiyen. 2012. Effect of Consumption of Fermented Milk with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* Isolated from Ligvan Cheese Against *E. Coli* O157:H7 Induced Infection in BALB/C Mice. *Advanced in Bioresearch Vol 3 (4)*
- Mubin, M.M dan E. Zubaidah. 2016. Studi Pembuatan Kefir Nira Siwalan (*Borassus Flabellifer* L.) (Pengaruh Pengenceran Nira Siwalan dan Metode Inkubasi). *Jurnal Pangan dan Agroindustri Vol. 4 No 1 p.291-301*
- Muntiha, M. 2001. *Teknik Pembuatan Preparat Histopatologi dari Jaringan Hewan dengan Pewarnaan Hematoksin Eosin (HE)*. Temu Teknis Non Peneliti. Balai Penelitian Veteriner, Bogor.

- Ogawa, M., Shimizu, K., Nomoto, K., Takahashi, M., Watanuki, M., Tanaka, R., Tanaka, T., Hamabata, T., Yamasaki, S. dan Takeda, Y. 2001. Protective effect of *Lactobacillus casei* strain Shirota on Shiga toxin producing *Escherichia coli* O157:H7 infection in infant rabbits. *Infection and Immunity* 69: 1101-1108.
- Oyetayo, V. O. 2004. Performance of rats orogastrically dosed with faecal strains of *Lactobacillus acidophilus* and challenged with *Escherichia coli*. *Afr. J. Biotechnol.* 3: 409-411
- Pawartha, P.A.A., Rimbawan, I. Tanziha, W. Winarsih, and S. Usmiati. 2015. Efficacy of Encapsulated *Lactobacillus casei* Probiotics as Anti Diarrheal Agents on Sprague Dawley Rats. *Pakistan Journal of Nutrition* 14 (10) : 666-671
- Perlindungan Tambunan. 2010. Potensi dan Kebijakan Pengembangan Lontar untuk Menambah Pendapatan Penduduk. *Jurnal Analisis Kebijakan Kehutanan Vol. 7 No. 1*
- Pratama, A.W. 2013. Gambaran Histopatologi dan Jumlah Mikroflora Jejunum Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang terpapar Indometasin dan Mendapat Suplementasi Bakteri Asam Laktat. Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
- Proborini, A., Sumarno, dan Sumakto. 2013. Probiotik Tidak Mempengaruhi Profil Sel Imun Adaptif pada Infeksi *Escherichia coli*. *Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. 27, No. 4*
- Pulendran B, Kumar P, Cutler C, Mohamadzadeh M, Dyke T, and Banchereau J. 2001. Lipopolysaccharides from Distinct Pathogens Induce Different Classes of Immune Responses In Vivo. *The Journal of Immunology.* 2001; 167: 5067-5076.
- Qodriani, T.K dan A. Setiani. 2010. Potensi Probiotik sebagai Terapi Adjuvan untuk Penatalaksanaan Autistic Spectrum Disorders (ADS). *Jurnal Mahasiswa Kedokteran Indonesia Vol.1 No.01*
- Rahayu, E.S. 2001. Potensi dan Peranan Prebiotik dan Probiotik dalam Makanan Sehat. Seminar Prebiotik, Probiotik dan Makanan Sehat. Fakultas Biologi Universitas Atmajaya. Yogyakarta
- Rita, H.R. 2001. Pengaruh Defisiensi Pakan terhadap Nilai Kecernaan Nutrien dan Pertumbuhan Tikus Putih Jantan Dewasa (*Rattus sp.*) [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor.
- Roffi, M. 2006. Perbandingan Kadar IL-10 Serum dengan dan tanpa Infiltrasi Levobupivakain pada Nyeri Pasca Insisi [Tesis]. Program Pasca Sarjana

Magister Ilmu Biomedik dan Program Pendidikan Dokter Spesialis I Anestesiologi. Universitas Diponegoro.

Samson, E dan A.J.A, Unility. 2014. Ekspresi Immunoglobulin A (IgA) pada Usus Halus Tikus Putih (*Rattus novergicus*). *Seminar Nasional Basic Science VI FMIPA Universitas Padjajaran*.

Sholikhah, S.M. 2010. Kajian Kadar Etanol dan Asam Asetat dalam Cairan Nira Siwalan (*Borassus Flabellifer Linn*) Menggunakan Metode Kromatografi Gas (GC) [Skripsi]. Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim. Malang

Standar Nasional Indonesia. 2006. Gula Kristal-Bagian 2 : Rafinasi. *SNI 01-3140.2.2006*

Soeroso, A. 2007. Sitokin. *Jurnal Oftalmologi Indonesia Vol. 5, No. 3*

Sumaryati, B.T., T, Utami dan Suparmo. 2009. Pengaruh Infeksi *Escherichia Coli* dan Pemberian *Lactobacillus Plantarum* Dad 13 terhadap Mikrobiota Feses Tikus Wistar. *Jurnal Agritech*, Vol. 29, No. 4

Sunaryanto, R., E. Martius, dan B. Marwoto. 2014. Uji Kemampuan *Lactobacillus casei* sebagai Agenasia Probiotik. *J. Biotek. Bios. Indon. Volume I No. 1*

Supar. 1997. Faktor-Faktor Virulensi Enterotoksin dan perlekatan *Escherichia coli* terhadap Kesehatan Ternak dan Manusia. *Wartazoa Vol. 6 No. 1*

Suprijono, M.M., I. Kuswardani, I. Nugerahani, S. Ristiarini. 2003. Pemanfaatan Mikroflora Nira siwalan (*Borassus flabelrer*) sebagai Pengawet A/ami Bahan Pangan: Isolasi Mikroba dan Deteksi Metabolit Anti Mikroba dari Mikro flora Legen. Makalah disajikan pada International Seminar: Strengthening Nation's Competitiveness trough Mutual Partnership between University and Industry, tanggal 5 Maret 2003, di Jakarta.

