PENGARUH EKSTRAK KOPI ROBUSTA LAMPUNG DAN *Lactobacillus acidophilus* TERHADAP JUMLAH RELATIF SEL T CD206 DAN JUMLAH *KOLONI Salmonella enterica* PADA HEWAN MODEL SALMONELLOSIS

SKRIPSI

Oleh:
DIMAS AZMI YUNIARTA
165130101111066

PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERISTAS BRAWIJAYA
MALANG
2019

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

PENGARUH EKSTRAK KOPI ROBUSTA LAMPUNG DAN *Lactobacillus acidophilus* TERHADAP JUMLAH RELATIF SEL T CD206 DAN JUMLAH *KOLONI Salmonella enterica* PADA HEWAN MODEL SALMONELLOSIS

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:
DIMAS AZMI YUNIARTA
165130101111066

PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERISTAS BRAWIJAYA
MALANG
2019

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Pengaruh Ekstrak Kopi Robusta Lampung Dan *Lactobacillus acidophilus* Terhadap KoloniBakteri *Salmonella enterica* Dan Jumlah Sel T CD206 Pada Mencit Hewan Model Salmonellosis

Oleh:
DIMAS AZMI YUNIARTA
NIM. 165130101111066

Setelah dipertimbangkan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 3 Januari 2020
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

drh. Dahliatul Qosimah, M.Kes
NIP. 1982012 7201504 2 001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

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

repository.ub.ac.id

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Dimas Azmi Yuniarta

NIM : 165130101111066

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulis Skripsi berjudul:

Pengaruh Ekstrak Kopi Robusta Lampung Dan *Lactobacillus acidophilus* Terhadap KoloniBakteri *Salmonella enterica* Dan Jumlah Sel T CD206 Pada Mencit Hewan Model Salmonellosis

Dengan ini menyatakan bahwa:

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

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 3 Januari 2020

Yang menyatakan,

Dimas Azmi Yuniarta
NIM. 165130101111066

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Pengaruh Ekstrak Kopi Robusta Lampung Dan *Lactobacillus acidophilus* Terhadap Koloni Bakteri *Salmonella enterica* Dan Jumlah Sel T CD206 Pada Mencit Hewan Model Salmonellosis

ABSTRAK

Salmonellosis merupakan zoonosis menyerang manusia dan hewan, salah satu penyebabnya adalah bakteri *Salmonella enterica* (*S. enterica*). Bakteri tersebut masuk kedalam intestinal dan merusak epitel intestinal dan memicu munculnya mediator imunitas seperti sel T CD206. Kombinasi kopi robusta (tanin, alkaloid, flavonoid saponin dan asam klorogenat) dan bakteri *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus)* dapat berfungsi sebagai antibakteri dan memicu proliferasi sel limosit Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui pengaruh sinbiotik *L. acidophilus* dan kopi robusta Lampung terhadap kadar CD206 dan jumlah koloni *S. enterica*. Penelitian ini bersifat *true* eksperimental dengan menggunakan hewan coba Mencit Balb C jantan berusia 8-10 minggu. Mencit berjumlah 24 ekor dibagi menjadi K+ (*S. enterica*10^8 CFU/mL*)*, K- (sehat), K *L. acidophilus* CFU/mL, P1, P2, P3 dengan dosis bertingkat (ektrak kopi robusta 250 mg/kgBB, 500 mg/kg BB, dan 750 mg/kgBB dikombinasi dengan *L. acidophilus* 10^8CFU/mL) selanjutnya diinfeksi dengan *S. enterica*10^8 CFU/mL, dengan masing masing kelompok terdapat empat ulangan. Pengumpulan data sel TCD206 dengan menggunakan *flowcitometry* dan *S. enterica*dihitung dengan metode *Total Plate Count* (TPC). Data tersebut kemudian dianalisis secara kuantitatif mengguakan uji *One Way Analysis of Varlance* (ANOVA). dengan tingkat kepercayaan 95%. Hasil menunjukan bahwa sinbiotik kopi robusta lampung 250 mg/Kg BB dan *Lactobacillus acidophilus* 0,5 mL mampu meningkatkan sel T CD206 dan menurunkan jumlah koloni *Salmonella enterica.* Kopi robusta lampung berpotensi sebagai antibakteri yang dapat menurunkan jumlah *S. enterica* pada intestinal mencit.

Kata kunci: Salmonellosis, *Sinbiotik*, Kopi robusta lampung, dan sel TCD206

The Effect of Robusta Lampung Coffee Extract And *Lactobacillus acidophilus* To *Salmonella enterica* Bacteria Colony And Number Of T Cells CD206 In Infectious Mice Balb/C with Salmonellosis

ABSTRACT

Salmonellosis is a zoonotic disease against humans and animals, one of the causes is *Salmonella Enterica (S. Enterica)* bacteria. The bacteria enter into intestinal and damage the epithelium of intestinal and trigger the emergence of a mediator of immunity such as the T cell CD206. The combination of robusta coffee (tannins, alkaloids, flavonoids saponins and chlorogenic acid) and bacteria *Lactobacillus acidophilus (L. acidophilus)* can serve as antibacterial and trigger the proliferation of cell limocytes. The purpose of this study to find out the synbiotic influence of *L. acidophilus* and Robusta coffee Lampung against CD206 and the number of *S. enterica* colonies. This research is true experimentally with the use of animals trying to try the male mice balb C 8-10 weeks. Mice numbered 24, divided into K + (*S. enterica* 10^8 CFU/mL), K-(healthy), K *L. acidophilus* 10^8 CFU/mL, P1, P2, P3 with multilevel dose (Ektrax coffee robusta 250 mg/kgBB, 500 mg/kg BB, and 750 mg/kgBB combined with *L. acidophilus* 10^8CFU/mL. Then infected with *S. enterica* 10^8 CFU/mL, with each group there are four occurrences. The data collection of CD206 cells by using Flowcitometry and *S. enterica* is calculated by the Total Plate Count (TPC) method. Both data are then analyzed quantitatively in the One Way Analysis of Varlance (ANOVA) test. With a confidence level of 95%. From the Result, synbiotic robust coffee Lampung 250 mg/kg BB and *Lactobacillus acidophilus* can increase T cell CD206 an decrease colony of *Salmonella enterica.*

Keywords: Salmonellosis, *Salmonella enterica*, *Lactobacillus acidophilus*, CD206 Cell and Robusta Lampung Coffee

DAFTAR ISI

Halaman

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI iii
LEMBAR PERNYATAAN iv
ABSTRAK v
ABSTRACT vi
KATA PENGANTAR vii
DAFTAR ISI ix
DAFTAR TABEL xii
DAFTAR GAMBAR xiii
DAFTAR LAMPIRAN xiv
DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG xv
BAB I PENDAHULUAN ..... **Error! Bookmark not defined.**
1.1 Latar Belakang ..... **Error! Bookmark not defined.**
1.2 Rumusan Masalah ..... **Error! Bookmark not defined.**
1.3 Batasan Masalah ..... **Error! Bookmark not defined.**
1.4 Tujuan Penelitian ..... **Error! Bookmark not defined.**
1.5 Manfaat Penelitian ..... **Error! Bookmark not defined.**
BAB II TINJAUAN PUSTAKA ..... **Error! Bookmark not defined.**
2.1 Sinbiotik ..... **Error! Bookmark not defined.**
2.1.1 Kopi Robusta ..... **Error! Bookmark not defined.**
2.1.2 Bakteri *Lactobacillus acidophilus* ..... **Error! Bookmark not defined.**
2.2 Mencit Balb C ..... **Error! Bookmark not defined.**
2.2.1 Saluran Pencernaan Mencit ..... **Error! Bookmark not defined.**
2.3 Morfologi dan Klasifikasi *Salmonella sp.* ..... **Error! Bookmark not defined.**
2.4 Salmonellosis ..... **Error! Bookmark not defined.**
2.4.1 Patogenesa ..... **Error! Bookmark not defined.**
2.4.2 Gejala Klinis ..... **Error! Bookmark not defined.**
2.4.3 Epidemiologi ..... **Error! Bookmark not defined.**

2.4.4 Kerugian akibat Salmonellosis ..... **Error! Bookmark not defined.**
2.5 Imunitas dan Respon Imun ..... **Error! Bookmark not defined.**
2.5.1 Imunitas Alamiah..... **Error! Bookmark not defined.**
2.5.2 Imunitas Adaptif ..... **Error! Bookmark not defined.**
2.5.3 Respon Imun Terhadap Salmonella..... **Error! Bookmark not defined.**
2.6 Sel CD206..... **Error! Bookmark not defined.**
BAB III KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS PENELITIAN.....**Error! Bookmark not defined.**
3.1 Kerangka Konsep..... **Error! Bookmark not defined.**
3.2 kerangka Teori..... **Error! Bookmark not defined.**
3.3 Hipotesis Penelitian ..... **Error! Bookmark not defined.**
BAB IV METODE PENELITIAN ..... **Error! Bookmark not defined.**
4.1 Lokasi dan Waktu Penelitian..... **Error! Bookmark not defined.**
4.2 Alat dan Bahan Penelitian ..... **Error! Bookmark not defined.**
4.2.1 Alat ..... **Error! Bookmark not defined.**
4.2.2 Bahan ..... **Error! Bookmark not defined.**
4.3 Variabel Penelitian..... **Error! Bookmark not defined.**
4.4 Rencana Penelitian..... **Error! Bookmark not defined.**
4.5 Tahap Penelitian..... **Error! Bookmark not defined.**
4.6 Prosedur Kerja..... **Error! Bookmark not defined.**
4.6.1 Persiapan Sinbiotik ..... **Error! Bookmark not defined.**
4.6.2 Persiapan Hewan Coba ..... **Error! Bookmark not defined.**
4.6.3 Persiapan Bakteri *Salmonella enterica* ..... **Error! Bookmark not defined.**
4.6.4 Perlakuan Pada Hewan Coba..... **Error! Bookmark not defined.**
4.6.5 Eutanasi dan Pembedahan ..... **Error! Bookmark not defined.**
4.6.7 Kultur S*almonella enterica*..... **Error! Bookmark not defined.**
4.7 Analisa Data ..... **Error! Bookmark not defined.**
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN ..... **Error! Bookmark not defined.**
5.1 Pengujian Kombinasi Kopi Robusta Lampung dan bakteri *Lactobacillus acidophilus*..... **Error! Bookmark not defined.**

5.2 Pengaruh Sinbiotik (Ekstrak Kopi Robusta Lampung dan Bakteri *Lactobaccilus acidophilus*) Terhadap Kondisi Feses Mencit..... **Error! Bookmark not defined.**

5.3 Pengaruh Pemberian Kombinasi Ekstrak Kopi Robusta Lampung dan *Lactobacillus acidophilus* Terhadap Jumlah Relatif sel CD206 **Error! Bookmark not defined.**

5.4 Pengaruh Pemberian Kombinasi Ekstrak Kopi Robusta Lampung dan *Lactobacillus acidophilus* Terhadap Jumlah Bakteri *Salmonella enterica* **Error! Bookmark not defined.**

5.5 Hubungan Antara Jumlah Bakteri *Salmonella enterica* dan Jumlah Relatif Sel T CD206 pada Pemberian Kombinasi Ekstrak Kopi Robusta Lampung dan *Lactobacillus acidophilus.* ..... **Error! Bookmark not defined.**

BAB VI PENUTUP ..... **Error! Bookmark not defined.**

6.1 Kesimpulan ..... **Error! Bookmark not defined.**

6.2 Saran ..... **Error! Bookmark not defined.**

DAFTAR PUSTAKA ..... **Error! Bookmark not defined.**

DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
4.1	Rancangan Penelitian (Hubungan Perlakuan dan Ulangan	37
5.1	Uji Sensitifitas Bakteri *Lactobacillus axiddophilus*	45
5.2	Tampilan Feses Pada Mencit	46
5.3	Hasil Uji Anova pada Sel T CD206	50
5.4	Jumlah rerata bakteri *Salmonella enterica* pada Mencit Balb C	55

DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
2.1	A. Kopi robusta, B. Perbedaan biji Kopi robusta dan koi arabika	9
2.2	Strutur asam Klorogenat	10
2.3	A. Bakteri *Lactobacillus acidophilus* dengan pewarnaan gram negatif, B. Lactomicrosel pada *Lactobacillus acidophilus*	11
2.4	Mencit	14
2.5	Baktri *Salmonella*	16
2.6	Proses Invasi *Salmnonella* kedalam sel epitel intestinal	20
2.7	Mekanisme sistem imun adaptif dan sistem imun alamiah	26
2.8	Mekanisme sistem imun gastrointestinal terhadap bakteri *Salmonella enterica*	26
5.1	Grafik Rata-Rata Jumlah Relatif Sel T CD206 Berdasarkan Flowcitometry pada Masing-masing Kelompok Perlakuan	49

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran		Halaman
1	Surat Pernyataan Bebas Patogen	70
2	Laik Etik	71
3	Bagian Kerangka Operasional Penelitian	73
4	Uji TFC dan LC-Ms Kopi robusta	74
5	Perhitungan dosis	75
6	Dokumentasi Penelitian	77
7	Identifikasi Bakteri *Salmonella enterica*	79
8	Identifikasi Bakteri *Lactobaccilus acidophilus*	80
9	Uji in vitro pengaruh Kopi robusta terhadap Lactobaccilus acidophilus	81
10	Hasil Olah Data Sel T CD206 dengan Metode *One Way Anova Analysis of Varience*	82
11	Hasil *flowcitometry* sel T CD206	85
12	Uji microbact *Salmonella enterica*	86

DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

BSA	: *Bismuth Sulfite Agar*
CFU	: *Colony Forming Unit*
EMP	: *Embden Meyerhof parnas*
H	: Flagela
Ig A	: Imunglobulin A
MRSA	: de Man, Rogosa and Sharpe Agar
NPIP	: The National Poultry Improvement Plan
L	: *Lactobacillus*
NK	: *Natural Killer*
NTS	*: Non Typhoid Salmonella*
O	: Somatik
S	: *Salmonella*
TPC	: *Total Plate Count*
Vi	: Kapsul

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Salmonellosis merupakan zoonosis yang dapat menyerang manusia dan juga hewan. Penyakit tersebut disebabkan oleh bakteri *Salmonella sp.* (Rahman, 2017). Salmonellosis menjadi penyakit zoonosis urutan kelima menurut Keputusan Mentri Pertanian Nomor 4971 Tahun 2012 tetang zoonosis prioritas. Jumlah kasus salmonellosis yang menyerang manusia di Indonesia mencapai 358-810/ 100.000 penduduk/ tahun (Dewi, 2015). Salmonellosis juga dapat menyerang pada ayam dan terjadi sebanyak 60.000 hingga 1.300.00 kasus dengan sedikitnya menimbulkan kematian 20.000 ekor setiap tahunnya (Sartika, 2016). Bakteri *Salmonella sp.* memiliki banyak spesies, dan memiliki hospes yang beragam dan spesifik, salah satu contohnya adalah *S. enterica.*

Bakteri *Salmonella enterica*termasuk kedalam famili *Enterobacteriaceae*dan merupakan subspecies dari *S. enteritica*(Obukhovska, 2013). Bakteri tersebut dapat hidup di saluran pencernaan pada hewan maupun manusia. Penyebaran *Salmonella enterica*dapat melalui telur dan melalui produk makanan yang berasal dari ayam yang menyebabkan terjadinya salmonellosis pada manusia (McKelvey, 2013). Menurut Akter (2007) bahwa penyakit salmonellosis merupakan penyakit yang penularannya dapat terjadi secara vertikal dari induk ke anaknya.Penggunaan vaksin

inaktif S. enteritidis dapat menimbulkan respon kekebalan humoral yang tinggi. Hal ini tidak menimbulkan secretory antibodi pada mukosa usus dan cell mediated immunity (CMI) response. Vaksin yang diterapkan pada ternak di lapangan saat ini masih belum efektif digunakan untuk penanggulangan penyakit ini sehingga antimikroba masih menjadi obat yang utama digunakan untuk pemberantasan penyakit Salmonellosis. Penggunakanbakteriofage dapat digunakan untuk membunuh *Salmonella sp.* namun Indonesia belum terdapat bakteriofage secara komersial. Hal ini disebabkan karena penelitian tentang bakteriofage masih sedikit. Penelitian bakteriofage yang telah dilakukan ditemukan isolasi, spesifitas, karakterisasi dan keamanan bakteriofage. Bakteriofage hanya melisiskan bakteri target, sehingga bakteriofage untuk melisiskan Salmonella sp dapat diperoleh dari isolasi bakteriofage yang berasal dari media yang tercemar bakteri *Salmonella sp*(Atterbury, 2007)Salmonllosisdisebabakan pula oleh adanya resistensi antimikroba*salmonella*. Peningatan resistensi Antimikroba pada *Salmonella* dapat dikurangi dengan pengurangan pemberian antibiotik. Beberapa cara yang dapat digunakan sebagai pengganti antibiotik adalah dengan menggunakan sinbiotik (Oliveira, 2006).

