

**PENGARUH KOMBINASI EKSTRAK KOPI ROBUSTA
LAMPUNG DAN *Lactobacillus acidophilus* PADA
MENCIT *Balb/c* YANG DIINDUKSI *Salmonella*
enterica TERHADAP JUMLAH BAKTERI ILEUM DAN
GAMBARAN HISTOPATOLOGI ILEUM**

SKRIPSI

Oleh:

MUHAMMAD ZULIONO DWI RISKY PRIAMBUDI

165130100111015



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2020**

**PENGARUH KOMBINASI EKSTRAK KOPI ROBUSTA
LAMPUNG DAN *Lactobacillus acidophilus* PADA
MENCIT *Balb/C* YANG DIINDUKSI *Salmonella*
enterica TERHADAP JUMLAH BAKTERI ILEUM DAN
GAMBARAN HISTOPATOLOGI ILEUM**

SKRIPSI

Oleh:

MUHAMMAD ZULIONO DWI RISKY PRIAMBUDI

165130100111015



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2020**

**PENGARUH KOMBINASI EKSTRAK KOPI ROBUSTA LAMPUNG
DAN *Lactobacillus acidophilus* PADA MENCIT *Balb/C* YANG DIINDUKSI
Salmonella enterica TERHADAP JUMLAH BAKTERI ILEUM
DANGAMBARAN HISTOPATOLOGI ILEUM**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:
MUHAMMAD ZULIONO DWI RISKY PRIAMBUDI
165130100111015



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2020**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

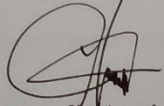
Pengaruh Kombinasi Ekstrak Kopi Robusta Lampung dan *Lactobacillus acidophilus* pada Mencit Balb/C yang Diinduksi *Salmonella enterica* Terhadap Jumlah Bakteri Ikum dan Gambaran Histopatologi Ileum

Oleh:

MUHAMMAD ZULIONO DWI RISKY PRIAMBUDI
NIM. 165130100111015

Setelah dipertimbangkan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 13 Januari 2020
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing



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

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya



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

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Muhammad Zuliono Dwi Risky Priambudi

NIM : 165130100111015

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulisan Skripsi berjudul:

Pengaruh Kombinasi Ekstrak Kopi Robusta Lampung dan *Lactobacillus acidophilus* Pada Mencit Balb/Cyang Diinduksi *Salmonella enterica* Terhadap Jumlah Bakteri Ileum dan Gambaran Histopatologi Ileum

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 di kemudian hari ternyata skripsi yang saya tuliskan terbukti hasiljiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan kesadaran.

Malang, 13 Januari 2020

Yang menyatakan,

Muhammad Zuliono Dwi Risky Priambudi

NIM. 165130100111015

Pengaruh Kombinasi Ekstrak Kopi Robusta Lampung dan *Lactobacillus acidophilus* pada Mencit Balb/C yang Diinduksi *Salmonella enterica* Terhadap Jumlah Bakteri Ileum dan Gambaran Histopatologi Ileum

ABSTRAK

Salmonellosis dapat disebabkan oleh *S. enterica*. Gejala klinis yang dapat teramati yaitu diare. *S. enterica* dapat memicu terjadinya kerusakan pada ileum. Kandungan kopi robusta Lampung seperti kafein, CGA dan alkaloid dapat sebagai antibakteri sehingga diharapkan dapat menekan jumlah *S. enterica* dan dikombinasikan dengan *L. acidophilus* sebagai kompetitor *S. enterica*. Tujuan dari penelitian ini yaitu mengetahui pengaruh pemberian kombinasi ekstrak kopi robusta Lampung dan *Lactobacillus acidophilus* terhadap jumlah bakteri pada ileum dan perbaikan organ ileum pada mencit Balb/C model salmonellosis. Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini yaitu studi eksperimental dengan metode RAL dengan pengambilan data *post test only control design*. Hewan coba menggunakan mencit Balb/C jantan umur 8 minggu, BB 20-25 gram sebanyak 24 ekor. Terdapat 6 kelompok perlakuan yaitu : K- (sehat), K+ (*S. enterica*), K. *Lactobacillus* (*L. acidophilus* dan *S. enterica*), P1, P2 dan P3 merupakan kelompok yang diberikan kombinasi ekstrak kopi robusta Lampung dan *L. acidophilus*. Dosis ekstrak kopi robusta Lampung yang digunakan yaitu mulai dari 250 mg/kg BB, 500 mg/kg BB dan 750 mg/kg BB. Parameter yang diamati yaitu jumlah bakteri pada ileum menggunakan metode TPC. Gambaran histopatologi ileum dianalisis secara deskriptif. Berdasarkan hasil yang didapat, pemberian kombinasi ekstrak kopi robusta Lampung dengan dosis 250 mg/kg BB dan *L. acidophilus* dapat meningkatkan jumlah bakteri serta mencegah kerusakan ileum.

Kata kunci : Ileum, Kopi robusta Lampung, *Lactobacillus acidophilus*, mencit Balb/C, *Salmonella enterica*.

**The Effect Of The Combination Of Lampung Robusta Coffee Extract
And *Lactobacillus acidophilus* On The Amount Of Bacteria And Ileum
Histopathology In *Salmonella enterica* Induce Mice Balb/C**

ABSTRACT

Salmonellosis is a disease that can be caused by *Salmonella enterica*. Clinical signs that can be observed are gastroenteritis and diarrhea. *S. enteritidis* entered the body and initiate damage towards the ileum. Contents from Lampung Robusta coffee such as caffeine, CGA and alkaloid has antibacterial properties which can be used to decrease the amount of infection caused by *S. enterica* combined with *Lactobacillus acidophilus* as a competitor. The aim of this research is to acknowledge the effect of combination of Lampung Robusta coffee extract with *L. acidophilus* towards the quantity of bacteria and the ileum's healing in salmonellosis Balb/C mice. This research used experimental study with RAL method which takes data in post test only control design. The 24 mice used were all Balb/C male mice, aged 8-10 weeks with body weight around 20-25 grams. The mice was then divided into 6 groups with different treatments. First group was used as negative controls with no induction, and the second was used as the positive control which was induced by *S. enterica*. The third group was induced by *S. enterica* and was given a shot of *L. acidophilus*. Group 4 (P1), group 5 (P2) and group 6 (P3) were all induced by *S. enterica* and combination of Lampung Robusta coffee extract with *L. acidophilus*. Dosage of the Lampung Robusta coffee extract used in this research was 250 mg/Kg (P1), 500 mg/Kg (P2) and 750 mg/Kg (P3). Parameters studied in this research are the quantity of bacteria using total plate count method, and descriptive analysis using histopathology of the ileum. Based on the results obtained, the combination of Lampung Robusta coffee extract with a dose of 250 mg /Kg and *L. acidophilus* can increase the quantity of bacteria and prevent ileum damage.

Key word : Ileum, Robusta Lampung Coffee, *Lactobacillus acidophilus* Balb/C mice, *Salmonella enterica*.

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL iii

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI Error! Bookmark not defined.

LEMBAR PERNYATAAN v

ABSTRAK vi

KATA PENGANTAR viii

DAFTAR ISI x

DAFTAR TABEL xiii

DAFTAR GAMBAR xiv

DAFTAR LAMPIRAN xv

DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG xvi

BAB I PENDAHULUAN 1

1.1 Latar belakang 1

1.2 Rumusan Masalah 3

1.3 Batasan masalah 3

1.4 Tujuan Penelitian 5

1.5 Manfaat Penelitian 5

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA 6

2.1 Salmonellosis 6

2.1.1 Morfologi dan Taksonomi 6

2.1.2 Gejala Klinis 8

2.1.3 Patomekanisme	8
2.1.4 Peneguhan Diagnosa	9
2.1.5 Pengobatan	9
2.2 Respon Imun Terhadap <i>Salmonella enterica</i>	10
2.3 Kopi Robusta	10
2.4 Mencit (<i>Mus musculus</i>)	13
2.5 Bakteri Asam Laktat	14
2.6 Ileum	16
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	17
3.1 Kerangka Teori	17
3.2 HIpotesis Penelitian	19
BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN	20
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	20
4.2 Alat dan Bahan Penelitian	20
4.3 Sampel Penelitian	21
4.4 Rancangan Penelitian	22
4.5 Variabel Penelitian	24
4.6 Tahapan Penelitian	25
4.6.1 Persiapan Hewan Coba	25
4.6.2 Pembuatan Suspensi <i>Salmonella enterica</i>	25
4.6.3 Pembuatan Ekstrak Kopi	26
4.6.4 Pengujian Fitokimia	26
4.6.5 Perlakuan Hewan Coba	28
4.6.6 Euthanasi dan Pembedahan	29
4.6.7 Kultur dan Perhitungan Bakteri	29
4.6.8 Pembuatan dan Pengamatan Histopatologi Ileum	30
4.6.9 Uji Konfirmasi	31
4.6.10 Analisis Data	33
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN	35
5.1 Hasil Uji Sensitifitas	35

5.2 Pengaruh Kombinasi Terhadap Konsistensi Feses.....	36
5.3 Hasil Perhitungan Jumlah Bakteri Ileum.....	39
5.4 Hasil Pemeriksaan Histopatologi Ileum.....	42
BAB 6 PENUTUP.....	47
6.1 Kesimpulan.....	49
6.2 Saran.....	49
DAFTAR PUSTAKA.....	50





DAFTAR TABEL

Tabel

Halaman

4.1 Rancangan kelompok penelitian.....	22
5.1 Uji Sensitifitas Bakteri.....	35
5.2 Tampilan Feses.....	37
5.3 Jumlah Bakteri.....	39
5.4 Panjang dan Lebar Vili.....	42
5.5 Skoring Vili.....	43



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2. 1 <i>Salmonella sp.</i>	7
2. 2 Lapisan buah kopi	11
2.3 Mencit.....	13
2. 4 <i>Lactobacillus sp.</i>	16
2. 5 Vili usus	16
5. 1 Histopat ileum	44



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran

Halaman

1 Patogen free.....	59
2 Laik etik.....	60
3 Perhitungan dosis.....	62
4 Pengujian fitokimia.....	68
5 Kerangka operasional penelitian.....	71
6 Kandungan kopi.....	72
7 Pembuatan ekstrak kopi.....	74
8 Identifikasi <i>Salmonella sp</i>	75
9 Identifikasi <i>Lactobacillus sp</i>	76
10 Uji in vitro.....	77
11 Perhitungan jumlah koloni bakteri.....	78
12 Perhitungan panjang dan lebar .vili.....	80
13 Koloni Bakteri.....	84

DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

BAL	: Bakteri Asam Laktat
BB	: Berat Badan
CFU	: <i>Colony Forming Unit</i>
CGA	: <i>Chlorogenic acids</i>
G	: Gram
HE	: Hematoxylin-Eosin
IgA	: Inunoglobulin A
Kg	: Kilogram
L	: <i>Lactobacillus</i>
ML	: Mililiter
MRSA	: de Man, Rogosa and Sharpe Agar
NK	: <i>Natural killer</i>
S	: <i>Salmonella</i>
TPC	: <i>Total Plate Count</i>

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Dunia perunggasan merupakan salah satu subsektor perekonomian yang paling diminati di Indonesia.

Adanya kesadaran masyarakat mengenai kebutuhan konsumsi makanan bernilai gizi tinggi menyebabkan peningkatan kebutuhan bahan makanan yang berasal dari protein hewani.

Namun, peningkatan permintaan tersebut tidak diimbangi oleh peningkatan produksi.

Pada tahun 2009, industri perunggasan di Indonesia mengalami penurunan akibat adanya unggas-unggas yang mati secara mendadak. Salah satu penyebab infeksi yang dapat menyebabkan kerugian akibat penurunan produksi adalah adanya penyakit salmonellosis (Afriyani, 2016).

Menurut Kusumaningsih (2011), *Salmonella enterica* merupakan bakteri patogen yang dapat mencemari makanan maupun minuman. Selain itu juga dapat menyebabkan gangguan pada sistem pencernaan misalnya gastroenteritis. Tidak hanya menyebabkan gangguan pada sistem pencernaan, *Salmonella enterica* yang masuk ke dalam tubuh akan masuk menembus dinding usus lalu menuju sistem limfatik dan masuk ke dalam sirkulasi peredaran darah sehingga bakteri dapat menyebar ke seluruh organ dan menyebabkan kerusakan pada organ lain.

Penggunaan antibiotik pada kasus salmonellosis dirasa kurang efektif sebab tidak memberikan hasil yang nyata.

Menurut Utami (2011), adanya penggunaan antibiotik juga dapat menimbulkan permasalahan baru, yaitu dapat membunuh bakteri yang bermanfaat bagi tubuh serta dapat memicu timbulnya resistensi antibiotik pada pemakaian antibiotik yang tidak tepat. Berdasarkan beberapa hal tersebut dibutuhkan obat yang lebih efektif serta memiliki efek samping yang seminimal mungkin. Salah satunya yaitu dengan penggunaan kombinasi antara ekstrak kopi robusta Lampung dan *Lactobacillus acidophilus*.

Menurut Maheswari (2015) kopi mengandung beberapa zat diantaranya yaitu CGA (*chlorogenic acid*), kafein dan *trigonelline*. Terdapat 2 jenis kopi yang umum di Indonesia yaitu arabika dan robusta. Menurut Wijaya (2016) Pada kopi arabika mengandung kafein kurang lebih sebanyak 0,4 % sampai 2,4 % dari total berat kering dan untuk kopi robusta memiliki kandungan kafein sebanyak 1 % sampai 2% dan juga asam organik sebanyak 10,4%. Menurut (Tome, 2011) CGA (*chlorogenic acid*) yang terkandung dalam kopi bersifat antibakteri sehingga diharapkan dapat membunuh bakteri yang bersifat patogen dalam tubuh. Selain itu, kandungan oligosakarida dalam kopi dapat digunakan sebagai makanan bakteri asam laktat sehingga diharapkan jumlah bakteri asam laktat pada sistem pencernaan dapat meningkat. Peningkatan jumlah bakteri asam laktat diharapkan dapat menekan pertumbuhan bakteri yang bersifat patogen dalam tubuh serta dapat meningkatkan imunitas hospes. Penambahan *Lactobacillus acidophilus* bertujuan untuk mencegah terjadinya iritasi pada saluran pencernaan yang disebabkan oleh kandungan kafein pada kopi (Arief, 2010).

Berdasarkan beberapa hal di atas maka pada penelitian ini dilakukan bertujuan untuk mengetahui pengaruh dari pemberian kombinasi ekstrak kopi robusta Lampung dengan *Lactobacillus acidophilus* untuk mengetahui jumlah bakteri dalam ileum dan histopatologi organ ileum pada mencit (*Mus musculus*) Balb/C yang diinduksi oleh *Salmonella enterica* yang sesuai dengan rumusan masalah di bawah ini.

1.2 Rumusan Masalah

Permasalahan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Apakah pemberian kombinasi ekstrak kopi robusta Lampung dan *Lactobacillus acidophilus* berpengaruh pada jumlah bakteri pada ileum mencit Balb/C?
2. Apakah pemberian kombinasi ekstrak kopi robusta Lampung dan *Lactobacillus acidophilus* berpengaruh terhadap perbaikan histopatologi ileum mencit Balb/C?

1.3 Batasan masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka penelitian ini dibatasi pada:

1. Hewancoba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit Balb/C umur 8 minggu dan berat badan rata-rata antara 20-25 gram yang berasal dari Laboratorium Hewan Coba UIN. Mencit yang dipakai dinyatakan bebas patogen dibuktikan dengan surat keterangan bebas patogen pada (Lampiran 1)

serta telah mendapatkan surat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya No. 1110-KEP-UB (LAMPIRAN 2).

2. Hewan coba mencedikan diberikan perlakuan induksi *Salmonella enterica*. *Salmonella enterica* 10^8 CFU/mL yang diberikan, didapatkan dari BB Vet

Wates.

3. Kopi robusta Lampung yang digunakan untuk pembuatan ekstrak, diperoleh dari Lampung dan dilakukan pembuatan ekstrak di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah jumlah bakteri organ ileum dan histopatologi ileum menggunakan pewarnaan *haematoxylin-eosin* (HE).