Suseno, T.I.P., S. Surjoseputro, dan Anita. 2000. Minuman Probiotik Nira Siwalan : Kajian Lama Penyimpanan terhadap Daya Antimikroba *Lactobacillus casei* pada Beberapa Bakteri Patogen. *Jurnal Teknologi Pangan dan Gizi Volume 1 Nomor 1*

Suwiti, N. K., N.L.E. Setiasih. I.P. Suastika. I. W. Piraksa. N. N. W. Susari. 2010. Studi Histologi Usus Besar Sapi Bali. *Buletin Veteriner Udayana Vol. 2 No.2. :101-107*

Suwito, P. 2009. Dampak Verotoksigenik Dan Enterohemoragik *Escherichia Coli* (Vtec dan Ehec) Pada Hewan, Manusia Dan Makanan. *Wartazoa Vol. 19*

- Tarmudji. 2005. Kolibasilosis Pada Ayam: Etiologi, Patologi Dan Pengendaliannya. *Wartazoa Vol. 13 No.2*
- Towoliu, S., P. Lintong, C. Kairupan. 2013. Pengaruh Pemberian Lactobacillus terhadap Gambaran Mikroskopis Mukosa Usus Halus Tikus Putih Wistar (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi dengan *Escherichia coli*. *Jurnal e-Biomedik (eBM), Volume 1, Nomor 2*
- Volk, W.A dan M.F. Wheeler. 1988. *Mikrobiologi Dasar*. Edisi Kelima. Erlangga : Jakarta
- Wuragil, L.R. 2007. Gambaran Histopatologi Pencernaan Tikus pada Pemberian Fraksi Asam Amino Non-Protein dan Fraksi Polifenol Lamtoro Merah (*Acacia Villosa*) [SKRIPSI]. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor.
- Xu, Cranwell PD. 2003. *Gastrointestinal and Nutrition the Neonatal Pig*. United Kingdom: Nottingham University Press
- Yang, S-C., Chen, J-Y., Shang, H-F., Cheng, T-Y., Tsou, S.C. and Chen, J-R. Effect of synbiotics on intestinal microflora and digestive enzyme activities in rats. *World J Gastroenterol, 11 (47), 7413-7417, 2005.*
- Yellita, Y., U. Cahyaningsih, D.I. Pradono, W. Winarsih, W. Manula. 2011. Ekstrak Sambiloto Menurunkan Patogenesitas Ookista *Eimeria Tenella*. *Jurnal Veteriner Vol. 12 No. 4: 307-318*
- Yoon, S., and J Sun. 2011. Review Article Probiotics, Nuclear Receptor Signaling Surono, I. 2004. Probiotik : Susu Fermentasi dan Kesehatan. PT Zitri Cipta Karya. Jakarta
- Yousif A.A., Al-Taai N.A. and Mahmood N.M. 2013. Humoral and Cellular Immune Response Induced by *E. coli* [O157:H7 and O157:H7:K99] Vaccines in Mice. *International Journal of Immunology Research Volume 3, Issue 1*
- Yulinery, T., E. Yulianto, dan N. Nurhidayat. 2006. Uji Fisiologis Lactobacillus sp. Mar 8 yang Telah Dienkapsulasi dengan Menggunakan Spray Dryer untuk Menurunkan Kolesterol. *Biodiversitas. Vol. 7, No. 2*
- Yuniastuti, A. 2004. *Pengaruh Pemberian Susu Fermentasi Lactobacillus casei Strain Shirota terhadap Perubahan Kadar Fraksi Lipid Serum Tikus Hiperkolesterolemia* [TESIS]. Magister Ilmu Biomedik Universitas Diponegoro. Semarang

LAMPIRAN 1. SERTIFIKAT LAIK ETIK



KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH MALANG
KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARANCE"

NO: E.S.a/47/KEPK-UMM/IV/2016

KOMISI ETIK PENELITIAN UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH MALANG
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN,
MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:

PENELITIAN BERJUDUL	: Pengaruh Pemberian Nira Sialan Hasil Fermentasi <i>Lactobacillus casei</i> pada Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) Model Enteritis yang Diinfeksi <i>Escherichia coli</i>
PENELITI	:Ketua : Dewi Febriana Widarna Anggota: 1. Linda Febriana 2. Baiq Nindi Puji R. 3. Melia Kusuma Melati 4. Yanunya Yala Puspita
UNIT / LEMBAGA / TEMPAT	: Laboratorium Farmakologi FK UMM
DINYATAKAN	: Laik Etik

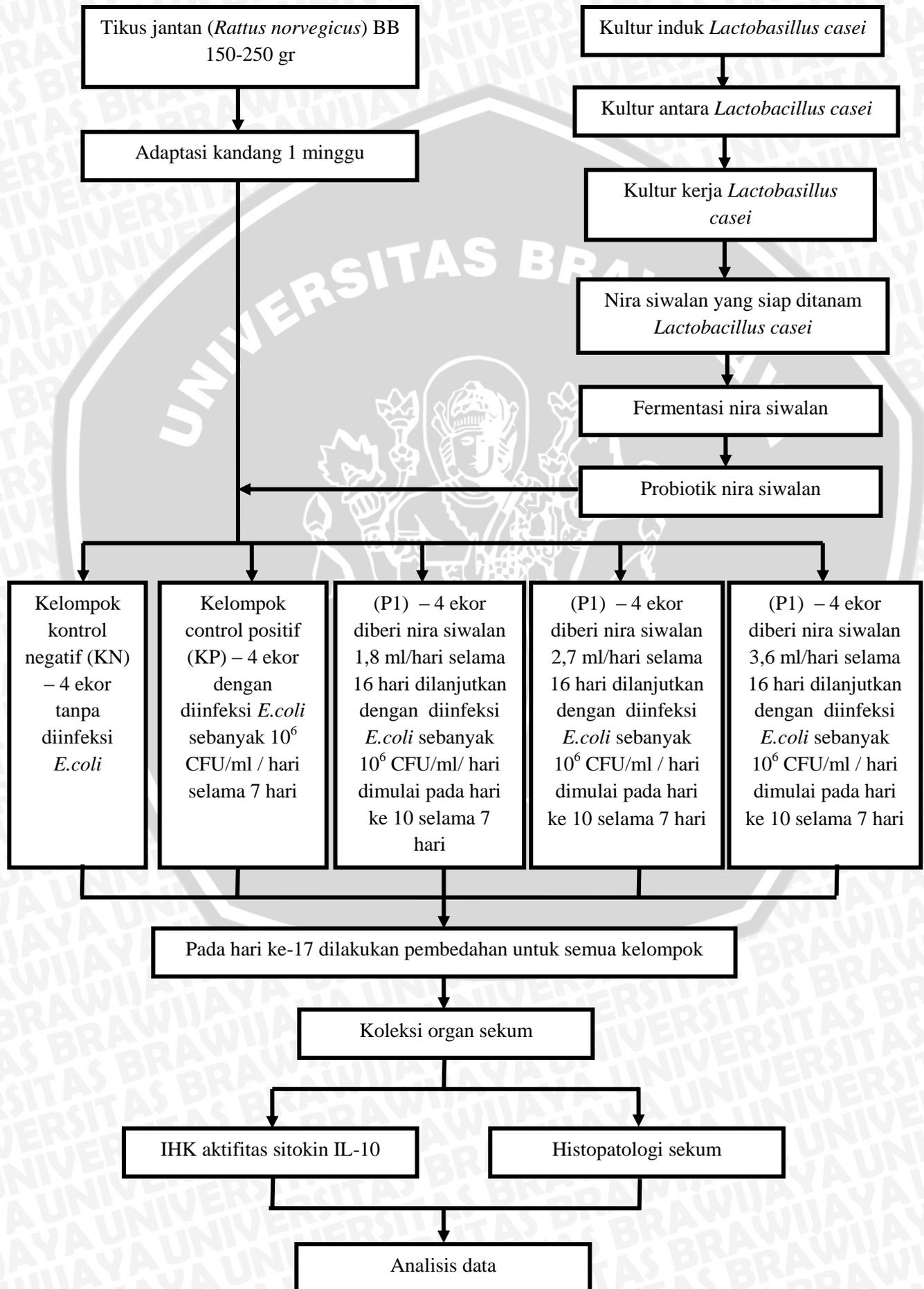
Malang, 20 April 2016
 Ketua Komisi Etik
 Univ. Muhammadiyah Malang



