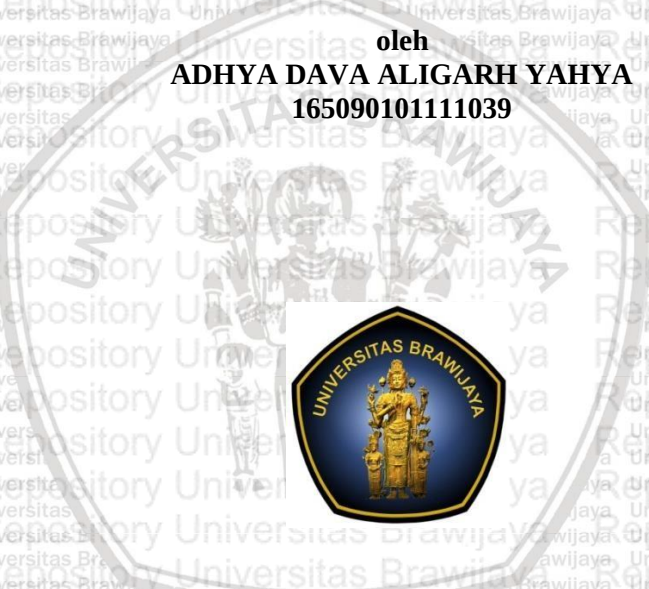


**KOMPOSISI MIKROBIOTA USUS DARI FESES TIKUS
(*Rattus norvegicus*) RHEUMATOID ARTHRITIS INDUKSI
CEA DIBERI PERLAKUAN SUSU DAN YOGURT
KAMBING ETHAWAH**

SKRIPSI

**oleh
ADHYA DAVA ALIGARH YAHYA
165090101111039**



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2020

**KOMPOSISI MIKROBIOTA USUS DARI FESES TIKUS
(*Rattus norvegicus*) RHEUMATOID ARTHRITIS INDUKSI
CEA DIBERI PERLAKUAN SUSU DAN YOGURT
KAMBING ETHAWAH**

SKRIPSI

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam Bidang Biologi**

**oleh
ADHYA DAVA ALIGARH YAHYA
165090101111039**



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2020

HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI**KOMPOSISI MIKROBIOTA USUS DARI FESES TIKUS
(*Rattus norvegicus*) RHEUMATOID ARTHRITIS INDUKSI
CFA DIBERI PERLAKUAN SUSU DAN YOGURT
KAMBING ETHAWAH****ADHYA DAVA ALIGARH YAHYA****165090101111039**

diseminarkan di depan Majelis Penguji

pada tanggal 03 Juli 2020

dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Sains dalam Bidang Biologi

Menyetujui

Pembimbing 1

Pembimbing 2

Prof.Dra. Fatchiyah, M.Kes., Ph.D
NIP. 196311271989032001Eko Suyanto, S.Si., M.Sc
NIP. 198601312018031001

Mengetahui

Ketua Program Studi S-1 Biologi
Fakultas MIPA Universitas BrawijayaDian Siswanto, S.Si., M.Sc.,M.Si.,Ph.D
NIP 197703202005011002

HALAMAN PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Adhya Dava Aligarh Yahya

NIM : 165090101111039

Jurusan : Biologi

Penulis Proposal Skripsi berjudul : Komposisi mikrobiota usus dari feses tikus (*Rattus norvegicus*) *rheumatoid arthritis* induksi CFA diberi perlakuan susu dan yogurt kambing ethawah.

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Skripsi ini adalah benar-benar karya saya sendiri dan bukan hasil plagiat dari karya orang lain. Karya-karya yang tercantum dalam daftar pustaka skripsi ini semata-mata digunakan sebagai acuan/refrensi.
2. Apabila kemudian hari diketahui bahwa isi skripsi saya merupakan hasil plagiat, maka saya bersedia menanggung akibat hukum dari keadaan tersebut.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 03 Juli 2020

Yang menyatakan

Adhya Dava Aligarh Yahya

NIM. 165090101111039

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skrripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.



Komposisi Mikrobiota Usus dari Feses Tikus (*Rattus norvegicus*) *Rheumatoid Arthritis* Induksi CFA yang diberi Perlakuan Susu dan Yogurt Kambing Ethawah

Adhya D. A. Yahya, Fatchiyah, Eko Suyanto

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Brawijaya
2020

ABSTRAK

Rheumatoid arthritis (RA) adalah penyakit autoimun sistemik kronis yang mempengaruhi lapisan sendi sinovial dan kerusakan sendi yang dapat menyebabkan kecacatan pada penderitanya. Mikrobiota usus dianggap sebagai faktor lingkungan yang mempengaruhi perkembangan RA. Mikrobiota yang dapat menyebabkan penyakit RA sangat prospektif dihambat melalui nutrisi yang mampu mengendalikan infeksi bakteri patogen dan menghambat reaksi inflamasi penyakit RA dengan susu kambing yang mengandung protein α -casein-S2 (CSN1S2) sebagai anti-oksidan, anti-osteoporosis, dan anti-inflamasi. Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis pengaruh protein CSN1S2 pada susu dan yogurt terhadap komposisi mikrobiota pada feses tikus model RA – CFA dan mengidentifikasi profil mikrobiota pada feses tikus model RA – CFA. Metode penelitian ini terdiri dari pengambilan sampel feses, perhitungan total koloni, isolasi bakteri, karakterisasi koloni bakteri, pemurnian isolasi bakteri, isolasi DNA, dan PCR. Analisa statistik menggunakan *One Way Analysis of Variance* (ANOVA), dengan nilai signifikansi $p < 0,05$. Analisis data dilakukan menggunakan software SPSS versi 16.0. Protein CSN1S2 pada susu kambing ethawah mampu mengembalikan jumlah total bakteri yang menurun pada perlakuan RA secara signifikan dibanding perlakuan yogurt. Profil mikrobiota pada feses tikus model RA-CFA berdasarkan hasil PCR didominasi oleh kelompok dari bakteri *Lactobacillus* yang mampu menghambat kelompok bakteri patogen dari kelompok *Enterococcus*.

Kata kunci : *Lactobacillus*, Mikrobiota, *Rheumatoid arthritis*, Susu, Yogurt

**Gut Microbiota Composition from Rat Feces (*Rattus norvegicus*)
Rheumatoid Arthritis Induction CFA treatment given by
Ethawah Goat Milk and Yogurt**

Adhya D. A. Yahya, Fatchiyah, Eko Suyanto
Biology Department, Faculty of Mathematics and Natural Sciences
Brawijaya University

2020

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic autoimmune disease that affects the synovial joint lining and joint damage that can cause disability in sufferers. Microbiota is considered as an environmental factor that influences the development of RA. Microbiota that can cause RA disease is very prospective inhibited through nutrients that can prevent pathogenic bacterial infections and inhibit RA's inflammatory reaction with goat milk containing α -casein-S2 protein (CSN1S2) as anti-oxidant, anti-osteoporosis, and anti-inflammatory. The purpose of this study was to analyze the CSN1S2 protein in milk and yogurt against microbiota in the RA-CFA mice model and to identify the microbiota profile in the RA-CFA fecal sample. This research method consisted of faecal sampling, total colony calculation, bacterial isolation, bacterial colony characterization, bacterial isolation purification, DNA isolation, and PCR. Statistical analysis using One Way Analysis of Variance (ANOVA), with a significance value $p < 0.05$. Data analysis was performed using SPSS software version 16.0. CSN1S2 protein in ethawah goat's milk was able to restore the total number of bacteria that decreased in the RA treatment significantly compared to yogurt treatment. Microbiota profile in RA-CFA model feces based on PCR results was dominated by groups of *Lactobacillus* bacteria which were able to inhibit the pathogenic bacteria group from the *Enterococcus* group.

Keyword: *Lactobacillus*, Microbiota, Milk, Rheumatoid Arthritis, Yogurt

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas segala nikmat dan karunia-NYA sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan proposal skripsi yang merupakan syarat untuk memperoleh gelar sarjana sains dalam bidang Biologi di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya Malang.

Dalam penyusunan skripsi ini banyak hambatan serta rintangan yang penulis hadapi namun pada akhirnya dapat melaluinya berkat adanya bimbingan dan bantuan dari berbagai pihak baik secara moral maupun spiritual. Untuk itu pada kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terimakasih, terutama pihak – pihak yang penulis sebutkan di bawah ini :

1. Ibu Prof. Dra. Fatchiyah, M.Kes., Ph.D dan bapak Eko Suyanto, S.Si., M.Sc.selaku dosen pembimbing skripsi yang telah mendampingi dan memberi pengarahan serta tambahan ilmu dan saran – saran yang sangat membangun bagi penulis.
2. Bapak Yoga Dwi Jatmiko, S.Si., M.App.Sc.,Ph.D selaku dosen penguji yang senantiasa memberikan saran dan masukan.
3. Tri Ardyati, M.Agr., Ph.D selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan pengarahan akademik.
4. Keluarga besar Yahya yang selalu memberikan *support* baik moril maupun materil.

Akhir kata, Penulis memohon maaf yang sebesar-besarnya jika dalam penyusunan proposal skripsi ini terdapat kesalahan, oleh karena itu penulis memohon kritik dan saran yang membangun dari semua pihak. Atas perhatian saudara/i saya ucapkan terimakasih.

Malang, 03 Juli 2020

Penulis

Adhya Dava Aligarh Yahya
NIM. 165090101111039

DAFTAR ISI

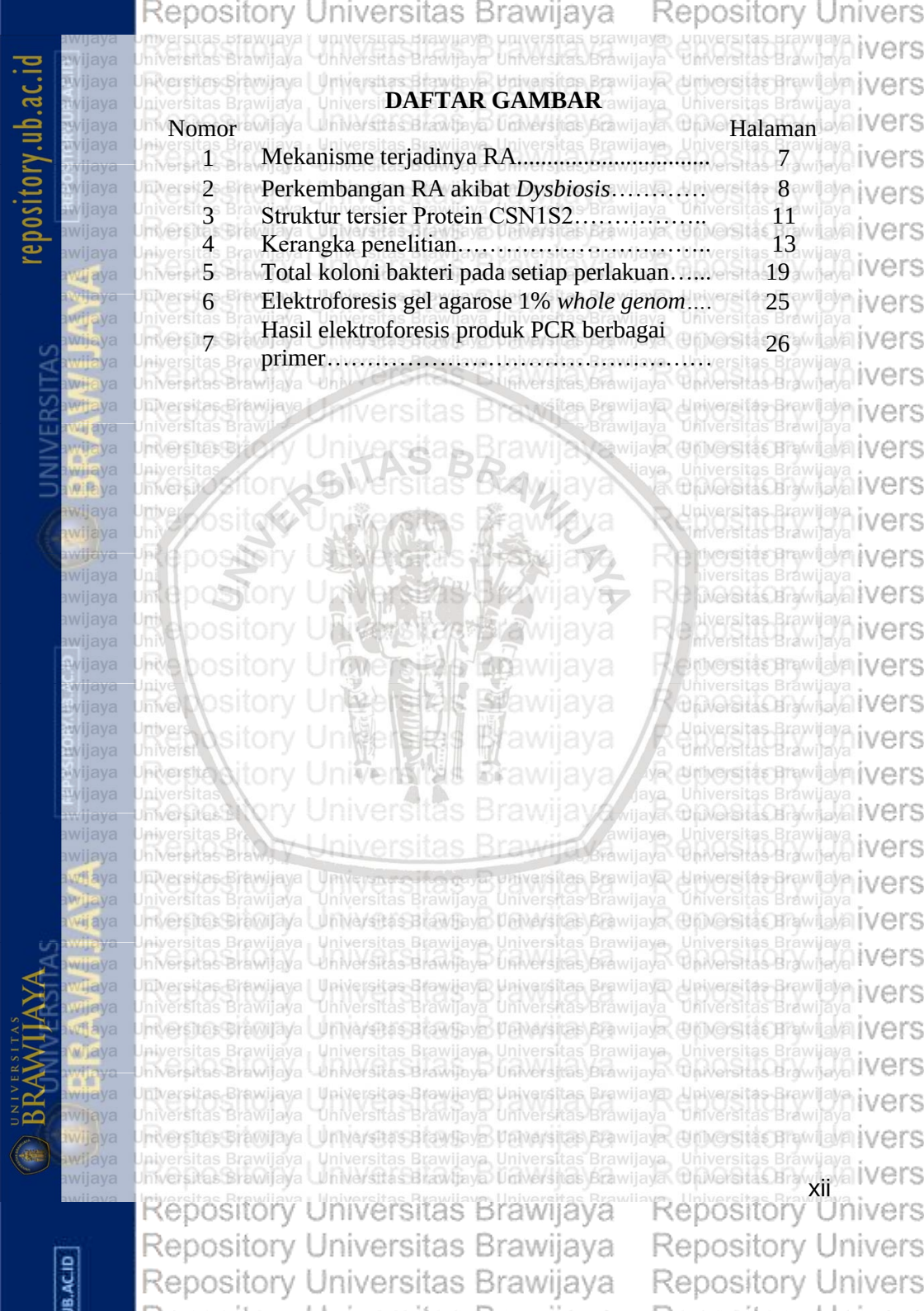
ABSTRAK.....	vi
ABSTRACT	vii
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Rheumatoid Arthritis	4
2.2 Mekanisme Penyebab Rheumatoid Arthritis.....	5
2.3 Mikrobiota Usus dan Analisis Feses.....	8
2.4 Protein CSN1S2 dalam Susu Kambing Ethawah dan Potensinya	9
2.5 Tikus Model <i>Rheumatoid Arthritis</i> Induksi <i>Complete Freund</i> <i>Adjuvant</i>	11
BAB III METODE PENELITIAN.....	13
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	13
3.2 Alat dan Bahan	13
3.3 Rancangan Penelitian	13
3.4 Diagram Alir Rancangan Penelitian	14
3.5 Kode Etik.....	14
3.6 Cara Kerja.....	14
3.6.1 Pengambilan Sampel.....	14
3.6.2 Perhitungan Jumlah Total Koloni Bakteri.....	15