Menurut Hartono (2016), Sinbiotik merupakan gabungan dari probiotik dan prebiotik yang dapat memperbaiki mikroflora di saluran pencernaan. Sinbiotik merupakan suatu produk yang mengandung dua jenis bahan yaitu probiotik dan prebiotik. Pemberian probiotik dapat meningkatkan aktivitas enzim pencernaan

sehingga penyerapan nutrient menjadi lebih optimal dengan makin luasnya area absorpsi sebab probiotik dapat mempengaruhi anatomi usus yaitu vili usus menjadi lebih tinggi dan densitasnya lebih

padat. Prebiotik adalah *nondigestible food ingredient* yang memiliki pengaruh baik terhadap *host* (inang) dengan memicu aktifitas, pertumbuhan selektif, atau keduanya terhadap satu jenis atau lebih mikroba.

Prebiotik yang digunakan adalah kopi robusta lampung. Kopi robusta memiliki kandungan oligosakarida yang merupakan jenis dari karbohidrat. Oligosakarida sebagai prebiotik karena dapat sebagai sumber pangan untuk bakteri, selain itu juga dapat mecegahperlekatan bakteri patogen pada intestinum (Tian, 2017). Kopi robusta memiliki kandungan *chlorogenic acid,* kafein, lignin, pectin, protein, dan trigonellineyang berperan sebagai antibakteri. Kopi robusta sebagai modulator untuk mengatur viability dari neutrofil dalam melawan bakteri (Ermawati, 2016). Kopi yang digunakan secara tunggal dapat menyebabkan terjadinya hipersekresi dari cairan lambung dan mengiritasiepitel dari saluran pencernaan dikarenakan kandungan asam yang cukup tinggi pada kopi (Rafetto, 2004). Probiotik adalah kelompok mikroorganisme yang sangat menguntungkan bagi kesehatan tubuh manusia. Kelompok bakteri yang tergolong probiotik adalah kelompok bakteri asam laktat yang merupakan mikroflora alami pada saluran pencernaan manusia dan dapat memproduksi bakteriosin yang dapat merangsang pembentukkan antibodi tubuh dan dapat dimanfaatkan sebagai imunomodulator. *Lactobacillus achidopilus,* merupakan bakteri asam laktat yang dapat digunakan menghambat pertumbuhan bakteri (Rusli, 2018). Bakteri tersebut dapat menjadi barrier dari intestinal epitel (Raheja, 2010).

Berdasarkan latar belakang tersebut, peneliti tertarik untuk melakukan penelitian tentang pengaruh pemberian ekstrak kopi robusta lokal dan bakteri *Lactobacillus acidophilus* pada mencit balb C yang diinfeksi*Salmonella enterica*terhadap jumlah relatif bakteri *Salmonella enterica*dan sel CD206.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh pemberian sinbiotik kopi robusta dan bakteri *Lactobacillus acidophilus* sebagai preventif terhadap penurunan koloni bakteri *Salmonella enterica*?
2. Bagaimana pengaruh pemberian sinbiotik kopi robusta dan bakteri *Lactobacillus acidophilus* sebagai preventif terhadap kenaikan jumlah relatif sel T CD206?

1.3 Batasan Masalah

Batasan dari penelitian ini adalah

1. Hewan coba yang digunakan adalah mencit balb C jantan berumur 2-3 bulan dengan berat berkisar 25 hingga 30 gram yang didapat dari Bapak Slamet dengan surat keterangan bebas patogen (**Lampiran 1)**. Penggunaan hewan coba mencit telah mendaptkansurat keterangan laik etik yang didapatkan dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya No 110-KEP-UB (**Lampiran 2)**.

2. Bakteri *Lactobacillus acidophilus* didapat dari laboratorium mikrobiologi Fakultas Kedokeran Universitas Brawijaya dan selanjutnya dilakukan uji konfirmasi dengan menggunakan *microbact*dan didapatkan hasil *Lactobacillus acidophilus* 10^8.
3. Bakteri *Salmonella enterica*didapat dari laboratorium mikrobiologi Fakultas Kedokeran Universitas Brawijaya, dan telah diidentifikasi dengan Mc Farland No 1 10^8 CFU/ mL. Jumlah koloni bakteri *Salmonella enterica*yang tumbuhkan dengan media *Bismuth Sulfite Agar* (BSA) dihitung dengan metode *spread.*
4. Kopi robusta lampung didapatkan dari Lampung dalam bentuk serbuk yang berwarna putih kehijuan dan dengan aroma kopi yang tidak bergitu menyengat.
5. Konsentrasi sinbiotik kopi yang digunakan adalah 250 mg dan 0.5 mL *L. acidophilus,* 500 mg kopi dan 0,5 mL *Lactobacillus. acidophilus,* dan 750 mg kopi dan 0.5 mL *L. acidophilus* yang diberikan secara peroral selama 15 hari.
6. Dosis infeksi *Salmonella enterica*10^8 CFU/mL/ekor diberikan secara peroral sebanyak 0,5 mL selama 5 hari.
7. Jumlah relatif sel CD206 dihitung dengan menggunakan metode *flowcytometry.*

1.4 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui pengaruh pemberian sinbiotik kopi robusta dengan bakteri *L. acidophilus* terhadap kenaikan jumlah relatif sel CD206 pada mencit balb C yang diinfeksi bakteri *S. enterica*.
2. Untuk mengetahui pengaruh pemberian sinbiotik kopi robusta dengan bakteri *L. acidophilus* terhadap penurunan jumlah koloni *S. enterica*.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi dari kombinasi kopi robusta dengan bakteri *L. acidophilus* sebagai pencegahan terhadap salmonellosis berdasarakan pengaruhnya terhadap jumlah reltif sel CD206 dan jumlah koloni*Salmonellaentericay*ang diifeksi*Salmonella enterica*.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sinbiotik

Sinbiotik merupakan kombinasi antara prebiotik dan probiotik dalam peningkatan kesehatan tubuh disebut. Sinbiotik dapat mampu memperbaki kehidupan bakteri dan menyediakan substrat yang spesifik untuk fermentasi. Adanya sinbiotik tersebut sangat membantu sebagai antimikroba, antidiare, dan antibakteri. Sinbiotik merupakan gabungan dari probiotik dan prebiotik. Sinbiotik mengandung mikrobia hidup yang distimulasi oleh adanya prebiotik. Keuntungan selain efek kesehatan dari probiotik komersial, juga adanya prebiotik yang mendorong pertumbuhan organisme probiotik pada kompleks kolon Mengkonsumsi probiotik, prebiotik dan sinbiotik berpengaruh terhadap komposisi mikroflora yaitu mengembalikan keseimbangan mikroba, sehingga asupan ini sangat berpotensi untuk kesehatan (Senditya, 2014). Menurut Widarnani (2014), Sinbiotik mampu memberikan keuntungan lebih terhadap pertumbuhan bakteri didalam saluran cerna.

Target dari sinbiotik adalah intestinal, baik *intestinum tenue* maupun *intestinum crasum*. Bakteri probiotik di stimulasi oleh prebiotik oligosakarida di kolon. Mikroorganisme prrobiotik menggunakan karbohidrat dari prebiotik untuk pertumbuhan dan replikasi di intestinal. Sinbiotik mampu menekan pertumbuhan

kanker kolon. Prebiotik, probiotik dan sinbiotik mempunyai kekuatan sebagai pencegahan dan pengobatan pada kasus salmonellosis (Sharma, 2017).

2.1.1 Kopi Robusta

Kopi merupakan tanaman yang berasal dari family *Rubiaceae* dan masuk kedalam genus *coffea.* Tanaman Kopi tumbuh tegak, bercabang,, dan mampu tubuh hingga 12 meter. Indonesia mengenal 3 jenis kopi yaitu kopi arabika, kopi robustam dan kopi liberika, seperti pada **Gambar 2.1**. Namun masyarakat Indonesia lebih memilih mengkonsumsi kopi jenis robusta. Kopi arabika menghasilkan rasa yang lebih enak dibandingkan dengan kopi yang lainnya. Perbedaan pada kedua kopi tersebut tidak terlepas dari perbedaan komponen kimia yang terdapat pada kedua kopi tersebut. Kopi robusta memiliki taksonomi yaitu:

Kingdom : *Phylum*

Divisio : *Spermathopyta*

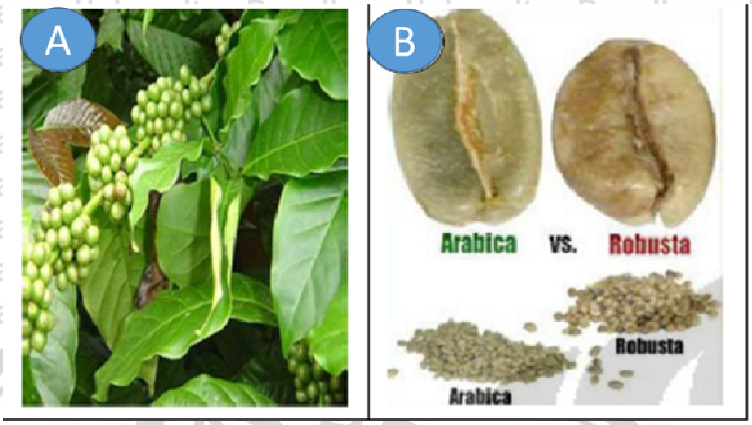
Subdivisiao : *Angiospermae*

Kelas : *Dicotyledonae*

Ordo : Rubiales

Genus : *Coffea*

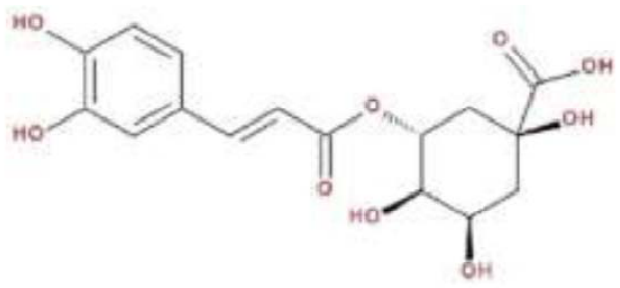
Spesies : *Coffea canephora* (Asti, 2015)



Gambar 2.1 A. Kopi robusta, B. Perbedaan biji Kopi robusta dan koi arabika (Hasanah, 2016).

Kandungan yang terdapat pada kopi adalah kafein, asam klorogenat, trigonelin, karbohidrat, lemak, asam amino, asam organik, aroma volatile. Asam klorogenat atau biasa disebut *chlorogenic acid* pada kopi 8% dan pada kopi yang di sangria 4%. Asam klorogenat pada kopi yang disangrai akan berubah menjadi asam kafeat dan asam kuinat. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Wijaya (2016), *Chologenic acid* bermanfaat sebagai anti mikroba. Dalam Penelitian tersebut, disebutkan bahwa kandugan asam klorogenat yang terdapat pada kopi robusta lebih besar yaitu 0,09% dibandingkan dengan kopi arabika yang hanya sebesar 0,07% dan kopi robusta memiliki antimikrobial lebih bagus dibandingkan arabika. Selain asam klorogenat, kopi juga mengandung alkaloid seperti kafein dan trigonelline yang berfungsi sebagai antibakteri.

Asam klorogenat adalah suatu senyawa yang termasuk kedalam komponen fenolik, mempunyai sifat yang larut dalam air dan terbentuk dari esterifikasi asam *quinic* dan asam *transcinnamic* tertentu seperti asam kafein, asam ferulic, dan asam *pcoumaric* pada **Gambar 2.2**. Kandungan Asam klorogenat yang terdapat pada 100 gram ekstrak kopi robusta hijau adalah 6.1-11.3 gram/100 gramm sedangkan robusta *roasted* hanya sebesar 3.3-3.8 gram/100 gram ekstrak. Faktor yang dapat mempengaruhi perbedaan kandungan asam klorogenat yang terdapat pada kopi adalah faktor genetic, kultivar, penanaman, hingga faktor iklim dan lingkungan sekitar (Farhati, 2016)



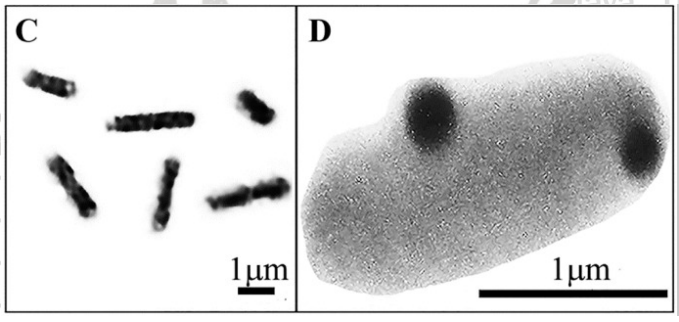
Gambar 2.2 Strutur asam Klorogenat (Susan, 2015)

Kopi juga mempunyai pengaruh terutama terhadap sistem pencernaan. Salah satu pengaruhnya ialah menginduksi defekasi. Kopi akan menginduksi respons gastrokolik dengan cara mempengaruhi reseptor pada sel epitel lambung dan usus halus. Kopi juga akan meningkatkan

sekresi gastrin yang akan meningkatkan aktivitas pencernaan mekanik pada kolon. Efek lain dari kopi adalah efek laksatif. Efek laksatif ialah efek yang memperlancar keluarnya feses dan meningkatkan pergerakan usus. Zat yang mempunyai efek laksatif ini biasanya digunakan untuk mengobati atau untuk mencegah terjadinya konstipasi (Bihi, 2017).

2.1.2 Bakteri *Lactobacillus acidophilus*

Probiotik merupakan makanan tambahan untuk sel-sel mikroba hidup, yang bermanfaat untuk hewan inang yang mengkonsumsinya melalui penyeimbangan flora mikroba di dalam intestinal. Bakteri *L. acidophilus* merupakan termasuk kedalam probiotik. Syarat suatu bakteri dijadikan probiotik adalah tidak bersifat patogen mauapun menganggu inang, tidak mengganggu keseimbangan kehidupan intestinal, dan mikroba tersebut dapat dengan mudah untuk diperbanyak (Supriatna, 2017).



Gambar 2.3 A. Bakteri *Lactobacillus acidophilus* dengan pewarnaan gram negatif, B. Lactomicrosel pada *Lactobacillus acidophilus* (Nagy, 2016).

Lactobacillus merupakan bakteri yang berada di saluran gastrointestinal. Bakteri tersebut termasuk kedalam bakteri gram postif, non motil, tidak berspora, berbentuk bulat dan berbentuk batang, memproduksi asam laktat sebagi produk akhir dari metabolisme fermentasi. Bakteri *Lactobacillus acidophilus* merupakan bakteri asam laktar yang memfermatasi gula dan produk asam laktat sebagai produk akhir melalui jalur *Embden Meyerhof parnas* (EMP). Bakteri *Lactobacillus acidophilus* adalah bakteri *thermophilic* yang dapat tumbuh dengan baik pada suhu 30-45^{0}C dan pada pH 4-5 (Anjum, 2014). Seperti pada **Gambar 2.3,** Identifikasi *L. acidophilus* dapat digunakan media de Man, Rogosa and Sharpe Agar (MRSA) yang diidentifikasi dengan pewarnaan gram, test biochemical (Pyar, 2014). Klasifikasi dari *Lactobacillus acidophilus* adalah sebagai berikut.

Kingdom : Bacteria

Divisi : Firmicutes

Kelas : Bacilli

Famili : Lactobacillaceae

Genus : *Lactobacillus*

Spesies : *Lactobacillus acidophilus* (Puspadewi, 2011).

Lactobacillus acidophilus merupakan mikroflora alami yang terdapat didalam intestinal dan dapat memproduksi asam laktat dan juga

bakteriosin yang dapat meranagsang pembentukan antibodi. Bakteri tersebut hidup di intestinal dan melekat pada epitel epitel intestinal (Adriani, 2008). Bakteri ini berkolonisasi didalam saluran intestinal dan mencegah adanya kolonisasi dari berbagai bakteri enterotoxigenik dan enteroinvasif. *Lactobacillus acidophilus* dapat sebagai proteksi terhadap *Salmonella enterica*dengan menyediakan mikrobiota intestinal sebagai agen bio terapeutik. Proteksi tersebut tidak mengurangi jumlah koloisasi dari *Salmonella* diintestinal tetapi sebagai gantinya agen bio terapeutik bekerja sebagai immunomodulasi, dan juga bekerja sebagai agen kompetitif terhadap *Salmonella enterica*(Scapin, 2012).

2.2 Mencit Balb C

Menurut Pribadi (2008), Mencit merupakan hewan yang dapat hidup diberbagai daerah dengan iklim yang berbeda beda, mulai dari iklim dingin hingga iklim panas, namun mencit lebih menyukai hidup di suhu lingkungan tinggi seperti pada **Gambar 2.4**. Mencit banyak digunakan sebagai hewan model dikarena memiliki siklus hidup yang pendek, jumlah kelahiran tinggi, mudah untuk ditangani, dan memiliki karakteristik sistem reproduksi yang hampir sama dengan kambing, domba, sapi, dan babi. Klasifikasi mencit adalah

Kerajaan : Hewan

Filum : Chordata

Sub Filum : Vertebrata

Kelas : Mamalia

Ordo : Rodentia

Subordo : Myoimorphia

Family : Muridae

Genus : *Mus*

Spesies : *Mus musculus.*

Gambar 2.4 Mencit (Moreira, 2015)

Mencit dengan strain balb C sering digunakan dalam penelitian mengenai bakteri, hal ini dikarenakan intestinal mencit balb C yang mengalami peningkatan jumlah bakteri tidak menyebabkan intestinal mencit tersebut mengalami inflamasi (Cheylani, 2018).