Dr. Elita Sandaja, MPH
 NIDR: 07.22.12.430



LAMPIRAN 2. KERANGKA OPERASIONAL PENELITIAN



LAMPIRAN 3. PERHITUNGAN DOSIS

a. Probiotik Nira Siwalan

Dosis susu fermentasi untuk manusia 100-200 ml/hari. Konversi dosis manusia ke tikus adalah sebagai berikut :

- Dosis kelompok P3 (100 ml)

$$\begin{aligned} \text{Dosis} &= \text{Dosis} \times \text{koefisien konversi} \\ &= 100\text{ml} \times 0.018 \\ &= 1,8 \text{ ml} \end{aligned}$$
- Dosis kelompok P4 (150 ml)

$$\begin{aligned} \text{Dosis} &= \text{Dosis} \times \text{koefisien konversi} \\ &= 150 \text{ ml} \times 0.018 \\ &= 2,7 \text{ ml} \end{aligned}$$
- Dosis kelompok P5 (200 ml)

$$\begin{aligned} \text{Dosis} &= \text{Dosis} \times \text{koefisien konversi} \\ &= 200 \text{ ml} \times 0.018 \\ &= 3,6 \text{ ml} \end{aligned}$$

b. Dosis *E.coli* : 10^6 cfu/ml (1ml) per ekor tikus

Tabel Konversi Dosis Manusia dan Antar Jenis Hewan

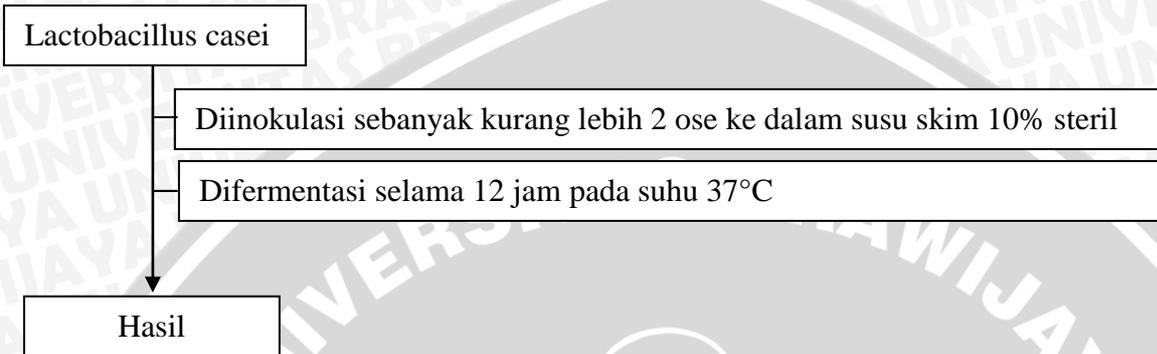
	Mencit (20 g)	Tikus (200g)	Marmot (400g)	Kelinci (1,5kg)	Kera (4kg)	Anjing (70kg)	Manusia (70 kg)
Mencit (20 g)	1	7	12,25	27,8	64,1	124,2	387,9
Tikus (200g)	0,14	1	1,74	3,9	9,2	17,8	56
Marmot (400g)	0,08	0,57	1	2,25	5,2	10,2	31,5
Kelinci (1,5kg)	0,04	0,25	0,44	1	2,4	4,5	14,2
Kucing (2kg)	0,03	0,23	0,41	0,92	2,2	4,1	13
Kera (4kg)	0,016	0,11	0,19	0,42	1	1,9	6,1
Anjing (70kg)	0,008	0,06	0,1	0,22	0,52	1	3,1
Manusi a (70 kg)	0,0026	0,018	0,031	0,07	0,16	0,32	1

Sumber : Laurance dan Bacharah, 1964 (dikutip oleh Yuniastuti, 2004)

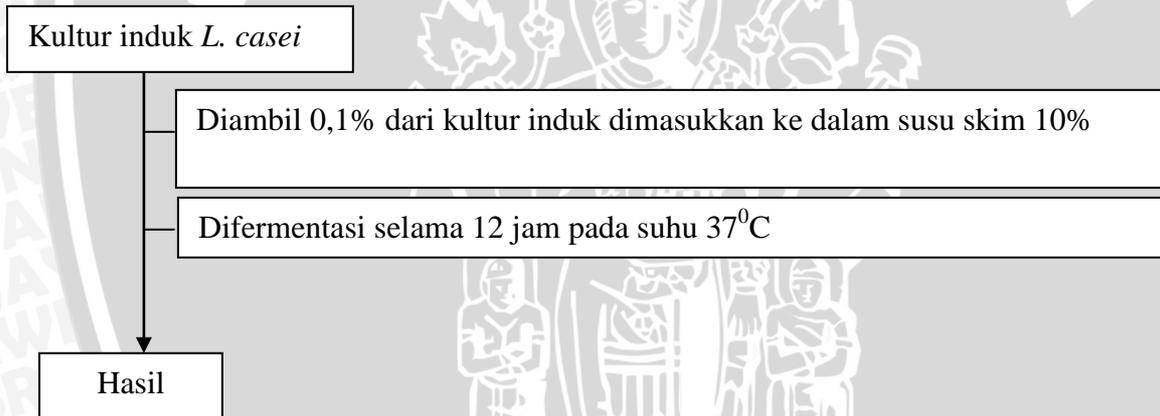
LAMPIRAN 4. Pembuatan Fermentasi Nira Siwalan