5. Konsentrasi ekstrak kopi robusta Lampung yang digunakan adalah 250 mg/Kg BB dan 0,5 mL *Lactobacillus acidophilus* pada perlakuan pertama, 500 mg/Kg BB dan 0,5 mL *Lactobacillus acidophilus* pada perlakuan kedua, 750 mg/Kg BB dan 0,5 mL *Lactobacillus acidophilus* pada perlakuan ketiga. Pemberian kombinasi ekstrak kopi robusta dan *Lactobacillus acidophilus* secara peroral menggunakan sonde lambung selama 15 hari.

6. Dosis infeksi *S. enterica* 10^8 CFU/ ml. Per ekor mencedikan sebanyak 0,5 mL selama 2 hari secara peroral.

7. Perhitungan jumlah bakteri menggunakan metode perhitungan TPC.

1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah diatas, maka tujuan penelitian ini adalah:

1. Mengetahui pengaruh pemberian kombinasi ekstrak kopi robusta Lampung dan *Lactobacillus acidophilus* terhadap jumlah bakteri pada ileum mencit *Balb/C*.
2. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kopi robusta Lampung dan *Lactobacillus acidophilus* terhadap histopatologi ileum mencit *Balb/C*.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini yaitu sebagai bahan informasi sertadasar bagi penelitian selanjutnya yang berkaitan mengenai kombinasi ekstrak kopi robusta Lampung dan *Lactobacillus acidophilus* sebagai pencegahan serta pengobatan salmonellosis.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Salmonellosis

Salmonellosis merupakan penyakit yang disebabkan oleh *Salmonella enterica*.

Bakteri ini berada pada saluran pencernaan, tetapi juga dapat ditemukan pada feses maupun lingkungan sekitar seperti air, tanah, tanaman, dan debu. Salmonellosis bersifat *food borne disease* yang

dapat mengakibatkan gangguan saluran cerna dengan gejala utama gastroenteritis.

Infeksi *S. enterica* pada ayam dapat menyerang semua umur dengan gejala klinis yang bervariasi. Pada ayam pedaging dapat menimbulkan gejala klinis yang jelas dan mengakibatkan penurunan berat badan antara 16-24% dalam kurun waktu 3 minggu.

Sedangkan pada

ayam petelur mengakibatkan kerugian ekonomi dengan penurunan produksi telur,

fertilitas, dan kematian embrio (Kusumaningsih, 2011).

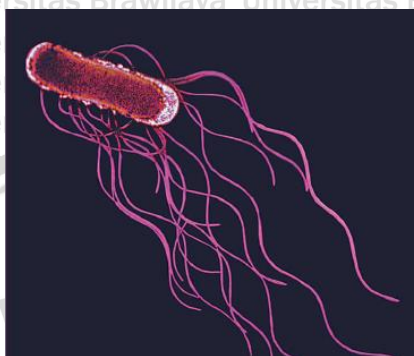
2.1.1 Morfologi dan Taksonomi

Taksonomi dari *Salmonella sp.* menurut Putri (2016) sebagai berikut :

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Gamma proteobacteria
Ordo	: Enterobacteriales
Famili	: Enterobacteriaceae

Genus : *Salmonella*

Spesies : *Salmonella enterica*



Gambar 2. 1 *Salmonella* sp. (Brands, 2006).

Menurut Mahmoud (2011) *Salmonella* sp. merupakan anggota bakteri *enterobacteriaceae*, termasuk dalam bakteri gram negatif dan tidak termasuk dalam golongan bakteri koliform. *Salmonella* sp. dapat berkembang secara optimal pada suhu 35-37 °C. Berdasarkan genus *Salmonella* sp. terdapat 2 spesies yaitu *S. enterica* dan *S. bongori*. Pengelompokan selanjutnya dapat berdasarkan spesies, subspecies dan serotipe. Pada pengklasifikasian berdasarkan serotipe dapat dilihat dari jenis antigen yang dimiliki. Terdapat beberapa macam jenis antigen yang dimiliki oleh *Salmonella* sp. diantaranya yaitu antigen O (somatik), antigen H (flagel) dan antigen K (kapsular). *Salmonella* sp memiliki flagel seperti pada **Gambar 2.1** yang berfungsi sebagai alat gerak sehingga bersifat *motil*. Selain itu, flagel juga berfungsi untuk membantu saat proses adesi pada mukosa usus (Anjung, 2016).

Menurut Ariyanti dan Supar (2008) antigen lipopolisakarida merupakan bagian paling luar dari *Salmonella* sp. yang berfungsi untuk mempertahankan diri dan juga yang membuat *Salmonella* sp. menjadi patogenik. Namun Menurut Rycroft (2000)

khusus pada jenis *Salmonella enteritidis* tidak memiliki lapisan polisakarida ini sehingga lapisan terluarnya hanya berupa rantai cabang lateral dari komponen LPS.

Pada *Salmonella enteritidis* bagian *Lipid A* yang terdapat di bagian membran luar dapat memicu timbulnya respon antibodi pada hewan yang sensitif seperti mencit.

Antigen *fimbria* pada *Salmonella enteritidis* berupa organel filamen yang terletak pada permukaan sel. *Salmonella enteritidis* memiliki *fimbria* SEF14 yang akan terbentuk optimal pada saat suhu 37°C.

2.1.2 Gejala Klinis

Pada kasus salmonellosis terdapat beberapa gejala klinis yang dapat muncul diantaranya yaitu diare. Diare menurut Nugrahyu (2011) merupakan peningkatan frekuensi buang air besar disertai perubahan konsistensi feses menjadi lebih cair. *Salmonella enterica* dapat mengeluarkan toksin yang menstimulasi sekresi cairan dan menurunkan proses absorpsi garam dan air di dalam usus serta selain itu dapat menyebabkan kerusakan pada sel mukosa usus sehingga dapat terjadi diare. Selain diare gejala klinis yang muncul adalah demam, mual, muntah dan gangguan sistem pencernaan.

2.1.3 Patomekanisme

Salmonella enterica yang dapat bertahan dari asam lambung akan masuk pada bagian usus halus. Setelah melakukan adesi pada usus halus bakteri akan menembus lapisan mukosa epitel usus dan menyebabkan tukak pada mukosa usus. Setelah berhasil menembus lapisan usus *Salmonella enterica* akan multiplikasi di bagian

lamina propia lalu masuk menuju kelenjar getah bening mesenterium. Bakteri masuk ke dalam sistem sirkulasi sehingga nantinya akan menyebar ke berbagai organ sehingga menyebabkan infeksi sistemik yang berujung dengan kematian. *Salmonella enterica* akan ikut keluar bersama dengan feses dan nantinya akan menginfeksi hewan lain (Baumler et al, 2000).

2.1.4 Peneguhan Diagnosa

Peneguhan diagnosa dapat dilihat berdasarkan dari gejala klinis yang muncul, salah satu contoh yaitu diare. Namun, untuk memastikan bahwa diare yang terjadi disebabkan oleh *Salmonella sp.* maka dibutuhkan pengujian laboratorium. Uji laboratorium yang dapat dilaksanakan diantaranya yaitu kultur darah. Interpretasi positif pada kultur darah akan menunjukkan tubuh mengalami bakteremia yaitu adanya bakteri dalam sirkulasi darah. Selain dengan uji kultur darah dapat juga dengan uji reaksi aglutinasi (Cita, 2011).

2.1.5 Pengobatan

Pada kasus salmonellosis selain menghilangkan penyebab terjadinya diare dengan menggunakan obat-obatan antibiotik misalnya kloramfenikol, harus disertai dengan terapi cairan. Terapi cairan menurut Suartha (2010) merupakan salah satu tindakan pengobatan yang penting pada pasien yang memerlukan perawatan intensif atau dalam kondisi kritis. Tujuan pemberian terapi cairan yaitu menjaga tingkat hidrasi dalam tubuh serta keseimbangan elektrolit dalam

tubuh. Peningkatan frekuensi buang air besar dapat diturunkan dengan pemberian obat antidiare misal loperamid yang mampu mengurangi peristaltik (Nurmasari, 2010).

2.2 Respon Imun Terhadap *Salmonella enterica*

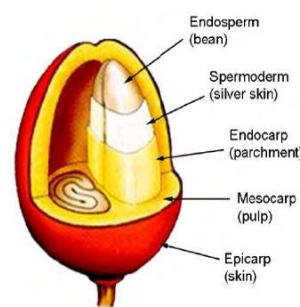
Menurut Aryanti dan Supar (2008) terdapat dua mekanisme pertahanan tubuh dalam menanggapi adanya infeksi bakteri. Diantaranya yaitu kekebalan non spesifik (*innate immunity*) dan kekebalan spesifik. Kekebalan non spesifik merupakan usaha dari tubuh untuk mencegah masuknya mikroorganisme sehingga mencegah kerusakan jaringan. Pada kekebalan non spesifik terdapat beberapa mekanisme yang terjadi diantaranya yaitu keluarnya sel polimorfonuklear dan makrofag yang berfungsi untuk memfagositosis bakteri, pelepasan CRP (*C-reactive protein*) yang dapat mengikat mikroorganisme sehingga memicu aktivasi komplemen dan menyebabkan lisis mikroorganisme. Selain itu dengan pelepasan granula yang mengandung *perforin* oleh sel *natural killer* (NK) yang menyebabkan kematian mikroorganisme (Munasir, 2001). Tubuh akan membentuk pertahanan spesifik yang sifatnya lebih kompleks jika terdapat mikroorganisme yang lolos dari pertahanan kekebalan non spesifik. Pada pertahanan spesifik, sel limfosit B akan memproduksi antibodi yang spesifik terhadap antigen yang masuk kedalam tubuh.

2.3 Kopi Robusta

Berdasarkan *Integrated Taxonomic Information System* (2011), Tanaman kopi memiliki klasifikasi sebagai berikut:

Kingdom : Plantae

Divisi : Tracheophyta
 Subdivisi : Spermatophyta
 Infradivisi : Angiospermae
 Kelas : Magnoliopsida
 Ordo : Gentianales
 Famili : Rubiaceae
 Genus : Coffea
 Spesies : *Coffea canephora*



Gambar 2. 2 Lapisan buah kopi (Zaini, 2009).

Tumbuhan kopi menurut Kurniawan (2017) merupakan tumbuhan yang dapat berkembang baik di daerah iklim tropis dan subtropis. Tanaman yang masih termasuk dalam famili *Rubiaceae* ini memiliki beberapa jenis diantaranya yaitu *Coffea arabica* dan *Coffea canephora*. Menurut Nopitasari (2010) tumbuhan kopi akan mulai menghasilkan buah kurang lebih 4 tahun dan akan berbuah secara optimal pada umur 8 tahun. Terdapat beberapa perbedaan antara kopi arabika dan kopi robusta. Kopi robusta selain memiliki kandungan kafein yang lebih tinggi jika

dibandingkan dengan kopi arabika, kopi robusta juga lebih tahan terhadap hama penyakit.

Menurut Zaini(2009) seperti pada **Gambar 2.2**, buah kopi tersusun dari bagian *exocarp* (kulit buah), *mesocarp* (daging buah), *endocarp*(kulit tanduk), kulit ari dan endosperma. Pada bagian endosperma terdapat senyawa kimia yang dapat mempengaruhi kualitas dari kopi. Kandungan senyawa kafein pada kopi robusta sebanyak 1,6-2,4% dan cenderung lebih tinggi jika dibandingkan dengan kandungan kafein pada kopi arabika yaitu 0,9-1,2% (Kuncoro dkk, 2018).

Menurut Farhaty (2016) terdapat beberapa senyawa kimia yang terdapat dalam kopi diantaranya yaitu kafein. Kafein menurut Tanuma dkk. (2016) adalah senyawa alkaloid yang dapat berfungsi sebagai antibakteri. Gugus basa yang mengandung nitrogen yang dapat menyebabkan kerusakan pada DNA bakteri. Kerusakan DNA bakteri disebabkan oleh adanya kontak gugus basa dengan asam amino yang terdapat pada dinding bakteri. Reaksi ini dapat menyebabkan perubahan dari struktur susunan DNA sehingga DNA mengalami perubahan keseimbangan yang dapat berakibat lisis inti sel bakteri sehingga bakteri akan mengalami kematian.

Selain itu terdapat juga senyawa CGA. CGA (Asam klorogenat). Menurut Farhaty (2016) asam klorogenat merupakan gabungan antara asam kuinant dan asam trans-sinamat. CGA tergolong dalam keluarga ester dan termasuk dalam komponen fenolik serta dapat larut dalam air. Selain berfungsi sebagai antioksidan, CGA dapat berfungsi sebagai hepatoprotektor, berperan dalam kegiatan antipasmodik serta dapat bersifat antibakteri dengan menghilangkan integritas membran sel bakteri. Selain

kandungan kafein dan CGA yang dapat bersifat antibakteri, senyawa flavonoid yang terdapat pada kopi, dengan adanya gugus alkohol dalam flavonoid dapat merusak sel bakteri. Hal ini disebabkan oleh adanya perbedaan kepolaran antara gugus alkohol dengan sel bakteri (Tanuma dkk, 2016).

2.4 Mencit (*Mus musculus*)

Berdasarkan klasifikasinya, menurut Arrington (1972) mencit memiliki taksonomi sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Famili	: Muridae
Genus	: Mus
Spesies	: <i>Mus musculus</i>



Gambar 2. 3 Mencit (*Mus musculus*) (Silitonga, 2008).

Menurut Pribadi (2008) mencit (**Gambar 2.3**) masih tergolong dalam satu family dengankus yaitu family Muridae.

Penggunaan mencit sebagai hewan coba dalam suatu penelitian memiliki beberapa alasan, diantaranya yaitu memiliki siklus hidup yang pendek sehingga tidak membutuhkan waktu penelitian yang cukup lama untuk perlakuan dan tidak memerlukan penanganan khusus dikarenakan kansel intergolong dalam hewan omnivor a, juga jinak serta cukup ekonomis untuk pakan. Menurut Pramesti (2018) kebutuhan nutrisi yang harus dipenuhi per hari diantaranya 20-25% protein, 5-12%, lemak, 2,5 % serat kasar serta 45-60% karbohidrat.

2.5 Bakteri Asam Laktat

Menurut Romadhon (2012) bakteri asam laktat merupakan bakteri golongan gram positif, tidak bersepora, bereaksi negatif pada uji katalase dan sebagian besar toleran terhadap asam namun bakteri asam laktat juga memiliki pH optimum untuk pertumbuhan. Selain itu, bakteri asam laktat dapat mengeluarkan produk hasil fermentasi karbohidrat yaitu asam laktat. Terdapat dua jalur metabolisme yang digunakan oleh bakteri asam laktat untuk mengubah karbohidrat menjadi asam laktat dan energi. Dua jalur tersebut adalah jalur metabolisme homofermentatif dan heterofermentatif. Pada jalur metabolisme homofermentatif hasil dari fermentasi hanya berupa asam laktat, namun pada jalur metabolisme heterofermentatif hasil dari fermentasi selain berupa asam laktat, dihasilkan juga etanol dan karbon dioksida.

Selain menghasilkan asam laktat menurut Yusmarini dkk. (2010) beberapa bakteri asam laktat misalnya *Lactobacillus acidophilus* memiliki enzim proteolitik yang membantu bakteri tumbuh pada substrat yang kaya akan protein. Terdapat beberapa jenis bakteri asam laktat yang dapat dikelompokkan berdasarkan filum yaitu filum *Firmicutes*, kelas *Bacilli* seta Ordo *Lactobacillales*. Berdasarkan bentuknya, terdapat dua bentuk bakteri yaitu kokus seperti *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Streptococcus* dan *Aerococcus* serta bakteri yang berbentuk batang seperti *Lactobacillus* dan *Carnobacterium* (Mahulette, 2019).