2.2.1 Saluran Pencernaan Mencit

Saluran pencernaan merupakan suatu saluran yang berkelanjutan dan dikelilingi oleh otot-otot. Sistem pencernaan terdiri dari saluran pencernaan dan juga organ-organ pelengkap yang berfungsi untuk mencerna makanan. Proses mencerna makanan tersebut dapat secara fisika maupun kimiawi yang dan akan diserap oleh tubuh. Pencernaan kimiawi dibantu oleh kelenjar-kelenjar seperti kelenjar ludah, pancreas, hati, dan kantung empedu. Saluran pencernaan terdiri dari rongga mulut, esophagus, lambung, usus halus, juga usus besar dan terakhir adalah anus.

Usus halus merupakan bagaian dari saluran pencernaan yang dimulai dari *pyloroduodenal junction* dan diakhiri pada *ileocaecal junction.* Usus halus terdiri duodenum, jejenum, dan ileum. Fungsi dari usus halus adalah untuk mencerna dan mengabsorpsi makanan. Duodenum terletak diantara *pyloroduodenal junction* dan akhir dari *duodenaljejunal flexura* dan akan dilanjutkan oleh jejenum. Jejenum merupakan saluran yang berhubungan langsung dengan duodenum dan dimulai dari *duodenojejunal.* Ileum merupakan bagian akhir dari usus halus dan berhubungan langsung dengan usus besar (Mahadevan, 2014)

2.3 Morfologi dan Klasifikasi *Salmonella sp.*

Salmonella merupakan bakteri dari gram negative, tidak memiliki spora, berbentuk batang lurus dan dapat bergerak dengan menggunakan flagel peritrik

seperti pada **Gambar 2.5** kecuali *Salmonella pullorum* dan *Salmonella gallinarum*. Bakteri tersebut dapt tumbuh pada suhu 5-45^{0}C, pada pH dibawah 4,1. *Salmonella* dapat membelah diri dalam proses berkembang biakannya, dan dapat menghambat bakteri enteric lainnya. Bakteri tersebut memiliki strukutur dinding sel yang berbeda dengan bakteri gram positif, dan resisten terhadap bahan kimia tertentu seperti berlian hijau dan natrium tetrationat (Arifin, 2015)

Gambar 2.5 Baktri *Salmonella* (Arifin, 2015)

Nomenklatur dari genus *Salmonella sp.* sangat komleks dan tidak konsisten pada pembagian genus hingga spesies, subspecies, subgenera, grup, subgroup, dan serotip (serovar). *Salmonella sp* untuk saat ini dibagi menjadi dua spesies, yaitu *S. bongori* dan *S. Enterica* berdasarkan pada kedekatan genom dan reaksi biokimia, pada 2005, terdapat spesies baru yaitu *S. subterranean,* namun sekrang sudah tidak lagi. Terdapat lebih dari 2500 serotip, masing-masing serotip diklasifikasikan berdasarkan lipopolisakarida antigen O (somatic) dan antigen H (ciliari), salah satu serotip yang ada adalah *S. enterica* serovar *enterica*yang menyebabkan 99% penyakit salmonellosis (Chlebics, 2018).

Salmonella enteritica serovar *Enterica* (*S. enterica*) adalah penyebab terjadinya infeksi gastrointestinal. *S. enterica*akan masuk secara peroral ke

saluran pencernaan kemudian akan masuk kedalam mukosa usus, dan kemudian akan menyebar ke limpa, hati dan organ serta jaringan lainnya. Infeksi *S. enterica*pada industry perunggasan akan muncul dengan gejala kerusakan vaskelr, adanya erupsi pada permukaan mukosa dari saluran pencernaan, lesi lymphoid pada organ dan dan gejala lainnya seperti organ yang mengalami parankimatous (Kang, 2019). Menurut Lee (2001), *Salmonella enterica*memiliki antigen O 1,9,12 dan juga memiliki antigen flagella dimana *S. gallinarum* tidak memilikinya. Bakteri *Salmonella sp.* yang memiliki antigen O yang sama, dapat digunakan vaksin yang sama pula untuk organisme tersebut.

2.4 Salmonellosis

Salmonellosis merupakan penyakit yang sering terjadi pada negara maju dan berkembang, namun jumlah yang yang dilaporkan masih jauh dari wabah yang sebenarnya terjadi. Salmonellosis disebakan oleh *Salmonella enterica*yang menyerang pada unggas. Penyebaran dari penyakit *salmonellosis* biasa terjadi di pasar yang menjual ayam maupun daging ayam yang kurang bersih, peralatan, wadah, maupun tempat yang digunakan untuk menampung daging ayam berulang hingga kotor dan setelah keruh baru diganti. Penggunaan timbangan juga menjadi salah satu faktor penyebaran dari penyakit *salmonellosis,* tidak menggunakan alat pendingin, dan sering dihinggapi lalat (Budiarso, 2009).

Salmonella disebabkan oleh bakteri *Salmonella sp.* Bakteri genus Salmonella terdiri dari banyak serovar, jumlahnya mencapai lebih dari 2.400

serovar yang diidentifikasi secara serologik berdasarkan variasi antigen somatik (O), flagela (H) dan kapsul (Vi). Serovar yang dapat menimbulkan penyakit pada hewan relatif sedikit, yaitu: *S. pullorum* dan *S. gallinarum* pada unggas, menyebabkan fowl typhoid; *S. cholerasuis* menginfeksi babi, *S. typhimurium* dan *S. enterica* menginfeksi semua jenis hewan ternak dan manusia (Ariyanti, 2008)

Bakteri *S. enterica* merupakan bakteri Gram negatif yang memiliki lapisan lipopolisakarida pada dinding selnya sehingga memiliki sistem seleksi terhadap zat-zat asing di lingkungannya. Ciri morfologi lain pada *S. enterica* adalah ada fimbriae yaitu sejenis polimer protein pada permukaan organel yang muncul ketika kondisi lingkungan pertumbuhan buruk dan ketika berinteraksi dengan sel host. Fimbriae ini kemungkinan dapat ikut menghambat efek bahan bioaktif dari binahong untuk menghambat pertumbuhan bakteri (Rahmawati, 2014).

Virulensi dari *Salmonella sp.* berdasarkan kromosal dan gen plasmid. Pada kromosom bakteri terdapat *pathogenicity islands (SPIs),* yang mengkode lebih dari 60 gen yang berinteraksi spesifik terhadap hospes. Patogenesa dari *Salmonella sp.* diawali dengan memakan mikroba tersebut sehingga masuk kedalam intestinalnya. Patogenesitas berdasarkan pada serotip dan imunitas hospes, dan virulensi disebabkan karena faktor

a. Adesi ke hospes, yang dimodulasi oleh fimbrae yang akan berinteraksi dengan reseptor hospes, adhesion (protein) yang terdiri dari BapA, SiiE,

ShdA, MisL, dan SadA, serta adanya flagella yang berfungsi untuk mobilitas atau pergerakannya.

b. Invasi dan replikasi bersarkan sel hospes. setelah terjadi perlekatan dengan hospes, dan akan memperoduksi sitokin proinflamasi.
c. Polisakarida, superfisial dari membrane bilayer bakteri gram negative adalah lipopoilisakarida. Lipid A yang merupakan lapisan luar dari lipopolisakarida akan memicu terjadinya respon imunitas dari hospes.
d. Produksi toxin, yang terdiri dari endotoxin (lipid A) dan exotoxin (citokin dan enterotoksin) (Chlebics, 2018).

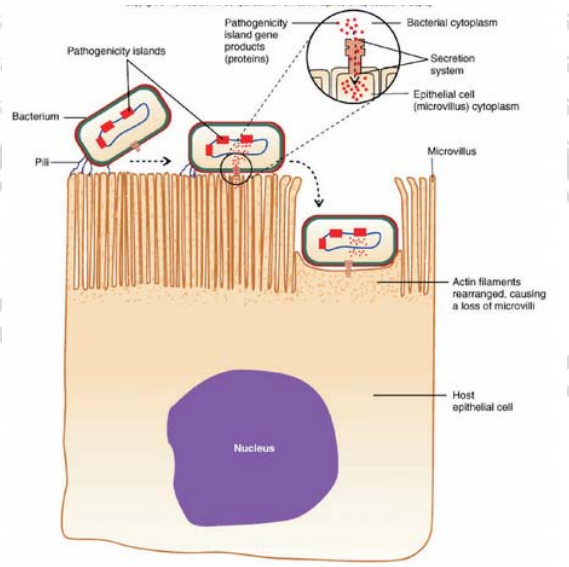
2.4.1 Patogenesa

Hospes *Salmonella* adalah manusia dan juga hewan yang dapat ditularkan baik secara langsung maupun tidak langsung. Hewan yang ditularkan secara langsung yaitu ayam atau yang berasal dari ternak unggas. Bakteri *Salmonella* dapat berasal dari hewan maupun dari manusia yang berperan sebagai pembawa dan juga yang terinfeksi. Waktu inkubasi dari *salmonellosis* adalah berkisar antara 5-72 jam, namun biasanya terjadi pada 12-48 jam (Purnawijayanti, 2001).

Penuluran dari bakteri *Salmonella enterica* dapat terjadi secara fecal oral hingga secara kontak langsung dengan hewan maupun manusia yang terkontaminasi. Bakteri tersebut secara mekanis menyebar melalui baju, sepatu, peralatan yang terkontaminasi, namun dapat juga melalui hewan rodensia seperti tikus dan juga mencit. Penuluran secara vertikal melalui

telur maupun *crop milk*. Makanan dan Minuman yang terkontaminasi dengan hewan yang terinfeksi, baik liar maupun domestik (Sauza, 2011).

Proses invasi dari bakteri *S. enterica* dapat dilihat pada **Gambar 2.6.**



Gambar 2.6 Proses Invasi *Salmnonella* kedalam sel epitel intestinal (Maat, 2009)

Patogenesitas dari *Salmonella* memerlukan beberapa kelompok kromosom dari gen penentu virulensi yang dikenal *pathogenicity islans,* SPI-1 mengkode tipe III yang diperlukan untuk menginvasi sel-sel nonfagositik. SPI-1*island* berperan dalam menghambat fusi fagosom lisosom didalam makrofag, sehingga *Salmonella* dapat bertahan didalam makrofag. Bakteri *Salmonella* hidup didalam SPI-3 makrofag, dan kemudian bereplikasi. Setelah berhasil replikasi, bakteri tersebut akan menyebar keseluruh tubuh melalui limfe dan darah, lalu berkembang di jaringan RES (*Reticulo*

Eendothelial System). Makrofag yang teraktivasi akan memicu munculnya sitokin, sehingga antibodi sistemik tidak dapat menghancurkan salmonella didalam makrofag, dan antibodi sistemik akan menunjukan adanya infeksi bukan imunitas. Lipopolisakarida yang terdapat pada dinding *Salmonella* akan membunuh, merusak, dan mengubah fungs dari sel, interaksi dengan hospes akan menimbulkan imunitas spesifik dan non spesifik (Nasronudin, 2011).

Menurut McKelvey (2014), bakteri *Salmonella* yang telah sampai pada intestinal, akan menghindari respon sistem imun alamiah. *Salmonella* Patogenecity Island 1 (SPI-1) dan SPI-2 akan menyandi *Type Three Secretion* System (T3SS-1) dan T3SS-2 untuk menyerang jaringan. Cara yang digunakan oleh *Salmonella* untuk bertahan didalam makrofag akan melawan faktor pembunuh pada host. Pertahanan hidup *Salmonella* di lingkungan dengan cara memanfaatkan komponen T3SS-1 dan T3SS-1.

2.4.2 Gejala Klinis

Salmonella dapat menyerang ayam dan menimbulkan kerugian yang tinggi dikarekan penyebaran yang cepat. Penularan yang terjadi pada anak bersal dari ovarium ayam yang terinfeksi sehingga telur ayam tersbut juga terinfeksi, namun juga bisa melalui cangkang ayang, inhalasi maupun melalui mulut. Anak ayam terkena akan nampak septikemik, kotor dan juga mengantuk, dan dapat menyebabkan kematian. Anak ayam yang dapat

melewati dan sembuh dari penyakit tersebut akan tetap membawa atau sebagai carier dan mengakibatkan terjadinya penurunan fertilitas, produksi serta daya tetas telur. Pada anak sapi yang terinfeksi *salmonella* akan menngalami gastroenteritis atau septikemia, poliartritis, gangrene pada daun telinga dan juga ekor.

Menurut Souza (2011), *Salmonella* dapat menginfeksi berbagai jenis unggas dan dapat menyerang bagian respirasi, gastrointestinal, renal, neurologi, kardiovaskuler, dan sistem reproduksi. Gejala klinis yang muncul adalah anorexia, enteritis, diare, letargi, dehidrasi, dan kematian mendadak. *Salmonella enterica*menyebabkan kematian 5 hari, dengan tingkat mortalitas dan morbiditas 6-20%. Anak ayam akan mengalami gejala anorexia, adipsia, depresi, bulu rontok, susah bergerak, dehidrasi, diare putih atau pasta (Wray, 2000).

2.4.3 Epidemiologi

Penyebaran dari penyakit *Salmonella enterica*terjadi di berbagai Negara. Uruguay mencatat pertama kali terdeteksi adanya *Salmonella enterica*pada tahun 1995 dan menyerang selama 10 tahun. Kurang lebih 600 orang menjadi korban dari adanya penyakit tersebut. *Salmonella enterica*memenjadi penyebab lebih dari 89% keracunan makan (80% diantaranya bersal dari telur ayam maupun daging ayam) (Betancor, 2010).

Berdasarkan data dari WHO, penyebab terjadinya infeksi NTS (*Non Typhoid Salmonella)* didunia adalah disebabkan karena *Salmonella enteritica* (65%) lalu disusul oleh *S. typhimurium* dan *S, Newport* (12% dan 4%). *Salmonella enteritica* penyebab utama di negera-negara Asia, Amerika Latin, eropa dengan total kasus sebanyak 38%, 31%, dan 87%. Penyebab terjadinya dikarenakan faktor teknik memasak produk, penyimpanan yang salah, dan kontak langsung dengan bahan mentah. Produk makan yang menajdi dominan seperti prosuk susu, perunggasan, telur, coklat, dan mentega kacang (Eng, 2015).

Pada tahun 2000 *Salmonella enterica* merupakan serotipe yang paling penting di benua Eropa dan Amerika karena merupakan penyebab diare paling banyak. Distrubusi serotype *Salmonella* di negara Vietnam dan Thailand sama dengan di negara-negara di Asia Tengara, tetapi berbeda dengan negara-negara di Eropa dan Amerika. Berdasarkan *surveillance* Salmonella pada bulan April 2002–2003 di Indonesia dilaporkan sebanyak Sembilan *Salmonella enterica* yang diisolasi dari bulu ayam yang baru menetas atau fluff, telur, dan embrio ayam (Suwito, 2011).

2.4.4 Kerugian akibat Salmonellosis

Kerugian yang terjadi akibat Salmonellosis pada hewan antara lain kematian, penurunan produksi ternak, abortus, kematian neonatal, dan

pengafkiran bahan makanan yang tercemar bakteri (Muzadin, 2018). Menurut Murwani (2015), kerugian dari *Salmonellosis* bertambah banyak dikarenakan banyak peternak yang belum mengetahui mengenai penyakit tersebut, teramasuk diantaranya kurang pengetahuan peternak dalam menajemen berternak yang baik dan benar. Dengan adanya kekurangan tersebut diperlukan peningkatan sosialisai atau komunikasi edukasi informasi (KIE) kepada peternak, tentang penyakit-penyakit yang menyerang ternak.

2.5 Imunitas dan Respon Imun

Imunitas atau daya tahan tubuh merupakan respon tubuh terhadap bahan asing. Respon imun yaitu reaksi yang dikoordinasi oleh sel-sel dan molekul-molekul terhadap mikroba ataupun agen agen yang lain. Sehingga bila dalam kondisi imun yang menurun, pertahanan tubuh pun akan menurun dan tubuh bisa mudah terserang penyakit kemudian terjadi sakit. Usus adalah bagian tubuh yang pertama terekspos oleh dunia luar melalui makan yang dikonsumsi. Usus bukan hanya berfungsi untuk penyerapan dan pencernaan makanan tetapi juga merupakan bagian dari sistem imun terbesar dalam tubuh yang mengatasi antigen dan zat berbahaya yang masuk (Mayasari, 2009). Menurut Puspitasari (2014), mekanisme pertahanan tubuh terhada bakteri yaitu melalui pertahanan spesifik dan mekanisme pertahanan non spesifik.

2.5.1 Imunitas Alamiah

Imunitas alamiah atau biasa dikenal dengan sebutan *non specific immunity* merupakan barisan pertama pertahanan tubuh terhadap benda asing, dan tidak membutuhkan paparan sebelumnya terhadao adanya molekul asing atau agen infeksi. Epitel merupakan barrier yang sulit untuk ditembus oleh agen infeksius dan didukung oleh barrier biokimia yang merupakan komponen dari imunitas non spesifik. Komponen selular dari imunitas alamiah adalah fagosit mononuclear, granulosit polimorfonuklear dan sel *natural killer* (NK) limfosit (Stewart, 2017).