a. Persiapan Starter

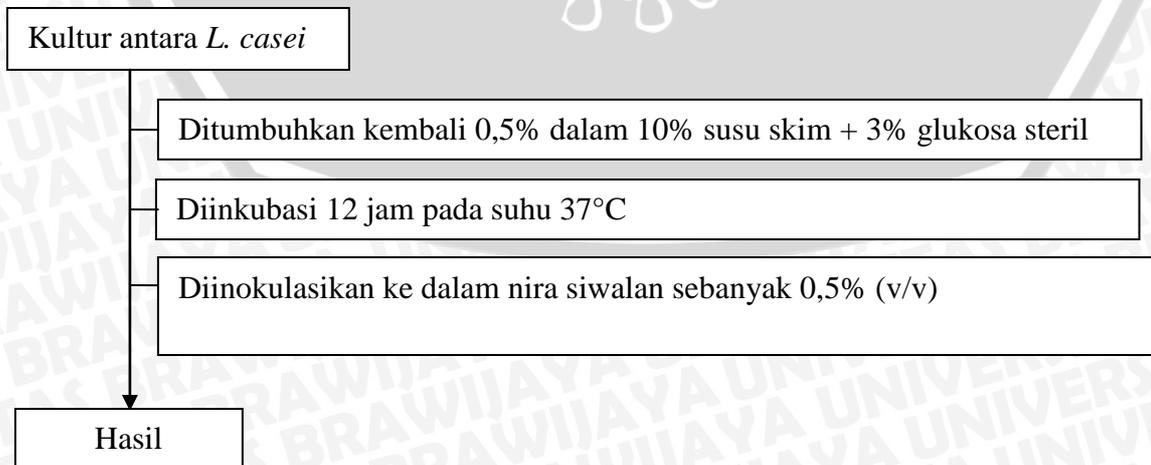
Kultur Induk



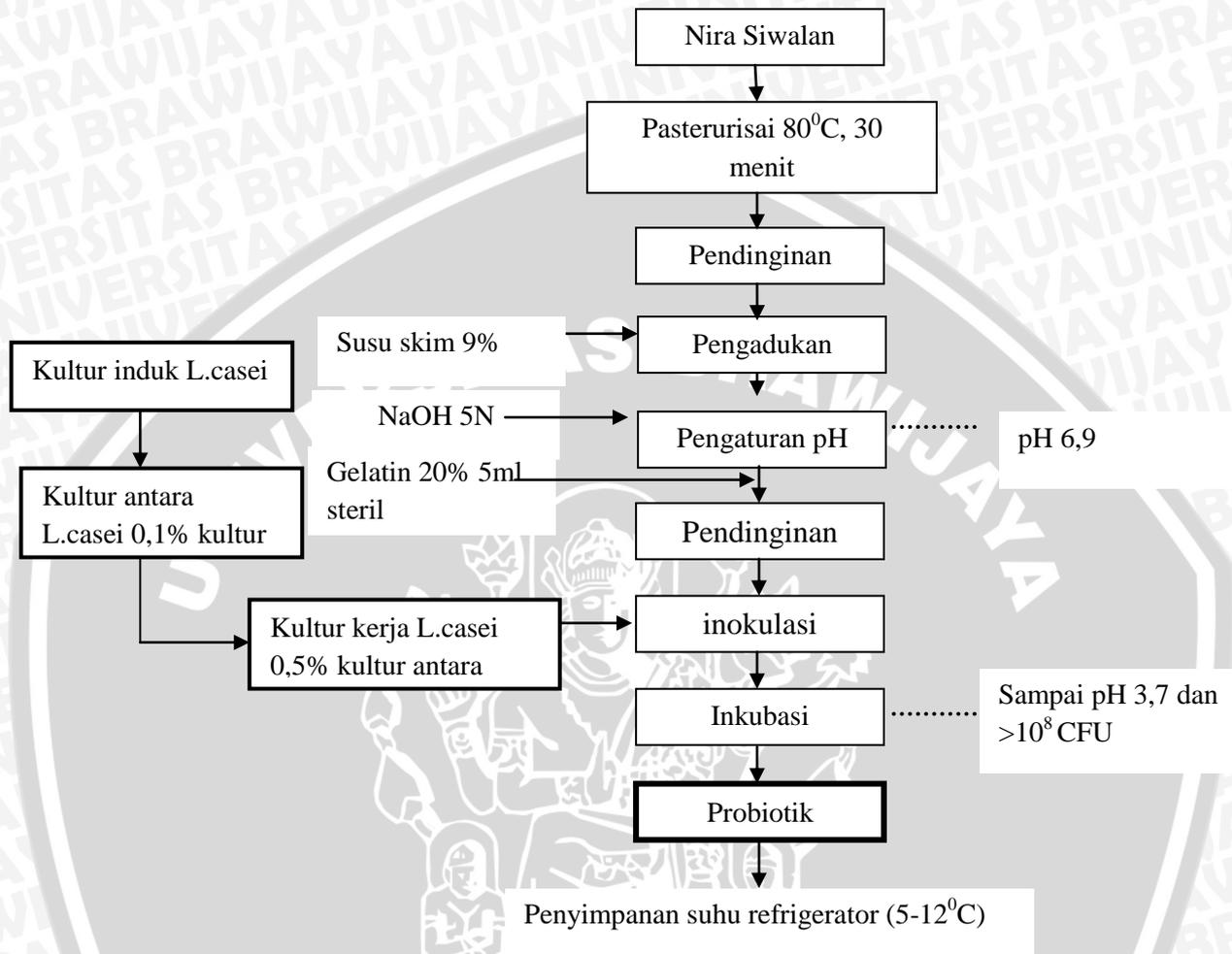
Kultur Antara



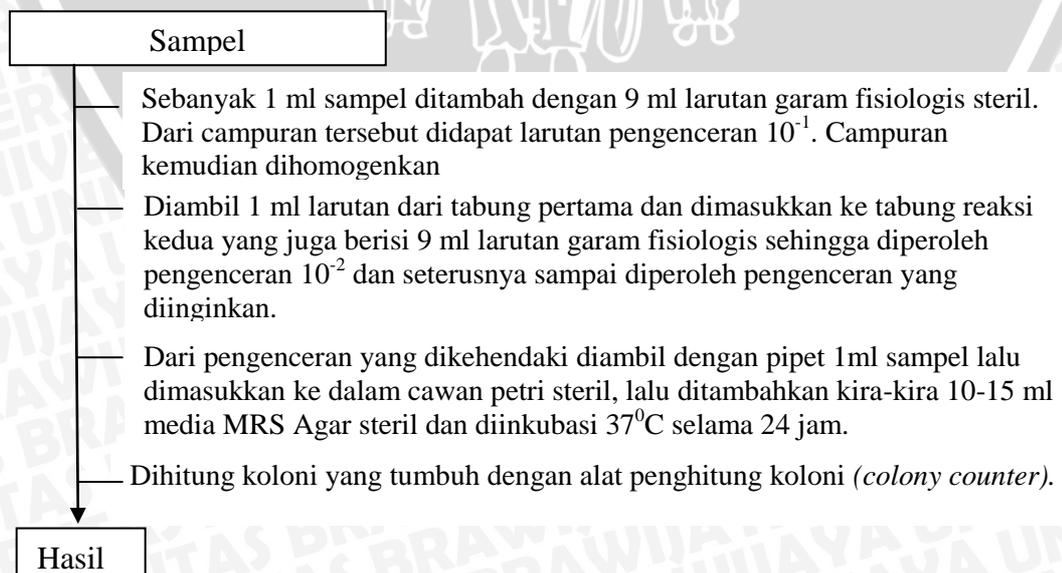
Kultur kerja