3.6.3 Perhitungan Indeks Keragaman.....	16
3.6.4 Isolasi Bakteri Feses.....	15
3.6.5 Karakterisasi Koloni.....	15
3.6.6 Pemurnian Isolat Biakan	16
3.6.7 Isolasi DNA Bakteri	16
3.6.8 Amplifikasi dengan PCR.....	18
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	19
4.1 Jumlah Total Bakteri	19
4.2 Indeks Diversitas Bakteri Anaerob.....	22
4.3 Uji Kuantitatif dan Kualitatif DNA	24
4.4 Analisis Elektroforesis hasil PCR.....	26
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	30
5.1 Kesimpulan.....	30
5.2 Saran.....	30
DAFTAR PUSTAKA.....	31
LAMPIRAN	41

DAFTAR TABEL

Nomor		Halaman
1	Primer untuk amplifikasi region 16S rRNA dari koloni bakteri.....	18
2	Karakteristik makroskopik koloni bakteri anaerob.....	22
3	Indeks dominasi pada isolat bakteri anaerob.....	23
4	Hasil kuantitatif NanoDrop DNA bakteri..	24
5	Interpretasi pita hasil PCR 16S rRNA pada isolat terpilih.....	27

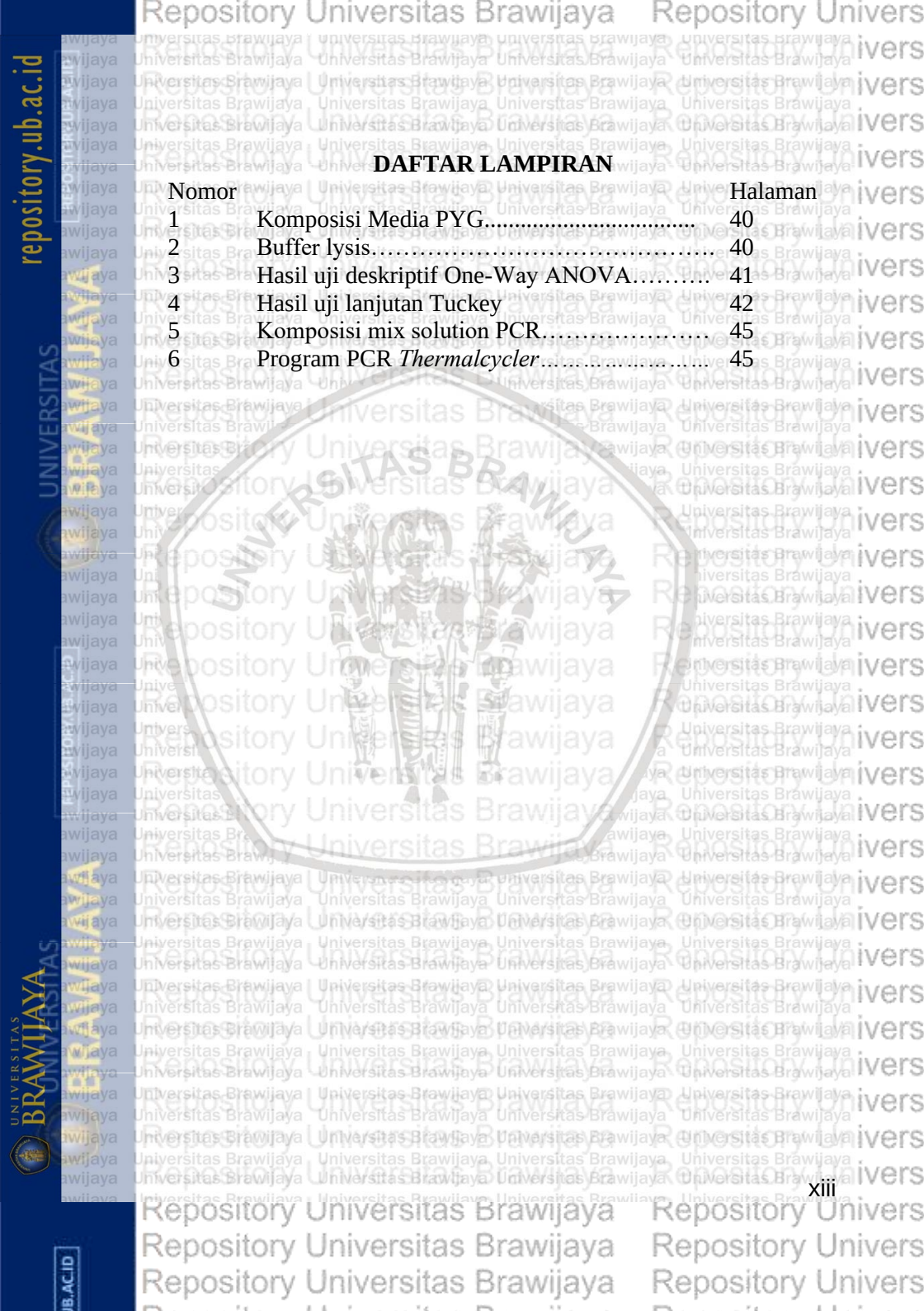




DAFTAR GAMBAR

Nomor		Halaman
1	Mekanisme terjadinya RA.....	7
2	Perkembangan RA akibat <i>Dysbiosis</i>	8
3	Struktur tersier Protein CSN1S2.....	11
4	Kerangka penelitian.....	13
5	Total koloni bakteri pada setiap perlakuan.....	19
6	Elektroforesis gel agarose 1% <i>whole genom</i>	25
7	Hasil elektroforesis produk PCR berbagai primer.....	26





DAFTAR LAMPIRAN

Nomor		Halaman
1	Komposisi Media PYG.....	40
2	Buffer lysis.....	40
3	Hasil uji deskriptif One-Way ANOVA.....	41
4	Hasil uji lanjutan Tuckey.....	42
5	Komposisi mix solution PCR.....	45
6	Program PCR <i>Thermalcycler</i>	45



DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

Singkatan

ANOVA

CFA

DNA

ECM

EtBr

PCA

PCR

PTM

PYG

RA

TBE

TNF

TPC

IL

CSN1S2

RNA

DC

Th

DMARDS

NSAID

CD4+

PCI

TE

TE

TE

TE

TE

TE

TE

TE

TE

TE

TE

TE

TE

TE

TE

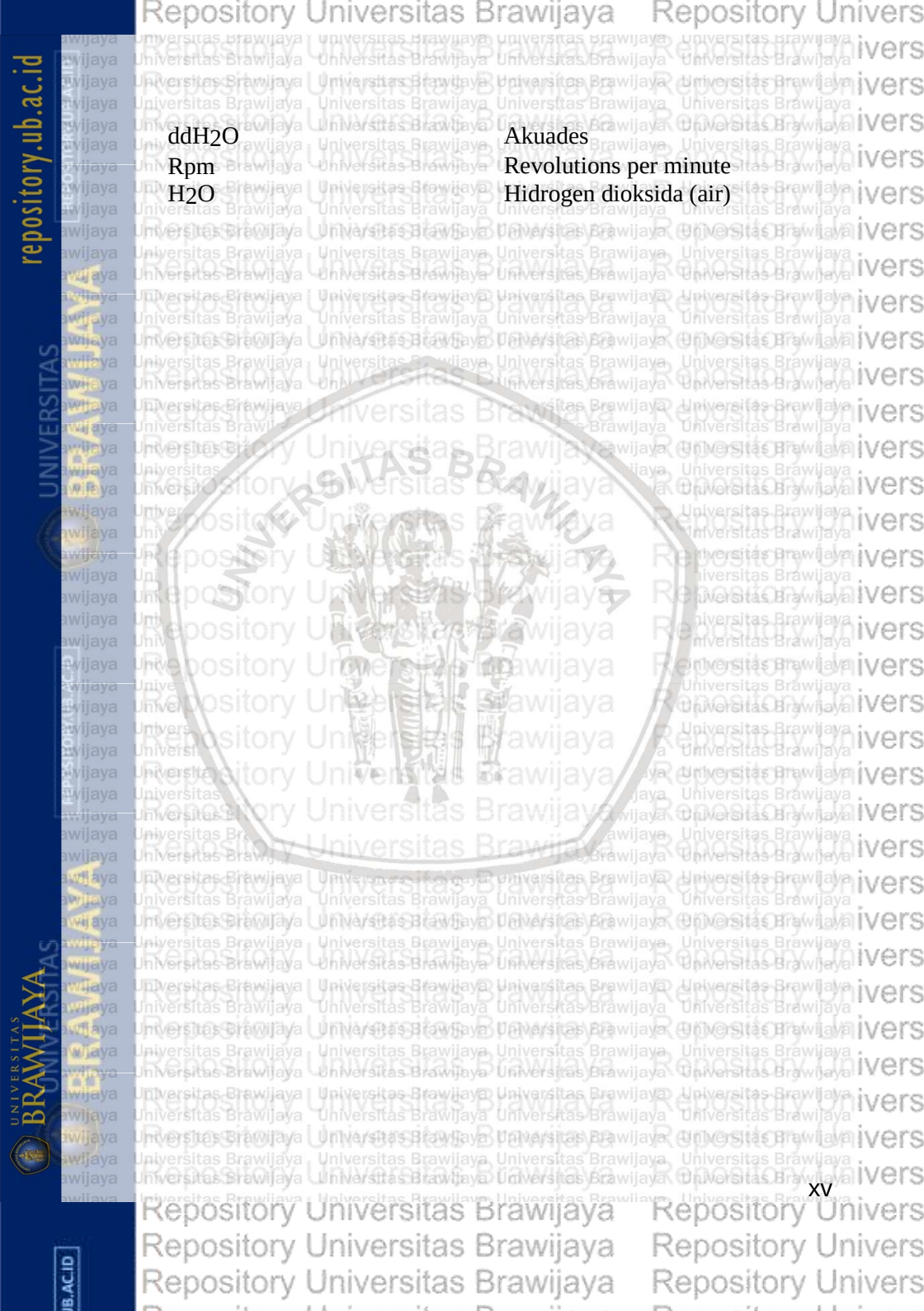
TE

TE

TE

Keterangan

*Analysis of Variance**Complete Freund Adjuvant's**Deoxyribonucleic Acid**Extra Cellular Matrix**Ethidium bromide**Plate Count Agar**Polymerase Chain Reaction**Penyakit Tidak Menular**Peptone Yeast Glucose**Rheumatoid Arthritis**Tris Borac acid EDTA**Tumor Necrosis Factor**Total Plate Count**Interleukin**α-casein-S2**Ribonucleic Acid**Dendritic Cell**T Helper**Disease-Modifying**Antirheumatic Drug**Nonsteroidal Anti-Inflammatory**Drugs**Cluster of differentiation 4+**Phenol, Chloroform,**Isoamilalkohol**Tris – EDTA**Tris – EDTA**Tris – EDTA**Tris – EDTA**Tris – EDTA**Tris – EDTA**Tris – EDTA**Tris – EDTA**Tris – EDTA**Tris – EDTA**Tris – EDTA**Tris – EDTA**Tris – EDTA**Tris – EDTA**Tris – EDTA*



ddH2O
Rpm
H2O

Akuades
Revolutions per minute
Hidrogen dioksida (air)