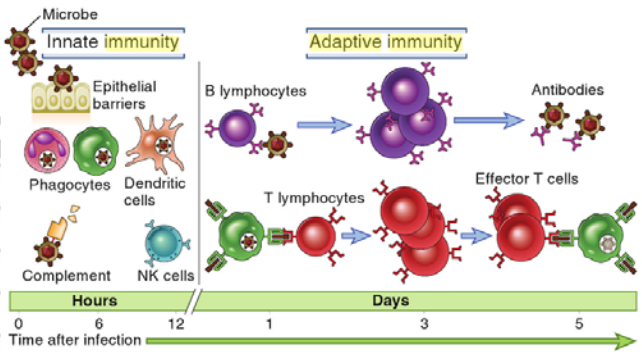
Mekanisme *non specific immunity* untuk mencegah invasi mikroorganisme kedalam tubuh

a. Barier mekanis adalah yang paling efektif dan kegagalannya sering mengakitbatkan infeksi pada lapisan mukosiliari saluran pernafasan, seperti pada cystitis fibrosis.
b. Faktor sekretori menginisiasi penghalang kimiawi pada banyak organisme. Apabila pH asam pada lambung membahayakan, seperti pada kasus gastritis atropi dengan asam klorida, bakteri dapat tumbuh berlebih pada intestinal (Cross, 2013).

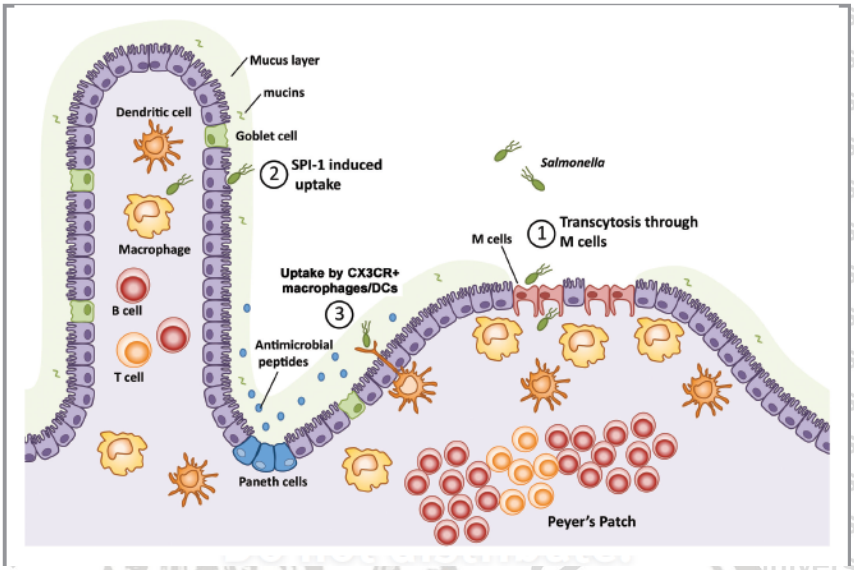
2.5.2 Imunitas Adaptif

Menurut Cross (2013), imunitas adaptif atau *specific immunity* atau *acquired immunity,* Imunitas adaptif merupakan bagian penting dari sistem kekebalan tubuh yang mengatur bagaimana tubuh merespon agen infeksi atau antigen yang telah terkena sebelumnya. Paparan antigen terhadap tubuh baik dalam bentuk alami atau buatan akan dapat membuat kehadiran memori antigen.

Imunitas adptif hanya dimiliki oleh vertebrata. Sistem imun ini seperti pada **Gambar 2.7** dan **Gambar 2.8** merupakan respon spesifik terhadap adanya mikroba dan juga patogen. Elemen seluler dari imunitas adaptif adalah limfosit T dan B tersusun dari kulit dan sistem imun mukos dan terkaid dengan limponodul. Produk utama imunitas adaptif adalah sel B dan juga antigen spesifik sel T yang secara langsung dapat membunuh mikroba dan sel yang terinfeksi atau memfasilitasi antimikroba pada sistem imun alamiah (Berczi, 2003).



Gambar 2.7 Mekanisme sistem imun adaptif dan sistem imun alamiah (Abdul, 2010).



Gambar 2.8 Mekanisme sistem imun gastrointestinal terhadap bakteri *Salmonella enterica*(Broz, 2012).

2.5.3 Respon Imun Terhadap Salmonella

*Salmonella enterica*termasuk bakteri golongan intraseluler. Bakteri intraseluler merupakan bakteri yang hidup didalam makrofag. Bakteri tersebut hidup didalam makrofag untuk menghindari mekanisme humoral dan juga sel fagosit seperti neutrofil. Makrofag merupakan sel yang dapat hidup lama, sehingga bakteri yang ada didalam makrofag juga akan berumur panjang, dan menyebabkan terjadinya infeksi subakut maupun kronis, sejalan dengan reaksi granulomatous (Paradise, 2002).

Menurut Nafiah (2018), respon imun tubuh terhdap *Salmonella* secara non spesifik berupa fagosit komplemen, antibodi, sel polimorfonuklear, dan monosit (berdiferensisasi menjadi makrofag) yang mempunyai Fcα. Monosit yang diproduksi oleh sumsum tulang, setelah

matang memasuki peredaran darah kemudian ke jaringan dan menjadi makrofag. *Salmonella* dapat menghindari antibodi terutama IgM karena mengandung LPS atau endotoksin, sehingga tubuh mengaktifkan sistem selular seperti respon CMI (CD4,CD8, dan sel NK).

Respon imun secara alamiah atau non spesifik dengan cara fagosit menelan dan menghancurkan mikroorganisme. *Salmonella* memicu aktivasi dari sel NK melalui induksi eskpresi, sehingga terproduksi IL-12 oleh stimulasi sel dendrik dan makrofag. NK memproduksi IFN-γ dan meingkatkan kemampuan fagosit. Sel NK merespon cepat sehingga terjadi interaksi sel NK dengan makrofag sebelum imunitas adaptif berperan. Sel T berfungsi sebagai efektor dan regulaot imunitas yang diperantarai oleh sel T dan reaksi hipersensitifitas lambat. Sel T berfungsi sebagai mengatur imunitas humoral dan seluler. Sehingga antibody yang diproduksi sel B plasma juga memerlukan partisipasi dari sel T helper (Nasrodin, 2011).

2.6 Sel CD206

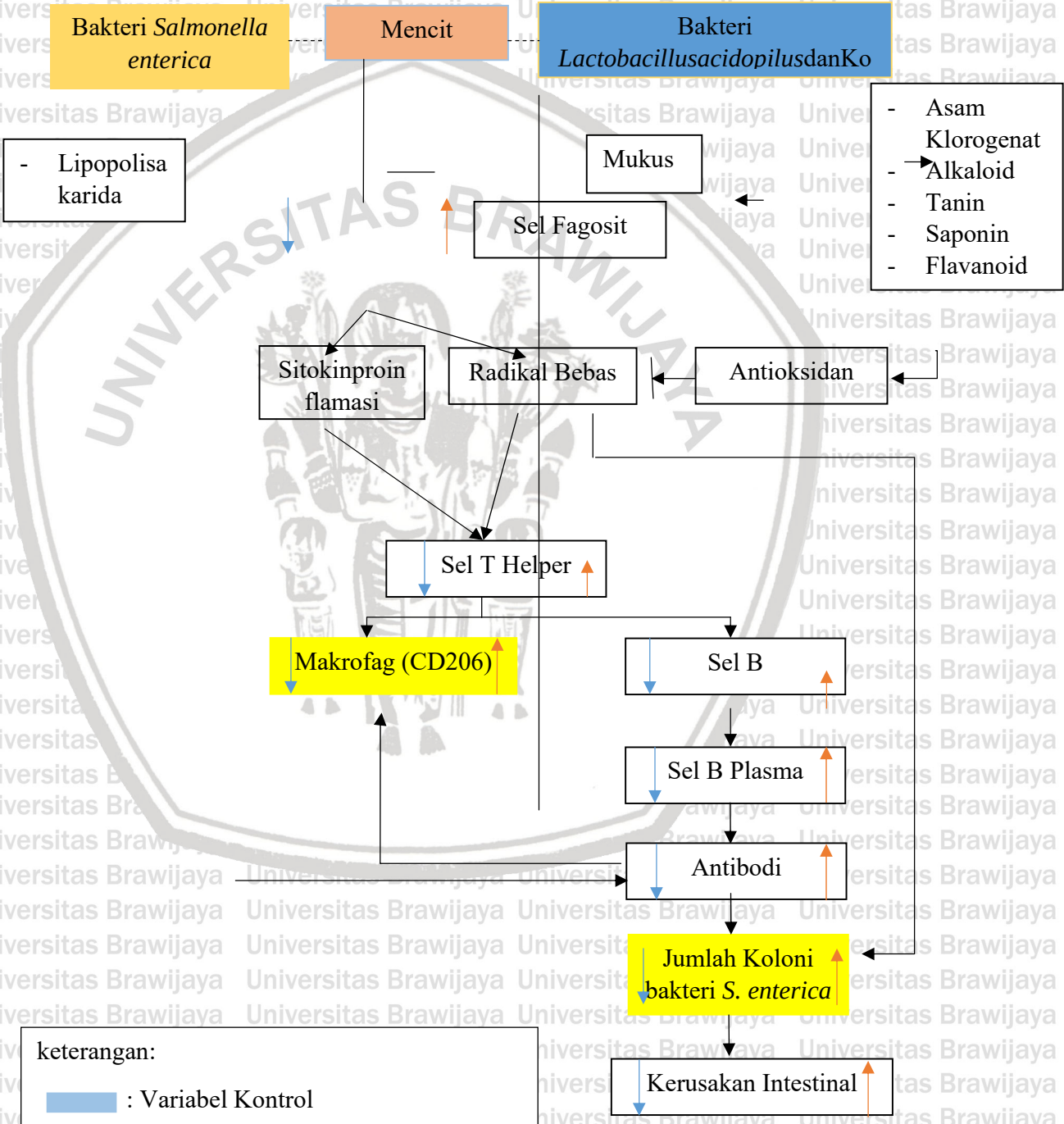
Infeksi *Salmonella* menyebakan adanya akumulasi hemafagosit makrofag dilakukan oleh M2 marker (CD36 dan CD206) di limpa. Selama tahap terakhir infeksi secara *in vivo, Salmonella* ditemukan sejalan dengan sel sel tersebut (Jankovic, 2015). *Makrofag mannose reseptor* (CD206) dan endo 180 reseptor merupakan reseptor tipe 1. CD206 berfungsi untuk meregulasi mediator anti

inflamasi seperti IL-4, IL-10, IL-13. CD206 diekspresika melalui makrofag, limpatik dan hepatic endothelium (Fox, 2006).

CD206 atau biasa disebut dengan *Makrofag Mannose Reseptor* (MMR) adalah tipe 1 transmembran glikoprotein. Merupakan *Mannose* reseptor dengan *C-tipe lectin activity* dan termasuk kelompok *pattern recognition* dari reseptor. CD206 bekerja sebagai reseptor makrofag yang memicu terjadinya endositosis dan fagositosis. Sel tersebut berfungsi sebagai pertahanan atau imunitas adaptif dan alamiah. Ligan dari CD206 adalah lisosomal hidrolas, *plant glycoprotein,* yeast protein, neoglikoprotein, kitin, molekul dinding sel bakteri, viral glikoprotein, glikoform sialoadhesin (CD169) dan CD45, lutropin dan kondroitin sulfat. Ekspresi dari CD206 akan menurunkan produksi dari IFN-γ dan akan menaikan jumlah IL-3 dan IL-4 (Zola, 2007). Infeksi dari bakteri *Salmonella* akan menyebabkan akumalasi dari makrofag hemofagosit dan mengaktifkan sel CD206 (Jankovic, 2015). Sel CD206 merupakan salah satu bagian dari *Mannose Binding Lectin* (MBL) (Azad, 2015). Bakteri *Salmonella enterica*memiliki kandungan *rich-* LPS, dan MBL akan berikatan dengan LPS dan akan mengopsonisasi terhadap bakteri *S. enterica,* sehingga bakteri akan mudah difagosit oleh makrofag (Jun Xu 2015).

BAB III KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



keterangan:

: Variabel Kontrol

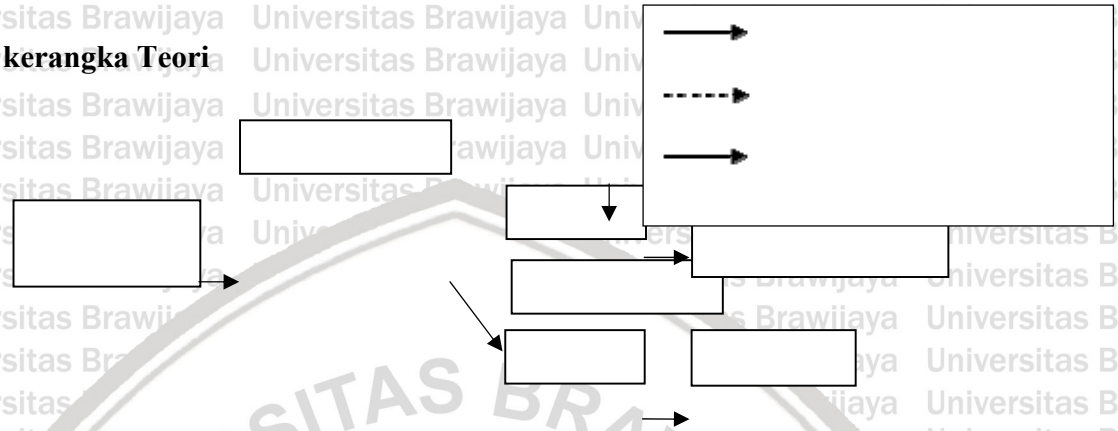
: Variabel Tegantung

: Variabel Bebas

: Efek Sinbiotik

: Efek *Salmonella enterica*

3.2 kerangka Teori



Hewan Coba mencit balb C diberikan sinbiotik yang berasal dari *Lactobacillus acidopilus*sebagai probiotikdan kopi robusta yang berperan sebagai prebiotik. Bakteri *Lactobacillus* mempunyai kemampuan untuk menekan pertumbuhan dari bakteri yang bersifat pathogen didalam usus dikarenakan kandungan antimikrobanya, mampu merangsang pengeluaran Ig A sebagai penghasil mukus dan dapat menganggu pertumbuhan bakteri yang tidak tahan terhadap asam. Kopi mempunyai kandungan asam klorogenik yang berfungsi sebagai antibakteri,untuk mencegah pertumbuhan serta kolonisasi dari bakteri. Kandungan lain yang terdapat pada kopi adalah tannin, saponin, alkaloid dan kafein yang juga berfungsi sebagai antibakteri. Gabungan dari probiotik dan prebiotik tersebut dapat menghambat pertumbuhan serta sebagai anti bakteri terhadap *Salmonella*.

Saponin dan flavanoid pada kopi robusta lampung dapat berfungsi sebagai antibakteri, antifungal, antiviral, anti infalamasi, dan anti ulcer. Saponin mampu

meningkatkan pengeluaran dari sitokin pada sel CD4+. Senyawa tersebut dapat meningkatkan regulasi dari sel T *helper* melalui peningkatan IL-2 makrofag. Tanin memiliki fungsi sebagai antiparasit, antivirus, dan antibakteri. Senyawa tersebut mampu menghambat pertumbuhan bakteri melalui melalui enzyme yang komplek (permease) dan protein membrane luar bakteri (porin). Aksi penghambatan ini mengganggu kerja fungsi vital dari bakteri seperti respirasi dan sintestis komponen dinding yang berkorelasi dengan fungsi asam nukleat. Alkaloid berfungsi sebagai antimikroba yang dapat berinteriaksi dengan enzim dan protein di membrane sel yang menyebakaniduksi kematian sel.

Bakteri *Lactobacillus acidophilus* dapat melakukan kontak dengan sel mikrofold (sel M), *FollicelAsociatedEpitelium*(FAE) dari *payer's patches*, dan dengan epitel dari intestinumtenue maupun intestinumkrasum. Kontak dengan sel M mengindusirespon imun spesifik. Bakteri *Lactobacillus acidophilus* yang berinteraksi dengan FAE akanmenginduksipegeluaranrespon imun non spesifik, responinflamasi, dan peningkatan respon imun spesifik juga. Epitel yang berinteraksi dengan *Lactobacillus acidophilus* akanmenginduksi imunitas lokal atau non respon oleh antigen *clearance.* Bakteri *Lactobacillus acidophilus* akan meningkatkan produksi dari sel limfosit T sehingga CD4 dan C8 ikut meningkat. sel CD4 yang meningkatkan akan menyebabkan peningkatan sel T helper 1 (Th1) sebagai agen proinflamasi yang terdiri dari TNF α, IFN γ, IL-2, dan IgG2α. Peningkatan dari sel Th2 kan ditandai dengan peningkatan dari IL-4,IL10, dan IgG1. Peningkatan pertahanan intestinal oleh *Lactobacillus acidophilus* yang

mencegah masuknya pathogen kedalam sel epitel dengan meningkatkan barrier mucus yang dikeluarkan oleh granulmusin dari sel goblet dan pengaturan permaebilitas intestinal meluipeningktan integritas interseluler oleh *apical tight junctions.*

Bakteri *Salmonella entericay*ang diinduksikan kedalam hewan coba mencit, memiliki Lipopolisakarida(LPS), dengan adanya LPS tersebut, Bakteri *Salmonella entericad*apat melakukan adhesi kedalam epitel usus halus. Mekanisme penghambatan adhesi terhadap *Salmonella entericaa*dalah dengan memberikan sinbiotik kedalam tubuh mencit. Bakteri ***Lactobacillus acidophilus*** akan menempati epitel intestinal, sehingga *Salmonella entericat*idak dapat berkompetisi dengan sinbiotik. Kandungan asam klorogenik pada kopi juga akan membunuh *Salmonella,* sehingga jumlah *Salmonella* di intestinal dapat berkurang.