Salah satu dari bakteri asam laktat yaitu *Lactobacillus acidophilus*. Menurut Suwayvia (2017) kalsifikasi *Lactobacillus acidophilus* yaitu:

Kingdom : Bakteria

Filum : Firmicutes

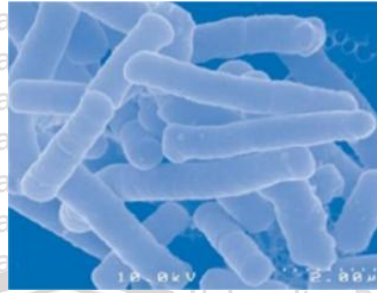
Kelas : Bacili

Ordo : Lactobacillales

Famili : Lactobacillaceae

Genus : Lactobacillaceae

Spesies : *Lactobacillus acidophilus*



Gambar 2. *Lactobacillus* sp. (Tambunan, 2016).

Lactobacillus acidophilus (**Gambar 2.4**) merupakan bakteri yang dapat tumbuh sampai suhu 37°C pada pH kurang dari 5. Jenis bakteri ini tidak dapat memfermentasi ribosa serta pada umumnya *Lactobacillus acidophilus* membutuhkan beberapa zat untuk mendukung pertumbuhannya diantaranya yaitu asetat, riboflavin, asam pantotenat, kalsium, miosin serta asam folat. Menurut Tambunan (2016) *Lactobacillus acidophilus* dapat mencegah adanya infeksi mikroba yang bersifat patogen dengan cara mengeluarkan asidosin, asidofilin dan bakteriosin serta dengan menjaga kondisi asam dalam tubuh (Ariyani, 2013).

2.6 Ileum

Usus dibagi menjadi dua, yaitu usus besar dan usus halus. Pada usus halus terdapat beberapa bagian diantaranya yaitu duodenum, jejunum dan ileum.

Ileum merupakan bagian usus halus yang terakhir sebelum masuk ke usus besar. Pada membran mukosa usus dilapisi oleh vili. Vili (**Gambar 2.5**) berfungsi untuk memperluas bidang penyerapan sehingga nutrisi dari makanan dapat terserap secara maksimal. Selain vili pada usus juga terdapat kriptaliberkun.

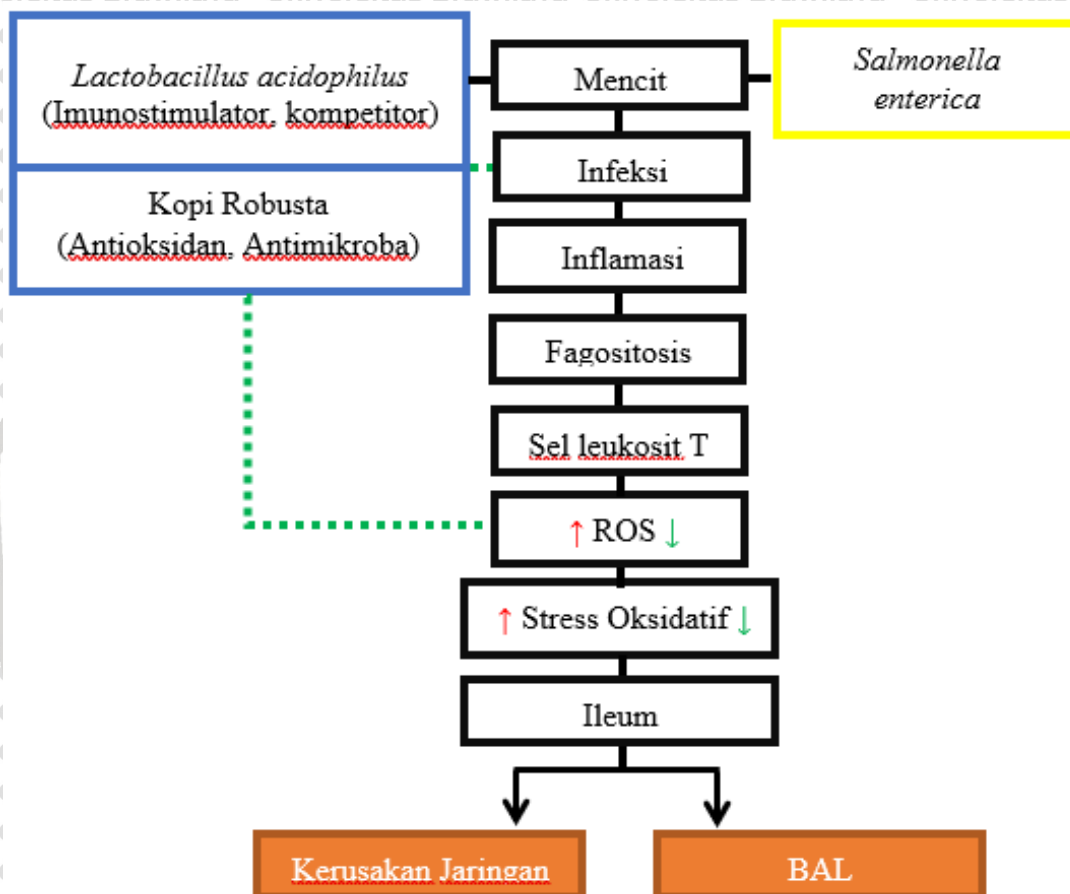
Kriptaliberkunataukelenjarususmenurut Zainuddin dkk. (2016) merupakan kelenjar yang terdapat pada membrane mukosa antaravili. Pada vili dan kelenjar usus dilapisi oleh epitel yang terdiri dari enterosit yang berfungsi untuk sekresi air serta elektrolit dan sel goblet yang berfungsi untuk mensekresikan mucus. Mucus yang dihasilkan oleh sel goblet berfungsi untuk melindungi usus.

Gambar 2. 5 Histologi ileum



BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 KerangkaTeori



Keterangan



= Variabel yang diamati



= Efek induksi salmonellosis



= Efek kombinasi



= Proses



= Perlakuan kombinasi



= Perlakuan salmonellosis

Salmonella enterica dapat melakukan adhesi (penempelan) pada epitel usus menggunakan fimbriae yang nantinya akan menjadi penyebab dari beberapa permasalahan di sistem pencernaan misal gastroenteritis. Untuk mencegah terjadinya gangguan dalam sistem pencernaan maka dapat diberikan campuran antara ekstrak kopi robusta Lampung dan *Lactobacillus acidophilus* dengan harapan, selain dapat memberikan efek antibakteri, juga dapat berfungsi sebagai imunomodulator. Kandungan CGA (*Chlorogenic acid*) dalam kopi robusta Lampung dapat bersifat sebagai antibakteri. Hal ini dikarenakan CGA dapat merusak dinding sel bakteri dengan menghilangkan integritas sel sehingga dapat menyebabkan kematian pada sel bakteri. Namun, dalam kopi terdapat kafein yang dapat mengiritasi mukosa saluran pencernaan. Sehingga untuk mengurangi adanya iritasi tersebut ditambahkan bakteri asam laktat yaitu *Lactobacillus acidophilus* sebagai pelapis. Selain berfungsi sebagai pelapis, peningkatan jumlah bakteri asam laktat dapat menekan jumlah bakteri yang bersifat patogen. Hal ini dikarenakan bakteri asam laktat mampu menginduksi pembentukan IgA. IgA merupakan imunoglobulin yang dapat ditemukan pada membran mukosa. IgA selain dapat menghambat adhesi bakteri patogen dengan cara memblokir reseptor epitel, IgA juga dapat melindungi dari degradasi enzim proteolitik pada imunoglobulin serta dapat menghambat efek inflamasi.

Masuknya bakteri ke dalam tubuh dapat memicu munculnya respon imun.

Respon imun yang muncul ditandai dengan adanya peningkatan aktivitas self-fagosit yaitu makrofag serta neutrofil. Sel-

selfagositanmulaimelakukanfagositosis antigen denganbantuanenzimlisosim.

Setelah terfagositosis antigen tersebutberubahmenjadifragmen-fragmen protein yang nantinyaakandipresentasikankesel T. sel T naif yang teraktivasiakanmemproduksi IL-2 sertaakanmengalamideferensiasimenjadisel Th1. Pada sel Th1 akanmenghasilkan IL-2 serta IFN.

Sitokin IFN- γ yang dikeluarkan oleh sel Th1 akanmenstimulasifaktortranskripsisehinggaakanmemicuekspresiberbagaienzimfagolis osommakrofag. Salah satudarienzimtersebutdapatmenghasilkan ROS (*reactive oxygen species*). ROS dapatberfungsisebagaipenghancurmikroba yang teringestidalamvesikel. Namunproduksi ROS yang berlebihanmemilikiefeksampingdikarenakan ROS merupakanradikalbebas yang dapatmenyebabkanrusaknyaembranseldenganmengangguupermeabilitasselmakadarii tuantioksidan yang didatpkandariiekstrak kopi ditujukanuntukmenekanadanyaradikalbebas yang berlebihansehinggamencegahterjadinya stress oksidatif.

3.2 HipotesisPenelitian

1. Efekpemberiankombinasiekstrak kopi robustaLampung dan *Lactobacillus acidophilus*dapatberpengaruh padajumlah bakteri pada ileum mencitBalb/Cyang diinduksi*Salmonella enterica*.

2. Efek pemberian kombinasi ekstrak kopi robusta Lampung dan *Lactobacillus acidophilus* dapat memperbaiki kerusakan histopatologi organ ileum mencit Balb/C yang diinduksi *Salmonella enterica*.



BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April – Juni 2019.

Tempat pelaksanaan penelitian berada di

Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk pembuatan

ekstrak kopi robusta,

Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya sebagai tempat

wawancara,

Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan untuk penanaman serta perhitungan

jumlah bakteri ileum dan

laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk pembuatan

histopatologi organ, Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang

sebagai tempat pengujian kandungan ekstrak kopi robusta,

Laboratorium Biologi Molekuler Universitas Brawijaya sebagai tempat pengujian flocculation

meter.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

4.2.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan diantaranya yaitu kandang hewan coba,

Eppendorf, Timbangan, Lemari pendingin, autoklaf, LAF,

Alat bedah, tempat minum mencit, sonde, spuit (1 ml, 3 ml, 5 ml, 10 ml), tabung reaksi,

spidol marker, tissue, glove, masker, rak tabung reaksi, gelas kimia (50 ml, 250 ml, 500

ml, 1000 ml), elenmeyer 250 ml , plastik, water bath, kertas label, plate, *plastic wrap*,
almlumunium foil,*flowcytometer*, ose, Bunsen, tabung falcon, gelasukur, mikropipet,
yellow tip, *blue tip*, *colony counter*, sentrifugator danice box.

4.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakanyaitu kopi robusta Lampung, mencit Balb/C (*Mus musculus*), pakan, minummencit, serbukkayu, *Salmonella enterica*, *Lactobacillus acidophilus*, MRSA, PBS, *Mc Farland* 0.5, media *Nutrien broth*, BSA, alkohol 70%, NaCl 0,9%, organ ileum.

4.3 Sampel Penelitian

Penelitian menggunakan sampel hewancoba mencit (*Mus musculus*) Balb/C Jantan. Berat badan rata-rata mencit berkisar antara 25 gram-30 gram dengan umur kurang lebih 8 minggu. Hewancoba terlebihdahulu dilakukan aklimatisasi selama kurang lebih tujuh hari.

Menurut Annisa (2015) jumlah sampel dapat dihitung dengan rumus Feder:

$$\begin{aligned} t(n-1) &\geq 15 \\ 6(n-1) &\geq 15 \\ 6n-6 &\geq 15 \\ 6n &\geq 21 \\ n &\geq 21/5 \\ n &\geq 3,5 \end{aligned}$$

$n \geq 4$

Keterangan : t=Jumlahkelompokperlakuan

n =Jumlahulangan yang diperlukan

Pada perhitunganjumlahsampelhewandipastikanhasil yait u 4 ulangan yang diperlukan dengan 6 kelompokperlakuansehinggadibutuhkanmencitsebanyak 24ekor.

4.4 Rancangan Penelitian

Dalam penelitian ini menggunakan studi eksperimental yang menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) untuk pengambilan data *post test only control design* (Angelina, 2018).

Metode ini dipilih karena dalam percobaan memiliki tujuan untuk mengetahui adanya pengaruh yang muncul akibat perlakuan tertentu. Pada

penelitian ini mencit *BabI/Cd* digunakan sebagai hewan model salmonellosis dan sudah mendapatkan persetujuan etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya

Nomor 1110-KEP-UB (Lampiran 2). Kelompok penelitian dapat dilihat pada Tabel 4.1 sebagai berikut:

Tabel 4.1 Rancangan Kelompok Penelitian

Kelompok	Keterangan
(Kontrol negatif)	Mencit sehat dan pad i berikan ekstrak kopi robusta, <i>Lactobacillus acidophilus</i> dan

(Kontrol positif)	<i>Salmonella enterica</i> Mencithanyadiinduksidengan<i>Salmonella enterica</i> 10^8 CFU/mL secara per oral sebanyak 0,5 ml pada setiapulangannya selama 2 hari.
(Kontrol <i>Lactobacillus acidophilus</i>)	Mencithanyadiinduksidengan<i>Lactobacillus acidophilus</i> 10^8 CFU/mL secara per oral sebanyak 0,5 ml selama 15 hari dan 0,5 ml <i>Salmonella enterica</i> selama 2 hari.
P1 (Perlakuan 1)	Mencitdiinduksidengankombinasiekstrak kopi robusta 250 mg/Kg BB dan <i>Lactobacillus acidophilus</i> selama 15 hari secara per oral dengan volume pemberian sesuai dengan berat badan dan 2 hari induksidengan<i>Salmonella enterica</i> secara peroral.
P2 (Perlakuan 2)	Mencitdiinduksidengankombinasiekstrak kopi robusta 500 mg/Kg BB dan <i>Lactobacillus acidophilus</i> selama 15 hari secara per oral dengan volume pemberian sesuai dengan berat badan dan

P3 (Perlakuan 3)

2hariinduksidengan*Salmonella*

*enterica*secara peroral.

Mencitdiinduksidengankombinasieksrak

kopi robusta 750 mg/Kg BB dan

Lactobacillus acidophilus selama 15

harisecara per oral dengan volume

pemberiansesuaidenganberat badan dan

2hariinduksidengan*Salmonella*

*enterica*secara peroral.

4.5 Variabel Penelitian

Pada penelitianiniterdapatbeberapa variable yang diamatiyaitu:

Variabelbebas :Ekstrak kopi (250 mg/kg BB, 500 mg/kg BB, 750 mg/kg BB), *Lactobacillus acidophilus* 10^8 CFU/ mL, *Salmonella enterica* 10^8 CFU/mL.

Variabel terikat :Jumlah bakteri dan histopatologi ileum.

Variabel kontrol :Tingkat homogenitas mencit mulai dari berat badan, umur, kandang, pakan dan minum.

4.6 Tahapan Penelitian

4.6.1 Persiapan Hewan Coba

Mencit yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari Laboratorium Fisiologi Hewan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang dengan berat rata-rata antara 20 - 25 gram. Umur mencit yang digunakan sekitar 8 minggu dan

berjenis kelamin jantan. Mencit yang digunakan memiliki surat keterangan bebas patogen (Lampiran 1) hal ini sesuai dengan salah satu syarat hewan coba. Menurut Tolistiawaty (2014) hewan coba yang baik memiliki syarat yang harus dipenuhi yaitu bebas dari mikroorganisme patogen dan memiliki kepekaan terhadap suatu penyakit.

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya 1110-KEP-UB (Lampiran 2). Sebelum dilakukan perlakuan, mencit dilakukan aklimatisasi terlebih dahulu selama 7 hari.

4.6.2 Pembuatan Suspensi *Salmonella enterica*

Pada pembuatan suspensi, *Salmonella enterica* 10^8 CFU/mL yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dilakukan penanaman pada media BSA lalu dilakukan inkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, diamati bakteri yang tumbuh pada media. Koloni *Salmonella enterica* akan terlihat berwarna hitam metalik. Setelah dipastikan bahwa yang

tumbuh adalah koloni *Salmonella enterica*, koloni bakteri tersebut diambil dan dimasukkan ke dalam *nutrient broth* lalu dilakukan sentrifugasi dan diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam. Untuk memastikan jumlah bakteri yang ada dalam NB 10^8 CFU/ mL dapat dibandingkan tingkat kekeruhannya menggunakan MC Farland 0,5 (Tanauma, 2016).