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Beberapa tahun terakhir, penyakit tidak menular (PTM) telah menjadi penyebab utama kematian di seluruh dunia sehingga diperkirakan akan meningkat pada tahun-tahun mendatang (Rudan dkk., 2015). Salah satu PTM yang menjadi perhatian serius adalah penyakit *rheumatoid arthritis* (RA). Penyakit RA adalah penyakit autoimun sistemik kronis yang mempengaruhi lapisan sendi sinovial dan merusak sendi yang dapat menyebabkan kecacatan dan kematian dini pada penderitanya (Guo dkk., 2018) sehingga kualitas hidup penderita penyakit ini lebih rendah dibandingkan dengan jenis PTM lainnya (Pretorius dkk., 2017). Di Indonesia, mayoritas jumlah kematian penduduk juga disebabkan oleh PTM yang diduga karena faktor lingkungan, perkembangan teknologi dan gaya hidup (Adhania dkk., 2018). Menurut hasil riset kesehatan dasar (Riset Kesehatan Dasar) tahun 2018 mengungkapkan bahwa prevalensi RA mencapai 11,9 % dari total populasi di Indonesia dan jumlah ini terus meningkat setiap tahunnya.

Rheumatoid Arthritis (RA) menyebabkan peradangan sistemik, dengan berbagai ketidakseimbangan antara aktivitas *pro- and anti-inflammatory cytokine*, sehingga menyebabkan terjadinya komplikasi imun multisistem (Pretorius dkk., 2017). Penyakit RA terjadi akibat aktivasi sel T helper CD4⁺ dengan melepaskan mediator inflamasi dan sitokin lokal seperti *tumor necrosis factor* (TNF- α) dan interleukin 1 (IL -1) yang dapat merusak sendi (Crawford dan Harris, 2015). Selain faktor genetik, RA juga dapat disebabkan oleh faktor lingkungan. Baru-baru ini, para peneliti telah memfokuskan pada mikrobiota usus, yang dianggap sebagai faktor lingkungan yang mempengaruhi perkembangan RA (Maeda dan Takeda, 2017). Pada usus manusia terdapat berbagai jenis mikrobiota yang membentuk flora usus dengan pola interaksi yaitu komensal, simbiosis, dan patogen diantara mereka maupun terhadap inang (Baas dkk., 2017). Perubahan mikrobiota (*Dysbiosis*) karena gaya hidup dan pola makan telah menyebabkan ketidakseimbangan imunologis yang dapat mengakibatkan penyakit radang usus (Guerreiro dkk., 2018). Kerusakan terjadi pada permukaan ileum terutama kerusakan vili ileum pada sel serapan kolumnar (Rohmah dkk., 2015). Namun,

hingga saat ini hubungan sebab akibat antara mikrobiota dengan *rheumatoid arthritis* masih diperdebatkan.

Mikrobiota usus terdiri dari 500 – 1000 spesies mikroba, namun sebuah studi baru memperkirakan bahwa mikroflora usus manusia terdiri dari lebih dari 35.000 spesies bakteri (Jandhyala dkk., 2015). Secara keseluruhan, mikrobiota usus yang sehat didominasi oleh filum Firmicutes dan Bacteroidetes (Hara dkk., 2006). Keragaman diversitas mikrobiota ditemukan berkurang pada pasien RA dalam berbagai penelitian (Zhang dkk., 2015). Komposisi mikrobiota pada usus penderita RA berbeda dengan usus yang sehat, dengan pengurangan genus bakteri tertentu seperti *Bifidobacterium* dan *Bacteroides* (Au dkk., 2017). Penelitian pada pasien RA di Jepang menunjukkan peningkatan jumlah bakteri *Prevotella copri* di usus yang menginduksi artritis (Maeda dan Takeda., 2017). Komposisi mikrobiota sebagian besar ditentukan oleh kebutuhan nutrisi bakteri individu dan sangat bervariasi di berbagai lokasi saluran usus yang dapat berfungsi menjadi pelindung terhadap kolonisasi bakteri patogen penyebab RA (Pickard dkk., 2017).

Metabolisme mikrobiota yang dapat menyebabkan penyakit RA sangat prospektif dihambat melalui nutrisi yang mampu mengendalikan infeksi bakteri patogen dan menghambat reaksi inflamasi penyakit RA (Atanasova dan Ivanova, 2010). Nutrisi mempengaruhi komposisi mikrobiota usus karena menyediakan sumber karbon organik utama mereka (Flint dkk., 2012). Susu adalah sumber nutrisi dengan kandungan nutrisi yang lengkap dan seimbang (Lad dkk., 2017). Susu kambing mengandung banyak peptida bioaktif dari protein α -casein-S1, α -casein-S2 (CSN1S2), β -casein dan κ -casein dibandingkan susu sapi (Rohmah dkk., 2015). Penelitian sebelumnya, melaporkan bahwa susu segar dari kambing Ethawah memiliki protein spesifik dengan berat molekul 36kDa, yaitu α -S2 casein (CSN1S2) yang mengandung delapan peptida bioaktif yang masing-masing peptida memiliki fungsi biologis spesifik dalam mekanisme perbedaan seperti anti-oksidan, anti-osteoporosis, dan anti-inflamasi (Tripsila dkk., 2015). Namun, pengaruh protein CSN1S2 terhadap bakteri patogen penyebab RA belum diketahui.

Penelitian mengenai pengaruh protein CSN1S2 yang terdapat dalam susu kambing ethawah terhadap komposisi mikrobiota dalam feses tikus model *Rheumatoid Arthritis* *Complete Freund's*

Adjuvant, serta mekanisme penghambatan mikrobiota usus penyebab *rheumatoid arthritis* belum banyak diteliti. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan informasi tersebut.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini antara lain adalah :

1. Apakah terdapat pengaruh protein CSN1S2 pada susu dan yogurt terhadap komposisi mikrobiota feces tikus model RA–CFA?
2. Bagaimana profil mikrobiota pada feces tikus model RA–CFA berdasarkan PCR?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dilaksanakan penelitian ini antara lain adalah:

1. Menganalisis pengaruh protein CSN1S2 pada susu dan yogurt terhadap komposisi mikrobiota pada feces tikus model RA – CFA.
2. Mengidentifikasi profil mikrobiota pada feces tikus model RA – CFA.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dilaksanakan penelitian ini adalah untuk memberikan informasi mengenai manfaat susu kambing ethawah sebagai nutrisi yang sehat bagi mikrobiota di usus untuk mengontrol penyakit *Rheumatoid Arthritis* penyebab nyeri sendi.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Rheumatoid Arthritis

Rheumatoid arthritis (RA) merupakan penyakit autoimun sistemik kronis yang lebih sering muncul pada wanita dibandingkan pria, serta lebih dominan pada orang tua, dan penyakit ini mempengaruhi sekitar 1% populasi di dunia (Guo dkk., 2018). Setiap tahun, 4 juta kasus baru telah didiagnosis dan di Indonesia prevalensi bervariasi dari 0,3-0,6% di berbagai daerah. Laporan terbaru terkait kasus RA yaitu terjadi sekitar 4,1-9% dari semua kasus baru (Fia dan Westra, 2018). Individu dengan RA akan menderita komorbiditas yang signifikan akibat cacat sistem muskuloskeletal yang mengarah pada penurunan fungsi fisik, peningkatan risiko komplikasi jangka panjang, dan penurunan kualitas hidup (Badghais dkk., 2018). Gejala umum yang sering dialami pasien penderita RA meliputi kaku pada sendi di pagi hari selama lebih dari 30 menit, kelelahan, demam, penurunan berat badan, sendi yang lunak, bengkak, dan nodul *rheumatoid* di bawah kulit (Bullock dkk., 2018).

Etiologi RA tidak diketahui secara pasti, namun faktor genetik telah dikaitkan dengan kondisi dan tingkat keparahannya serta berbagai faktor lingkungan dan gaya hidup juga terbukti meningkatkan risiko RA (Xu dan Lin 2017). Faktor-faktor tersebut dapat digunakan dalam model prediksi untuk RA di masa mendatang serta untuk mengidentifikasi target untuk pencegahan (Deane dkk., 2017). Faktor genetik memberikan pengaruh besar pada perkembangan RA dan meningkatkan prevalensi RA dalam keluarga (Hemminki dkk., 2009).

Identifikasi RA pada presentasi awal dan pengobatan pada tahap awal dapat mempengaruhi perjalanan penyakit, mencegah perkembangan erosi sendi atau memperlambat perkembangan penyakit (Heidari, 2011). Lesi sinovial pada *rheumatoid arthritis* menunjukkan kompleks aspek histopatologis yang berguna dalam diagnosis keparahan penyakit. Secara morfologis, radang sendi pada *rheumatoid arthritis* dimulai dengan membran sinovial dan meluas ke tingkat tulang rawan dan tulang subkondral, akhirnya mengarah pada perubahan destruktif pada sendi (Capistanescu dkk., 2011). RA adalah salah satu kondisi di mana pasien perlu minum obat setiap hari untuk menghilangkan rasa sakit mereka dan mengurangi

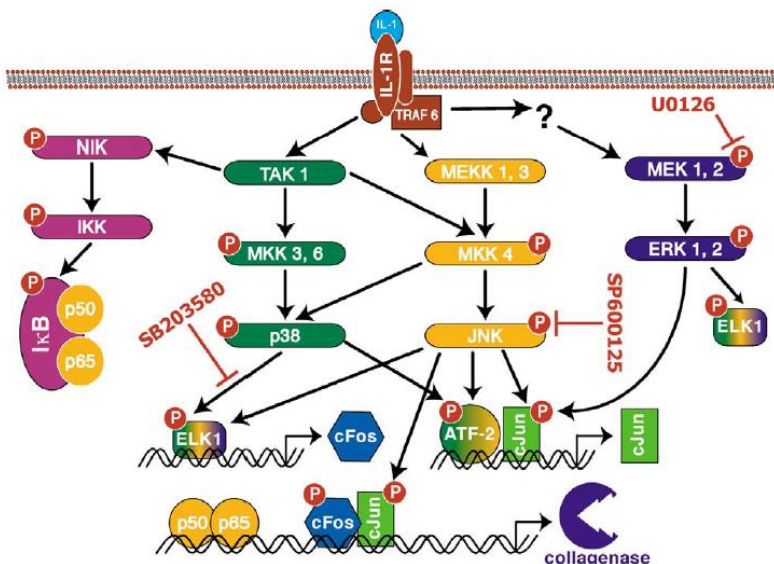
kemungkinan cacat fisik (Alsubaie dkk., 2018). Obat lini pertama secara tradisional telah menjadi agen yang dapat mengurangi peradangan adalah NSAID. Jenis terapi ini berfungsi dengan cepat untuk mengurangi rasa sakit, namun meningkatkan pembengkakan pada pasien RA (Abbasi dkk., 2018). Agen baru yang mampu menginduksi remisi penyakit ini telah diperkenalkan dalam praktik klinis selama dekade terakhir, seperti *disease-modifying antirheumatic drugs* (DMARDs), termasuk DMARDs nonbiologis dan biologis seperti *kinase inhibitor*, *anti-IL-1 and anti-IL-6 agents*, *TNF α blockers*, *B cell depletion regulators and lymphocyte co-stimulators* (Kourilovitch dkk., 2014).