Koloni bakteri *Salmonella entericay*ang masih bertahan, akan melakukan penetrasi kedalam epitel usus dan akan dianggap sebagai benda asing oleh tubuh. Akibat masuknya bakteri kedalam intestinal, menyebabkan epitel intestinal mengeluarkan endotoksin yang akan menyebabkan munculnya respon imun diawali dengan munculnya *Antibody Presenting Cell* (APC). Interaksi antara *Salmonella entericad*an APC menimbulkan reaksi inflamasi dan neutrofil serta sel dijaringan menjadi aktif. Interaksi antara sel epitel dan LPS menyebabkan sel epitel mengeluarkan mediator inflamasi dan memicu sel imun dari hospes menuju daerah yang terjadi inflamasi tersebut.

Mekanisme imunitas dari tubuh dilakukan oleh sel limfosit T sedangkan efektor untuk melakukan eliminasi bakteri dilakukan oleh makrofag yang diaktifkan oleh sitokin dimana sitokin diproduksi oleh interferon gamma. IL-1 dan IL-6 yang berperan sebagai sitokinproinflamatori akan memediasi reseptor di CD4 menjadi Th1 dan Th2. Sel CD4 memberikan respon terhadap peptide antigen MHC II sehingga memediasi sel Th1 dalam memproduksi IFN γ yang mengaktifkan makrofag untuk penghancurkanmikroba melalui fagositosis. APC juga akan mengaktifkan sel B yang akan menghasilkan sel B plasma dan sel B memori. Th 2 akan membantu sel B untuk menghasilan sel B plasma yang memproduksi antibodi dan bersamaan dengan makrofag akan meghancurkan bakteri *S. enterica.*Antibodi yang diproduksi akan menurunkah jumlah bakteri sehingga kerusakan dari intestinal akan menurun.

3.3 Hipotesis Penelitian

Hipotesis dari penelitian ini adalah dengan pemberian *Lactobacillus acidophilus* dan kopi robusta sebagai sinbiotik dapat digunakan untuk mencegah terjadinya infeksi oleh *Salmonella enterica*pada hewan coba mencit balb C dengan ditandai penurunan jumlah *Salmonella enterica*dan kenaikan jumlah sel CD20

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dimulai pada bulan April 2019 hingga Juni 2019 dan dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya, Laboratorium Biologi Molekuler Universitas Brawijaya, Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang, Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, dan Laboratorium Fisiologi Universitas Brawijaya.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

4.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: kandang menict, tempat minum mencit, tempat pakan mencit, galon, timbangan digital, ember, *autoclave, glove, object glass, yellow tip, blue tip, ice box, flowcytometer*,masker, spuit, gunting bedah, mortar, ose, tabung reaksi, vortex, Bunsen, tabung Erlenmeyer, tabung falcon, tabung reaksi, gelas ukur, tabung ependorf, mikroskop cahaya, mikropipet, penangas air, rak tabung, sentrifugator, LAF, cawan petri, *colony counter*.

4.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit balb C, serbuk gergaji, alcohol, densifektan, pakan mencit, *Salmonella enterica,*

Lactobacillus acidophilus, kopi robusta lampung, standar *Mc Farland* 1, media *nutrient broth, deMannRogosa Sharpe Agar* (MRSA), Bismuth Sulfite Agar (BSA), alkohol, *Phosfat Buffer Saline* (PBS), NaCl 0,9%, organ sekum, limpa, alkohol 70%, antibodi ekstraseluler CD206.

4.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas	: Jumlah bakteri *Salmonella enterica*dan konsentrasi sinbiotik ekstrak kopi robusta dan *Lactobacillus acidophilus*
Variabel terikat	: Jumlah koloni *Salmonella enterica*dan jumlah sel relatif CD206
Varabel kontrol	: Mencit balb c dengan berat 25-30 gram, suhu, kelembaban, dan kandang.

4.4 Rencana Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode *experimental* dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Penelitian ini menggunakan hewan coba mencit balb C yang telah mendapatkan persetujuan laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya Nomor 1110-KEP-UB (**Lampiran 2).** Berat badan mencit adalah berkisar 25 gram, umur sekitar 2 bulan dengan total berjumlah 24 mencit. dandikelompokan menjadi 6 perlakuan dengan masing-

masing perlakuan memiliki 4 ulangan. Penggunaan hewan coba dihitung dengan rumus faderer (Charan, 2013).

t (n-1) ≥ 15

6 (n-1) ≥ 15

6n ≥21

n ≥3,5

n ≥4

Keterangan:

t = Jumlah kelompok perlakuan

n = Jumlah ulangan yang diperlukan

Tabel 4.1 Rancangan Penelitian (Hubungan Perlakuan dan Ulangan)

Perlakuan	Ulangan				Total	Rata-rata
	1	2	3	4		
K+						
K-						
K *Lac*						
P1						
P2						
P3						

Keterangan:

K- = Mencit tanpa pemberian bakteri *Salmonella enterica*, *Lactobacillus acidophilus* maupun ekstrak kopi robusta.

K+ = Mencit balb C yang diinduksi*Salmonella enterica*standar *Mc Farland*nomor 1 standar 10^8 CFU/mL sebanyak 0,5 pada setiap ulangan secara per oral.

K *Lac* = Mencit balb C yang diberikan *Latobacillus acidophilus* selama 15 hari, kemudian diberikan *Salmonella enterica*selama 2 hari.

P1 = Mencit balb C yang diberikan sinbitoik kopi robusta 250 mg/Kg BB selama 15 hari dan *Salmonella enterica*selama 2 hari.

P2 = Mencit balb C yang diberikan sinbitoik kopi robusta 500 mg/Kg BB selama 15 hari dan *Salmonella enterica*selama 2 harisesuai dengan berat badan

P3 = Mencit balb C yang diberikan sinbitoik kopi robusta 750 mg/Kg BB selama 15 hari dan*Salmonella enterica*selama 2.

4.5 Tahap Penelitian

Tahapan dari penelitian adalah

1. Persiapan sinbiotik
2. Persiapan hewan coba
3. Perlakuan pada mecit dengan pemberian sinbiotik
4. Pemberian *Salmonella enterica*pada mencit balb c
5. Nekropsi dan preparasi organ sekumdan lien.
6. Pengukuran jumlah relative sel CD206
7. Pengenceran dan penanaman bakteri *Salmonella enterica* dari organ sekum pada media BSA

4.6 Prosedur Kerja

4.6.1 Persiapan Sinbiotik

Sinbiotik yang digunakan adalah kombinasi antara Lactobacillus acidophilus sebagai probiotik dan kopi robusta lampung sebagai prebiotik. Bakteri *Lactobacillus acidophilus* diperoleh dari laboratorium mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan kopi robusta hijau didapatkan dari lampung. Setelah mendapatkan bakteri *Lactobacillus acidophilus*, dilakukan penanaman bakteri tersebut pada media MRSA untuk memperbanyak bakteri. Kemudian bakteri *Lactobacillus acidophilus* dibuat dengan mengikuti aturan Mc Farland 1 ($1{,}5 \times 10^8$ CFU/mL).

4.6.2 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah 24 ekor mencit balb C dengan berat 20-25 gram dan berumur 2 bulan yang kami perloleh dari Laboratorium Fisiologi Hewan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibram Malang. Penggunaan hewan coba dalam penelitian ini telah mendapat persetujuan laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya 1110-KEP-UB **(Lampiran 2).** Mencit balb C di aklimatisasi atau di adaptasi selama 7 hari dan diletakandidalam kotak plastic berukuran 50 x 30 cm. Adanya masa aklimatisasi diperlukan untuk mengurangi tingkat stres pada mencit. Mencit diletakan di dalam ruangan yang bersih, bebas suara bising, serta memiliki aliran udara yang baik.

Pakan serta minum diberikan secara adlibitum. Menurut Tolitiaswaty (2014), Pakan mencit yang baik diberikan untuk mencit mengandung air 8%, protein 53%, serat 7,6%, lemak 13 % dan karbohidrat 4 %. Mencit diberikan pakan berupa pelet agar dapat mengeratnya. Pakan diberikan sebanyak 10% dari berat badan mencit yaitu sekitar 2,5 gram. Pakan yang diberikan adalah pecan BR karena memiliki kandungan protein kasar 23%, serat kasar 4%, lemak 6%, Ca 1%, energy metabolis 3200 Kcal/kg, serta memiliki bentuk pelet (Kusuma, 2016).

4.6.3 Persiapan Bakteri *Salmonella enterica*

Bakteri *Salmonella enterica*berasal dari Laboratoorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan telah di identifikasi dengan hasil positif *Salmonella enterica*. Bakteri *Salmonella enterica*kemudian ditanam pada media *Bismuth Sulfith Agar* (BSA) dan dilakukan inkubasi pada suhu 37^0C selama 24 jam. Bakteri yang tumbuh akan tampak berwarna keabu-abuan hingga hitam kemudian dilakukan uji *microbact* untuk memastikan bahwa yang tumbuh merupakan bakteri *Salmonella enterica*. Bakteri yang telah tumbuh tersebut kemudian dilakukan perbanyakan dengan menggunakan media *Nutrient Broth* (NB), dan dilakukan inkubasi dengan suhu 37^0C selama 24 jam. Hasil yang didapat kemudian dibandingkan dengan 0,5*MC Farland*(Loisa, 2016).

4.6.4 Perlakuan Pada Hewan Coba

Hewan coba mencit Balb C yang telah dilakukan aklimatisasi atau masa penyesuaian kemudian ditimbang untuk mengetahui berat badan. Setelah itu diberikan sinbiotik*Lactobacillus acidophilus* dan kopi robusta dengan dosis berbeda sesuai dengan berat badan dari mencit. Pemberian sinbiotik tersebut dilakukan selama 15 hari. Setelah 15 hari mencit ditimbang kembali untuk mengetahui adanya perubahan berat badan. Kemudian mencit diberikan *Salmonella enterica*sebanyak 0,5 mL pemberian dengan menggunakan sonde lambung. *Salmonella enterica*diberikan selama lima hari berturut turut. Adanya *Salmonella enterica*dapat menyebabkan terjanya infeksi pada mencit. Pemberian obat pada mencit dapat dilakukan dengan berbagai cara seperti secara peroral, intraperitoneal, dan lain lain (Sasmito, 2015).

4.6.5 Eutanasi dan Pembedahan

Mencit Balb C ditimbang satu persatu, kemudian dilakukan dislokasi cervikalis pada daerah leher. Pembedahan pada mencit dimulai dari incisi pada bagian lineaabdominalis, diincisi hingga terlihat organ dalam. Diambil beberpa organ seperti limpa untuk dilakukan *flowcitometry* untuk mengukur jumlah sel CD206 serta diambil organ sekum untuk

dilakukan pengenceran dan penanaman pada media BSA guna mengetahui jumlah relative *Salmonella enterica.*

4.6.6 *Flowcytometry*

Proses *flowcitometry*dilakukan dengan mengambil organ limpa. Organ limpa yang berasal dari mencit tersebut kemudian dilakukan pembelisan dengan menggunakan NaCl 0,9%, kemudian diletakan pada cawan petri yang telah berisi 5 mL NaCl. Limpa digerus dengan menggunakan pangkal dari spuit, dan dimasukan kedalam tabung ependorf. Lakukan sentrifus dengan kecepatan 2500 rpm selama kurang lebih 5 menit. Setelah selesai, supernatant dibuang dan diambil pelet yang ada. Pelet yang didapat ditambahkan dengan antibodi CD206. kemudian dimasukan kedalam kuvet *flowcitometry*kemudian dilakukan running (Gage, 2011).

4.6.7 Kultur *Salmonella enterica*

Organ sekum yang didapat dari hasil nekropsi mencit, ditimbang sebesar 0,1 gram lalu dipotong-potong kecil kecil kemudian dilakukan pengenceran bertingkat hingga 10^8. Pengenceran dilakukan dengan cara memasukan potongan tersebut kedalam 0,9 mL PBS, kemudian di sentrifus. Diambil 0,1 mL dari pengenceran pertama dan dimasukan kedalam PBS pada pengenceran kedua. Lakukan pengenceran hingga 10^8. Setelah didapatkan pengenceran 10^8, dilakukan penanaman pada media

BSA. Penanaman dengan menggunakan *streak*keseluruh permukaan media. Media diinkubasi dengan suhu 37^0C selama 24 Jam. Dihitung jumlah koloni yang berwarna keabuan hingga hitam dengan menggunakan *colony counter*. Perhitungan bakteri dengan menggunakan metote *Total Plate Count* (TPC) jumlah koloni mikroba yang dianalisis ialah rentang jumlah anatara 30-300 koloni cfu/gpada tingkat pengenceran 10^7-10^8 CFU/mL (Sukmawati, 2018).

4.7 Analisa Data

Analisa data yang digunakan pada penelitian ini adalah secara kuantitatif baik untuk jumlah *Salmonella enterica*maupun sel CD206. Jumlah *Salmonella enterica*dihitung pada seluruh permukaan media BSA dengan ciri koloni berwarna keabuan hingga hitam. Analisa kuantitatif untuk sel CD206 dengan menggunakan *One Way Anova*dengan metode *flowcitometry*. Jika suatu penelitian mempunyai sampel lebih dari dua, maka dianjurkan untuk menggunkanAnalisa Varians (ANOVA) untuk mengetahui perbedaan kelompok perlakuan. Penggunaan One Way Anovadikarekan hanya terdapat datu variabel yang diamati (Sirait, 2001).

BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengujian Kombinasi Kopi Robusta Lampung dan bakteri *Lactobacillus acidophilus.*

Uji Kromatografi cair-spektrometri massa atau *Liquid chromatography-mass spectrometry* (LCMS) yang dilakukan pada laboratorium kimia laboratorium Poliklinik Negeri Malang seperti pada **Lampiran 4** menunjukan hasil bahwa pada ekstrak kopi lampung yang didapat mengandung senyawa seperti flavanoid sebanyak 11,815 µg/g , alkaloid, tanin dan saponin. Pengujian terhadap kandungan kopi robusta dilakukan secara kuantitatif dan kualitatif. Hasil pengujian tersebut selaras dengan pernyataan dari Wijaya (2016), yang menyebutkan bahwa kopi mengandung berbagai senyawa seperti tanin, alkaloid, saponin, dan juga flavonoid. Kandungan lain seperti CGA juga terdapat pada kopi sebesar 0,09%.Uji Sensitifitas dengan menggunakan metode Disk Diffusion Test dapat dilihat pada **Tabel 5.1**.pada ekstrak Kopi robusta dengan persentase 10%, 20%, 30%, 40%, 50% dan 60% sebanyak 20 mikrolit terhadap bakteri *Lactobaccilus acidophilus*, dengan kontrol (+) menggunakan antibiotik Gentamycin dan kontrol (-) dengan *blank disc* isi aquades 20 mikrolit pada media MRSA yang ditambahkan CaCO3 1%.

Tabel 5.1 Uji Sensitifitas Bakteri *Lactobacillus axiddophilus*

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

Berdasarkan **Tabel 5.1** dapat dilihat dengan uji daya hambat bakteri dilakukan dengan media *Mueller Hinton Agar* (MHA), *Methicilin-resistant Staphylococcus Aureus* (MRSA) dan dengan diberikan antiobitk gentamicin sebagai kontrol. Penggunaan ekstrak kopi pada berbagai tingkat konsentrasi dimulai dari 10%, 20%, 30%, 40%, dan 50% yang ditanam pada media Media MHA tidak menumbuhkan bakteri sama sekali. MRSA sebagai media lain yang digunakan menghasilkan zona hambat pada kontrol antibiotik berupa lingkaran dengan diameter 0,8 cm. Menurut Hardisari (2016), syarat dapat digunakan sebagai prebiotik adalah dapat dicerna oleh bakteri yang berada di intestinal, tahan terhadadp hidrolisa saluran gastrointestinal atas, dan mampu menekan pertumbuhan dari bakteri patogen. Syarat bakteri dapat dijadikan sebagai probiotik adalah tahan terhadap garam empedu dan asam, tahan terhadap antibiotik, dapat mengikat kolesterol dengan menempel pada epitel dari intestinal dan mampu menghambat bakteri patogen (Yulinery, 2006).

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

Flora normal pada intestinal mempunyai peran penting sebagai agen barier terhadap fungsi dan hemostasis dari intestinal, dan proteksi dalam melawan infeksi patogen. Proteksi pada hospes memppunyai efek langsung terhadap jalur inflamasi dan fungsi pertahanan (Martz, 2015). Bakteri *Salmonella enterica* pada saat menginvansi intestinal dari mencit dapat menyebabkan terjadinya diare. Berdasarkan pernyataan dari Astawan (2012) menyebutkan bahwa dengan pemberian bakteri *Salmonella enterica* menyebabkan terjadinya diare dengan ciri pada feses terdapat lendir, lembek dan terjadi perubahan warna dimana warna normal feses mencit adalah hitam.