4.6.3 Pembuatan Ekstrak Kopi

Kopi yang didapatkan sudah dalam bentuk serbuk. Kopi yang sudah berbentuk serbuk dilanjutkan ke proses ekstraksi kopi. Pada proses ekstraksi, metode yang digunakan yaitu metode maserasi. Maserasi merupakan metode ekstraksi yang menggunakan cara penambahan pelarut kemudian dilakukan pengadukan secara terus menerus pada suhu ruang. Etanol 90% digunakan sebagai pelarut pada saat ekstraksi kopi robusta (Depkes RI, 2000).

4.6.4 Pengujian Fitokimia

Pada pengujian fitokimia ekstrak kopi robusta Lampung terdapat beberapa uji secara kualitatif diantaranya yaitu uji alkaloid, uji saponin dan uji tanin. Sedangkan untuk uji secara kuantitatif terdapat uji aktivitas antioksidan dan uji total flavonoid. Selain uji kuantitatif dan kualitatif, untuk mengetahui senyawa aktif pada ekstrak kopi robusta Lampung dilakukan uji determinasi senyawa aktif asam klorogenat pada ekstrak kopi robusta Lampung. Beberapa uji ini dilakukan bertujuan untuk

mengetahui adanya komponen bioaktif pada ekstrak kopi robusta Lampung. Langkah pengujian beberapa senyawa tersebut seperti berikut, yaitu:

a. Uji Tanin

Pada uji ini 200 mg sampel ditambahkan dengan etanol. Larutan yang sudah homogen diambil sebanyak 1 ml dan diletakkan ke dalam tabung reaksi. Setelah diletakkan dalam tabung reaksi dilakukan penambahan larutan FeCl_3 sebanyak 2-3 tetes dan dihomogenkan. Pada interpretasi hasil positif uji ini ditandai dengan terbentuknya warna biru tua atau hitam kehijauan (Putri, 2011).

b. Uji Alkaloid

Pada pengujian alkaloid dimulai dengan penghalusan sebanyak 4 gram dan dilanjutkan dengan penambahan kloroform secukupnya. Selanjutnya ditambahkan 10 ml amoniak dan 10 ml kloroform. Setelah larutan homogen dilakukan penyaringan dan filtrat tersebut ditambahkan H_2SO_4 2N sebanyak 10 tetes. Filtrat yang sudah dilakukan penambahan H_2SO_4 dilakukan pengocokan lalu didiamkan sampai terbentuk 2 lapisan. Setelah terbentuk 2 lapisan, pada lapisan atas dipindahkan ke dalam 2 tabung reaksi dan dilakukan analisis menggunakan pereaksi Mayer dan Wagner. Interpretasi hasil pada pereaksi Mayer akan terlihat endapan putih. Sedangkan interpretasi hasil pada pereaksi Wagner akan terbentuk endapan merah kecoklatan (Asmara, 2017).

c. Uji Saponin

Sebanyak 200 mg sampel ditambahkan dengan akuades. Setelah larutan homogen dilakukan perebusan sampai mendidih selama 2-3 menit dan didinginkan.

Setelah larutan dingin, larutan dikocok dengan kuat dan ditambahkan HCL sebanyak 2 tetes. Interpretasi hasil dari pengujian saponin yaitu akan bernilai positif jika terbentuk buih yang stabil (Nugrahani, 2016).

d. Uji Total Kandungan Flavonoid

Sampel dilakukan penambahan dengan 4 ml methanol dilanjutkan dengan penambahan $AlCl_3$ 2% sebanyak 1 ml. Setelah larutan homogen dilakukan inkubasi pada suhu ruang kurang lebih selama 30 menit. Setelah diinkubasi dilanjutkan dengan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 430 nm (Jiang, 2009).

e. Uji Determinasi Senyawa CGA (LC- MS)

Pada pengujian kandungan asam klorogenat diawali dengan pengambilan sampel sebanyak 50 μ l dan dilakukan pengenceran dengan pelarut yang terdiri dari 0,1 % asam format dalam aquabidest sebanyak 950 μ l. Setelah itu, dilanjutkan dengan vorteks larutan dengan kecepatan 13.000 rpm selama 30 detik dan dipindahkan ke dalam autosampler vial. Setelah terbentuk lapisan dari larutan tersebut dilakukan pengambilan cairan jernih dari larutan tersebut dan diinjeksikan pada LC-MS sebanyak 2 μ l. LC-MS merupakan teknik kromatografi cair dengan detektor spektrometer massa (Ginting, 2012).

4.6.5 Perlakuan Hewan Coba

Setelah dilakukan aklimatisasi selama 7 hari, pada hari 7 aklimatisasi dilakukan penimbangan berat badan mencit. Hal ini bertujuan untuk menentukan dosis kombinasi ekstrak kopi robusta dan *Lactobacillus*

acidophilus. Dilanjutkandenganperlakuanpemberiankombinasi pada mencitperlakuanpertama, kedua, ketiga dan pemberian*Lactobacillus acidophilus* pada mencitkontrol*Lactobacillus acidophilus*selama 15 hari secara peroral. Setiapminggudilakukanpenimbanganberat badan masing-masingmencit. Setelah 15 hariperlakuidilakukaninduksi*S. enterica*10⁸ CFU/ mL selama2harisebanyak 0,5 mL secara peroral menggunakansonde (Naughton dkk,2016).

4.6.6 Euthanasi dan Pembedahan

Euthanasi pada mencitdapatdilakukandengancaradislokasicervicalis. Setelah dilakukandislokasi pada mencitdilanjutkandenganpembedahanmencit. Pembedahandimulaidariincise bagian line abdominalis dan dilanjutkansampaiterekspose organ dalam. Setelah organ dalamterlihatmakadilakukanpengambilanbagian ileum untukdilakukanpenanamanbakteri pada media MRSA. Hal inibertujuanuntukmengetahuijumlahbakteri pada organ tersebutsertasebagian ileum untukdilakukanpembuatanhistopatologi organ ileum (Carbone and all, 2012).

4.6.7 Kultur dan PerhitunganBakteri

Pada kultur bakteri organ yang diambiladalah ileum sertasekum. Setelah dilakukannekropsimencit organ diambillaludiambilsebanyak1 gramuntukdilakukanpengenceransecarabertingkat. Setelah Organ dimasukkankedalam 9 mL PBS dan dihomogenkan. Setelah homogendiambilsebanyak 1 mL dan dimasukkankepengencerankedua.

Pengenceran dilakukan sampai pengenceran 10^7 . Dilakukan penanaman pada pengenceran 10^5 , 10^6 dan 10^7 pada MRSA menggunakan streak. Media yang telah ditam bakteri diletakkan pada inkubator dengan suhu 30°C selama 24 jam. Setelah 24 jam koloni bakteri dapat dihitung berdasarkan TPC (*Total Plate Count*) (Wijayanti dan Ardyati, 2007).

4.6.8 Pembuatan dan Pengamatan Histopatologi Ileum

Terdapat beberapa langkah yang harus dilakukan untuk pembuatan preparat histopatologi. Menurut Santi (2013) mulai dari fiksasi yang bertujuan untuk mencegah terjadinya *autolysis* pada sel. Pada proses fiksasi biasanya dengan cara merendam jaringan dalam formalin 10%. Pada langkah yang kedua yaitu *trimming* atau pemotongan jaringan, jaringan dipotong dengan ukuran yang lebih kecil sehingga dapat dimasukkan ke dalam *tissue cassette*. Selanjutnya terdapat proses dehidrasi yaitu penarikan air dari jaringan menggunakan alkohol secara bertingkat dari konsentrasi 80% sampai konsentrasi absolut dan kemudian masuk proses *clearing* menggunakan xylol. Langkah selanjutnya yaitu dimasukkan ke dalam cetakan serta diisi dengan parafin cair dan ditunggu sampai keras. Setelah dipastikan keras. Blok parafin yang berisi jaringan dipotong menggunakan mikrotom dengan ketebalan 5 mikrometer. Pemotongan jaringan dilakukan secara longitudinal. Setelah terpotong, hasil potongan dimasukkan dalam *water bath* dengan suhu air 45°C . Hal ini bertujuan untuk mencegah munculnya lipatan pada saat proses pemotongan. Setelah itu potongan organ diangkat dengan

cara menempelkan *object glass* yang sudah diberi zat perekat misalnya *Mayers albumin* pada organ yang ada pada *water bath* dan ditunggu selama 24 jam. Pada saat proses deparafinisasi potongan organ dimasukkan ke dalam xylol kurang lebih 3 menit sebanyak 2 kali dan dilanjutkan pada proses rehidrasi jaringan. Pada proses rehidrasi jaringan dilakukan pencelupan jaringan kedalam etanol bertingkat mulai dari 30%, 50%, 70%, 80%, 96% serta absolut masing-masing selama 3 menit dan dilanjutkan dengan mencuci dengan air mengalir. Setelah itu dilanjutkan menuju proses pewarnaan. Metode pewarnaan yang dipakai adalah pewarnaan HE (Hematoxylin-Eosin).

Pewarnaan jaringan dapat menggunakan *Mayer's Hematoxyline* selama 8 menit dan dilanjutkan pembilasan menggunakan air. Setelah pembilasan dilakukan pencelupan pada eosin selama 15 detik. Setelah proses pewarnaan selesai dilakukan proses selanjutnya yaitu pencelupan menggunakan etanol 90%, etanol absolute I, etanol absolute II, xylol I, xylol II. Proses pembuatan histopat diakhiri dengan menetesi sediaan dengan perekat kemudian dilakukan penutupan menggunakan cover glass. Pengamatan histopatologi ileum dilakukan dengan mikroskop dengan perbesaran 100x dan 400x dan dilakukan analisis perubahan yang terjadi pada histopatologi organ (Pertiwi, 2018).

4.6.9 Uji Konfirmasi

a. Uji Katalase

Uji konfirmasi untuk *Lactobacillus acidophilus* menggunakan uji katalase.

Langkah kerja untuk uji katalase, dimulai dari mengambil bakteri dengan ose lalu disuspensikan di atas *object glass* dengan aquadest steril. Suspensi tersebut ditambahkan larutan H_2O_2 3% dan dilakukan pengamatan terhadap perubahan yang terjadi. Uji akan bernilai positif jika terbentuk gelembung. Uji katalase bertujuan untuk mengetahui bakteri yang memiliki enzim katalase, enzim yang dimiliki oleh bakteri yang bersifat aerobik (Dewi, 2013).

b. Pewarnaan Gram

Selain uji katalase untuk uji konfirmasi dapat dengan pewarnaan gram. Pewarnaan gram berfungsi untuk mengetahui jenis bakteri. Langkah pertama yaitu sampel diletakkan pada *object glass* lalu dan ditetesi dengan 1 tetes aquadest steril. Selanjutnya dilakukan fiksasi dengan lampu spiritus. Setelah dilakukan fiksasi dilanjutkan ditetesi kristal violet dan ditunggu selama 1 menit. Setelah 1 menit dilakukan pembilasan dan dilanjutkan dengan penambahan lugol dan ditunggu selama 1 menit, lalu dilakukan pembilasan kembali. Kemudian warna dilunturkan menggunakan alkohol 95 % selama 1 menit. Selanjutnya dilakukan pewarnaan dengan safranin selama 45 detik lalu dilakukan pembilasan dan preparat dikeringkan. Setelah preparat kering dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop perbesaran 1000x dengan penambahan minyak emersi. Bakteri gram positif misalnya *Lactobacillus sp.* pada pewarnaan gram akan terlihat berwarna ungu sedangkan untuk bakteri gram negatif seperti *Salmonella enterica* akan tampak berwarna merah (Dewi, 2013).

4.6.10 Analisis Data

Data yang diperoleh dari beberapa perlakuan yaitu jumlah bakteri dianalisa secara deskriptif. Pada histopatologi organ ileum dilakukan beberapa pengamatan diantaranya yaitu sel radang, panjang dan lebar vilus serta jumlah sel goblet. Menurut Harimurti dan Rahayu (2009), pengukuran panjang vilus, lebar vilus dan kedalaman kriptas minimal menggunakan tiga lapang pandang per slide dengan bantuan aplikasi *Imageraster*. Panjang vilus diukur dari bagian apex vilus sampai basal vilus. Pengukuran lebar vilus dilakukan pada bagian basal vilus dan kedalaman kriptas diukur mulai dari basal vilus sampai membran basalis. Satuan yang dipakai untuk pengukuran panjang dan lebar vilus adalah mikromili (μm). Pengamatan histopatologi ileum dibantu dengan optilab yang telah terpasang pada mikroskop cahaya (Olympus CX31RBSFA).

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil Uji Sensitifitas *L. acidophilus* dengan Ekstrak Kopi Robusta Lampung

Hasil uji fitokimia pada **Lampiran 4** menyatakan bahwa ekstrak kopi robusta Lampung mengandung beberapa senyawa aktif diantaranya yaitu flavonoid sebesar 11,82 $\mu\text{g/g}$ dan alkaloid yang dapat digunakan untuk antibakteri. Menurut Tanauma dkk. (2016), flavonoid dapat digunakan sebagai antibakteri. Hal itu dikarenakan oleh perbedaan kepolaran gugus alkohol dengan lipid penyusun sel bakteri. Berdasarkan hal itu, diperlukan uji spesifitas pada *L. acidophilus* untuk mengetahui pengaruh dari ekstrak kopi robusta Lampung terhadap *L. acidophilus*. Uji sensitifitas menurut Soleha (2015), merupakan suatu metode yang digunakan untuk mengukur tingkat aktivitas antibakteri. Terdapat beberapa metode yang dapat digunakan, salah satunya yaitu metode *Disk Diffusion Test*. Pengujian dilakukan dengan pemberian ekstrak kopi robusta Lampung mulai dari konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, dan 50%. Pengujian dilakukan secara in vitro pada media MRSA. Kontrol (+) menggunakan antibiotik Gentamycin dan kontrol (-) menggunakan *blank disc*. Hasil pengujian dapat dilihat pada **Tabel 5.1**.

Tabel 5.1 Uji Sensitifitas Bakteri *Lactobacillus axiddophilus*

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

Hasil pengujian pada **Tabel 5.1** dapat diketahui bahwa terdapat zona hambat pada kontrol positif (+) dengan diameter 0,8 cm pada kedua ulangan. Namun, hasil pada semua tingkat konsentrasi ekstrak kopi tidak menunjukkan terbentuknya zona hambat. Tidak terbentuknya zona hambat menandakan bahwa ekstrak kopi tidak menghambat pertumbuhan bakteri *Lactobacillus acidophilus*. Namun, hal ini berbeda dengan yang dikemukakan oleh Bharath *et al.* (2015), bahwa kandungan *chlorogenic acid* (CGA) dapat menghambat pertumbuhan bakteri gram positif diantaranya yaitu *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus lactis* dan *Streptococcus faecalis*. Selain itu, CGA juga dapat menghambat bakteri gram negatif diantaranya *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* dan *Pseudomonas aeruginosa*. CGA dapat menyebabkan penurunan pertahanan bakteri dengan meningkatkan permeabilitas membran sel. Bakteri dapat dikatakan sebagai agensi probiotik jika dapat menekan bakteri yang bersifat patogen dalam sistem pencernaan. Selain itu, menurut Sunaryanto dkk. (2014), bakteri harus dapat bertahan pada suasana asam dan garam empedu sehingga dapat mencapai saluran pencernaan.

5.2 Pengaruh Kombinasi Ekstrak Kopi Robusta Lampung dan *L. acidophilus* Terhadap Perubahan Konsistensi Feses

Perubahan dari konsistensi feses dapat menjadi indikasi adanya permasalahan pada saluran pencernaan. Pada infeksi *Salmonella enterica* sering disertai dengan adanya gejala klinis diare. Menurut Zein dkk. (2004), penurunan konsistensi feses pada saat diare dapat disebabkan oleh penurunan absorpsi cairan pada usus sehingga feses akan cenderung lembek dan juga berlendir. Diare dapat dibedakan menjadi

beberapa kelompok berdasarkan tampilan serta konsistensinya. Menurut Nurrahman (2016), terdapat 5 skoring yaitu, normal yaitu feses berbentuk lonjong, hitam serta konsistensinya keras, lalu diare skoring 1 yaitu feses berbentuk lonjong berwarna hitam namun sedikit lembek. Diare skoring 2 yaitu feses berbentuk lonjong berwarna hitam dan lembek. Diare 3 skoring yaitu feses tidak berbentuk lonjong, berwarna kecoklatan, lembek dan sedikit berlendir. Diare skoring 4 yaitu feses cair, berwarna coklat dan berlendir. Hasil pengamatan tampilan serta konsistensi feses setelah perlakuan dan induksi *S. enterica* selama dua hari secara peroral dapat dilihat pada

Tabel 5.2.