2.2 Mekanisme Penyebab Rheumatoid Arthritis

Rheumatoid arthritis (RA) adalah polyarthritis kronis dan simetris yang paling umum melibatkan persendian tangan, kaki, dan lutut. Degradasi jaringan ikat dimediasi terutama oleh kondrosit, fibroblas sinovial dan osteoklas. Gangguan autoimun ini sebagian besar didorong oleh rekrutmen sel-sel imun teraktivasi (sel T dan B) dan makrofag ke sendi yang sakit (Vincenti dan Brinckerhoff, 2001). Perkembangan penyakit sendi seperti RA dan osteoarthritis dikaitkan dengan proses inflamasi, di mana mediator inflamasi dilepaskan oleh sel imun yang menginfiltrasi serta sel-sel sendi yang menginduksi perubahan ekspresi gen yang mendorong degradasi *extracellular matrix* (ECM). Sitokin seperti interleukin (IL-) 1 dan *tumor necrosis factor α* (TNF α) adalah mediator kunci dalam respon inflamasi pada penyakit sendi destruktif (Baker dkk., 2018).

Tulang rawan artikular normal dijaga oleh tipe sel tunggal yaitu kondrosit, yang mempertahankan homeostasis dengan mengatur ekspresi komponen ECM dan faktor katabolik seperti matrix metalloproteinases (MMPs). Secara kolektif, MMP dapat mendegradasi semua makromolekul ECM, dan selama penyakit radang sendi merangsang kondrosit untuk meningkatkan sekresi kadar MMPs, setelah diaktifkan, memediasi proteolisis tendon, tulang dan tulang rawan (McCaw dkk., 2007). Kolagen interstitial (tipe I, II dan III), adalah target prinsip penghancuran, dan collagenase yang disekresikan (MMP-1 dan MMP-13) memiliki peran utama dalam proses ini. MMP ini diinduksi sebagai respons terhadap sitokin dan *growth factor* yang biasanya ditemukan pada sendi artritis (Vincenti dan Brinckerhoff, 2001).

IL-1 β dan TNF- α mengatur ekspresi gen MMP melalui jalur transduksi sinyal, seperti yang diregulasi oleh protein kinase yang diaktifkan-mitogen (MAPK). C-Jun N-terminal kinase (JNK) memfosforilasi c-Jun untuk mengaktifkan kompleks AP-1 pengikat DNA. Menanggapi rangsangan inflamasi, AP-1 juga menginduksi sintesis mRNA c-fos dan c-jun. MAPK, p38, juga mengaktifkan faktor yang diperlukan untuk sintesis protein AP-1 dan Ets. Dengan demikian, jalur MAPK adalah mediator pensinyalan penting dari sitokin inflamasi dan mereka menargetkan situs AP-1 dan Ets dalam promotor MMP (Burrage dkk., 2006).

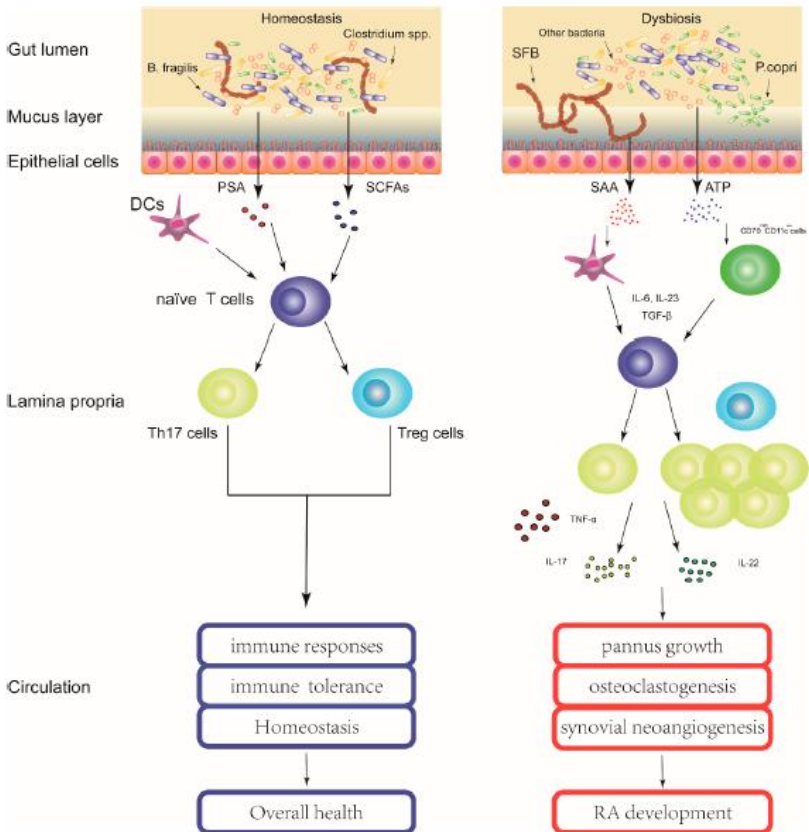


(Burrage dkk., 2006)

Gambar 1. Jalur pensinyalan utama untuk IL-1 beta dalam kondrosit dan sel sinovial

Studi sebelumnya tentang model hewan bebas kuman dan gnotobiotik menunjukkan bahwa keberadaan spesies mikrobiota usus tertentu dapat memengaruhi perkembangan arthritis autoimun (Wu dkk., 2016). Studi pada tikus menunjukkan bahwa kehadiran *segmented filamen bacteria* (SFB) meningkatkan artritis pada tikus (Moreno, 2016). Dalam proses inflamasi ini, SFB meningkatkan produksi isoform fase akut serum amiloid A (SAA) di ileum, yang dapat bertindak pada sel dendritik dari lamina propria usus kecil

untuk menginduksi sel CD4 + T naif untuk berdiferensiasi menjadi Th17 sel (Ivanov dkk., 2009). Sel-sel Th17 adalah bagian dari sel-sel T yang mensekresi sitokin interleukin pro inflamasi seperti IL-17. IL-17 dan IL-22 dapat menginduksi ekspresi RANKL dalam fibroblast sinovial manusia, yang menyebabkan hilangnya keseimbangan RANKL / OPG dan peningkatan osteoklastogenesis dan erosi tulang yang meningkat pada autoimun. radang sendi (Lubberts dkk., 2003). Selain itu, IL-17 dapat merangsang ekspresi berbagai sitokin pro-inflamasi (misalnya, IL-1 β , TNF- α dan IL-6) dan enzim pengurai matriks (misalnya, matrix metalloproteinase (MMP) -1, -2, -9 , dan -13) di seluruh jaringan sinovial, fibroblas sinovial, dan tulang rawan, sehingga meningkatkan peradangan, pergantian matriks, dan destruksi tulang rawan selama perkembangan RA (Moran dkk., 2009).



(Wu dkk., 2016)

Gambar 2. Perkembangan RA akibat *dysbiosis*

2.3 Mikrobiota Usus dan Analisis Feses

Mikrobiota usus manusia diisi oleh populasi mikroorganisme yang kompleks, terdiri dari mikrobiota komensal dan patogen. Mereka tinggal di tubuh setiap orang dan berinteraksi dengan manusia dalam berbagai cara (Au dkk., 2017). Saluran pencernaan manusia adalah ekosistem yang kaya akan spesies mikroba, dengan perkiraan 10^{13} - 10^{14} sel hadir di usus besar (Agans dkk., 2011). Dari saat kita dilahirkan, manusia dihuni oleh komunitas bakteri yang kompleks dan terus berubah yang keduanya membantu membentuk sistem kekebalan mukosa dan menyediakan nutrisi penting (Brusca dkk., 2014). Komunitas mikroba usus ini merupakan komponen penting dari kesehatan dan penyakit manusia. Mikrobiota usus bertanggung jawab untuk hidrolisis dan fermentasi polisakarida, produksi vitamin, stimulasi sistem kekebalan tubuh, modulasi motilitas usus, serta untuk perlindungan inang manusia dari invasi patogen (Agans dkk., 2011).

Mikrobiota usus adalah faktor lingkungan yang memengaruhi homeostasis metabolik dan imun. Komposisi mikrobiota usus cukup stabil pada individu yang normal dan sangat heterogen antar individu (Zhang dkk., 2015). Studi yang meneliti komposisi dan peran mikrobiota usus di berbagai negara penyakit telah mengungkap hubungan dengan penyakit radang usus, autoimun, diabetes tipe 2, obesitas, dan aterosklerosis (Singh dkk., 2017). Peradangan usus dapat menyebabkan perubahan komposisi mikrobiota usus, yang dikenal sebagai *dysbiosis*, yang berhubungan dengan perubahan fungsional dalam transkripom mikroba, proteom atau metabolisme. Semakin banyak bukti telah menunjukkan bahwa gangguan komunitas mikroba usus dapat memicu berkembangnya bakteri dengan kelimpahan rendah dan berbahaya yang selanjutnya dapat memperburuk peradangan usus. Memang, *dysbiosis* di usus distal sering ditandai dengan penurunan prevalensi anaerob obligat dan peningkatan kelimpahan relatif bakteri anaerob fakultatif. Secara khusus, ekspansi Enterobacteriaceae umumnya diamati pada *dysbiosis* usus dalam berbagai konteks yang melibatkan peradangan usus (Pickard dkk., 2017).

Ekosistem mikroba usus yang sehat umumnya dianggap

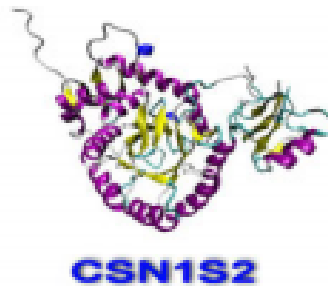
bercirikan kekayaan dan keanekaragaman bakteri yang tinggi, yang diduga mencerminkan stabilitas dan ketahanan ekosistem (Lozupone dkk., 2012). Analisis mikrobiota tinja telah mengungkapkan hubungan yang tampaknya konsisten antara penyakit dan pengurangan jumlah spesies yang diamati atau diperkirakan dalam sampel, menunjukkan kekayaan bakteri menjadi penanda utama bagi kesehatan usus (Cho dan Blaser, 2012). Mayoritas mikrobiota usus pada manusia terdiri dari bakteri anaerob fakultatif dan obligat yang termasuk dalam lima filum yang berbeda termasuk Firmicutes (utama), Bacteroidetes (utama), Proteobacteria (minor), Verrucomicrobia (mayor) dan Actinobacteria (minor) (Lamichhane dkk., 2018). Informasi penting tentang penyakit yang mempengaruhi sistem pencernaan dapat diperoleh dengan pemeriksaan feses. Kotoran dapat diperiksa secara makroskopis, mikroskopis, kimiawi, imunologis, dan mikrobiologis. Sampel tinja yang akan diperiksa harus dikumpulkan dalam wadah bersih, segar atau disimpan dalam kondisi yang sesuai (Lien dkk., 2011). Identifikasi mikrobiota pada feses pasien RA dibandingkan dengan kontrol menunjukkan adanya perubahan keanekaragaman dan kelimpahan bakteri seperti ditemukannya spesies *Prevotella* (Deane dkk., 2017). Keragaman mikroba ditemukan berkurang pada pasien RA dalam berbagai penelitian. Penelitian lain mengamati tidak ada perbedaan pada tingkat filum antara pasien dan subyek sehat, tetapi anggota kelas *Bacillus* dan urutan *Lactobacillus* meningkat, dan spesies *Faecalibacteriumprausnitzii* berkurang pada pasien RA yang tidak menerima terapi. Studi pada pasien di Cina melaporkan bahwa *Lactobacillus* meningkat pada kasus RA yang sangat aktif, dan pada pasien RA dengan onset baru, *Prevotella copri* lebih banyak daripada subjek sehat tetapi kurang berlimpah pada kasus RA yang mapan. Dalam penelitian lain, *Prevotella copri* lebih diperkaya pada individu yang berisiko mengalami *rheumatoid arthritis* (Jeong dkk., 2019).