Tabel 5.2 Tampilan Feses Pada Mencit

Perlakuan	Tampilan Feses	Keterangan
Kontrol Positif (K+)	- bentuk tidak lonjong, tidak bulat, - warna coklat - sangat lembek lembek, berlendir	Diare
Kontrol negatif (K-)	- Berbentuk Lonjong, - Warna Hitam, - Solid.	Normal
Kontrol *Lactobaccilus acidophilus* (KLac)	- bentuk agak bulat, - warna coklat - lembek	Diare

Perlakuan 1 (P1)	-bulat agak lonjong -hitam -lembek	Normal
Perlakuan 2 (P2)	- bentuk lonjong, - warna hitam - tidak lembek	Diare
Perlakuan 3 (P3)	- bentuk lonjong, - warna coklat - agak lembek	Diare

Penelitian dengan hewan mencit yang diinduksi bakteri *Salmonella enterica* mengalami diare pada kelompok kontrol +. Mencit yang diberikan bakteri patogen selama 2 hari memunculkan gejala klinis diare seperti pada **Tabel 5.2**. Bakrteri *Salmonella enterica* menyebakan terjadinya terjadinya edema pada sekum, dengan adanya infiltrasi dari sel inflamasi kedalam submukosa dan mukosa dan penurunan dari sel goblet dan adanya kerusakan dari epitel (Marchelletta, 2015).

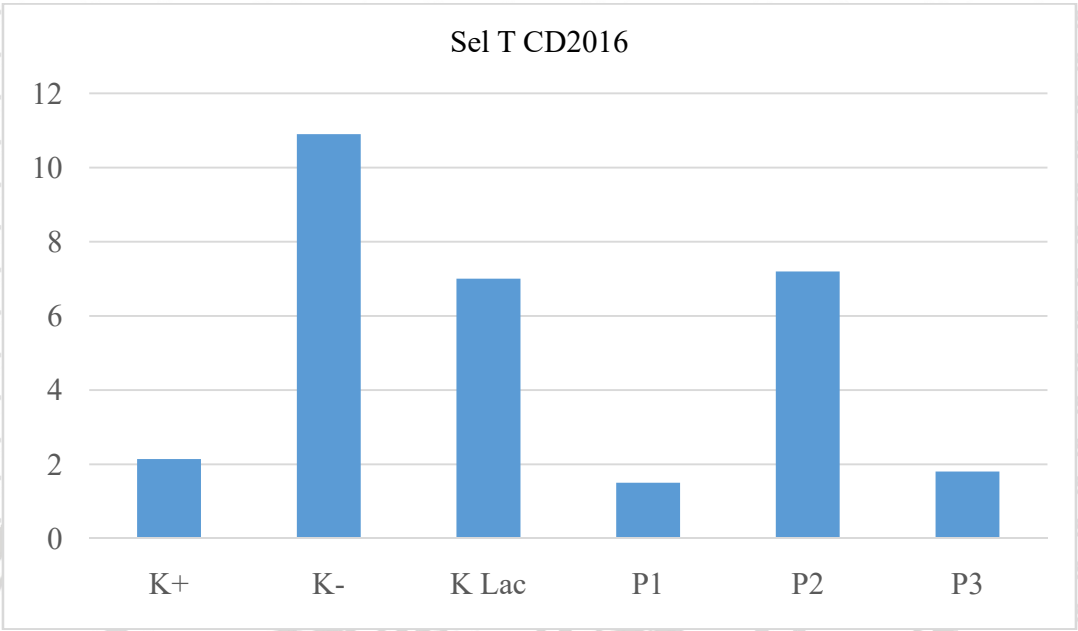
Kelompok kontrol K Lac yang diberikan *Lactobacillus acidophilus* dan diberikan pula bakteri *Salmonella enterica,* menghasilkan feses diare yang tidak separah dengan kontol K+. Feses yang tidak selembek dari kontrol positif (K+), dikarekan dengan pemberian dari *lactobacillus acidophilus* akan melapisi epitel dari intestinal sehingga bakteri patogen tidak dapat menginvasi dan membuat kolonisasi pada intestinal, dengan begitu bakteri patogen tidak dapat mengeluarkan toksiknya. Efek lain dari *Lactobacillus* adalah karena bakteri

tersebut juga memunculkan respon imun berupa pengeluaran dari Ig A (Nakazato, 2010).

Kelompok perlakuan P2 dan P3 terlihat adanya feses yang mengalami diare dengan ciri ciri feses berbentuk bulat ataupun lonjong, berwarna coklat dan lembek. Pemberian kombinasi antara kopi belum mampu mengurangi jumlah kolonisasi dari *Salmonella,* akibatnya masih banyak bateri patogen tersebut yang menyebabkan terjadinyta diare. Kandungan senyawa dari kopi seperti tanain, flavanoid, saponin, dan alkaloid belum mampu menginduksi sistem imun secara maksimal, sehingga masih banyak bakteri patogen tersebut yang tidak terfagosit oleh makrofag maupun sel fagosit lainnya (Jamal, 2019).

5.3 Pengaruh Pemberian Kombinasi Ekstrak Kopi Robusta Lampung dan *Lactobacillus acidophilus* Terhadap Jumlah Relatif sel CD206

Mencit Balb C yang telah dilakukan pemberian perlakuan kemudian dilakukan eutanasi dengan cara dislokasi *cervicalis* dan dipisahkan organ limpa untuk selanjutnya dilakukan pengujian dengan menggunakan *flowcitometry.* Penggunaan *flowcitometry* dimaksudkan untuk mengetahui jumlah relatif sel T Cd206, dan hasil dapat dilihat pada **Gambar 5.1.**



Gambar 5.1 Grafik Rata-Rata Jumlah Relatif Sel T CD206 Berdasarkan *Flowcitometry* pada Masing-masing Kelompok Perlakuan

Hasil *flowcitometry* pada **Gambar 5.1**, rata-rata sel T CD206 tertinggi pada kelompok perlakuan Kontrol negatif atau K- disusul oleh kelompok berikutnya yaitu dari P2, K lacm K+, P3 dan P1. Hasil perlakuan sel T CD206 terendah pada kelompok P1 dan tertinggi pada kelompok perlakuan K-. Data dari *flowcitometry* dilakukan analisis dengan menggunakan metode *One Way Analisys of Varience* dan dilanjutkan dengan melakukan uji *Tukey*. Data yang berasal dari *flowcitometry* dianalisis dengan menggunakan *SPSS Statistic 21* untuk mengetahui uji normalitas dan homogenitas dari data tersebut.

Hasil Uji normalitas pada **Lampiran 10**menunjukan adanya persebaran data yang normal antara K+,K-,K Lacto, P1,P2, dan juga P3 dengan tingkat kesalahan 0,5% (p>0,05)**.** Hasil pengujian homogenitas dari sel T CD206 yang terdapat pada

Lampiran 10 menunjukan hasil signifikansi lebh besar 0,05 sehingga dapat dikatakan bahwa data sel T CD206 bersifat homogen atau tidak bereda populasi satu dengan lainnya.

Berdasarkan data uji normalitas dan homogenesitas, maka data dari CD206 telah memenuhi syarat uji ANOVA, data *flowcytometry* yang telah memenuhi syarat, kemudian dianalisis dengan *One Way Analisys of Varience* dan dilanjutkan dengan uji Tukey. Uji beda yang dapat dilihat pada **Lampiran 10** digunakan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian kombinasi kopi robusta Lampung dan bakteri *Lactobacillus acidophilus* terhadap jumlah relatif sel T CD206 yang diinfeksi oleh bakteri *Salmonella enterica.*

Hasil dari uji statistik menunjukan nilai signifikansi kurang dari 0,05 ($p<0,05$), sehingga dapat dimaknai bahwa data sel T CD206 terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

Hasil uji dari ANOVA dapat dirangkum pada **Tabel 5.3** menunjukan bahwa kombinasi antara kopi robusta Lampung dan bakteri *Lactobacllus acidophilus* terdapat perbedaan antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan, dimana data seperti berikut ini.

Tabel 5.3 Hasil Uji Anova pada Sel T CD206

Perlakuan	Ulangan				Total	Rata-Rata
	1	2	3	4		
K+	3,06	2,8	2,46	2,27	10,59	2,6 ± 0,137[a]

K-	12,13	10,48	10,23	11,02	43,8	10,9 ±1,03 [b]
K Lac	8,47	5,13	8,97	1,23	23,8	5,95 ±0,8 [b]
P1	1,49	1,54	1,23	2,12	6,38	1,59 ±0,1 [a]
P2	8,28	7,30	8,39	5,13	29,1	7,27 ±0,85 [b]
P3	1,22	3.04	1,36	1,87	7,49	1,87 ±0,24 [a]

ket : Notasi yang berbeda menunjukan perbedaan yang signifikan ($p<0,05$)

Berdasarkan analisa berganda *multiple comparisons* memperlihatkan tidak ada perbedaan yang signifikan antara K- dengan K Lac dan keduanya memiliki perbedaan signifikan dengan K+. Kelompok K- memiliki rata-rata tinggi diakibatkan banyaknya makrofag yang terkumpul di limpa lebih tepatnya pada bagian pulpa putih. Makrofag dengan jumlah yang tinggi pada limpa menandakan tingginya sel T CD206, karena sel T CD206 terletak pada permukaan dari makrofag. Menurut literatur, makrofag diproduksi oleh susmsum tulang, dan kemudian didistribusi menuju limpa. Makrofag merupakan turunan dari monosit, dimana monosit diproduksi disumsum tulang. Hasil produksi di sumsum tulang kemudian di distribusikan ke berbagai lokasi salah satuya limpa (Trouplin, 2013). Makrofag yang tedapat pada limpa berfungsi untuk memfagosit sel darah merah yang sudah tua, meregulasi zat besi dan pelepasan zat besi, dan membunuh bakteri dan virus yang terdapat di *marginal zone* (MZ) pada limpa (Bronte, 2013).

Kontrol positif (K+) yang merupakan positif terhadap *Salmonella enterica* pada penelitian ini berpengaruh signifikan terhadap K-, K Lac, dan juga P2, dengan nilai rata rata lebih rendah dari K-, K Lac dan P2. Nilai rata rata sel T CD206 pada K+ sebesar 2,6 ± 0,37[a] dikarenakan tidak adanya pemberian dari sinbiotik sehingga jumlah makrofag rendah, dimana sinbiotik berfungsi sebagai imunomodulator untuk meningkatkan sistem imun melalui peningkatan makrofag. Kombinasi antara bakteri *L. acidophilus* dan Kopi robusta dapat menginduksi peningkatan jumlah makrofag karena memiliki kandungan saponin dan flavanoid yang mampu meningkatkan pengeluaran dari sitokin pada sel CD4. Menurut Listiani (2019), kandungan saponin dan flavanoid mampu meningkatkan sitokin IL-2 sehingga terjadi peningkatan regulasi dari sel T helper.

Kelompok perlakuan dengan pemberian *Lactobacillus acidophilus* (K Lac) mendapatkan hasil 5,95 ±0,8 [b]. Kelompok K Lac berpengaruh signifikan terhadap K+, P1 dan P3 dan tidak berpengaruh terhadap K-. Jumlah rata rata K Lac lebih tinggi dari K+ dikarenakan dengan pemberian *Lactobacillus acidophilus* dapat menstimulus sistem imun hospes, sehingga akan menaikan jumlah dari makrofag. Probiotik berupa bakteri *Lactobacillus acidophilus* dapat enaikan sistem imun seluler non spesifik dengan diaktifkannya makrofag, sel *natural killer* (NK), antigen spesifik sitokin limfosit T, dan lepasnya berbagai sitokin (Ashraf, 2013). Nilai rataan dari K Lac lebih rendah dibandingkan dengan K-, dikarenakan pada kelompok perlakuan K Lac ini dengan pemberian *Lactobacillus acidophilus* makrofag akan meningkat. Kelompok ini juga diberikan bakteri *Salmonella*

enterica akibatnya sejumlah makrofag pada limpa akan menuju kedaerah infeksi yaitu intestinal. Rao (2014) menyebutkan, apabila terjadi infeksi maka neutrofil akan menuju kedaerah infeksi meninggalkan vaskuler. Neutrofil yang telah sampai akan memfagosit dan mengeluarkan sitokin. Infeksi yang berkelanjutan menyebabkan monosit menuju kedaerah infeksi dan berdiferensiasi menjadi makrofag dan menyebabkan pengeluaran berbagai sitokin sebagai respon dari proinflamasi dan anti inflamasi.

Kelompok perlakuan 1 (P1) dengan pemberian kombinasi kopi robusta 250 mg/kg BB dan *Lactobacillus acidophilus* memiliki pengaruh yang signifikan jumlah sel T CD206 terhadap K-, K Lac, dan P2. Jumlah sel T CD206 pada P1 memiliki nilai rata-rata sebesar 1,59 ±0,1 [a] atau paling rendah diantara P2, dan P3. Kelompok perlakuan P1 yang diberikan sinbiotik dengan kandungan saponin dan flavanoid mampu meningkatkan secara maksimal sitokin IL-2 sehingga peningkatan regulasi dari sel T helper maksimal, dan efeknya sitokin dalam aktivasi sel CD4 sepenuhnya bekerja. Menurut literatur disebutkan bahwa, dengan adanya infeksi dari bakteri *Salmonella* menyebabkan CD4 bekerja sebagai respon imunitas dari tubuh (Maybeno, 2012).

Kelompok perlakuan P2 dengan pemberian kombinasi kopi robusta 500 mg/kg BB dan *Lactobacillus acidophilus* memiliki pengaruh yang signifikann terhadap K+, P1 dan P3. Hasil statistika dari P2 paling tinggi diantara P1 dan P3 yaitu sebesar 7,27 ±0,85 [b]. Pemberian kopi dengan kandungan flavanoid dan saponin mampu menstimulus pengeluaran dari sel T CD4 secara maksimal dan

kandungan *lactobacillus* juga dapat menstimulus pengeluaran mediator inflamasi. Sel CD4 yang telah teraktivasi akan berdiferensiasi menjadi sel T helper 1 dan 2. sel Th1 akan menghasilkan IFN-γ, yang mana IFN akan mengaktifkan makrofag. Makrofag yang teraktifasi memiliki sel CD206 pada permukaan makrofag (Cong Wu, 2014).

Kelompok perlakuan 3 (P3) dengan pemberian kombinasi kopi robusta 750 mg/kg BB dan *Lactobacillus acidophilus* memiliki pengaruh yang signifikan jumlah sel T CD 206 terhadap K-, K Lac, dan P2. Nilai rerata dari P3 adalah sebesar 1,87 ±0,24[a], lebih rendah dari P2. Perlakuan 3 (P3) tidak optimal dalam menstimulus pembentukan sistem imun, dikarenakan dosis dari kopi yang tinggi dapat menyebabkan terjadinya kerusakan pada epitel intestinal, sehingga jumlah sel T CD206 rendah. Kandungan dari kopi seperti kafein pada pada dosis yang rendah dapat menghasilkan efek yang menguntungkan, namun pada dosis yang tinggi pada mencit dapat menyebabkan anxiety/khawatir, nausea, tidak tenang dan juga menyebabkan iritasi pada saluran pencernaan (Yin, 2014).

5.4 Pengaruh Pemberian Kombinasi Ekstrak Kopi Robusta Lampung dan *Lactobacillus acidophilus* Terhadap Jumlah Bakteri *Salmonella enterica*

Penelitian mengenai kombinasi kopi robusta dan bakteri *Lactobacillus acidophilus* dengan menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC) untuk menghitung jumlah dari bakteri *Salmonella enterica*. Mencit yang telah dilakukan

nekropsi kemudian dipisahkan bagian sekum, diencerkan dan ditanam pada media *Bismuth Sulfith Agar* (BSA) kemudian diinkubasi pada suhu 37^{0}C selama 24 jam.

Bakteri yang tumbuh pada media BSA tersebut berjenis *Salmonella enterica,* dengan ciri koloni bakteri berwarna hitam metalik. Data hasil dari penanaman bakteri *Salmonella enterica* dapat dilihat pada **Tabel 5.4**. yang merupakan hasil rerata dari pengenceran 10^7 dan 10^8 pada tiap perlakuan

Tabel 5.4 Jumlah rerata bakteri *Salmonella enterica* pada Mencit Balb C

Perlakuan	Jumlah Pertumbuhan Koloni *Salmonella enterica* (CFU/mL)		
	10^7	10^8	Total Bakteri
K+	244 x 10^7	77 x 10^8	5,1 x 10^9
K-	Tidak tumbuh	Tidak tumbuh	Tidak tumbuh
K Lac + *S. enterica*	129 x 10^7	81 x 10^8	4,7 x 10^9
P1	4 x 10^7	2 x 10^8	4 x 10^7
P2	2 x 10^7	1 x 10^8	2 x 10^7
P3	130 x 10^7	65 x 10^8	3,9 x 10^9

Bakteri *Salmonella enterica* pada kelompok K+ memiliki jumlah terbanyak, dikarenakan hewan diberikan induksi bakteri *Salmonella enterica* agar hewan mengalami sakit. Kelompok K+ tersebut tidak diberikan sinbiotik, sehingga jumlah bakteri tinggi, karena keterbatasan dari sistem imun tubuh hospes. Sistem

imun hospes tidak mampu menghancurkan koloni *Salmonella enterica.* Makrofag akan menghacurkan bakteri dengan cara menelan bakteri pada komponen intraseluler, memalui pengasaman pada bakteri untuk membunuh bakteri *salmonella* tersebut (Richardson, 2015).