Tabel 5.2 Tampilan Feses Mencit

Perlakuan	Tampilan Feses	Keterangan
Kontrol negatif (K-)	- Berbentuk Lonjong, - Warna Hitam, - Keras.	Normal
Kontrol Positif (K+)	- Bentuk tidak lonjong, - Warna coklat mentah - Lembek, berlendir	Diare (skor 4)
Kontrol <i>Lactobacillus acidophilus</i> (KL)	- Bentuk agak bulat, - Warna coklat - Lembek	Diare (skor 3)
Perlakuan (P1)	- Berbentuk lonjong - Coklat tua - Keras	Normal

Perlakuan (P2)	-Bentuklonjong, -Warnahitam -Sedikitlembek	Diare (skor 3)
Perlakuan (P3)	-Bentuklonjong, -Warnacoklat -Sedikitlembek	Diare (skor 3)

Berdasarkan Tabel 5.2 pada kelompok kontrol positif, konsistensi feses mengalami penurunan serta disertai adanya lendir. Menurut Zein dkk. (2004), hal itu disebabkan oleh adanya kerusakan mukosa usus sebagai akibat dari adanya infeksi *Salmonella enterica* sehingga terjadi penurunan dari fungsi reabsorpsi usus dan peningkatan motilitas pada usus. Mencit pada kelompok perlakuan kontrol *Lactobacillus*, P2 dan P3 menunjukkan adanya diare dengan skor 3. Pada perlakuan kontrol *Lactobacillus* dapat terjadi diare dikarenakan bakteri asam laktat tidak dapat mengurangi jumlah dari *Salmonella enterica* secara signifikan sehingga *Salmonella enterica* yang berhasil melakukan adhesi akan merusak membran mukosa usus. Menurut Sumaryati (2009), toksin yang dikeluarkan oleh bakteri patogen dapat menyebabkan penurunan jumlah bakteri asam laktat dalam saluran pencernaan. Selain itu, dengan banyaknya jumlah *Salmonella enterica* yang diinduksikan maka terdapat peningkatan persaingan dalam mendapatkan nutrisi. Selanjutnya yaitu pada perlakuan 2 dan 3 mencit juga mengalami diare namun tidak separah seperti mencit pada kontrol negatif. Menurut Keraru (2017), kafein dalam kopi dapat meningkatkan motilitas usus sehingga feses menjadi lebih lunak. Berdasarkan beberapa perlakuan, pada P1 atau pemberian kombinasi antara ekstrak kopi robusta Lampung dengan dosis 250 mg/ Kg BB dan *L. acidophilus* dapat memperbaiki derajat keparahan diare.

Hal ini ditunjukkan dengan konsistensi feses yang keras, berwarna coklat tua dan berbentuk lonjong sebagai indikasi adanya perbaikan pada saluran pencernaan.

5.3 Hasil Perhitungan Jumlah Bakteri

Pada penelitian ini untuk mengetahui jumlah bakteri ileum menggunakan metode TPC (*Total Plate Count*). Setelah proses nekropsi mencit, bagian ileum pada setiap perlakuan diambil dan dilakukan pengenceran bertingkat sampai pengenceran

10⁷. Setelah dilakukan pengenceran dilakukan penanaman pada media MRSA.

MRSA digunakan sebagai media penanaman bakteri asam laktat. Hal ini dikarenakan dalam MRSA terdapat beberapa nutrisi yang mendukung tumbuhnya bakteri asam laktat diantaranya yaitu dextrose yang berfungsi sebagai sumber energi dan dapat difermentasi. Selain itu adanya kandungan sodium acetat dapat berfungsi untuk menghambat beberapa pertumbuhan mikroorganisme misalnya streptokokus dan kapang. Setelah dilakukan penanaman dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C, diamati dan dilakukan perhitungan dengan metode TPC (*Total Plate Count*). Tujuan dari perhitungan TPC menurut Yunita dkk. (2015), untuk mengetahui jumlah mikroorganisme dengan menghitung jumlah total koloni bakteri yang telah ditumbuhkan pada media agar. Menurut Putri dan Kusdiyantini (2018), koloni bakteri pada media MRSA akan terlihat berwarna putih dan krem. Berdasarkan hasil dari penanaman bakteri pada media MRSA pada tingkat pengenceran 10⁵ didapatkan hasil seperti pada Tabel 5.3. Perhitungan jumlah koloni bakteri pada organ ileum menggunakan rumus (Baron, *et al*, 1994).

$$\frac{(\text{colony count}) \times (\text{dilution}) \times (\text{first dilution concentration})}{(\text{specimen weight})}$$

(1)

Tabel 5.3 Perhitungan Bakteri

Perlakuan	Pengenceran	Jumlah Bakteri (CFU/Gram)
	10 ⁵	
K+	101.5	1 X 10 ⁸
K-	1.75	1,8 X 10 ⁶
KL	11.25	1,1 X 10 ⁷
P1	15	1,5 X 10 ⁷
P2	12	1,2 X 10 ⁷
P3	7	7 X 10 ⁶

Berdasarkan hasil penelitian seperti pada **Tabel 5.3** pada kelompok kontrol (+) didapatkan hasil sebanyak 1X 10⁸CFU/mL. Jumlah bakteri yang tinggi dapat diakibatkan oleh bakteri yang tumbuh bukan hanya bakteri asam laktat. Meskipun MRSA termasuk dalam media yang selektif namun menurut Yuan et all. (2011), *Salmonella sp.* mampu bertahan pada konsentrasi 3% sodium asetat. Selain itu *Salmonella sp.* mampu bertahan hidup pada suhu yang tinggi. Dengan hal ini untuk mengkonfirmasi bahwa bakteri yang tumbuh adalah bakteri asam laktat, dapat dilakukan uji konfirmasi. Konfirmasi bakteri asam laktat dapat dilakukan dengan uji katalase dan uji pewarnaan gram. Pada penelitian ini tidak dilakukan uji konfirmasi.

Pada kontrol negatif jumlah bakteri didapatkan hasil 1,8 x 10⁶CFU/mL. Jumlah bakteri yang tidak begitu banyak dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor. Menurut Pertiwi (2008), peristaltik usus dapat membuat bakteri asam laktat susah untuk

melakukan adesi pada mukosa usus. Adanya bakteri asam laktat dalam saluran pencernaan berfungsi sebagai kompetitor dari bakteri patogen selain itu bakteri asam laktat juga berfungsi sebagai imunomodulator (Dicks and Botes, 2010).

Jumlah bakteri pada kelompok kontrol *Lactobacillus* menunjukkan adanya peningkatan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif yaitu $1,1 \times 10^7$ CFU/mL. Hal ini membuktikan bahwa pemberian probiotik berguna untuk meningkatkan jumlah bakteri asam laktat pada usus. Sejalan dengan hal itu menurut Wijayanti dan Ardyati (2007), probiotik hanya dapat bertahan beberapa hari setelah pemberian, maka dari itu pemberian probiotik harus secara rutin dan terus menerus.

Pada kelompok P1, P2 dan P3 juga mengalami peningkatan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif dan kontrol *Lactobacillus*. Hal ini dapat dikarenakan dengan efek dari pemberian ekstrak kopi Lampung. Kandungan oligosakarida dalam kopi dapat berfungsi sebagai prebiotik. Prebiotik menurut Azhar (2009), merupakan substrat yang susah dicerna oleh inang, sehingga membutuhkan bantuan flora normal usus untuk mencernanya. Namun, antara kelompok P1, P2 dan P3 menandakan adanya penurunan jumlah bakteri. Pada kelompok P1 menunjukkan hasil sebanyak $1,5 \times 10^7$ CFU/mL, P2 sebanyak $1,2 \times 10^7$ CFU/mL, serta P3 sebanyak 7×10^6 CFU/mL. Penurunan jumlah bakteri pada ketiga perlakuan dapat disebabkan oleh peningkatan konsentrasi ekstrak kopi robusta Lampung yang diberikan.

Berdasarkan **Lampiran 4** CGA, *caffeic acid*, flavonoid serta *trigonelline* dapat bersifat antibakteri. Menurut Maheswari dkk. (2015), kandungan *caffeic acid* lebih

sensitif pada bakteri gram positif jika dibandingkan dengan bakteri gram negatif. Hal ini dikarenakan perbedaan komponen pembentuk dinding sel bakteri.

5.4 Hasil Pemeriksaan Histopatologi Ileum

Diare yang disebabkan oleh *Salmonella enterica* dapat menjadi indikasi adanya kerusakan pada saluran pencernaan khususnya pada bagian ileum. Berdasarkan dari hal itu, dalam penelitian ini dilakukan pemeriksaan histopatologi ileum. Tujuan dilakukannya pemeriksaan histopatologi ileum yaitu untuk mengetahui derajat kerusakan pada setiap perlakuan. Pada penelitian ini dilakukan metode pewarnaan HE serta pengamatan menggunakan 5 lapang pandang secara acak pada satu preparat menggunakan perbesaran 100x dan 400x. Pengukuran panjang vili, lebar vili dan kedalaman kriptal menggunakan perbesaran 100x. Panjang vili diukur dari bagian puncak vili sampai bagian basis vili. Lebar vili diukur pada bagian basis vili dan kedalaman kriptal diukur dari bagian basis vili sampai membran basalis, sedangkan untuk mengamati adanya erosi vili, sel goblet serta sel-sel radang menggunakan perbesaran 400x.

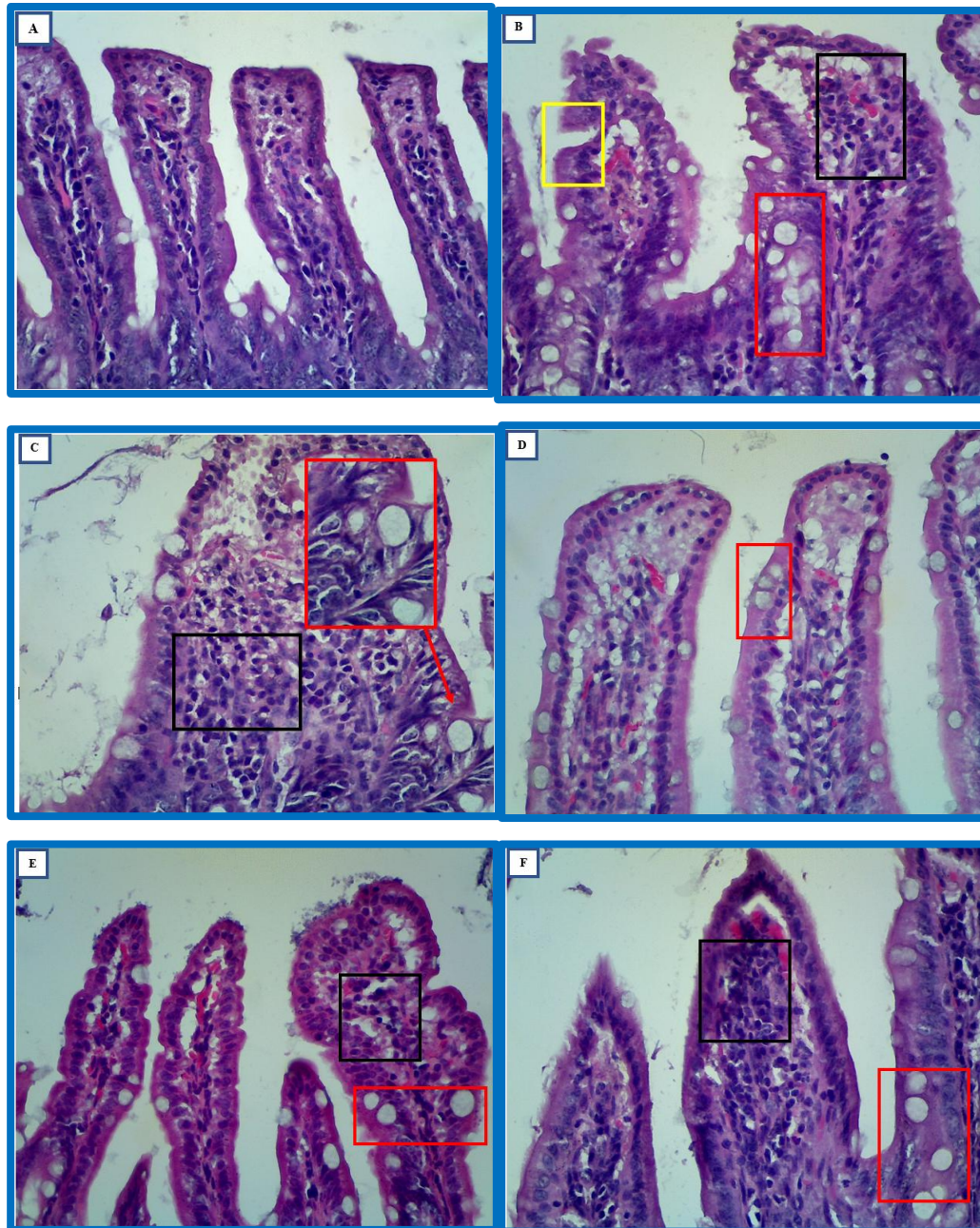
Tabel 5.4 Panjang dan lebar vili

Perlakuan	Panjang(μm)	Lebar (μm)
K+	257.4	93.7
K-	228.1	66.2
KL	347.4	84.3
P1	305.3	73.2
P2	268	66.8
P3	249.9	74.9

Tabel 5.5 Skoring pemendekan vili

Perlakuan	Vili
K+	Sedang (4)
K-	Ringan (3)
KL	Ringan (1)
P1	Ringan (2)
P2	Ringan (2)
P3	Sedang (1)

Hasil pengukuran panjang dan lebar vili dapat dilihat pada **Tabel 5.4**. Pengukuran panjang dan lebar vili bertujuan untuk mendukung data scoring pengamatan vili. Menurut Erben et all. (2014), Skoring dimulai dari pemendekan vili ringan yaitu perbandingan panjang vili dan kripta menjadi 2:1 sampai 3-1 dengan skoring 1-3. Pada pemendekan vili sedang , perbandingan antara panjang vili dan cripta menjadi 1:1 sampai 2:1 dengan skoring 2-4 serta jika terjadi atropi vili didapatkan hasil skoring 3-5. Hasil skoring dapat dilihat pada **Tabel 5.5**.



Gambar 5. 1 Gambaran mikroskopis ileum mencit dengan perbesaran 400x; A) Kontrol negatif; B) Kontrol positif; C) Kontrol *Lactobacillus*; D) P1; E) P2; F) P3; Kotak merah menunjukkan sel goblet; kotak hitam menunjukkan sel radang; kotak kuning menunjukkan adanya erosi epitel.

Hasil pengamatan pada mencit kelompok kontrol negatif (sehat) dengan perbesaran 400x (**Gambar 5.1A**) menunjukkan perubahan pada vili dengan skoring ringan (3) hal ini didukung oleh data pengukuran panjang dan lebar vili pada **Tabel 5.4**. Ukuran vili pada kontrol negatif terlihat seragam meskipun memiliki panjang yang lebih pendek jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Selain itu tidak ditemukan adanya erosi maupun ruptur pada villi sehingga dapat dikatakan bahwa vili dalam kondisi yang baik. Kondisi vili yang baik dapat meningkatkan proses absorpsi nutrisi. Nutrisi yang terabsorpsi digunakan tubuh untuk sumber energi dalam proses metabolisme, sehingga nantinya dapat menyebabkan peningkatan berat badan. Hal ini sejalan dengan hasil pemeriksaan feses. Feses mencit pada kontrol negatif menunjukkan masih dalam kondisi normal yaitu konsistensinya keras berwarna hitam dan berbentuk lonjong (Putra, 2018).