2.4 Protein CSN1S2 dalam Susu Kambing Ethawah dan Potensinya

Susu adalah sumber nutrisi dengan kandungan nutrisi yang lengkap dan seimbang. Salah satu jenis susu dari hewan dengan kandungan gizi tinggi adalah susu kambing yang memiliki daya cerna yang lebih baik, kapasitas buffer, alkalinitas, dan memiliki nilai terapeutik (Lad dkk., 2017). Susu kambing berbeda dari susu

sapi, di mana total energi, protein, dan kalsium lebih tinggi daripada susu sapi (Turck, 2013). Susu kambing memiliki protein susu yang merupakan sumber utama peptida bioaktif (Tripsilla dkk., 2016).

Peptida bioaktif dari protein susu dimasukkan dalam urutan primer protein asli yang dihidrolisis oleh enzim pencernaan, kemudian dipotong dan dimodifikasi untuk menghasilkan produk aktif sebagai fragmen protein spesifik. Peptida bioaktif berperan penting sebagai pensinyalan molekul dalam fungsi fisiologis dan penyakit kronis yang berhubungan dengan patogenesis, seperti hipertensi, diabetes, kanker, dan osteoporosis, serta imunomodulator, dan antiinflamasi (Rohmah dkk., 2015). Peptida bioaktif adalah produk fermentasi enzimatik yang merupakan aspek penting dari protein makanan dan menawarkan efek nutrisi yang memadai. Banyak peneliti telah melaporkan bahwa produk fermentasi susu turunan peptida, seperti yogurt, keju, atau makanan fermentasi lainnya, menunjukkan fungsi biologis yang lebih bermanfaat terkait jalur pensinyalan sel dibandingkan dengan peptida dari susu segar (Fatchiyah dkk., 2015). Peptida bioaktif dari protein susu diaktifkan dan dilepaskan melalui proses enzimatik proteolisis selama pencernaan makanan dan pemrosesan pada saluran pencernaan (Tripsilla dkk., 2016).



(He dkk., 2010)

Gambar 3. Struktur Tersier Protein CSN1S2

Sebuah protein pada susu dapat dibagi menjadi dua kelompok yang berbeda, protein larut (protein whey) dan protein tidak larut (kasein) pada titik isoelektrik (pI) dan dalam susu kasein larut sebagai misel. Protein whey mengandung α -Lactoalbumin dan β -Lactoglobulin, sedangkan kasein mengandung α S1-, α S2-, β -, dan κ -

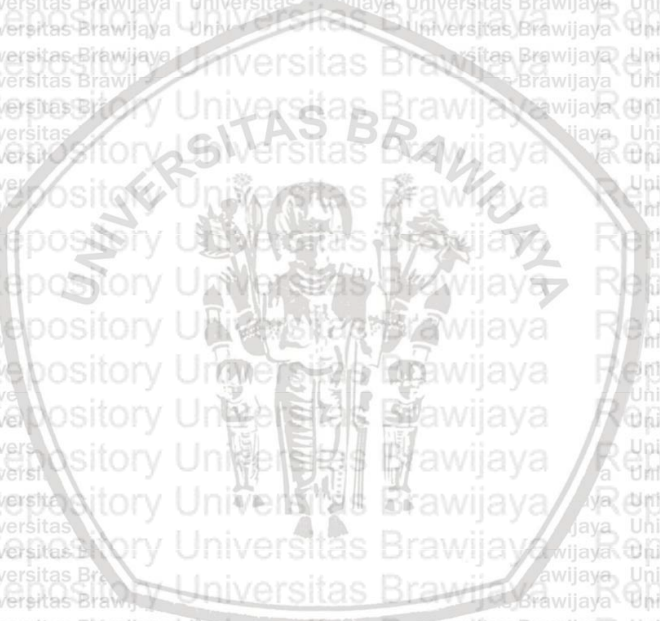
casein (Tripsilla dkk., 2016). Kandungan kualitatif dan kuantitatif dari masing-masing fraksi protein tergantung pada banyak faktor yaitu faktor fisiologis (tahap laktasi, urutan laktasi), lingkungan (iklim, kebersihan), genetik (berkembang biak, silsilah), dan nutrisi. Fraksi protein susu kambing, seperti halnya ruminansia domestik lainnya, sebagian besar dibentuk oleh kasein, yang merupakan 80% dari total protein (Greppi dkk., 2008).

Susu sapi dan susu kambing mengandung banyak peptida bioaktif dari protein α -casein-S1, α -casein-S2 (CSN1S2), β -casein dan κ -casein (Rohmah dkk., 2015). Penelitian sebelumnya, melaporkan bahwa susu segar dari kambing peranakan Ethawah memiliki protein spesifik dengan berat molekul 36kDa, yaitu α -S2 casein (CSN1S2), di mana protein spesifik ini tidak ditemukan dalam susu sapi segar (Fatchiyah dkk., 2015). Protein α -S2 kasein (CSN1S2) yang mengandung delapan peptida bioaktif yang masing-masing peptida memiliki fungsi biologis spesifik dalam berbagai mekanisme (Tripsilla dkk., 2015). Protein susu juga bisa menjadi sumber penting peptida antimikroba, agen alami dengan aplikasi potensial sebagai biopreservatif untuk mengontrol pertumbuhan dan kelangsungan hidup patogen bakteri dalam kandungan makanan. Telah ditemukan bahwa protein yang ada dalam susu kambing adalah prekursor komponen bioaktif, dengan berkontribusi pada aktivitas antimikroba tertentu terhadap spektrum luas bakteri patogen (Costa dkk., 2014).

2.5 Tikus Model Rheumatoid Arthritis Induksi Complete Freund Adjuvant

Penggunaan model hewan tikus untuk mengevaluasi karakteristik penyakit RA telah digunakan untuk mempelajari patogenesis dan proses inflamasi arthritis untuk mengembangkan obat anti-reumatik yang cocok untuk pengobatan. Adjuvant-induced arthritis adalah salah satu model eksperimental terbaik untuk mempelajari efek arthritis dan masih banyak digunakan dalam pengujian praklinis RA. Model RA terbaik yang tersedia untuk peradangan kronis adalah model arthritis *complete Freund's adjuvant* (CFA) (Snehalatha dkk., 2013). Tikus yang diimunisasi dengan CFA yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis* untuk mengembangkan bentuk arthritis yang disebut *Adjuvant-Induced Arthritis* (AIA). AIA dapat diinduksi pada tikus yang naif dengan memperkenalkan sel-T (bukan antibodi

serum) dari tikus rematik. Sel-T arthritogenic mengenali epitop pada protein shock panas mikobakterial (HSP) 65kDa antara residu asam amino 180 dan 188, yang berbagi struktur yang mirip dengan peptida-link proteoglikan yang ditemukan dalam jaringan ikat. Ini menunjukkan bahwa sel-T merespons komponen-mandiri, dan berkontribusi pada induksi artritis (Chondrex, 2017).



BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2019 – Maret 2020 di laboratorium Biologi Molekular dan laboratorium SMONAGENES, Institut Biosains, Universitas Brawijaya, Malang.

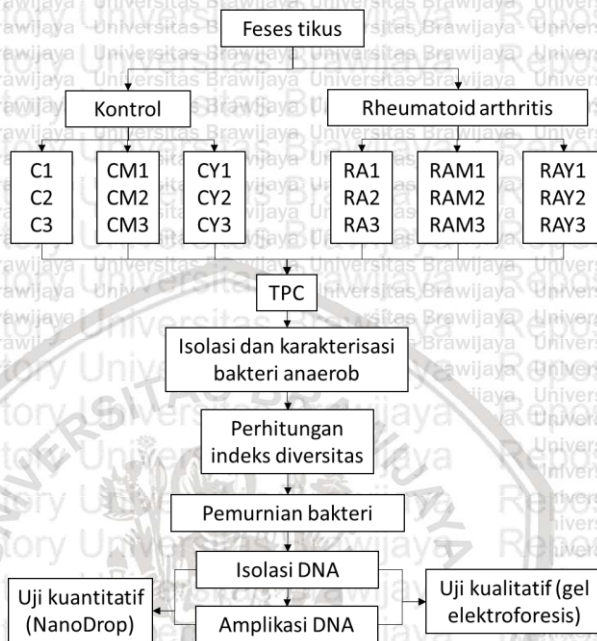
3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi seperangkat peralatan standar kerja di lab mikrobiologi meliputi cawan petri, jarum ose, tips, mikropipet 1ml, mikropipet 200 μ L, mikropipet 10 μ L, erlenmeyer, gelas ukur, *anaerobic jar*, tabung reaksi, tabung propilen, *microtube*, *hot plate stirrer* Thermo scientific, *vortex* Thermo scientific, oven, *PCR tube*, *Microsentrifuge* Fresco, Nanodrop ND-1000 *spectrophotometer*, Takara *PCR thermalcycler*, *gel doc* Biorad. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah PCA agar, PYG agar, *Luria Bertani broth*, agarose, buffer lysis, phenol chloroform isoamilalkohol (PCI), etanol absolut, etanol 70%, buffer TE pH 7,6, buffer TBE, EtBr, *nuclease free water* (ddH₂O), *PCR mix solution*, dan 6 macam Primer (Universal, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*).

3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 6 perlakuan masing – masing 3 ulangan untuk jumlah total bakteri. Analisis komposisi bakteri pada sampel menggunakan indeks Simpson. Analisis data menggunakan ANOVA pada signifikansi $p(<0,05)$.

3.4 Diagram Alir Rancangan Penelitian



Gambar 4. Kerangka penelitian

3.5 Kode Etik

Studi ini telah dievaluasi dan disetujui oleh komite etika penelitian dari Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang, Jawa Timur, Indonesia (nomor registrasi, KEP-90-UB).

3.6 Cara Kerja

3.6.1 Pengambilan Sampel

Sampel feses didapatkan dari berbagai perlakuan pada model tikus yaitu feses tanpa perlakuan (C), feses kontrol perlakuan susu (CM), feses kontrol yang diberi perlakuan yogurt (CY), feses tikus penyakit RA (RA), feses tikus penyakit RA yang diberi perlakuan susu (RAM) dan feses tikus penyakit RA yang diberi perlakuan yogurt (RAY). Sampel feses berbagai model tikus dimasukkan ke dalam masing – masing *microtube* 1,5 mL kemudian disimpan dalam kulkas pada kisaran suhu -80°C dengan tujuan untuk menjaga kondisi

fisiologi sampel untuk analisis lebih lanjut.