Bakteri *Salmonella enterica* pada kelompok K- memiliki jumlah yang sedikit dibandingka dengan kelompok K+ dan K Lac. Jumlah bakteri 0 CFU/ mL dikarenakan pada kelompok K- tidak diberikan induksi bakteri *Salmonella enterica* sehingga pada intestinal dari mencit tidak terdapat bakteri patogen tersebut. Intestinal mencit secara normal tidak memiliki bakteri *Salmonella enterica,* hal tersebut diperkuat dengan pernyataan dari Jamil (2014), mikrobiota ataupun flora normal yang terdapat didalam intestinal mencit seperti *Lactobacillus acidophilus* yang bermanfaat sebagai probiotik.Intestinal hewan mencit yang sehat memiliki jumlah bakteri probiotik normal sebanyak 80%. Bakteri probiotik tersebut dapat mencegah kolonisasi dari *Salmonella sp.* yang menyebabkan terjadinya sembelit diare, kembung, masalah kesehatan lainnya. Kusumaningsih (2011) menyatakan, bahwa bakteri *Salmonella enterica serovar enterica*banyak ditemukan pada intestinal dari mencit dan juga pada feses dari mencit maupun ayam, dan penularan *Salmonella* bisa melalui feses tersebut.

Kelompok kontrol K Lac, ditemukan jumlah bakteri *Salmonella enterica* sebanyak 470 CFU/mL. Jumlah bakteri *Salmonella enterica* pada K Lac lebih sedikit dibandingkan dengan K- dikarenakan, adanya pemberian dari bakteri

Lactobacillus acidophilus sebanyak 0,5 mL, dapat digunakan sebagai barier dari intestinal. Barier tersebut akan mengurangi kolonisasi dari bakteri *Salmonella enterica* akibatnya *Salmonella enterica* tidak dapat berkompetisi dengan *Lactobacillus acidophilus.* Menurut Nakazato (2010), bakteri *Lactobacillus acidophilus* akan melalukan blokade adesi dari bakteri *Salmonella enterica* pada *peyer's patches* melului kehadiran fisik dari *Lactobacillus acidophilus.*

Kelompok perlakuan P1 yang diberikan sinbiotik kopi robusta 250 mg/kgBB dan *Lactobacillus acidophilus* 0,5 mL kemudian diberikan induksi bakteri *Salmonella enterica* sebanyak 0,5 mL memiliki jumlah kultur *S. enterica* sebanyak 4 CFU/mL, lebih banyak dibandingkan P2 yang sebanyak 2 CFU/mL. Jumlah bakteri *Salmonella enterica* yang sedikit dikarenakan kopi dengan kandungan flavanoid dan saponin mampu bekerja secara maksimal untuk menstimulus pengeluaran dari reseptor imunitas terutama pada sel T CD206. Kandungan alkaloid dan tanin dari kopi juga bisa secara efektif membunuh bakteri dengan dosis 250 mg/kg BB. Bakteri *L. acidophilus* belum sepenuhnya berkompetisi secara maksimal dengan bakteri *Salmonella enterica*, sehingga masih ada *S. enterica* yang tumbuh dan berkolonisasi di epitel. Kelompok Perlakuan P1 terdapat jumlah imunoglobulin A (IgA) yang tinggi dibandingkan dengan kelompok perlakuan lainnya (data tidak ditampilkan). Ig A berfungsi sebagai antibodi yang melawan koloni *Salmonella enterica.* Ig A merupakan salah satu antibodi yang berada pada intestinal sekresi, dan menjadi pertahanan

pertama melawan patogen enteroinvasif seperti *Salmonella enterica.* Penelitian pada hewan model menunjukan Ig A melawan antigen O (O-Ag) efektif dalam pencegahan infeksi *Salmonella* (Amarasinghe, 2013).

Kelompok perlakuan P2 dengan pemberian sinbiotik kopi robusta 500 mg/kgBB dan *Lactobacillus acidophilus* 0,5 mL kemudian diberikan induksi bakteri *Salmonella enterica* sebanyak 0,5 mL menghasilkan jumlah rataan bakteri *Salmonella* paling sedikit dibandingkan dengan P1 dan P3 yaitu sebanyak 2 CFU/mL. Dosis kopi 500 mg/Kg BB sudah mampu membunuh bakteri. Flavanoid dan saponin dari ekstrak kopi telah mampu membunuh bakteri patogen tersebut. Alkaloid dan Tanin menghancurkan dinding dari bakteri *Salmonella enterica.* Berdarkan literatur menyebutkan bahwa flavanoid mampu merusak dinding dari bakeri melalui perbedaan tingkat kepolaran gugus alkohol dengan lipid penyusun dari DNA bakteri sehingga dinding sel bakteri *S. enterica* akan rusak dan senyawa tersebut dapat bergerak masuk menuju inti sel bakteri. Senyawa alkaloid memiliki sifat reaktif gugus basa yang mana akan bereaksi dengan gugus asam amino pada sel bakteri (Tanauma, 2016).

Kelompok perlakua P3 dengan pemberian sinbiotik kopi robusta 750 mg/kgBB dan *Lactobacillus acidophilus* 0,5 mL kemudian diberikan induksi bakteri *Salmonella enterica* sebanyak 0,5 mL, memiliki hasil rata-rata *Salmonella enterica* sebanyak 3,9 x 10^9 CFU/mL. Jumlah tersebut berbeda jauh dari P1 maupun P2 diakibatkan karena semakin tingginya jumlah dosis kopi yang

diberikan, akan menyebabkan kerusakan pada epitel intestinal sehingga epitel tidak mampu melawan bakteri *Salmonella enterica* tersebut. Epitel yang rusak menyebabkan barier terhadap *S. enterica* menjadi rusak akibatnya banya bakteri patogen yang berkembang.

5.5 Hubungan Antara Jumlah Bakteri *Salmonella enterica* dan Jumlah Relatif Sel T CD206 pada Pemberian Kombinasi Ekstrak Kopi Robusta Lampung dan *Lactobacillus acidophilus.*

Hubungan antara jumlah bakteri *Salmonella enterica* dengan sel T CD206, semakin banyak CD206 maka jumlah bakteri *Salmonella enterica* akan semakin sedikit. Sel T CD206 pada K+ memiliki jumlah paling sedikit dibandingkan K- dan K Lac sehingga pada K+ jumlah *Salmonella enterica* terbanyak yaitu 506 CFU/mL. Pada perlakuan K- Jumlah relatif sel T CD206 paling banyak sehingga jumlah *Salmonella enterica* paling sedikit dibandingkan dengan K+ dan K Lac.

Kelompok perlakuan P1 memiliki jumlah sel T CD206 paling sedikit, dan jumlah *Salmonella enterica* sebanyak 4 CFU/mL. Sel goblet dari intestinal (data tidak ditampilkan)masih dalam keadaan bagus sehingga menghasilkan mukus paling banyak. Mukus sebagai barier pertahanan pertama akan membunuh bakteri sehingga bakteri yang ditemukan pada sekum sedikit dan tidak terdapat diare. Bakteri *Salmonella enterica* yang terdapat pada sekum sedikit, sehingga

makrofag yang teraktivasi juga sedikit akibatnya makrofag dalam limpa juga sedikit.

Kelompok perlakuan P2 memiliki jumlah rerata sel CD206 terbanya dibandingkan dengan P1 da P3, dan jumlah bakteri *Salmonella enterica* paling sedikit yaitu 2 CFU/mL. Kandungan dari kopi telah efektif meningikatkan respon imunitas, dan baik untuk menghancurkan bakteri. Bakteri *Lactobacillus acidophilus* sebanyak 0,5 mL efektif mencegah kolonisasi dan perlekatan dari *Salmonella enterica* pada intestinal, sehingga jumlah bakteri patogen tersebut sedikit. Feses pada kelompok perlakuan P2 masih menunjukan adanya diare dikarekan jumlah makrofag yang tinggi akan memfagosit *S. enterica* sehingga menyebabkan *S. enterica* menghasilkan endotoxin pada saat terfagosit. Endotoxin meningkat menyebabkan terjadinya diare.

Kelompok P3 dengan jumlah relatif sel T CD206 sebanyak 1,87 ±0,24[a] memiliki jumlah *Salmonella enterica* yang begitu banyak dibandingkan dengan P1 dan P3. Jumlah bakteri meningkat diakibatkan karena dosis kopi yang terlalu tinggi sehingga menyebabkan kerusakan epitel, dan tidak menstimulus pembentukan CD4+ akibatya jumlah *salmonella* banyak.

Bakteri *Salmonella enterica*merupakan bakteri dari famili enterobacteriaceae, dengan betuk batang anaerob fakultatif serta merupakan bakteri golongan gram negatif (Ilham, 2017). Bakteri *Salmonella enterica* masuk kedalam intestinal, pada intestinal bakteri tersebut akan melakukan kolonisasi dan akan melakukan penetrasi pada epitel intestinal. Bakteri *Salmonella enterica* yang berhasil masuk

kedalam epitel, memiliki lipopolisakarida (LPS) pada dinding selnya, LPS tersebut akan mengaktivasi makrofag untuk menuju lokasi terjadiya infeksi. Makrofag yang telah teraktivasi akan semakin meningkat kemampuannya dalam memfagosit bakteri. Peningkatan makrofag diakibatnya adanya percepatan dari difensiasi makrofag dan juga percepatan proliferasi makrofag. Percepatan migrasi dari makrofag disebabka karena makrofag menghasilkan IL-6 (Besung, 2016). Makrofag dan sel fasosit lainnya apabila tidak mampu melawan *Salmonella,* makan akan mengeluarkan sitokin proinflamasi yang akan mestimulus perubahan sel T menjadi sel T I dan T helper II. Sel Th I akan menghasilkan IFN-γ, dan IFN-γ akan mengaktifkan makrofag.

Kandunga kopi setelah dilakukan uji LCMS flavanoid dari kopi dapat merusak dinding sitoplasma dari bakteri. Sitoplasma sendiri merupakan tempat masuknya bahan bahan makanan ataupun nutrisi untuk bakteri. Sitoplasma yag dirusak maka akan menyebabkan makanan tidak bisa masuk kedalam bakteri, sehingga bakteri tidak dapat tumbuh dan akan mati. Tanin juga dapat merusak memban dari sel bakteri. Saponin dapat meningkatkan permaebilitas dari membran sel, sehingga merubah struktur dan fungsi dari membran, menyebabkan denaturasi dan akan menyebabkan kerusakan serta lisisnya bakteri (Jamal, 2019).

Bakteri seperti *Lactobacillus, Bifidobacterium, Leuconostoc, Pediococcus, and Enterococcus* dapat berfungsi sebagai probiotik. Probiotik dapat

memmodulasi sistem imun melalui kompetisi nutrisi, kolonisasi, kompetisi tempat penempelan pada epitel intestinal, memproduksi bakteriosin, menurunkan pH koolon, dan stimulasi imunitas non spesifik. Mekanisme lain yang digunakan oleh probiotik adalah dengan meningkatkan pengeluaran dan Ig A dan respon inflamasi dan barier nonimunologi intestinal melalui kontrol peningkatan permaebilitas intestinal (Ashraf, 2014). Bakteri *Lactobacillus acidophilus* akan menyebabkan sel CD4 berdiferensiasi menjadi sel Th2 untuk mestimulus pengeluaran dari sitokin inflamasi dan juga sitokin antiinflamasi berupa IL4 dan IL 5, sehingga sitokin tidak bekerja secara berlebihan (Nakazato, 2010).

Berdasarkan penjelasan diatas, jumlah sel T CD206 yang tinggi pada kelompok perlakuan P2 masih menunjukan terjadinya diare, namun pada P1 dengan jumlah sel T CD206 menunjukan tidak terjadinya diare dan jumlah *Salmonella enterica* yang sedikit. Bakteri *Salmonella enterica* yang mati tidak hanya sebabkan karena tingginya sel T CD206, namun juga diakibatkan oleh adanya peran imuntias lainnya seperti peningkatan mukus pada intestinal.

BAB VI PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Hasil penelitian menunjukan terdapat pengaruh kombinasi kopi robusta lampung dengan dosis 250 mg/kg BB dan bakteri *Lactobacillus acidophilus* 0,5 mLmenyebabkan terjadinya kenaikan jumlah relatif sel T CD206 dan penurunan jumlah bakteri *Salmonella enterica*menjadi 4 x 10^7 CFU/mL.

6.2 Saran

Penelitian lanjutan mengenai kombinasi kopi robusta dan bakteri *Lactobacillus acidophilus* disarankan melakukan:

1. Uji microbact untuk mengetahui sorovar dari *Salmonella enterica*.
2. Uji toksisitas kombinasi sinbiotik terhadap bakteri *Salmonella enterica*.
3. Uji aktivitas dan kapasitas fagosit untuk mengetahui kemampuan sel fagosit terhadap bakteri *Salmonella enterica.*

DAFTAR PUSTAKA

Abdul, K. H.H. Andrew, H. Lichtman. Basic Immunology:Functions and Disorders of the Immune System. Elsevier. India 3-4

Abul, K.A, V.S. Murugesa. 2015. γ-Tilmanocept, a New Radiopharmaceutical Tracer for Cancer Sentinel Lymph Nodes, Binds To The Mannpse Receptor (CD206). Journal Immunology. Vol 195.

Adriani, L. N. Indrayati, U. H. Tanuwiria, N. Mayasari. 2008. Aktivitas *Lactobacillus Acidophilus* Dan *Bifidobacterium* Terhadap Kualitas Yoghurt Dan Penghambatannya Pada *Helicobacter Pylori. Jurnal Bionatura*. 10(2): 129-140.

Akter, M. R., K.A. Choudhury, M.M. Rahman, and M.S. Islam. 2007. SeroprevalenceOf Salmonellosis In Layer Chickens With Isolation, Identification And Antibiogram Study Of Their Causal Agents. *Bangl. J. Vet. Med*. 5 (1 & 2): 39–42.

Amarasinghe. J. J, R.E. D'Hondt, C. M.W. Waters. N.J. Mantis. 2013. Exposure of Salmonella enterica Serovar Typhimurium to a Protective Monoclonal IgA Triggers Exopolysaccharide Production via a Diguanylate Cyclase-Dependent Pathway. *Journal ASM.org*. 81(3): 653–664.

Anjum.N, A.Maqsoos, T. Masud, A. Ahmad, A. Momin. 2014. Lactobacillus acidophilus : Characterization of the Species and Application in Food Production. https://www.researchgate.net/publication/260116039. [7 Juli 2019]

Arifin, I.M. 2015. Deteksi *Salmonella sp.* pada Daging Sapi di Pasar Tradisional dan Pasar Modern di Kota Makassar. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas hasanuddin.

Ariyanti, T. Supar. 2008. Antigenisitas Dan Imunogenisitas Salmonella *Enterica*: Implikasinya Dalam Diagnosis Dan Pengembangan Vaksin Isolat Lokal Untuk Unggas. *Wartazoa*18(4): 187-197.

Ashraf. R, N. P. Shah. 2013. Immune system stimulation by probiotic microorganisms. *Food Science and Nutrion*. 37-41.

Asti.S.I.P. 2015. Pengaruh Ekstrak Biji Kopi Robusta *(Coffea Robusta*) Terhadap Aktivitas Fagositosis Sel Monosit (Penelitian Eksperimental Laboratoris*In-Vitro*).*[skripsi]*. Fakultas Kedokteran Gigi. Universitas Jeber.

Atterbury, R.J., M.A.P.V. Bergen, F. Ortiz, M.A. Lovvel, J.A. Harris, A.D. Boer, J.A. Wagenaar, V.M. Allen, P.A Barrow. 2007. Bacteriophage therapy to reduce Salmonella colonization of broiler chickens. Appl. Environ Microbiol 73:4543-4549.

Berczi, E., A. Szentivanyi. 2003. Neuroimmune Biology. Elsevier. Amsterdam. 417.

Betancor. L, M. Pereira, A. Martinez, G. Giossa, M. Fookes, K. Flores, P. Barrios, V. Repiso, R. Vignoli, N. Cordeiro, G. Algorta, N. Thomson, D. Maskell,qF. Schelotto, dan J. A. Chabalgoity. 2010. Prevalence of *Salmonella enterica* in Poultry and Eggs in Uruguay during an Epidemic Due to *Salmonella enterica*SerovarEnterica. *Journal of Clinical Microbiology* 48(7): 2413-2423.

Besung. I. N. K, N. M. Astawa, K. Suata, dan N. K. Suwiti. 2016. Hubungan Antara Aktivasi Makrofag Dengan Kadar Interleukin-6 Dan Antibodi Terhadap Salmonella Typhi Pada Mencit. *Jurnal Kedoteran Hewan.* 10(1): 1-4.

Bihi. A. K, A.Wiranegara. R Wiranegara, R.N. Fitri. M. Tandian, B. Maria, dan K.A. Budiman. 2017. Effects of Arabica Coffee (Coffeaarabica) on Laxative Efect and Urine Mass of Mice (Mus musculus). *Laporan Penelitian Kecil Proyek Anatomi dan Fisiologi Hewan.* 1-7.

Budiarso, T.Y, dan M.J.X. Belo. 2009. Deteksi Cemaran *Salmonella Sp* Pada Daging Ayam Yang Dijual Di Pasar Tradisional Di Wilayah Kota Yogyakarta. *Prosiding Seminar Nasional Penelitian, Pendidikan dan Penerapan MIPA.* 245-251.