Menurut Adawiyah (2017), *Salmonella sp.* dapat menyebabkan kerusakan epitel usus pada saat infeksi. Hal ini dikarenakan pada saat melakukan invasi ke jaringan usus, *Salmonella sp.* merusak epitel usus. Berdasarkan pengamatan pada preparat diketahui bahwa pada mencit kelompok kontrol positif pada ileum terlihat adanya erosi epitel dan hipertropi dari sel goblet, infiltrasi sel-sel radang yang terdiri dari PMN (Polimorfonuklear) dan MN (Mononuklear). Jenis PMN yang dapat teramati yaitu neutrofil. Menurut Rosales (2018), jika terjadi infeksi mikroorganisme jenis sel radang yang keluar terlebih dahulu adalah neutrofil. Salah satu indikator adanya inflamasi adalah adanya infiltrasi sel radang pada vili usus. Infiltrasi sel radang

tersebut dapat dilihat dengan adanya pelebaran pada vili usus. Infiltrasi sel radang dapat mengindikasikan adanya antigen yang masuk kedalam tubuh salah satunya yaitu bakteri patogen seperti *Salmonella sp.* Seiring dengan peningkatan jumlah sel radang pada jaringan maka vili akan terlihat melebar. Hal itu dapat dilihat pada **Tabel 5.4**, kontrol positif (**Gambar 5.1B**) memiliki lebar paling besar jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan lain. Berdasarkan perubahan pada vili pada kelompok kontrol positif mengalami pemendekan ukuran vili dengan skoring sedang (4) yang berarti perbandingan antara panjang vili dan kriptanya kurang lebih 1 : 1. Pada preparat kontrol positif dapat terlihat adanya peningkatan aktivitas dari sel goblet. Hal ini berhubungan dengan bentuk kompensasi tubuh terhadap adanya antigen yang dapat menyebabkan kerusakan pada organ. Tubuh berusaha menghilangkan antigen yang masuk kedalam tubuh dengan cara meningkatkan aktivitas sel goblet dalam sekresi mukus. Peningkatan sekresi mukus bertujuan untuk melindungi sel epitel dari kerusakan. Peningkatan sekresi mukus serta kerusakan vili pada mencit kontrol positif dapat dilihat dari tampilan feses pada **Tabel 5.2**. Feses memiliki konsistensi lembek dan berlendir (Balqis dkk. 2015).

Pada kelompok perlakuan kontrol *Lactobacillus acidophilus* seperti pada **Gambar 5.1C** terdapat adanya hipertrofi sel goblet yang mengindikasikan adanya peningkatan produksi mukus. Adanya *Salmonella sp.* dapat memicu sel radang keluar dari pembuluh darah menuju jaringan. Namun berbeda dengan kontrol positif, pada kontrol *Lactobacillus acidophilus* terlihat tidak ada erosi epitel. Bakteri asam laktat

dapat melindungi lapisan mukosa dengan cara berkoloni pada permukaan mukosa usus sehingga membuat bakteri patogen tidak dapat melakukan adesi. Berdasarkan

Tabel 5.4 pada kontrol *Lactobacillus acidophilus* panjang vili mengalami peningkatan. Peningkatan tersebut dapat disebabkan oleh pemberian probiotik.

Menurut Wresdiyati dkk. (2013), pemberian probiotik dapat menstimulasi proliferasi sel epitel. Proliferasi ini terjadi karena adanya peningkatan produksi asam lemak yang diinduksi oleh probiotik sehingga menyebabkan vili memanjang.

Pada kelompok P1, P2 seta P3 terdapat beberapa kelainan di antaranya hipertropi sel goblet serta infiltrasi sel radang menuju jaringan. *Salmonella sp.* yang masuk kedalam tubuh akan memicu keluarnya mediator radang, salah satunya yaitu histamin. Histamin dapat menyebabkan terjadinya vasodilatasi pembuluh darah. Pada saat vasodilatasi pembuluh darah, plasma darah keluar dan menyebabkan edema.

Pada P1 (**Gambar 5.1D**), panjang vili mengalami peningkatan jika dibandingkan dengan P2 (**Gambar 5.1E**) dan P3. Kerusakan paling parah terlihat pada kelompok P3 seperti pada **Gambar 5.1F**, dari ketiga kelompok perlakuan, P3 memiliki panjang vili yang paling kecil. Hal ini dapat dikarenakan oleh pemberian dosis ekstrak kopi robusta Lampung yang tinggi. Menurut Selviana (2015), kandungan kafein pada kopi dapat memicu sekresi asam lambung yang berlebihan sehingga, dapat merusak mukosa lambung dan usus.

Kelompok mencit P2 seperti pada **Gambar 5.1E** jenis sel radang yang teramati yaitu polimorfonuklear dan mononuklear. Menurut Adenin (2019), jaringan yang

mengalami cedera akan memicu keluarnya beberapa sel diantaranya yaitu leukosit, eritrosit serta trombosit. Pada infeksi bakteri, sel leukosit yang berperan yaitu neutrofil. Neutrofil banyak berperan pada 24-48 jam pertama terjadinya cedera. Neutrofil akan dibantu oleh monosit yang nantinya akan berubah menjadi makrofag setelah keluar dari pembuluh darah.

Berdasarkan beberapa gambar diatas mulai dari **Gambar 5.1D**(histopatologi ileum P1), **Gambar 5.1E**(histopatologi ileum P2) dan **Gambar 5.1F** (histopatologi ileum P3). Tingkat kerusakan organ paling parah yaitu pada **Gambar 5.1F**. Kerusakan tersebut sejalan dengan tampilan feses menciit pada P3 yang dapat digolongkan dalam diare dengan skoring 3, yang berarti memiliki tampilan feses sedikit lembek. Hal ini dapat dikarenakan selain adanya inflamasi yang dapat memicu motilitas usus sehingga mempengaruhi penyerapan nutrisi dan cairan. Peningkatan motilitas usus juga dapat dipengaruhi oleh kandungan kafein dalam ekstrak kopi (Keraru, 2017).

BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan dari hasil penelitian, maka dapat disimpulkan bahwa pemberian kombinasi ekstrak kopi robusta Lampung dengan dosis 250 mg/kg BB serta *Lactobacillus acidophilus* dapat meningkatkan jumlah bakteri pada ileum serta dapat mencegah kerusakan organ ileum pada mencit Balb/C yang diinduksi *Salmonella enterica*.

6.2 Saran

Pada penelitian selanjutnya diharapkan melakukan uji konfirmasi bakteri asam laktat serta perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui adanya efek yang ditimbulkan pada organ lain.

DAFTAR PUSTAKA

Adenin, I. 2019. Peran Komponen Inflamasi Akibat Inserasi Alat Kontrasepsi dalam Rahim dan Hubungan dengan Peningkatan Kadar Glikodelin A. *Ejki* Vol. 2: 156-161.

Afriyani, Darmawi, Fakhruddin, Z. H. Manaf, M. Abrar, dan Winaruddin. 2016. Isolasi Bakteri *Salmonella* sp. pada Feses Anak Ayam Broiler di Pasar Ulee Kareng Banda Aceh. *Jurnal Medika Veterinaria* 10(1): 74-76.

Angelina, I. O. 2018. Uji Karakteristik Kopi Non Kafein Dari Biji Pepaya Dengan Variasi Lama Penyinaran. *Journal of Agritech Science* Vol. 2 No. 1.

Annisa, dan Hasanah. 2015. Efek Jus Bawang Bombay (*Allium Cepa* Linn.) Terhadap Motilitas Spermatozoa Mencit Yang Diinduksi Streptozotocin (Stz). *Jurnal Ilmu Kesehatan* Vol. 11 No.2.

Arief, I. I., B. S. L. Jenie, M. Astawan dan A. B. Witarto. 2010. Efektivitas Probiotik *Lactobacillus plantarum* 2C12 dan *Lactobacillus acidophilus* 2B4 Sebagai Pencegahan Diare pada Tikus Percobaan. *Media peternakan* No. 43 (137-143).

Ariyani, P. W. 2013. Viabilitas *Lactobacillus acidophilus* dan *Bifidobacterium bifidum* Terenkapsulasi dan Mutu Sensori Yogurt Tepung Pisang Sinbiotik Selama Penyimpanan Dingin [Skripsi]. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor.

Ariyanti T. dan Supar. 2008. Antigenisitas dan Immunogenisitas *Salmonella enterica*: Implikasinya dalam Diagnosis dan Pengembangan Vaksin Isolat Lokal untuk Unggas. *Wartazoa* 18(4): 187-197.

Arrington, L. R. 1972. *Introductory Laboratory Animal. The Breeding, Care dan Management of Experimental Animal Science*. The Interstate Printers and Publishing, Inc. New York.

Asmara, A. P. 2017. Uji Fitokimia Senyawa Metabolit Skunder Dalam Ekstrak Metanol Bunga Turi Merah (*Sesbania grandiflora* L. Pers). *Al-Kimia* Vol. 5 No. 1.

Azhar, M. 2009. Inulin Sebagai Prebiotik. *SAINSTEK* Vol. XII. No. 1.

Balqis, U., M. Hanafiah, C. Januari, M. N. Salim, S. Aisyah dan Y. Fahrimal. 2015. Jumlah Sel Goblet Pada Usus Halus Ayam Kampung (*Gallus domesticus*) yang Terinfeksi *Ascaridia galli* Secara Alami. *Jurnal Medika Veterinaria* Vol. 9 No. 1.

Baron, E. J., L. R. Peterson, and S. M. Finegold. 1994. *Bailey and Schott's Diagnostic Microbiology, Enterobacteriaceae Ninth edition*. Mosby Year.

Bharath, N., N. K. Sowmya and D. S. Mehta. 2015. Determination of antibacterial activity of green coffee bean extract on periodontogenic bacteria like *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. An in Vitro study. *Contemporary Clinical Dentistry* 2015 6(2):166-169.

Carbone, L., E. T. Carbone, E. M. Yi, D. B. Bauer, K. A. Lidstrom, J. M. Parker, J. A. Austin, Y. Seo, A. D. Gandhi and J. D. Wilkerson. 2012. Assessing Cervical Dislocation as a Humane Euthanasia Method in Mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* Vol. 51 No. 3.

Cita, Y. P. 2011. Bakteri *Salmonella typhi* dan Demam Tifoid. *Jurnal Kesehatan Masyarakat* Vol. 6 No. 1.

Departemen Kesehatan RI. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstraksi Tumbuhan Obat*. Jakarta: Direktorat Jendral POM-Depkes RI.

Dewi, A. K. 2013. Isolasi, Identifikasi dan Uji Sensitivitas *Staphylococcus aureus* terhadap *Amoxicillin* dari Sampel Susu Kambing Peranakan Ettawa (PE) Penderita Mastitis Di Wilayah Girimulyo, Kulonprogo, Yogyakarta. *JSV* 31 (2).

Dicks, L. M. T. and M. Botes. 2010. Probiotic lactic acid bacteria in the gastrointestinal tract : health benefits, safety and mode of action. *Beneficial Microbes* 1(1): 11-29.

Erben, U., C. Loddenkemper, K. Doerfel, S. Spieckermann, D. Haller, M. M. Heimesaat, M. Zeitz, B. Siegmund and A. A. Kuhl. 2014. A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse model. *Int J Clin Exp Pathol* 2014;7(8): 4557-4576.

Ginting, M. K. 2012. Validasi Metode LC-MS/MS untuk Penentuan Senyawa Asam Trans, Trans-Mukonat, Asam Hippurat, Asam 2-Metil Hippurat, Asam 3-Metil Hippurat, Asam 4-Metil Hippurat Dalam Urine Sebagai Biomarker Paparan Benzena, Toluena, dan Xilena [Skripsi]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Indonesia.

Harimurti, S. dan E. S. Rahayu. 2009. Morfologi Usus Ayam Broiler Yang Disuplementasi Dengan Probiotik Strain Tunggal Dan Campuran. *AGRITECH* Vol. 29 No. 3.

Herlinae, Y. 2014. Pola Konsumsi Daging Ayam Broiler pada Rumah Tangga di Perumahan Bereng Kalingu I di Kelurahan Kereng Bangkirai Kota Palangka Raya. *Jurnal Ilmu Hewan Tropika* 3(2): 15-19.

ITIS (*Integrated Taxonomic Information System*). 2011. *Coffea L.* http://itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?searchtopic=TSN&research_value=35189/. (2 September 2019).

Keraru, E. N. 2017. Pengaruh Pemberian Variasi Dosis Seduhan Bubuk Kopi Robusta (*Coffea canephora*) Manggarai Terhadap Efek Laksatif Pada Tikus Putih betina [Skripsi]. Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan. Universitas Sanata Dharma.

Kusumaningsih, A. 2011. Patogenesitas *Salmonella enterica serotype enterica* Isolat Lokal pada Anak Ayam dan Mencit. *Berita Biologi* 10(4): 463-469.

Maheswari, R. A., A. Krismariono dan L. Bargowo. 2015. Dayahambatekstrak bijikopi robusta (*Coffea canephora*) terhadap pertumbuhan bakteri plak. Unair

Mahmoud, B. S. M. 2011. *Salmonella- A Dangerous Foodborn Pathogen*. InTech. Croatia.

Mahulette, F. 2019. Keragaman Bakteri Asam Laktat Dalam Fermentasi Ikan-Inasua Dengan dan Tanpa Nira Kelapa [Skripsi]. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.

Naughton, P. J. G. Grant, R. J. Spencer, S. Barcadocz, and A. Pusztai. 1996. A Rat Model of Infection by *Salmonella typhimurium* or *Salm. Enteritidis*. *Journal of Applied Biology*. 81 : 651-65.

Nopitasari, I. 2010. Proses Pengolahan Kopi Bubuk (Campuran Arabika Dan Robusta) Serta Perubahan Mutunya Selama Penyimpanan [Skripsi]. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor.

Nugrahani, R., Y. Andayani dan A. Hakim. 2016. Skrining Fitokimia Dari Ekstrak Buah Buncis (*Phaseolus vulgaris* L) Dalam Sediaan Serbuk. *Jurnal Penelitian Pendidikan IPA* Vol. 2 No. 1.

Nugrahayu, E. A. 2011. Salmonella, Leukosit, dan Hematokrit dari Penderita Diare Di Puskesmas Cangkurawok, Dramaga, Bogor [Skripsi]. Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor.

Nurmasari, M. 2010. Pola Pemilihan Obat dan Outcome Terapi Gastroenteritis Akut (GEA) pada Pasien Pediatric di Instalasi Rawat Inap Rumah Sakit PKU Muhammadiyah Surakarta Januari-juni tahun 2008 [Skripsi]. Universitas Muhammadiyah. Jawa Tengah.

Nurrahman, dan Mariyam. 2016. Pengaruh Tempe Kedelai Hitam Terhadap Berat Badan Dan Kadar Air Feses Tikus Yang Diinfeksi Dengan Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC). *The 4th University Research Colloquium* 2016.35-42

Pertiwi, R. dan H. M. Saputra. 2018. Pengaruh Perasan Umbi Bengkuang (*Pachyrhizus erosus* L.) terhadap Gambaran Histopatologi Lambung Mencit (*Mus musculus* L.) dengan Model Tukak Lambung. *Jurnal Farmasi dan Ilmu Kefarmasian Indonesia* Vol. 5 No. 2.

Pramesti, N.A., T. I. Restiadi, A. Yudhana, T. Hernawati, I. S. Hamid, dan M.T. E. Purnama. 2018. Pengaruh Pemberian Ekstrak Kedelai (*Glycine max*) Terhadap Jumlah Pertumbuhan Folikel Ovarium Mencit (*Mus musculus*). *Jurnal Medik Veteriner* Vol. 1 No. 3 : 120-127.

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

Putra, A. L. O. dan E. Kusdiyantini. 2018. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Pangan Fermentasi Berbasis Ikan (Inasua) yang Diperjualbelikan di Maluku- Indonesia. *Jurnal Biologi Tropika* Vol. 1 No. 2 : 6-12.

Putri, A. P. 2011. *Kandungan Fenol, Komponen Fitokimia Dan Aktivitas Antioksidan dalam Dugong (Thalassia hemprichii)* [Skripsi]. Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor.

Romadhon, Subagyo dan S. Margino. 2012. Isolasi Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Dari Usus Udang Penghasil Bakteri usin Sebagai Agen Antibakteria Pada Produk-Produk Hasil Perikanan. *Jurnal Saintek Perikanan* Vol. 8 No. 1.