3.6.2 Perhitungan Jumlah Total Koloni Bakteri

Perhitungan jumlah total koloni dalam cawan dilakukan menggunakan metode *Total plate count* (TPC). Dilusi dilakukan hingga konsentrasi pengenceran 10^{-4} . Media yang digunakan dalam metode ini adalah PCA (*Plate Count Agar*) dirancang untuk menumbuhkan mikroorganisme yang umum digunakan untuk menghitung jumlah bakteri total (semua jenis bakteri) yang terdapat pada setiap sampel. Media PCA kemudian dilarutkan dalam 250 mL aquades dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL kemudian disterilisasi dengan *autoclave* 121°C , tekanan 1 atm selama 15 menit.

Sampel feses sebanyak 1 g disuspensikan dalam 9 mL garam fisiologis (NaCl 0,9%) dalam masing – masing tabung reaksi kemudian dilakukan serial dilusi sampai 10^{-4} . Sampel hasil dilusi sebanyak 0,1 mL diinokulasi menggunakan teknik *spread plate* pada cawan petri yang berisi medium PCA. Sampel diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Koloni bakteri yang tumbuh dapat langsung dihitung.

3.6.3 Isolasi Bakteri Feses

Bakteri feses diisolasi menggunakan teknik serial dilusi terlebih dahulu hingga pengenceran 10^{-4} . Sampel yang diperoleh dari hasil pengenceran berseri diambil sebanyak 0,1 mL dan diinokulasikan ke dalam masing – masing cawan petri steril. Media yang digunakan untuk mengisolasi bakteri feses yaitu *peptone yeast glucose* (PYG) agar kemudian dituang pada cawan yang telah berisi sampel menggunakan teknik *pour plate* kemudian dihomogenkan dengan menggoyangkan cawan petri membentuk ukuran angka delapan. Inkubasi dilakukan dalam *anaerobic jar* selama 48 jam pada suhu 37°C .

3.6.4 Karakterisasi Koloni

Karakterisasi koloni dilakukan dengan cara mengamati karakter morfologi yang tampak. Karakter yang diamati diantaranya yaitu bentuk, konfigurasi, elevasi, ciri optik, tekstur, warna, tepi dan adanya zona bening.

3.6.5 Perhitungan Indeks Dominasi Simpson

Keragaman spesies bakteri pada masing – masing sampel feses tikus setiap perlakuan dapat diketahui dengan perhitungan menggunakan indeks keragaman Simpson. Koloni bakteri yang tumbuh dapat langsung dihitung. Jumlah total koloni yang ditemukan pada masing – masing sampel dihitung, serta setiap spesies yang memiliki morfologi berbeda pada sampel juga dihitung. Data yang didapatkan kemudian dihitung menggunakan rumus I_d (Guinnes dan Brenda, 2015).

$$D = 1 - \left\{ \sum n(n-1) / N(N-1) \right\}$$

Keterangan :

D = indeks diversitas

n = jumlah individu

N = jumlah total individu yang ditemukan

Nilai indeks keragaman Simpson berkisar antara 0 – 1 dengan representasi sebagai berikut :

0 – 0,3 : Dominansi rendah, keragaman tinggi

0,31 – 0,6 : Dominansi sedang, keragaman sedang

0,61 – 1 : Dominansi tinggi, keragaman rendah

3.6.6 Pemurnian Isolat Biakan

Pemurnian dilakukan dengan cara mengambil koloni dengan karakter yang berbeda secara morfologi menggunakan jarum ose. Selanjutnya melakukan metode *streak plate* pada media PYG agar, kemudian dilakukan inkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Isolat murni dikultur pada *agar slant* sebagai isolat stok dan disimpan pada *coolroom* dengan suhu 4°C untuk digunakan pada uji selanjutnya.

3.6.7 Isolasi DNA Bakteri

Isolasi DNA bakteri pada sampel feses mengikuti protokol Fatchiyah dkk (2011). DNA yang akan diisolasi merupakan isolat perwakilan dari masing – masing perlakuan yang berjumlah 10 isolat dengan karakter morfologi yang berbeda – beda. Isolat murni yang telah dikultur pada *agar slant* diambil dan dipindahkan dan ditumbuhkan ke dalam 3 mL media *Luria Bertani Broth* selama 16 jam. Sebanyak 3 mL bakteri yang telah ditumbuhkan dipindahkan ke dalam 1,5 mL microtube kemudian disentrifugasi dengan kecepatan

10.000 rpm, selama 5 menit, dengan suhu 25°C. Supernatan dibuang kemudian pelet yang tersisa ditambahkan dengan *buffer lysis* sebanyak 1 mL dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C, selanjutnya setiap 10 menit sekali sampel di *mix gentle*. Setelah inkubasi selesai sampel kemudian disentrifugasi kembali dengan kecepatan 10.000 rpm, selama 10 menit, dengan suhu 4°C. Supernatan dibuang, kemudian pelet ditambahkan dengan PCI (*Phenol, Chloroform, Isoamilalkohol*) sebanyak 1x volume larutan dan divortex selama 1 menit. Sentrifugasi sampel kembali dengan kecepatan 10.000 rpm, selama 10 menit, dengan suhu 4°C. Supernatan yang merupakan bagian atas diambil dengan hati – hati jangan sampai terambil bagian tengahnya dan ditambahkan dengan etanol absolut (96%) dingin sebanyak 2,5x volume supernatan, kemudian di *mix gentle* dengan perlahan. Inkubasi sampel pada suhu -20°C selama 5 menit. Dilakukan sentrifugasi kembali dengan kecepatan 10.000 rpm, selama 10 menit, dengan suhu 4°C. Supernatan dibuang dan pelet ditambah dengan larutan alkohol 70% sebanyak 2x volume larutan pelet dan divortex selama 5 menit, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm, selama 10 menit, dengan suhu 4°C, diulang sekali lagi. Pelet yang didapatkan kemudian dikering – anginkan dalam suhu ruang hingga bau alkohol hilang. Pelet yang sudah dikering – anginkan kemudian ditambahkan dengan buffer TE pH 7,6 sebanyak 50 µL dan disimpan pada suhu -20°C untuk dianalisis lebih lanjut. Konsentrasi dan kemurnian DNA diketahui menggunakan nanodrop.

Sampel DNA yang didapatkan dideteksi dengan elektroforesis gel agarosa 0.8 %. Gel agarosa 0.8 % dibuat dengan melarutkan 0,45 g bubuk agarosa kemudian dilarutkan pada 30 mL TBE buffer. Larutan gel agarosa dipanaskan diatas *hotplate stirrer* hingga larut dan mendidih (ditandai dengan larutan gel menjadi bening). Larutan gel agarosa ditambahkan 1 µl ethidium bromide (EtBr) kemudian campuran dihomogenasi. Larutan gel agarosa dituang kedalam gel *tray* kemudian dipasang *comb* (sisiran). Setelah cetakan gel memadat, gel agarosa dipindahkan dalam *chamber elektroforesis* lalu digenangi dengan TBE buffer 1x sebagai larutan penyangga. Marker DNA sebanyak 3 µl, sampel DNA 1 µl dan loading dye 1 µl dimasukkan ke dalam sumuran. Sampel *dirunning* pada tegangan 100 volt selama 60 menit. Pita DNA pada gel divisualisasikan dengan *gel docBiorad*.

3.6.8 Amplifikasi dengan PCR

Sekuen 16S rRNA pada DNA kromosomal diamplifikasi menggunakan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Primer yang digunakan yaitu primer Universal, *Bacteroides*, *Clostridium coccoides*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, dan *Lactobacillus* (tabel 1)(Yusufdkk., 2016). Primer yang dipilih sebelumnya diharapkan mampu mewakili kelompok bakteri dominan yang diharapkan muncul pada feses. Kontrol positif digunakan untuk menentukan ukuran amplikon yang merupakan sampel positif dari penderita *rheumatoid arthritis*. Komposisi mix solution PCR dibuat dengan komposisi terlampir. Program PCR untuk amplifikasi sekuen 16S rRNA menggunakan mesin *Thermalcycler* terlampir. Amplikon atau hasil PCR dilihat menggunakan gel elektroforesis. Konsentrasi gel agarose yang digunakan yaitu 1,5% dan di *running* pada voltase 100 volt selama 45 menit. Marker yang digunakan adalah DNA ladder 100 bp. Gel yang berisi amplikon PCR divisualisasikan menggunakan *gel doc* Biorad.

Tabel 1. Primer untuk amplifikasi region 16S rRNA dari koloni bakteri (Yusuf dkk., 2016).

Primer	Primer sequence (5'-3')	Target
V6-V8: F	TACGGGAGGCAGCAG	Universal
V6-V8: R	ATTAACCGCGGCTGCTGG	
g-Bifid F	CTCCTGGAAACGGGTGG	Bifidobacterium
g-Bifid R	GGTGTCTCTCCCGATATCTACA	
Ent.1017F	CCTTTGACCACTCTAGAG	Enterococcus
Ent.1263R	CTTAGCCTCGCGACT	
Lac1F	AGCAGTAGGGAATCTTCCA	Lactobacillus
Lac2R	ATTYCACCGCTACACATG	
Bact_596F	TCAGTTGTGAAAGTTTGCG	Bacteroides
Bact_826R	GTRTATCGCMAACAGCGA	
Ccoc_F	AAATGACGGTACCTGACTAA	Clostridium
Ccoc_R	CTTTGAGTTTYATTCTTGCGAA	

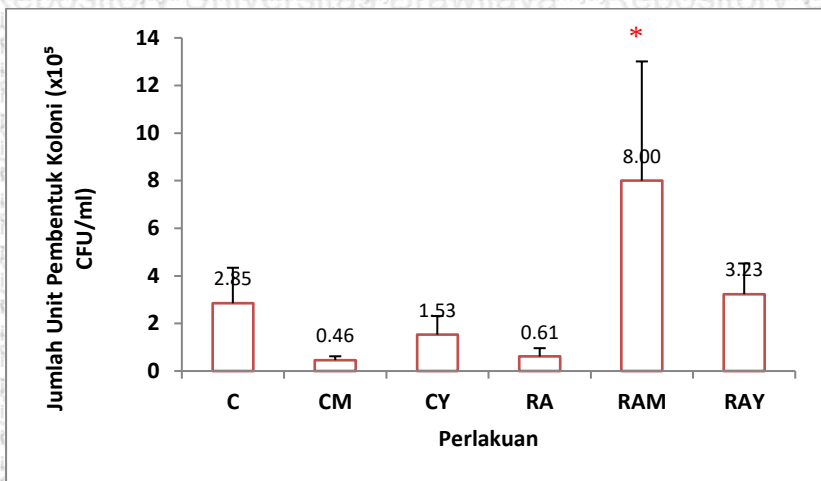
BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Jumlah Total Bakteri

Jumlah total bakteri dari masing – masing perlakuan diketahui dengan metode *total plate count* (TPC). Bakteri ditumbuhkan pada media *plate count agar* (PCA) selama 48 jam. *Plate count agar* cocok untuk penentuan jumlah total bakteri aerob dari susu, produk susu, air, dan bahan sampel lainnya. Media ini tidak mengandung inhibitor atau indikator apa pun dan relatif kaya akan nutrisi (Jorgensen dkk., 2015). Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai TPC pada setiap perlakuan model hewan memiliki nilai yang berbeda – beda. Nilai TPC yang berbeda – beda ini disebabkan perbedaan perlakuan yang diberikan pada masing – masing model hewan. Hasil menunjukkan total koloni rata – rata tiap perlakuan berjumlah 10^5 CFU/mL. Perhitungan total bakteri pada setiap perlakuan dapat dilihat pada gambar 3. Data dibawah menunjukkan total bakteri pada perlakuan model hewan RA terjadi penurunan yaitu $0,61 \times 10^5$ CFU/mL dibandingkan dengan perlakuan kontrol yaitu sebesar $2,85 \times 10^5$ CFU/mL. Perlakuan kontrol yang diberi perlakuan susu dan yogurt kambing ethawa juga mengalami penurunan yaitu $0,46 \times 10^5$ CFU/mL dan $1,53 \times 10^5$ CFU/mL. Model hewan RA yang diberi perlakuan susu dan yogurt menunjukkan terjadinya perubahan total bakteri dengan peningkatan pada model hewan RA yang diberi perlakuan susu (RAM) yaitu $8,00 \times 10^5$ CFU/mL, dan pada perlakuan yogurt (RAY) yaitu $3,23 \times 10^5$ CFU/mL.