b. Kerangka Operasional Pembuatan Fermentasi Nira Siwalan



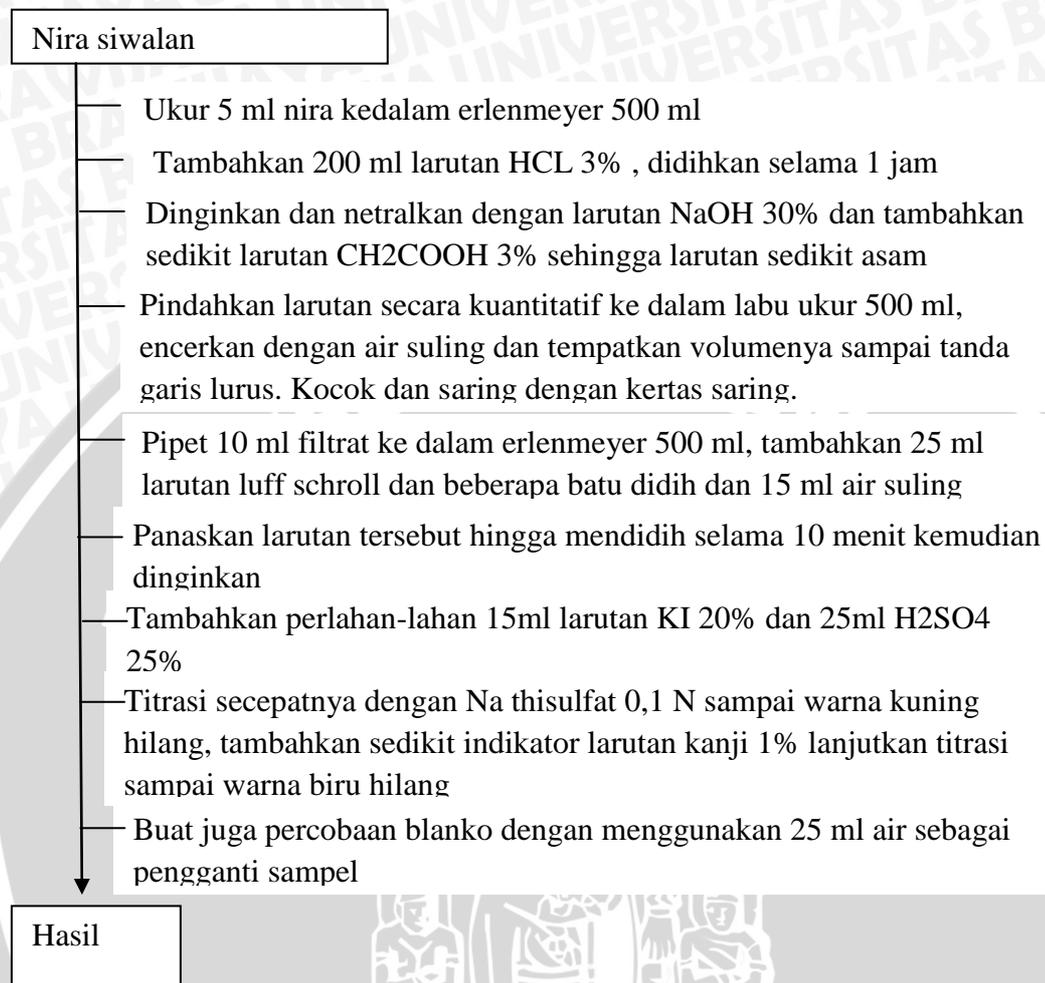
c. Perhitungan Total Bakteri Asam Laktat Fermentasi Nira dengan metode TPC