Rosales, C. 2018. Neutrophil : A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types?. *Front. Physiol.* Vol. 9:113.

Santi, V. D. 2013. *Studi Histopatologi Organ Hati Hamster (Mesocricetus auratus) Yang Diinfeksi Coxiella burnetii* [Skripsi]. Fakultas Peternakan. Institut Pertanian Bogor.

Selviana, B. Y. 2015. Efek of Coffee and Stress With the Incidence Of Gastritis. *J MAJORITY* Vol. 4 No. 2.

Sembulingam, K. and Prema Sembulingam. 2012. *Essential of Medical Physiology Sixth Ed.* J.P. Medical Ltd. London.

Silitonga, F. M. P. 2008. *Penampilan Reproduksi Mencit (Mus musculus) yang Diberi Daun Torbangun (Coleus amboinicus Lour) dan Taraf Sop Daun Torbangun Kering* [Skripsi]. Fakultas peternakan. Institut Pertanian Bogor.

Soleha, T.U. 2015. Uji Kepekaan Terhadap Antibiotik. *JuKe Unila* Vol. 5 No. 9:119-123.

Suartha, I. N. 2010. Terapi Cairan Pada Anjing dan Kucing. *Buletin Veteriner Udayana* Vol. 2 No. 2:69-83.

Sumaryati, B. T., T. Utami dan Suparmo. 2009. Pengaruh Infeksi *Escherichia coli* dan Pemberian *Lactobacillus plantarum* Dad 13 Terhadap Mikrobiota Feses

Tikus Wistar. *AGRITECH* Vol. 29 No. 4.

Sunaryanto, R., E. Martinus dan B. Marwoto. 2014. Uji Kemampuan *Lactobacillus casei* Sebagai Agensia Probiotik. *J. Bioteknologi Biosains Indonesia* Vol. 1 No. 1: 9-14.

Suwayvia, N. 2017. Produksi Bakteriosin Asal *Lactobacillus plantarum* FNCC 0020 Sebagai Antimikroba dan Stabilitasnya pada Variasi Suhu Pemanasan, Suhu Penyimpanan dan PH [Skripsi]. Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

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

Tanauma, H. A., G. Citraningtyas dan W. A. Lolo. 2016. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffeacaneophora*) Terhadap Bakteri *Escherichia coli*. *PHARMACON Jurnal Ilmiah Farmasi- UNSRAT* Vol. 5. No. 4.

Tolistiawaty, I., J. Widjaja, P. P. F. Sumolang dan Octaviani. 2014. Gambaran Kesehatan pada Mencit (*Mus musculus*) di Instalasi Hewan Coba. *Jurnal Vektor Penyakit*, Vol. 8 No. 1.

Tome, M. M., A. M. J. Monreal, L. G. Jimenez, L. Almela, L. G. Diz, M. M. Arcas and M. A. Murcia. 2011. Assessment of antimicrobial activity of coffee brewed

in three different ways from different origins. *Eur Food Res Technol* 233:497-505.

Treuting, P. M., S. M. Dintzis and K. S. Montine. 2018. *Comparative Anatomy and Histology A mouse, Rat, an Human Atlas Second Edition*. Elsevier Inc. London.

Utami, E.R. 2011. Antibiotika, Resistensi, Dan Rasionalitas Terapi. *El-Hayah* Vol.4 (191-198).

Wijayanti E. D. dan Tri A. 2007. Uji Potensial Perlekatan Bakteri Asam Laktat Isolat TLA-15 dan TLA-20 pada Sel Epitel Usus Tikus (*Rattus norvegicus*) [Skripsi]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya, Malang.

Wresdiyati, T., S. R. Laila, Y. Setiorini, I. I. Arief dan M. Astawan. Probiotik Indigenus Meningkatkan Profil Kesehatan Usus Halus Tikus yang Diinfeksi Enteropathogenic *E. coli*. *MKB* Vol. 45 No. 2.

Yuan, W., R. Agoston, D. Lee, S. C. Lee and H. G. Yuk. 2011. Influence of Lactate and Acetate Salt Adaptation on *Salmonella typhimurium* acid and heat resistance. *Food Microbiology* 30(2012)448-452.

Yunita, M., Y. Hendrawan dan R. Yulianingsih. 2015. Analisis Kuantitatif Mikrobiologi Pada Makanan Penerbangan (*Aerofood ACS*)

Garuda Indonesia Berdasarkan TPC (*Total Plate Count*) Dengan Metode *Pour Plate*. *Jurnal Keteknik Pertanian Tropis dan Biosistem* Vol. 3 No. 3 :237-248.

Yusmarini, R. Indrati, T. Utami dan Y. Marsono. 2010. Aktivitas Proteolitik Bakteri Asam Laktat Dalam Fermentasi Susu Kedelai. *J. Teknol. Dan Industri Pangan* Vol. XXI No. 2.

Zainuddin, D., Masyitha, Fitriani, Sarayulis, M., Jalaluddin, E., Rahmi dan idawati.
2016. Gambaran Histologi Kelenjar Intestinal pada Duodenum Ayam Kampung
(*Gallus domesticus*), Merpati (*Columba domestica*) dan Bebek
(*Anser anser domesticus*). *Jurnal Medika Veterinaria* Vol. 10 No. 1.

Zein, U., K.H. Sagala dan J. Ginting. 2004. Diare Akut Disebabkan Bakteri. *e-USU Repository*.

LAMPIRAN

LAMPIRAN 1. Patogen free





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

SURAT KETERANGAN PEMBELIAN HEWAN COBA

NOMOR : 006/HC/5/2019

Dengan ini menerangkan bahwa:

Nama : Nuha Rufaidah

Status : Mahasiswa Fakultas Kedokteran Hewan

Hp/ Telp. : 0877-8795-8008

telah membeli mencit Balb/C dengan kriteria sebagai berikut:

Jenis Kelamin : Jantan

Kondisi Hewan : Sehat (*Free Pathogen*)

Jumlah Hewan : 35 ekor

Umur Hewan : 2 Bulan

Berat badan rata-rata : 20-25 gr

Digunakan untuk : Penelitian

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

Demikian surat keterangan kami buat untuk dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Malang, 10 Mei 2019

M. Basyaruddin, M.Si
Lab. Fisiologi Hewan





**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARENCE"**

No: 1110-KEP-UB

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

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

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

PENELITI : DAHLIATUL QOSIMAH

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 20 Maret 2019
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya



Prof. Dr. H. Auliani'am, DES.
NIP. 19600903 198802 2 001

NB: Nama yang tertera pada sertifikat ini merupakan anggota peneliti

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

LAMPIRAN 3. Perhitungan dosis

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

P1

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

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

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

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

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

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

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

P2

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

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

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

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

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

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

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

P3

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

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

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

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

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

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

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





Lampiran 4. Pengujian Fitokimia

019 6:06:59 PM

tion:

control is on. Temp(C): 35.000

control is on. Temp(C): 20.000

ode is partial loop

ed (ul/s): 8.000

ion Valve switch time (min): 0.000

l (ul/s): 100.000

(ul): 0

ht from bottom(mm): 2.000

source is bottle.

le(ul): 400

volume (ul) 2.000

;

;

;

;

;

od:

;

7/23/2019 by Quantum

Accela Instrument Method

SRM_CHLOROGENIC_ACID.meth

2019 6:06:59 PM

UNIVER

Pressure:
10.00
bar

Pump 1

0.1% PA in Water
0.1% PA in Acetonitril

0.1% PA in Methanol
Acacia AS Injection Logic
First line conditions
Low pressure (0...7000 PSI)
0.00
1250.00

Unit table:
B5 C5 D5 H1/min
5.0 0.0 0.0 300.0
5.0 0.0 0.0 300.0
75.0 0.0 0.0 300.0
5.0 0.0 0.0 300.0
5.0 0.0 0.0 300.0

2019 6:06:59 PM

LABORATORIUM KIMIA ANALISIS DAN INSTRUMENTASI
JURUSAN TEKNIK KIMIA POLITEKNIK NEGERI MALANG
JL. SOEKARNO HATTA NO. 09 PO. BOX 04 MALANG 65141

REKAPITULASI PERHITUNGAN TFC
(QUERCETIN EQUIVALENT)

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

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

Malang, 22 Juli 2019
Pelaksana,

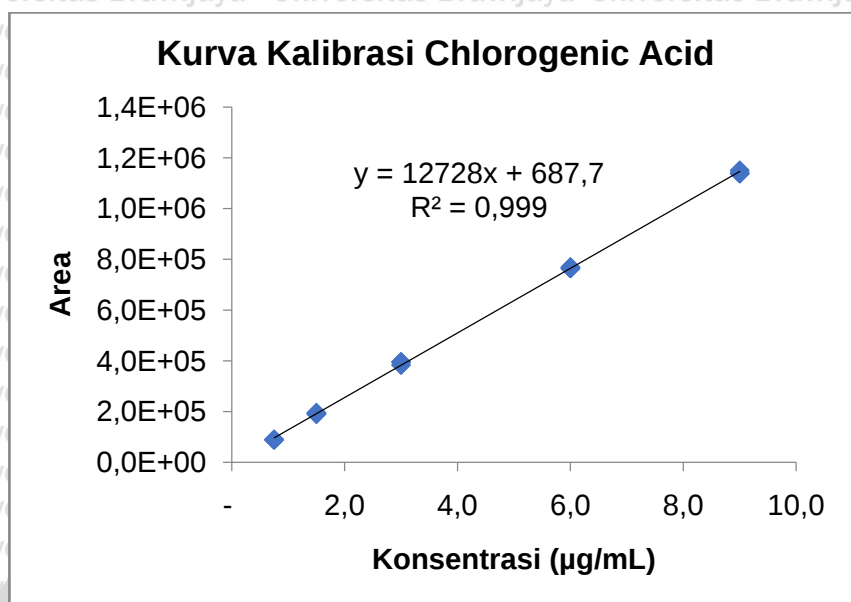
Kaliawan

**LABORATORIUM KIMIA ANALISIS
INSTRUMENTASI
JURUSAN TEKNIK KIMIA POLITEKNIK
NEGERI MALANG**

REKAPITULASI PERHITUNGAN STANDARD

CHLOROGENIC ACID

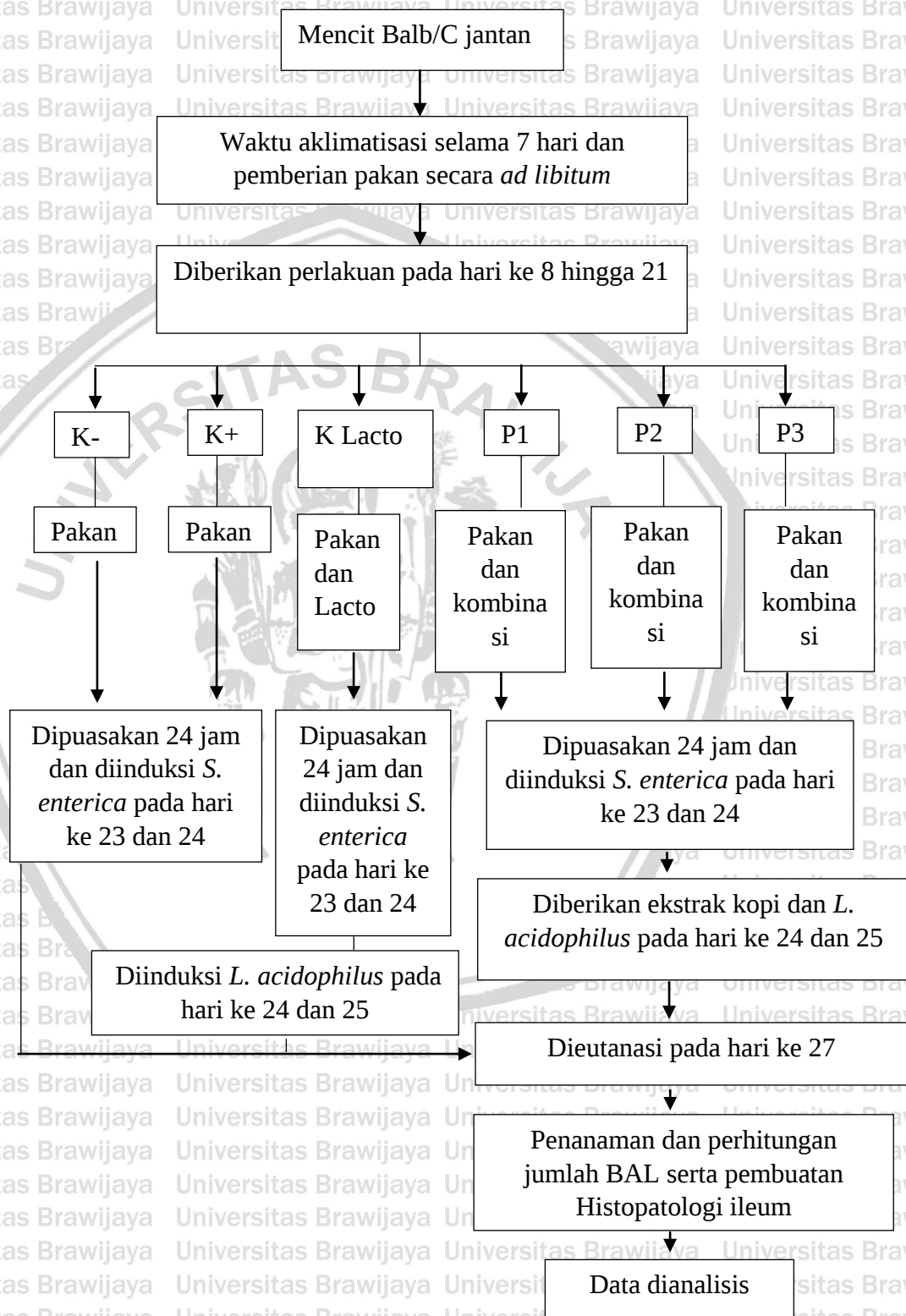
No	Nama STANDARD	Kons. (µg/mL)	(Area)	KONS. THT (µg/mL)	%Ratio
1	nd_CGA_Std_41	0.75	90,094.32	0.71	95.10
	nd_CGA_Std_42	0.75	88,287.94	0.70	93.21
	nd_CGA_Std_43	0.75	88,200.36	0.70	93.11
2	nd_CGA_Std_51	1.50	195,247.80	1.54	102.63
	nd_CGA_Std_52	1.50	192,531.38	1.52	101.20
	nd_CGA_Std_53	1.50	189,199.46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



Malang, Maret
2018

Pelaksana,

Kaliawan



Lampiran 6. Kandungan kopi

Komponen	Konsentrasi (g/100g)		Konsentrasi (g/100g)	
	Green <i>Coffea</i>	Roasted <i>Coffea</i>	Green <i>Coffea</i>	Roasted <i>Coffea</i>
	<i>arabica</i>	<i>Arabica</i>	<i>canephora</i>	<i>canephora</i>
Sukrosa	6.0-9.0	4.2-tr	0.9-4.0	1.6-tr
Gula Pereduksi	0.1	0.3	0.4	0.3
Polisakarida	34-44	31-33	48-55	37
Lignin	3.0	3.0	3.0	3.0
Pectin	2.0	2.0	2.0	2.0
Protein	10.0-11.0	7.5-10	10.0-11.0	7.5-1.0
Asam Amino Bebas	0.5	Tidak terdeteksi	0.8-1.0	Tidak terdeteksi
Kafein	0.9-1.3	1.1-1.3	1.5-2.5	2.4-2.5
Trigonelline	0.6-2.0	1.2-0.2	0.6-0.7	0.7-0.3