Hasil uji lanjut statistik menggunakan *one way analysis of variance* (ANOVA) 5% ($p < 0,05$) dilakukan untuk mengetahui beda nyata perbedaan antar perlakuan. Hasil uji tersebut menunjukkan bahwa perlakuan model hewan kontrol (C) yang diberi perlakuan susu berbeda nyata dengan RAM ($p < 0,05$). Perlakuan RA berbeda nyata dengan RAM ($p < 0,05$). Perlakuan RAM berbeda nyata dengan CM dan RA ($p < 0,05$). Hasil statistik terhadap jumlah total bakteri pada semua perlakuan ditunjukkan pada lampiran 3.



Gambar 5. Total koloni bakteri pada setiap perlakuan

Hasil perhitungan total koloni bakteri pada feses model hewan semua perlakuan menunjukkan adanya perubahan komposisi mikrobiota. Mikrobiota usus memberikan manfaat kesehatan yang penting bagi inang mereka, terutama dengan mengatur sistem kekebalan tubuh (Hooper dkk., 2012). Studi terbaru menunjukkan bahwa perubahan mikrobiota usus (*dysbiosis*) dapat menyebabkan banyak penyakit autoimun seperti *rheumatoid arthritis* dan diabetes tipe 1, (Chervonsky, 2013). Selain itu, *dysbiosis* meningkatkan jumlah bakteri berbahaya dalam usus (Zeng dkk., 2017), yang dapat melepaskan enterotoksin, sehingga meningkatkan permeabilitas usus, menginduksi produksi protein imunosupresif yang menyebabkan disfungsi imun, merusak sel-sel epitel usus, dan memengaruhi metabolisme energi yang menyebabkan peradangan usus (Shen dkk., 2018). Peradangan usus pada manusia dikaitkan dengan ketidakseimbangan dalam mikrobiota dan ditandai oleh berkurangnya keragaman mikroba, berkurangnya jumlah bakteri anaerob obligat dan perluasan bakteri anaerob fakultatif dalam filum Proteobacteria, sebagian besar anggota keluarga Enterobacteriaceae (Chiodinidkk., 2015). Grafik diatas dapat terlihat bahwa terjadi penurunan jumlah koloni bakteri pada model hewan dengan perlakuan RA jika dibandingkan dengan kelompok kontrol (C). Mikrobiota usus memainkan peran penting dalam pengembangan penyakit radang sendi pada tikus (Baas dkk., 2017). Tikus yang

diinduksi dengan *complete Freund's adjuvant* (CFA) mempengaruhi komposisi mikrobiota usus pada model hewan RA. Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa induksi CFA menyebabkan penurunan pada jenis bakteri *Bacteroides* dan terjadi peningkatan pada jenis Lactobacillaceae and Lachnospiraceae (Liu dkk., 2016). CFA efektif dalam merangsang imunitas sel T-helper yang mengarah pada produksi imunoglobulin dan sel T efektor tertentu (Armentoro dkk., 2006). Injeksi model hewan RA dengan CFA sebagai agen inflamasi dapat menginduksi imunitas adaptif yang merangsang sel T-helper untuk melepaskan IL-17 sehingga terjadi respon inflamasi yang menyebabkan kerusakan pada usus (Rohmah dkk., 2015).

Meningkatnya total koloni pada perlakuan RAM dan RAY dibandingkan dengan CM dan CY menunjukkan adanya pengaruh dari pemberian susu dan yogurt kambing peranakan Ethawah pada model hewan RA yang mampu mengembalikan koloni komensal bakteri di usus. Telah dilaporkan bahwa mikrobiota utama dalam susu kambing terdiri dari spesies *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* dan *Streptococcus*, bakteri dengan sifat probiotik dan bakteriokinogenik yang diketahui (Quigley dkk., 2013). Probiotik menghasilkan agen antimikroba atau senyawa metabolik yang menekan pertumbuhan mikroorganisme lainnya (Collado dkk., 2007). Probiotik dapat memanipulasi komunitas mikroba usus dan menekan pertumbuhan patogen dengan menginduksi produksi host dari β -defensor dan IgA. Probiotik dapat membentengi *intestinal barrier* dengan mempertahankan *tight junctions* dan mendorong produksi musin. Imunomodulasi yang dimediasi probiotik dapat terjadi melalui mediasi sekresi sitokin melalui jalur pensinyalan seperti NF κ B dan MAPK, yang juga dapat memengaruhi proliferasi dan diferensiasi sel-sel imun (seperti sel T) atau sel epitel (Thomas dan Versalovic, 2010).

Susu dianggap berperan penting dalam diet yang seimbang karena kaya akan protein berkualitas tinggi, serta komponen bioaktif yang mempromosikan kesehatan (Pfeuffer dan Schrezenmeir, 2007). Protein CSN1S2 yang terkandung dalam susu dan yogurt kambing peranakan Ethawah dapat menekan efek inflamasi secara tidak langsung melalui peningkatan IL-10 terhadap IL-17. Studi terbaru juga melaporkan bahwa IL-10 dapat menekan Th-17 pada gilirannya dan menurunkan level IL-17 (Gu dkk., 2008). Susu kambing dapat membantu dalam mempertahankan homeostasis inflamasi dengan

merangsang produksi beberapa sitokin dengan berbagai efek, seperti TNF- α (sitokin proinflamasi), IL-6 (reaktan fase akut dan faktor pertumbuhan untuk sel B), dan IL -10 (sitokin anti inflamasi) (Amati dkk., 2010). Penelitian sebelumnya menyebutkan protein CSN1S2 mampu memperbaiki sel – sel epitel usus yang rusak (Rohmah dkk., 2015).

Pemberian yogurt pada perlakuan RAY meningkatkan jumlah bakteri tidak signifikan dibandingkan dengan RA yang diberi susu, hal ini dapat disebabkan oleh peptida bioaktif yang berasal dari protein susu. Protein CSN1S2 pada yogurt kambing Ethawah dimungkinkan gagal untuk mengontrol fungsi fisiologis karena memiliki mekanisme yang berbeda untuk mengontrol ketidakseimbangan flora di usus (Serino dkk., 2010), sehingga tampak perubahan yang tidak terlalu signifikan pada RA yang diberi perlakuan yogurt. Protein kasein seperti CSN1S2 dari susu kambing Ethawah memiliki fungsi biologis sebagai imunomodulator, namun memiliki respon yang berbeda pada protein yogurt CSN1S2 (Rohmah dkk., 2015).

4.2 Indeks Diversitas Bakteri Anaerob

Isolasi bakteri anaerob dari feses menggunakan media *peptone yeast glucose* (PYG) agar selama 48 jam didalam anaerobic jar diperoleh koloni bakteri yang memiliki karakteristik yang berbeda – beda. *Peptone Yeast Glucose* (PYG) adalah media pengayaan, non selektif yang direkomendasikan untuk kultur dan identifikasi biokimia dari mikroorganisme anaerob (Jousimies dkk., 2002). *Peptone Yeast Glucose* (PYG) awalnya diformulasikan oleh *Virginia Polytechnic Institute Anaerobe Laboratory* (VPI) untuk memfasilitasi pemulihan mikroorganisme yang lebih rewel, seperti *Prevotella*, *Porphyromonas*, dan kelompok *Bacteroides fragilis*, serta bakteri anaerob obligat lainnya (Versalovic dkk., 2011). Bakteri yang sudah tumbuh pada media PYG, kemudian dikarakterisasi secara makroskopik meliputi pengamatan morfologi koloni bakteri dengan mengamati bentuk, konfigurasi, elevasi, ciri optik, tekstur, warna, dan tepi yang tumbuh pada media. Hasil pengamatan secara makroskopik dapat dilihat pada tabel 2.



Tabel 2. Karakteristik makroskopik koloni bakteri anaerob

Kode Isolat	Makroskopik Koloni						
	Bentuk	Konfigurasi	Elevasi	Ciri Optik	Tekstur	Warna	Tepi
2	Tidak teratur	Beralun	Datar	Opalesens	Kasar	Putih	Bergerigi
4	Bulat	Menyeluruh	Datar	Miring vertikal	Halus	Putih	Halus
6	Bulat	Menyeluruh	Datar	Pudar	Halus	Putih	Halus
7	Bulat	Menyeluruh	Datar	Miring horizontal	Halus	Putih	Halus
11	Tidak teratur	Berserabut	Datar	Seperti debu	Kasar	Putih bening	Serabut
13	Bulat	Menyeluruh	Datar	Kecil	Halus	Putih	Halus
17	Bulat	Menyeluruh	Datar	Mengkilat, opalesens	Halus	Putih menyala	Halus
20	Bulat	Menyeluruh	Datar	Miring horizontal, pudar tipis	Halus	Putih tipis	Halus
21	Bulat	Menyeluruh	Datar	Mengkilat, iridesens	Kasar	Putih menyala	Beralun
26	Bulat	Menyeluruh	Datar	Pudar	Halus	Putih tipis	Halus

Hasil karakteristik morfologi yang telah dilakukan, selanjutnya digunakan untuk menentukan indeks dominasi. Indeks diversitas yang digunakan yaitu indeks Simpson yang berfungsi untuk mengetahui tingkat dominasi pada masing - masing perlakuan. Perhitungan menggunakan indeks Simpson didapatkan nilai yang bervariasi pada setiap perlakuan. Karakter morfologi diatas digunakan untuk menentukan isolat yang akan diisolasi DNAny. Nilai indeks Simpson yang diperoleh berkisar antara 0,60 – 0,98 seperti pada tabel 6. Menurut (Zheng dkk., 2017) nilai indeks dominasiSimpson berkisar antara 0 -1. Nilai semakin rendah menunjukkan semakin rendahnya tingkat dominasi spesies dalam suatu komunitas dan jika mendekati angka satu maka dominasi makin tinggi. Data hasil indeks dominasi Simpson yang diperoleh, menunjukkan adanya dominasi yang tinggi pada sampel C dan dominasi menengah pada sampel CY. Hal tersebut berdasarkan tabel 3, dimana isolat 4 dan 7 mendominasi pada setiap perlakuan. Spesies dominan dalam mikrobiota usus termasuk anaerob seperti *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, dan *Clostridium* (Quigley, 2011). Isolat yang mendominasi pada setiap perlakuan dimungkinkan memiliki pengaruh untuk menghambat

pertumbuhan bakteri jenis lain.

Tabel 3. Indeks Dominansi Simpson pada isolat bakteri anaerob

ISOLAT	C	CM	CY	RA	RAM	RAY
ISOLAT 2	1	0	1	0	0	0
ISOLAT 4	33	19	1	4	15	6
ISOLAT 6	2	9	0	0	0	0
ISOLAT 7	17	10	2	3	9	7
ISOLAT 11	0	0	0	0	1	0
ISOLAT 13	0	0	16	0	0	13
ISOLAT 17	0	0	0	1	0	0
ISOLAT 20	0	0	0	0	0	1
ISOLAT 21	0	0	1	0	0	1
ISOLAT 26	2	0	0	0	0	0
Id Simpson	0,98	0,97	0,60	0,89	0,93	0,83

4.3 Uji Kuantitatif dan Kualitatif DNA

Isolasi DNA bakteri pada 10 isolat terpilih didapatkan konsentrasi serta kemurnian pada ekstrak DNA dapat dilihat pada tabel 7. Pemilihan isolat dipilih berdasarkan perwakilan dari masing-masing perlakuan beserta jumlah bakteri yang ditemukan. Isolat 4, 7, dan 21 merupakan isolat yang ditemukan pada semua perlakuan. Isolat 11 hanya ditemukan di perlakuan CY, isolat 26 dan 20 hanya ditemukan di perlakuan RAY, 26 ditemukan di perlakuan C, isolat 17 ditemukan di RA dan RAM. Isolat 6 hilang di perlakuan CY dan isolat 2 hilang pada perlakuan CM.