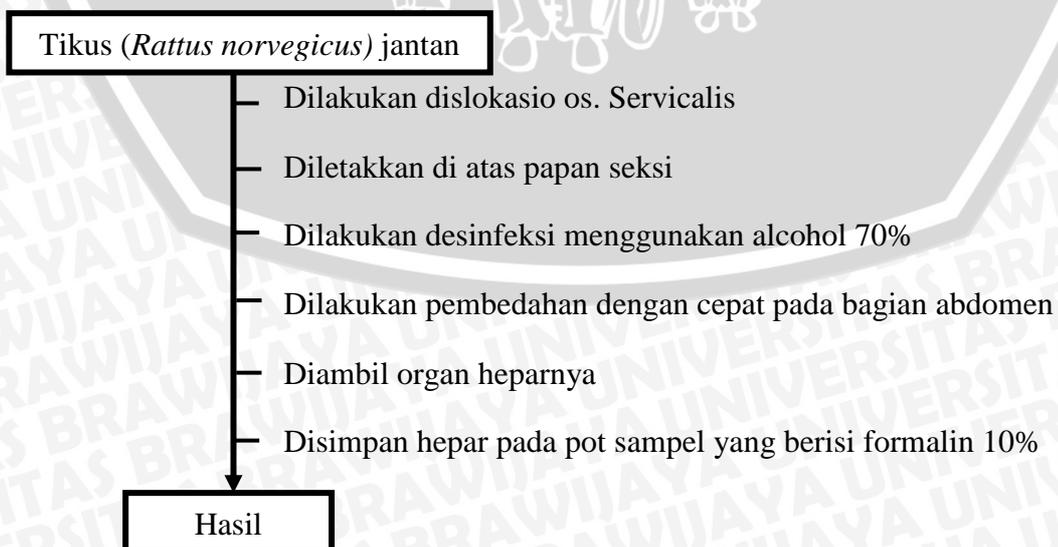
Lampiran 5. Pembuatan Larutan

- a. Kultur induk
Susu skim 10% = 1 gram susu : 9 ml pengencer
- b. Kultur antara
0,1% kultur induk + 10% susu skim
= $0,1\% \times 10 \text{ ml} + 10 \text{ ml}$ (1 gr susu : 9 ml pengencer)
= $0,01 \text{ ml} + 10 \text{ ml}$
= 10,01 ml
- c. Kultur Kerja
0,5% kultur antara + susu skim 10% + 3% glukosa
= $0,5\% \times 10,01 \text{ ml} + 10 \text{ ml} + 10 \text{ ml}$ (0,3 gr glukosa : 9,7 pengencer)
= $0,05 \text{ ml} + 10 \text{ ml} + 10 \text{ ml}$
= 20,05 ml
- d. Pembuatan Fermentasi Nira Siwalan
Volume nira yang di butuhkan :
- Perlakuan 1 : $1,8 \text{ ml} \times 4 \text{ ulangan} \times 16 \text{ hari} = 115,2 \text{ ml}$
 - Perlakuan 2 : $2,7 \text{ ml} \times 4 \text{ ulangan} \times 16 \text{ hari} = 172,8 \text{ ml}$
 - Perlakuan 3 : $3,6 \text{ ml} \times 4 \text{ ulangan} \times 16 \text{ hari} = 230,4 \text{ ml}$
-
- 518,4 ml
- Volume nira yang difermentasikan : 1000 ml
- Susu skim 9% (w/v) : $9\% \times 1000 \text{ ml} = 9 \text{ gram}$
- Volume kultur kerja : $0,5\% \times 1000 \text{ ml} = 5 \text{ ml}$
- 5 ml Gelatin 20% = $20/100 \times 5 \text{ ml} = 1 \text{ gram}$

Lampiran 7. Analisa Gula Total Metode Luff-schroll



LAMPIRAN 8. Cara Pengambilan Organ



LAMPIRAN 9. Pewarnaan Histopatologi Sekum**Sekum**

- Difiksasi dengan formalin 10%
- Dilakukan dehidrasi menggunakan alkohol dengan konsentrasi bertingkat mulai 70% sampai 100% masing-masing 2 jam
- Dijernihkan dengan *Xylol* I dan II
- Ditanam/embedding dalam parafin
- Disayat secara serial menggunakan *mikrotom rotary* dengan ketebalan 0,4 μ m
- Diletakkan pada gelas objek
- Disimpan dalam inkubator 40°C selama 24 jam
- Diwarnai dengan hematoksilin-eosin
 - deparafinisasi dengan dimasukkan ke dalam larutan xylol I dan II masing-masing selama 3 menit
 - dimasukkan kedalam etanol absolut I dan II masing-masing 3 menit
 - dimasukkan ke dalam etanol 90% dan 80% masing-masing 3 menit
 - dibilas dengan air mengalir selama 1 menit.
 - dicelupkan ke pewarna hematoksilin selama 6-7 menit
 - dibilas dengan air mengalir selama 1 menit
 - dilarutkan lagi ke larutan hematoksilin selama 1 menit
 - dibilas dengan air keran 1 menit.
 - dicelupkan dalam larutan eosin selama 1-5 menit
 - dengan air mengalir 1 menit
 - dicelupkan dalam xylol I, II dan III masing-masing 3 menit.
- preparat diangkat dari lautn terakhir dalam keadaan basah, diberi 1 tetes cairan perekat selanjutnya ditutup dengan cover glass

Hasil

LAMPIRAN 10. IHK Sekum**Jaringan Sekum**

- Deparafinisasi (xylol I, xylol II) dan rehidrasi (alkohol bertingkat 100%, 90%, 80%, 70%). Dicuci PBS pH 7,4 3x5 menit
- 3% H₂O₂ selama 45 menit. Dicuci PBS pH 7,4 3x5 menit
- Blocking (BSA 2% selama 45 menit dalam suhu ruang) . Dicuci PBS pH 7,4 3x5 menit
- Antibodi primer (anti-rat IL-10) selama semalam, suhu 4⁰C. Dicuci PBS pH 7,4 3x5 menit
- Antibodi sekunder (rabbit anti rat labeled streptavidin biotin) selama 1 jam, suhu ruang. Dicuci PBS pH 7,4 3x5 menit
- SA-HRP (Strep-Avidin Horseradish Peroxidase) selama 45 menit, suhu ruang. Dicuci PBS pH 7,4 3x5 menit
- kromagen DAB (Diamino benzidine) selama 10-20 menit, suhu ruang. Dicuci PBS pH 7,4 3x5 menit
- counterstain (mayor hematoxylin) selama 10 menit. Dicuci aquades dan dikeringkan
- mounting dengan entellan
- pengamatan di bawah mikroskop

Hasil

Lampiran 11. Hasil Analisa Kualitatif bahan baku Nira Siwalan

a. Hasil pengujian Total Gula



UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH MALANG
FAKULTAS KEDOKTERAN
LABORATORIUM BIOMEDIK
Kampus II - Jl. Bendungan Sutani No. 188-A tlp. (0341) 551149 Pws. Fax (0341) 582060 Malang 65145

LAPORAN HASIL PENGUJIAN
 No : 088/Lab.Biomedik/FK-UMM/VI/2016

Berikut ini kami sampaikan hasil uji yang dilakukan di laboratorium kami, dengan data pengujian sebagai berikut :

Nama :
 Instansi :
 Jenis Sampel : **Nira**
 Tanggal Terima : **28 Mei 2016**
 Tanggal Pengujian : **30 Mei 2016**
 Uji : **Total KH Luff schoorl**
 Hasil Uji :

NO	SAMPEL	KH
1	Nira	11,83 %

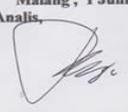
Demikian surat laporan hasil pengujian ini kami sampaikan semoga dapat dipakai sebagaimana mestinya.