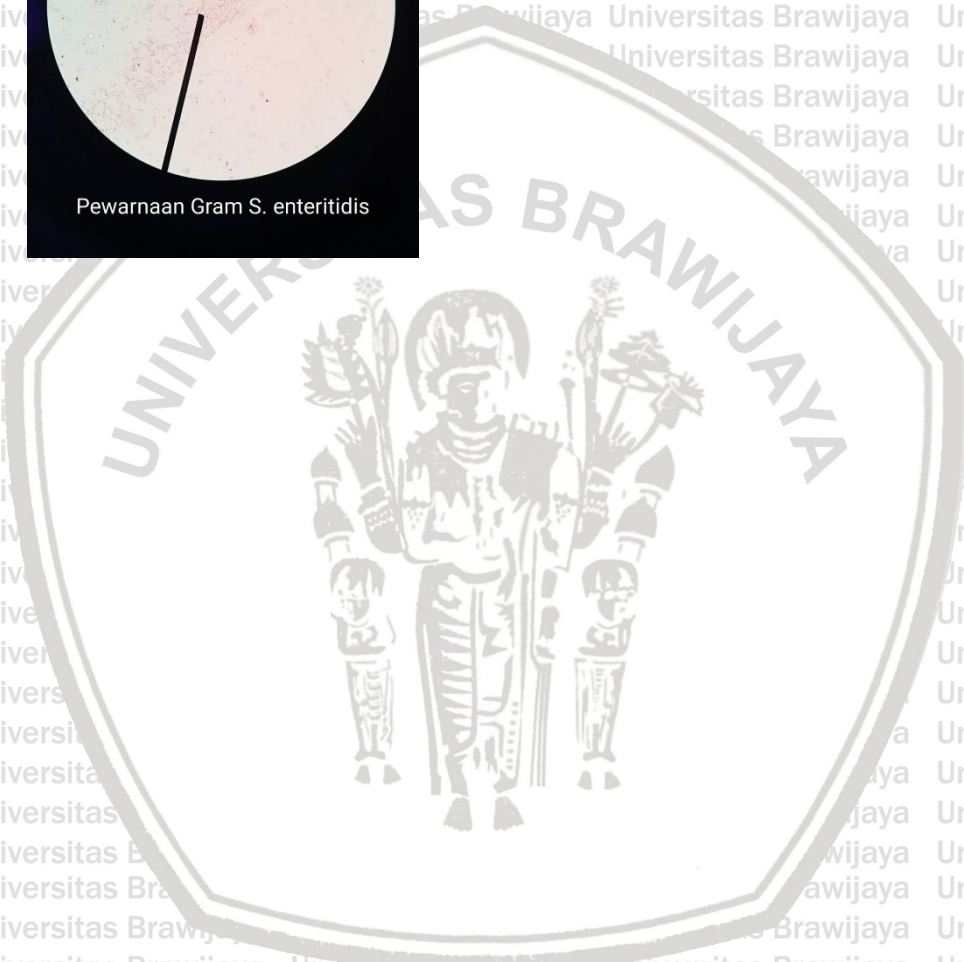
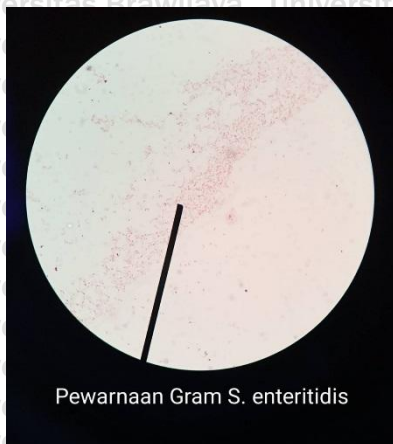
Asam Nikotinik	-	0.016-0.026	-	0.014-0.025
Minyak kopi	15-17.0	17.0	7.0-10.0	11.0
(Trigliserida, sterol/tocopherol)				
Diterpen	0.5-1.2	0.9	0.2-0.8	0.2
Mineral	3.0-4.2	4.5	4.4-4.5	47
Asam Klorogenat	4.1-7.9	1.9-2.5	6.1-11.3	3.3-3.8
Asam Alifatik	1.0	1.6	1.0	1.6
Asam Quinic	0.4	0.8	0.4	1.0
Melanoidins	-	25	-	25



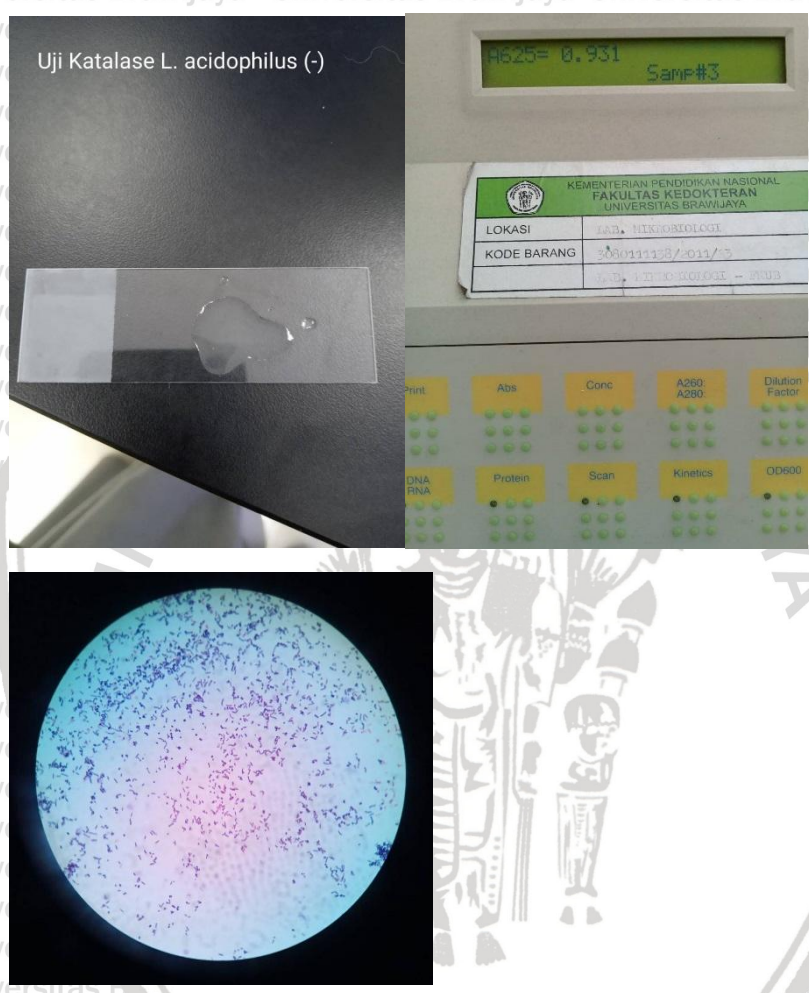
Lampiran 7. Pembuatan Ekstraksi Kopi robusta



Lampiran 8. Identifikasi Bakteri *Salmonella enterica*



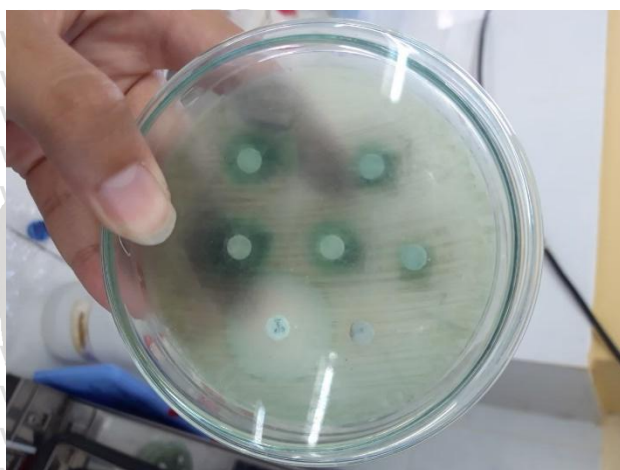
Lampiran 9. Identifikasi Bakteri *Lactobacillus acidophilus*



Lampiran 10. Uji in vitro pengaruh Kopi robusta terhadap *Lactobacillus acidophilus*

2. *Lactobacillus Acidophilus*

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



Lampiran 11. Perhitungan jumlah koloni bakteri ileum

K+ ILEUM			
	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷
1	12	3	1
2	0	0	1
3	183	176	135
4	211	93	79
	101.5	68	54

K- ILEUM			
	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷
1	2	5	4
2	1	0	0
3	2	39	2
4	2	1	1
	1.75	11.25	1.75

LAC ILEUM			
	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷
1	23	1	1
2	6	0	0
3	1	1	16
4	15	1	0
	11.25	0.75	4.25

P1 ILEUM			
	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷
1	59	6	5
2	0	0	0
3	1	0	0
4	0	0	0
	15	1.5	1.25

P2 ILEUM			
	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷
1	4	0	0
2	0	0	73
3	44	12	4
4	0	0	0

12 3 19.25

P3 ILEUM			
	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷
1	1	0	0
2	16	10	5
3	9	6	0
4	2	2	0

7 4.5 1.25

Perhitungan jumlah bakteri (Baron, et al, 1994).

$$\frac{(\text{colony count}) \times (\text{dilution}) \times (\text{first dilution concentration})}{(\text{specimen weight})}$$

(1)

Diketahui: Berat organ ileum yang digunakan = 1 gram

Pengenceran = 10^5

Pengenceran pertama = 10^1

$$K+ = \frac{101,5 \times 10^5 \times 10}{1 \text{ gr}}$$

$$= 1 \times 10^8 \text{ CFU/g}$$

$$K- = \frac{1,75 \times 10^5 \times 10}{1 \text{ gr}}$$

$$= 1,8 \times 10^6 \text{ CFU/g}$$

$$KL = \frac{11,25 \times 10^5 \times 10}{1 \text{ gr}}$$

$$= 1,1 \times 10^7 \text{ CFU/g}$$

$$P1 = \frac{15 \times 10^5 \times 10}{1 \text{ gr}}$$

$$= 1,5 \times 10^7 \text{ CFU/g}$$

$$P2 = \frac{12 \times 10^5 \times 10}{1 \text{ gr}}$$

$$= 1,2 \times 10^7 \text{ CFU/g}$$

$$P3 = \frac{7 \times 10^5 \times 10}{1 \text{ gr}}$$

$$= 7 \times 10^6 \text{ CFU/g}$$

Lampiran 12. Perhitungan panjang vili, lebar vili dan kedalaman kript

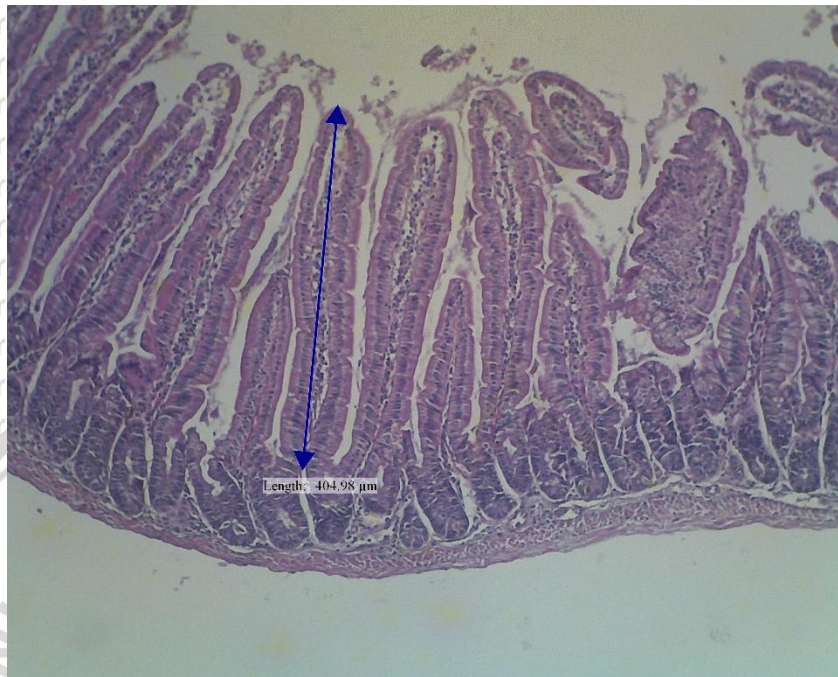
Perlakuan		Panjang (mm)	Lebar (μm)
K+	1	233.48	95.9
	2	283.94	86.85
	3	277.79	111.23
	4	234.29	80.92
Rata-rata		257.4	93.7
K-	1	233.91	65.55
	2	216.94	66.64
	3	227.62	81.02
	4	233.87	51.65
Rata-rata		228.1	66.2
KL	1	278.48	83.33
	2	416.06	72.36
	3	434.41	92.7
	4	260.6	88.9
Rata-rata		347.4	84.3
P1	1	259.95	79.97
	2	266.65	71.25
	3	303.56	51.8
	4	391.1	89.79
Rata-rata		305.3	73.2
P2	1	243.06	82.16
	2	169.93	69.36
	3	275.16	56.07
	4	383.81	59.53
Rata-rata		268	66.8
P3	1	304.69	98.78
	2	213.27	78.73
	3	198.77	81.04
	4	282.94	41.09
Rata-rata		249.9	74.9

Perlakuan		kripta	Vili	Rasio
K+	1	94.57	99.06	1:1 (Sedang 4) 1.2
	2	149.46	147.14	
	3	172.94	187.35	
	4	84.23	155.04	
Rata-rata		125.3	147.15	
K-	1	101.45	161.66	2:1 (Ringan 3) 2.1
	2	101.05	140.6	
	3	77.68	191.49	
	4	41.61	187.06	
Rata-rata		80.45	170.2	
KL	1	89.15	181.34	3:1 (Ringan 1) 3.3
	2	101.85	400.93	
	3	91.93	412.75	
	4	101.53	265.09	
Rata-rata		96.12	315.03	
P1	1	118.59	172.16	2:1 (Ringan 2) 2.4
	2	97.69	173.71	
	3	72.27	286.85	
	4	126.23	352.48	
Rata-rata		103.7	246.3	
P2	1	72.51	195.94	2:1 (Ringan 2) 2.4
	2	64.71	101.61	
	3	76.91	225.89	
	4	120.89	274.03	
Rata-rata		83.76	199.37	
P3	1	138.11	251.54	1:1 (Sedang 1) 1.8
	2	85.61	151.42	
	3	103.31	132.15	
	4	113.61	243.05	

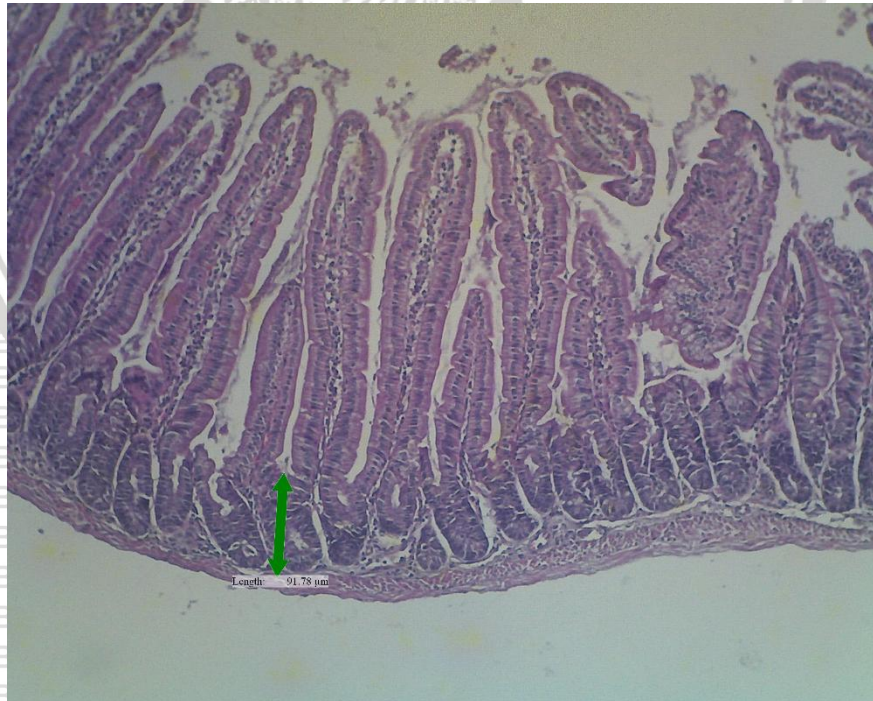
Rata-rata	110.16	194.54	
-----------	--------	--------	--



(Lebar basis vili)



(Panjang vili)



(Kedalaman Kripta)

Lampiran 13. Koloni bakteri organ ileum pada media MRSA