Bronte. V, Mikael. J.P. 2013. The spleen in local and systemic regulation of immunity. *National Institut oh Health.*39(5): 1-2

Broz. P, Maikke. B.O, dan Denise. M. 2012. Innate Immune Respone to *Salmonella typhimurium,* a Model Enteric Pathogen. *Landes Bioscience.* Vol3(2) Hal. 62-70.

Charan. J, Kantharia. N. D. 2013. How to calculate sample size in animal studies?.*Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*. Vol 4(4): 303-306

Cheylani. T, E.J. dogru, R. Gurbanov, H.T Teker, dan A.G. Gozen. 2018. The effects of repeated antibiotic administration to juvenile BALB/c mice on the microbiota status and animal behavior at the adult age. *Helion*4: 1-23.

Chlebicz. A, dan K.Slizewska. 2018. Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review. *International Journal of environmental Research and Public health*. 15(863): 1-29.

Cong. Wu, Y.Xue, P. Wang, Li Lin, Q. Liu, N. Li, J. Xu dan X. Cao. 2014. IFN-γ Primes Macrophage Activation by Increasing Phosphatase and Tensin Homolog via Downregulation of miR-3473b. *The Journal of Immunology*. 193(6). 3036-2044.

Cross,S. 2013. Underwood's Pathology. London. Elsevier. 134.

Decker, E. 2009. Functional Foods. International Food Informatin service. USA. 110-111.

Dewi, Putra. S, Riti. N, Purnawati. D, dan Saputrp. R. C. 2015. Salmonellosis Pada Daging Dan Telur Ayam Di Provinsi Bali, NTB Dan NTT. *Buletin veteriner BBVet Denpasar*. Vol. 27(87): 1-10.

Eng. S.K, P. Pusparajah. N.S.A, Mutalib, H.L. Seng. K.G. Chan dan L.H. Lee. 2015. *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science* 8(3): 283-293.

Ermawati, T. 2016. Effects Of Robusta Coffee Bean Extract (*Coffea Robusta)* On The Viability Of Neutrophils Exposed By *PorphyromonasGingivalis. Proveeding ICMS* 3(1): 169-172.

Farhati. N, dan Muchtaridi. 2016. Tinjuan Kimia dan Aspek Farmakologi Senyawa Asam Klorogenik pada Biji Kopi : Review. Jurnal Suplemen 14(1): 214-227.

Fox,.J.G. 2006. The Mouse In Biomedical Research Second Edition. Elsevier. London. 13-14.

Gage. E, Maria. O. H, Joanne. M.O, Elizabeth. A. M, dan Nicholas. J. M. 2011. Role of the Mannose Receptor (CD206) in Innate Immunity to Ricin Toxin. *Toxins*. Vol. 3: 1131-1145.

Hardisari. R, N. Amaliawati, 2016. Manfaat Prebiotik Tepung Pisang Kepok (Musa paradisiaca formatypica) terhadap Pertumbuhan Probiotik Lactobacillus casei secara In Vitro. *Jurnal Teknologi Laboratorium*. 5(2): 64-67.

Hartono.E.F, N. Iriyanti, S. Suhermiyati. 2016. Efek Penggunaan Sinbiotik Terhadap Kondisi Miklofora dan Histologi Usus Ayam Sentul Jantan. *agripet*16(2): 97-105.

Hasanah.I.N. 2016. Pengaruh Substrat Tanam Terhadap Keberhasilan Aklimatisasi Embrio Somatik Kopi Robusta (CoffeaCanephora Pierre Ex A. Froehner). [Skripsi]. Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan. Universitas Muhammadiyah Purwokerto.

Ilham, J. Nugraha, M. Purwanta. 2017. Deteksi Igm Anti *Salmonella Enterica Serovar Typhi* Dengan Pemeriksaan Tubex Tf Dan Typhidot-M. *Jurnal Biosains Pascasarjana.* 19(2): 1-3

Jamal. K. P, Muhaimin, Fitrianingsih. 2019. Antibacterial Activities Of Ethanol Extracts Of Durian Fruit Skin (Durio Zibethinus Murr.) On Salmonella Bacteria In Atcc 14028 And Bacillus Cereus Atcc 11778 Cause Of Diarrhea. *Indonesian Journal of Pharma Science.* 1(1): 1-6

Jamil A.S, B. Adi, B. Prasaja, A. Ariani, Z. Hardi. 2014. Aktivitas Antimikroba Ekstrak Biji Nigella Sativa Terhadap Viabilitas Bakteri Probiotik Secara In Vitro Dan In Vivo. *Pharmacy.* 11(2): 214-228.

Jankovic, D. C.G.Feng. 2015. $CD4^+$ T Cell Differentiation In Infection : Amendment To The TH1/TH2 Axiom. Frontiers in Immunology. USA. 14.

Jun Xu1, S. Nakamura, S. Islam, Y. Guo. 2015. Mannose-Binding Lectin Inhibits the Motilityof Pathogenic Salmonella by Affecting theDriving Forces of Motility and theChemotactic Response. Journal Plus One. 1-14

Kang. J, M.A. Hossain, H.C. Park. Y.S. Kim. K.J. Lee, dan S.W. Park. 2019. Pharmacokinetic and pharmacodynamic integration of enrofloxacin against *Salmonella Enterica* after administering to broiler chicken by per-oral and intravenous routes. *Journal of Veterinary Science* 20(2): 1-12

Kusuma. H.A, Mukhtar. A, dan Dewanti. R. 2016. Pengaruh Tingkat Pembatasan Pemberian Pakan (*Restricted Feeding*) Terhadap Performan Ayam Broiler Jantan. *Sains Peternakan.* Vol 14(1):45-51.

Lee. Y.J, M.S.Kang. Y. Woo, I.P. Mo dan R.B. Tak. 2001. Comparative Exclusion Against *Salmonella gallinarum*of *Salmonella enterica* Infected Chickens. *Journal Veterinary Science.* 2(1): 33-36

Loisa, Deny. W. L, dan Hadri. L. 2016. Resistensi *Salmonella Spp*. Terhadap Beberapa Antibiotik Pada Daging Itik Di Kabupaten Bogor Yang Dapat Memengaruhi Kesehatan Konsumen. Vol 1(2): 115-120.

Maat. S. 2009. Toll-Like Reseptor (Tlr). Airlangga University Press. Surabaya. Hal. 69.

Martz. S.L.E, J.A.K McDonald. 2015. Administration of defined microbiota is protective in murine Salmonella infection model. *Scientific Report.* 5(16): 1-14

Marchelleta. R.R, M.G. Gareau, S. Okamoto, D.G. Guiney, K. E. Barret dan J. Fierer. 2015. Salmonella-induced Diarrhea Occurs in the Absence of IL-8 Receptor (CXCR2)-Dependent Neutrophilic Inflammation. JID. 2012.Maybeno, M. A. Redeker. S.P.M. Welten, B. Peters, S. M. Loughhead, S. P. Schoenberger, A. Sette1, R. Arens. 2012. Polyfunctional CD4+ T Cell Responses to Immunodominant Epitopes Correlate with Disease Activity of Virulent *Salmonella.* Journal of Plos One. 7(8): e43481-e43481.

McKelvey. J. A, Ming. Y, Yanhua. J. dan Shuping. Z. 2013. Salmonella entericaSerovar*Enterica* Antimicrobial Peptide Resistance Genes Aid in Defense against Chicken Innate Immunity, Fecal Shedding, and Egg Deposition. *Journal ASM.* Vol 82(12): p 5185-5202.

Mahadevan. V. 2014. Anatomy of the Small Intestinal. Elsevier. London. 391-395.

Mayasari.D, A.Pratiwi. 2009. Hubungan Respon Imun Dan Stres Dengan Tingkat Kekambuhan Demam Tifoid Pada Masyarakat Di Wilayah Puskesmas ColomaduKaranganyar. *Berita Ilmu Keperawatan* 2(1): 13-18.

Moreira. V.B, V.G.M. Mattaraia. A.S.A.M.T. Moura. 2015. Lifetime Reproductive Efficiency of BALB/c Mouse Pairs after an Environmental Modification at 3 Mating Ages. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 54(1): 29-34

Munasir, Z. 2001. Respon Imun Terhadap Infeksi Bakteri. *Sari pediatric.* 2(4): 193-197.

Murwani. S. 2015. Dasar-dasar mikrobiologi veteriner. UB Press. Malang. 341-342.

Muzadin.C,I, T.R. Ferasyi, dan Fakhrurrazi. 2018. Isolasi Bakteri *Salmonella sp*Dari Feses Sapi Aceh Di Pusat Pembibitan, Aceh Besar. *JIMVET* 2(3): 2540-9492.

Nakazato. G, F.L. Paganelli, J.C. Lago, F.H. Aoki, C. Mobilon, M. Brocchi, E.G. Stehling. 2010. Lactobacillus Acidophilus Decreases Salmonella Typhimurium Invasion In Vivo. *Journal Foos and Safety*. 31 (2011) 284–289.

Nafiah, F. 2018. Kenali Demam Tifoid dan Mekanismenya. Deepublish. Yogyakarta. 20-21.

Nagy. G, G. Pinczes, G. Pinter, I. Pocsi. J. Prokish, dan G. Banflvi. 2016. *Internasional Journal of Mulecular Sciences* 17: 1-8.

Nasronudin. 2011. Penyakit Infeksi di Indonesiaa dan Solusi Mendatang Edisi Kedua. Airlangga University Press. Surabaya. Hal. 202.

Obukhovska. O. 2013. The Natural Reservoirs of Salmonella *Entericai*nPopulations of Wild Birds. *Onlone Journal of Public Health Informatics.* Vol 5(1): e171.

Oliveira.F.A, ABradelli, E.C. Tondo. 2006. Antimicrobial Resisten in *Salmonella enterica*from Foods Involved in Human Salmonellosis outbreak in southern Brazil. *The New Microbiologica 29: 49-54.*

Paradise, L.J, H. Friedman, M. Bendinelli. 2002. Oportunistic Intracellular Bacteri and Immunity. Kluwer Academic Publishing. New York. 1.

Puspadewi, R. A. Adirestuti, G. Anggraeni. 2011. Aktivitas Metabolit Bakteri *Lactobacillus plantarum* dan Perannya dalam Menjaga Kesehatan Saluran Pencernaan. *Konferensi Nasional Sains dan Aplikasinya*

Puspitasari,A.K, K.A. Noianitri, dan A.S. Duniaji. 2014. Viabilitas *Lactobacillus rhamnosus*SKG 34 dalam Berbagai Jenis Enkapsulasi dan Suhu Pengujian. *JITV*. 9(2)

Pribadi. G.A. 2008. Penggunaan Mencit dan Tikus Sebagai Hewan Model Penelitian Nikotin. [Skripsi]. Fakultas Pertanian. Institut Pertanian Bogor.

Purnawijayanti.H.A. 2001. Sanitasi Higiene dan Keselamatan Kerja dalam pengolahan Makanan. Kanisius. Yogyakarta. Hal. 77.

Pyar Hassan, K.K.Peh. 2014. Characterization And Identification Of Lactobacillus Acidophilus Using Biolog Rapid Identification System. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.*

Raheja. G, Varsha. S, Redouane B, Alip. B, Ravinder. K, Seema. S. Waddah. A. Krisnamurthy. R dan Pradeep. K. D. 2010. Lactobacillus Acidophilus Stimulates The Expression Of SLC26A3 Via A Transcriptional Mechanism. *Am J PhysiolGastrointest Liver Physiol.* Vol 298: G395–G401.

Rahman. H.S, Hemn. H.O. 2017. Salmonella Infection: The Common Cause of Human Food Poisoning. Progress in Bioscience And Bioengineering. Vol 1 (1): 5-10

Rahmawati, F. S,HBintari. 2014. Studi Aktivitas Antibakteri Sari Daun Binahong (AnrederaCordifolia) Terhadap Pertumbuhan *Bacillus Cereus* Dan *Salmonella Enterica. Unnes J Life sci*3(2): 103-111.

Richardson. L. A.2015. How Salmonella Survives the Macrophage's Acid Attack. *Plos Biology Fifteenth Anniversary.*

Rusli, F.A, Z.Dwyana. 2018. Potensi Bakteri *Lactobacillus Acidophilus* Sebagai Antidiare Dan Imunomodulator. *Jurnal Biologi Makassar* 3(2): 25-30.

Tolistiawaty.I, J.Widjaja, P. Pamela .Sumolang, Octaviani. 2014. Gambaran Kesehatan pada Mencit (Mus musculus) di Instalasi Hewan Coba. Jurnal Vektor Penyakit. Vol. 8(1) 27 - 32

Sartika. D, Susilawati, dan Gusman A. 2016. Identifikasi Cemaran *Salmonella Sp.* Pada Ayam Potong Dengan Metode Kuantifikasi Di Tiga Pasar Tradisional Dan Dua Pasar Modern Di Kota Bandar Lampung. *Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian.* Vol 21(2): 89-96.

Sasmito. W.A, Agustina. D.W, Ida. F, dan Puspa. W. S. 2015. Pengujian Toksisitas Akut Obat Herbal Pada Mencit Berdasarkan Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). *Jurnal Science Veteriner*. Hal. 235-239.

Scapin. D, W.F Grandom E.M. Rossi, K.J. Perez, P. S. Malheiros, E.C. Tondo. 2012. Antagonistic activity of Lactobacillus acidophilus LA10 against Salmonella entericaserovar*Enterica* SE86 in mice. *Brazilian Journal of Microbiology* 44(1): 57-61.

Senditya, M. M.S. Hadi, T. Estiasih, E. Saparianti. 2014. Efek Prebiotik Dan Sinbiotik Simplisia Daun Cincau Hitam (*MesonaPalustrisBl*) Secara In Vivo: Kajian Pustaka. *Jurnal Pangan dan agroindustri* 2(3): 141-151.

Sharma. P, A.Singh, N.Mathur 2017. Review Synbiotics" Combinationof Probiotics And Prebiotics ". *Journal of biotechnology and Biochemistry* 3(4): 19-24.

Sirait. A.M. 2001. Analisa Varians (ANOVA) dalam Penelitian Kesehatan. *Media LItbang Kesehatan.* Vol 11(2): 39-43.

Souza. M.J. 2011. Zoonoses, Public Health and the Exotic Animal Practitioner. *Elsevier*. 14(3): 463-464

Sukmawati, F. Hardianti. 2018. Analisis Total Plate Count (TPC) Mikroba Pada Ikan Asin Kakap Di Kota Sorong Papua Barat. *Jurnal Biodjati*, 3(1): 72-78

Supriatna. I, I. B. Hismayasari, I. G. A Bidiadnyani, M. Sayuti, A. Yani. 2017. Analisis karakter bakteri probiotik. *Jurnal Airaha.* 5(2): 130-132.

Susan, H. Ben. Shailendra. K. Andrew, M. Chaterine. 2015. A Review of Bioactivity of coffe, Caffein, and Key CoffeConstituens on Inflamatory Responses Linked to Depression. *Food Research International* 76: 626-636.

Suwito. W. 2011. Distribusi Serotipe*Salmonella* Dari Rumah Potong Hewan (Rph) Dan Tempat Pemotongan Ayam (TPA) Di Bogor. *Widyariset*14(2): 361-365.

Stewart. T.H.M dan E.F. Wheelock. 2017. Cellular Immune Mechanisms and Tumor Dormancy. USA. CRC Press.

Tanauma. H.A, G. Citraningtyas, W. A. Lolo1. 2016. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Biji Kopi Robusta (Coffea Canephora) Terhadap Bakteri Escherichia Coli. *Jurnal Ilmiah Farmasi.* 5(4) 243.

Tian. T, Samra. F, Mark. C. Bruce. G, dan Daniela. B. 2017. Chemical Characterization of Potentially Prebiotic Oligosaccharides in Brewed Coffee and Spent Coffee Grounds. *Journal Agriculture and Food Chemistry*. Hal. 1-33.

Trouplin. V. N. Boucherit, L. Gorvel, F. Conti, G. Mottola, E. Ghigo. 2013. Bone Marrow-derived Macrophage Production. *Journal of Visualized of Experiments.* 81 : 1-6.

Widarnani, J.I. Noermala, Sukenda. 2014. Prebiotik, probiotik, dan sinbiotik untuk mengendalikan koinfeksi Vibrio *harveyi* dan IMNV pada udang vaname. *Jurnal Akuakultur Indonesia 13(1): 11-20.*

Wijaya. W, R.D. Ridwan. dan H.S. Budi. 2016. Antibacterial ability of arabica (*Coffeaarabica*) and robusta (Coffeacanephora) coffee extract on Lactobacillus acidophilus. *Dental Journal* 49 (2): 99-103.

Wray. C. 2000. *Salmonella* in Domestic Animal. CIBI Publishing. Florida. Hal. 118.

Yin, Y. Q, C. Zhang, J. X. Wang, J. Hou, X. Yang, dan J. Qin. 2014. Chronic caffeine treatment enhances the resilience to social defeat stress in mice. *Journal Royal Society of Chemistry*. 1-13.

Yulinery, T. E. Yulianto, N. Nurhida. 2006. Uji Fisiologis Probiotik Lactobacillus sp. Mar 8 yang Telah Dienkapsulasi dengan Menggunakan Spray Dryer untuk Menurunkan Kolesterol. *Jurnal Biodiversitas.* 7(2): 188-122.

Zola. H, B.Swart, I.Nicholson, E.Vos. 2007. Leukocyte and Stromal Cell Molecules The CD Makers. Willey. Canada. 349-350.