Mengetahui,
 Kepala Laboratorium
 Biomedik FK-UMM



dr. Desy Sudari
 NIDN: 0709127503

Malang , 1 Juni 2016
 Analis,



Drs. Joko Trisilo Wahono

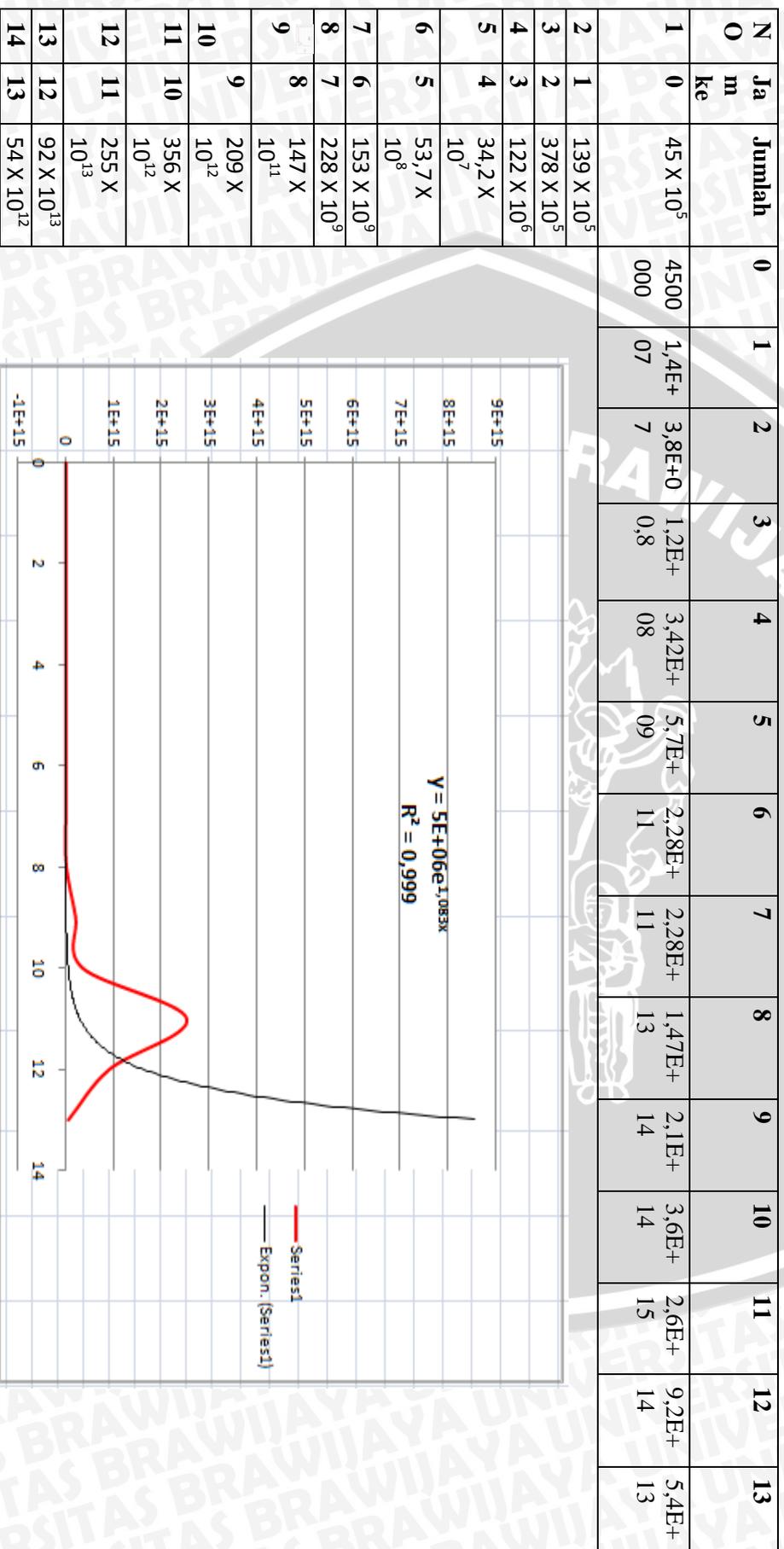
b. Hasil pengukuran pH awal Nira siwalan

Hari ke-	pH
0 (sebelum difermentasikan)	5,64



Lampiran 12. Hasil Analisa Kualitatif Fermentasi Nira Siwalan

a. Kurva Pertumbuhan *L.casei* shirota dalam susu skim 10%



b. Hasil pengukuran pH fermentasi nira siwalan

Hari ke-	pH
1	4,93
5	4,7
9	4,5
13	3,9

c. Hasil TPC Fermentasi Nira Siwalan

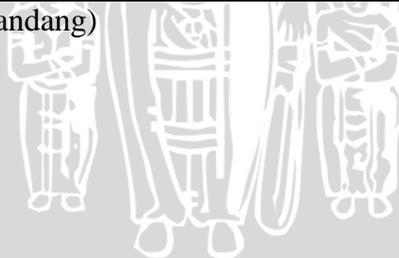
Faktor pengenceran	Total koloni
10^{-3}	395
10^{-4}	299
10^{-5}	135
10^{-6}	112
10^{-7}	73
10^{-8}	64
10^{-9}	45
10^{-10}	18

Lampiran 13.

Data Rata-Rata Persentase Ekspresi IL-10 pada Jaringan Sekum

Perlakuan	Ulangan	LP 1	LP 2	LP 3	LP 4	LP 5	Total	Rata-rata
Kontrol negatif	1	26,5	21,7	21,6	15,5	10,5	95,8	19,16
	2	23,6	18,7	15,1	16,2	27,4	101	20,2
	3	18,5	15,6	28,8	34,3	28,0	125,2	25,04
	4	16,5	21,1	14,1	41,6	24,7	118,6	23,6
Kontrol positif	1	6,7	8	7	6,7	4,5	32,9	6,58
	2	6,3	4,2	5,2	12	7,2	34,9	6,98
	3	10,7	9,6	11	9,7	10,3	51,3	10,26
	4	8,1	10,8	10,9	11,8	10	51,6	10,32
Perlakuan 1	1	35,0	6,4	7,9	8,9	5,6	63,8	12,76
	2	16,5	10,1	14,6	9,2	8,8	59,2	11,84
	3	12,7	15,9	20,8	9,6	16,0	75	15
	4	10,0	32,1	10,2	4,4	16,1	72,8	14,56
Perlakuan 2	1	21,9	23,2	13,1	19,1	22,4	99,7	19,94
	2	18,7	16	13,5	19,5	18,9	86,6	17,32
	3	14,7	10,8	23,9	21,9	27,8	99,1	19,82
	4	11,5	15,8	14,7	19	16,5	77,5	15,5
Perlakuan 3	1	33,1	23	11,5	22,3	19,1	109	21,8
	2	33,5	22,1	16,0	21,4	14,2	107,2	21,44
	3	10	17,1	22,7	9,6	30,9	90,3	18,06
	4	29,3	33,2	29,7	14,5	7,6	114,3	22,86

Keterangan : LP (Lapang Pandang)



Lampiran 13. Hasil Uji Statistik

Uji Normalitas Data

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Unstandardized Residual
N		20
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	,0000000
	Std. Deviation	5,36940397
	Most Extreme Differences	
	Absolute	,122
	Positive	,072
	Negative	-,122
Test Statistic		,122
Asymp. Sig. (2-tailed)		,200 ^{c,d}

a. Test distribution is Normal.

Hasil pengujian normalitas data menunjukkan nilai signifikansi (p) sebesar 0,200. Oleh karena nilai $p > 0,05$, maka H_0 diterima dan dapat disimpulkan bahwa data yang digunakan mempunyai distribusi yang tersebar dengan normal.

One Way

Descriptives

Hasil IHK

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					1,0	4		
2,0	4	8,535	2,0332	1,0166	5,300	11,770	6,6	10,3
3,0	4	13,540	1,4911	,7456	11,167	15,913	11,8	15,0
4,0	4	18,145	2,1373	1,0687	14,744	21,546	15,5	19,9
5,0	4	21,040	2,0761	1,0380	17,736	24,344	18,1	22,9
Total	20	16,652	5,4841	1,2263	14,085	19,219	6,6	25,0

Test of Homogeneity of Variances

IHK

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,224	4	15	,342

Hasil pengujian menunjukkan nilai dari levene test sebesar 1,224 dengan nilai signifikansi (p) sebesar 0,342. Oleh karena nilai $p > 0,05$, maka H_0 diterima dan dapat disimpulkan bahwa data yang digunakan mempunyai ragam yang homogen.

Pengujian nilai homogenitas telah memenuhi asumsi sehingga pengujian dengan menggunakan ANOVA dapat dilanjutkan.

ANOVA

Hasil IHK

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	502,620	4	125,655	27,390	,000
Within Groups	68,814	15	4,588		
Total	571,434	19			

Karena nilai F tabel (3,05) kurang dari F hitung (27,390) atau nilai $p < 0,05$, maka dapat diputuskan untuk tolak H_0 , yang berarti bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara perlakuan.

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Hasil IHK

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1,0	2,0	13,4650*	1,5145	,000	8,788	18,142
	3,0	8,4600*	1,5145	,000	3,783	13,137
	4,0	3,8550	1,5145	,132	-,822	8,532
	5,0	,9600	1,5145	,967	-3,717	5,637
2,0	1,0	-13,4650*	1,5145	,000	-18,142	-8,788
	3,0	-5,0050*	1,5145	,033	-9,682	-,328
	4,0	-9,6100*	1,5145	,000	-14,287	-4,933
	5,0	-12,5050*	1,5145	,000	-17,182	-7,828
3,0	1,0	-8,4600*	1,5145	,000	-13,137	-3,783
	2,0	5,0050*	1,5145	,033	,328	9,682
	4,0	-4,6050	1,5145	,055	-9,282	,072
	5,0	-7,5000*	1,5145	,001	-12,177	-2,823
4,0	1,0	-3,8550	1,5145	,132	-8,532	,822
	2,0	9,6100*	1,5145	,000	4,933	14,287
	3,0	4,6050	1,5145	,055	-,072	9,282
	5,0	-2,8950	1,5145	,353	-7,572	1,782
5,0	1,0	-,9600	1,5145	,967	-5,637	3,717
	2,0	12,5050*	1,5145	,000	7,828	17,182
	3,0	7,5000*	1,5145	,001	2,823	12,177
	4,0	2,8950	1,5145	,353	-1,782	7,572

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

Hasil IHK

Tukey HSD^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
2,0	4	8,535		
3,0	4		13,540	
4,0	4		18,145	18,145
5,0	4			21,040
1,0	4			22,000
Sig.		1,000	,055	,132

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

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

Persentase Area Ekspresi IL-10 pada Sekum

Kelompok	Rata-rata Ekspresi IL-10 ± SD	Peningkatan	Penurunan
Kontrol Negatif	22,0 ± 4,4 ^c	-	-
Kontrol Positif	8,53 ± 3,2 ^a	-	157,9%
Perlakuan 1	13,54 ± 2,4 ^b	63,5%	-
Perlakuan 2	18,14 ± 3,4 ^{bc}	107,5%	-
Perlakuan 3	21,04 ± 3,3 ^c	151,8%	-

Perhitungan Persentase Peningkatan dan Penurunan Ekspresi IL-10

a. Kontrol positif

$$\begin{aligned} \text{Persentase penurunan (\%)} &= \frac{\text{Rataan KN} - \text{Rataan KP}}{\text{Rataan KP}} \times 100\% \\ &= \frac{22,0 - 8,53}{8,53} \times 100\% \\ &= 157,9\% \end{aligned}$$

b. Perlakuan 1

$$\begin{aligned} \text{Persentase Peningkatan (\%)} &= \frac{\text{Rataan P1} - \text{Rataan KP}}{\text{Rataan KP}} \times 100\% \\ &= \frac{13,54 - 8,53}{8,53} \times 100\% \\ &= 58,7\% \end{aligned}$$

c. Perlakuan 2

$$\begin{aligned} \text{Persentase peningkatan (\%)} &= \frac{\text{Rataan P2} - \text{Rataan KP}}{\text{Rataan KP}} \times 100\% \\ &= \frac{18,14 - 8,53}{8,53} \times 100\% \\ &= 112,6\% \end{aligned}$$

d. Perlakuan 3

$$\begin{aligned} \text{Persentase peningkatan (\%)} &= \frac{\text{Rataan P3} - \text{Rataan KP}}{\text{Rataan KP}} \times 100\% \\ &= \frac{21,04 - 8,53}{8,53} \times 100\% \\ &= 146,6\% \end{aligned}$$