Hasil dari isolasi DNA bakteri anaerob dari feses tikus (*Rattus novergicus*), kemudian dilakukan uji kuantitatif menggunakan alat *NanoDropSpectrophotometer*. *Spectrophotometer* digunakan untuk mengetahui perbandingan absorbansi DNA pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm (Wilfinger dkk., 2018). *NanoDrop Spectrophotometer* digunakan untuk mengukur konsentrasi asam nukleat dalam volume sampel satu mikroliter. Rasio konsentrasi DNA dan *optical density* (OD) pada 260/280 nm yang didapatkan, kemudian digunakan untuk mengevaluasi kemurnian DNA yang

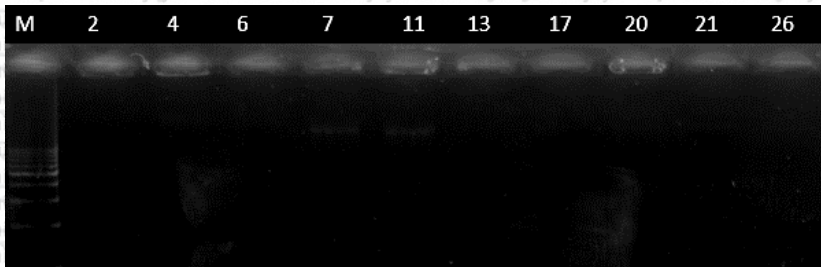
dihitung pada waktu yang sama (Lee dkk., 2010). Hasil uji kuantitatif DNA pada sampel DNA bakteri feses berupa nilai konsentrasi dan kemurnian ekstrak DNA dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil kuantitatif NanoDrop DNA bakteri

Sampel	Konsentrasi (ng/ μ L)	Kemurnian (260/280)
2	226.24	1.67
4	65.37	1.56
6	81.67	1.62
7	71.68	1.65
11	62.55	1.59
13	98.73	1.76
17	100.65	1.55
20	54.03	1.58
21	179.37	1.65
26	298.89	1.74

Hasil pengecekan kuantitas dengan *Nanodrop Spectrophotometer* menunjukkan bahwa DNA yang diperoleh dari ekstraksi DNA memiliki kuantitas yang cukup baik. Konsentrasi DNA yang diperoleh memiliki kisaran antara 54.03 – 298.89 ng/ μ L. Jumlah ini relatif cukup dan dapat digunakan untuk analisis molekuler lebih lanjut. Sebanyak 1 μ L yang dibutuhkan untuk amplifikasi DNA dengan PCR (Nzilibili dkk., 2018). Kemurnian dari ekstrak DNA yang didapatkan belum cukup murni, dimana rasio kemurnian DNA yang diperoleh berada pada kisaran angka 1.55 – 1.76. Fatchiyah dkk (2011) menjelaskan bahwa DNA dikatakan murni apabila memiliki rentang antara 1.8 - 2.0. Rasio kemurnian DNA dengan nilai <1,75 maka dapat dikatakan DNA masih terkontaminasi dengan protein, sedangkan jika rasio tersebut >2,0 maka DNA terkontaminasi oleh RNA (Willian dkk., 1997). Hasil ekstraksi DNA yang telah dilakukan dapat dikatakan masih terkontaminasi dengan protein, dimana hasil menunjukkan kemurnian dibawah 1,75. Rasio 260/280 yang tidak normal biasanya menunjukkan bahwa sampel terkontaminasi oleh residu fenol, guanidin, atau reagen yang digunakan dalam protokol ekstraksi, dalam hal ini akan menyebabkan rasio rendah. Rasio yang tidak

akurat juga dapat ditemui pada konsentrasi yang sangat rendah (<10 ng / μ l) asam nukleat (Wilfinger dkk., 2018).



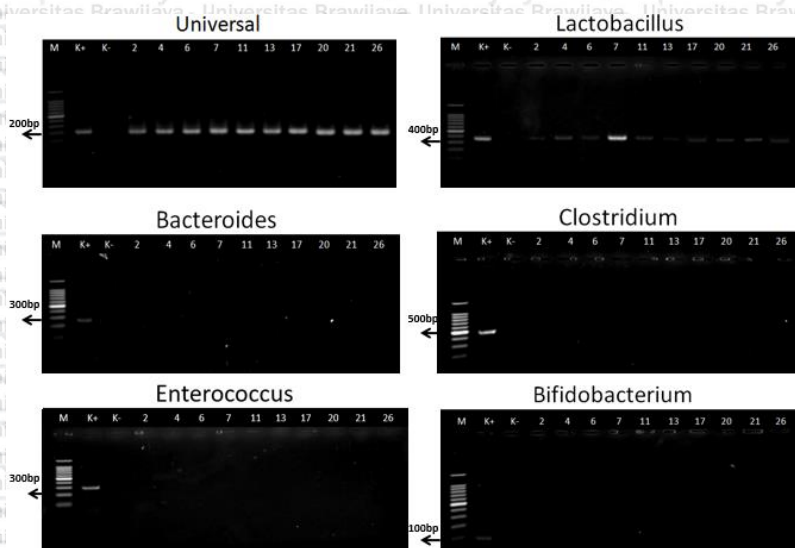
Gambar 6. Elektroforesis gel agarose 0.8% *whole genom*

Penelitian uji kualitatif DNA dari hasil isolasi DNA bakteri pada feses dilakukan dengan elektroforesis gel agarose 0.8% (gambar 5). Elektroforesis gel agarosa adalah cara paling efektif untuk memisahkan fragmen DNA dengan berbagai ukuran mulai dari 100bp hingga 25.000 bp (Lee dkk., 2012). Secara umum, visualisasi hasil isolasi DNA bakteri feses menunjukkan kualitas yang relatif rendah, dikarenakan band atau pita DNA yang terbentuk kurang jelas, tipis, dan tidak muncul. Hasil menunjukkan pita DNA yang muncul hanya pada isolat 4, 7, 11, namun pada isolat 4 pita DNA sangat tipis (gambar 4). DNA dari isolat 4, 7, 11 memiliki ukuran diatas 10.000 bp hal ini dapat dilihat dari posisi Marker 1kb dimana pita DNA dari isolat tersebut berada diatas posisi Marker. Pita DNA yang tipis dapat dipengaruhi oleh banyak faktor, diantaranya yaitu konsentrasi DNA yang digunakan untuk elektroforesis, kualitas pewarna DNA, serta buffer yang digunakan sebagai fase geraknya elektroforesis (Khusnuryan dkk., 2016).

4.4 Produk PCR

Hasil pengecekan kualitas dan kuantitas yang sudah dilakukan, kemudian DNA genom hasil isolasi feses diamplifikasi dengan PCR menggunakan 6 set Primer yaitu Universal, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Enterococcus*, dan *Bifidobacterium*. Uji kualitatif dilakukan menggunakan buffer TBE 1x dan gel agarosa 1,5%, kemudian divisualisasikan dengan *Gel Doc Biorad*. Hasil elektroforesis menunjukkan pita DNA terlihat jelas dan tidak ada pita yang tercampur ataupun pita yang tidak muncul, hal ini dapat

diartikan bahwa Primer mengenali DNA *template* yang ditunjukkan pada gambar 5. Visualisasi dengan gel elektroforesis menunjukkan bahwa dengan kemurnian DNA dibawah 1.75 tidak menghambat proses amplifikasi pada proses PCR, hal ini ditunjukkan bahwa semua pita muncul dengan jelas pada gel elektroforesis.



Gambar 7. Hasil elektroforesis produk PCR berbagai Primer

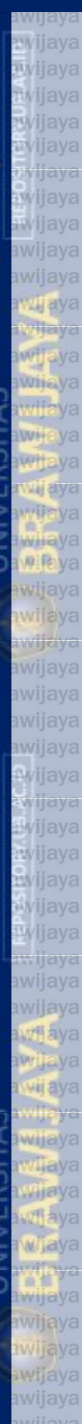
Primer Universal menunjukkan pita yang muncul berjumlah 10 dengan ukuran 200bp, Primer *Lactobacillus* juga berjumlah 10 dengan ukuran 400bp, dan amplifikasi dengan Primer *Bacteroides*, *Clostridium*, *Enterococcus*, dan *Bifidobacterium* menunjukkan tidak adanya pita yang muncul (tabel 5). Visualisasi pita DNA pada Primer Universal dan *Lactobacillus* berbeda, dimana pada Primer *Lactobacillus* visualisasi pita tidak merata atau tampak perbedaan antar isolat dengan isolat 7 memiliki pita yang cukup tebal dibanding isolat lain. Marker yang digunakan yaitu 100bp dan terlihat cukup jelas untuk menentukan ukuran hasil amplifikasi.

Tabel 5. Interpretasi pita hasil PCR 16S rRNA pada isolat terpilih

Isolat	Universal	Bifidobacterium	Lactobacillus	Enterococcus	Bacteroides	Clostridium
2s Brawijaya	+	+	+	+	+	+
4s Brawijaya	+	+	+	+	+	+
6s Brawijaya	+	+	+	+	+	+
7s Brawijaya	+	+	+	+	+	+
11s Brawijaya	+	+	+	+	+	+
13s Brawijaya	+	+	+	+	+	+
17s Brawijaya	+	+	+	+	+	+
20s Brawijaya	+	+	+	+	+	+
21s Brawijaya	+	+	+	+	+	+
26s Brawijaya	+	+	+	+	+	+

Keterangan : (+) = muncul, (-) = tidak muncul

Studi yang menggunakan amplifikasi PCR gen 16S rRNA dengan enam primer yang berbeda menunjukkan bahwa sepuluh isolat terpilih diatas, telah teramplifikasi dengan primer *Lactobacillus*. Hal ini menunjukkan bahwa 10 isolat yang terpilih dari perwakilan masing – masing perlakuan, termasuk kedalam kelompok bakteri *Lactobacillus* baik yang ditemukan ada sampel kontrol dan RA. Kelompok Bakteri *Bifidobacterium*, *Clostridium*, dan *Bacteroides* mengalami penurunan pada penderita RA (Seksik dkk., 2003), hal ini dapat dilihat pada hasil PCR dimana tidak teramplifikasi gen dari kelompok bakteri diatas. Modulasi dengan probiotik telah terbukti mengurangi aktivitas dari penyakit RA pada arthritis yang diinduksi kolagen dan mengurangi manifestasi penyakit. Selain itu, sitokin inflamasi (interleukin [IL] -1b, IL-2, IL-6, IL-12, IL-17, interferon [IFN], *tumour necrosis factor* [TNF] α) menurun (Amdekar dkk., 2011). Strain probiotik *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, dan *Streptococcus* menekan ekspresi sitokin pro-inflamasi IL-6 dan IL-7, dan menstimulasi ekspresi protein *Tight Junction*, yang mengarah pada peningkatan stabilitas penghalang. *L. rhamnosus* GG berinteraksi dengan sel-sel usus dan mempertahankan integritas *gut blood barrier* (GBB) (Bajaj dkk., 2015). *Lactobacillus casei* adalah di antara sedikit *lactic acid bacteria* (LAB) yang dikenal sebagai probiotik dan telah sering dilaporkan mampu mengontrol kekebalan pada penelitian model hewan (Anal dkk., 2007). *Lactobacillus casei* terbukti secara signifikan mengurangi ekspresi sitokin proinflamasi, yaitu aktivitas IL-6 dan TNF- α , dan COX-2, mengurangi manifestasi RA (Alipour dkk., 2014). Sebaliknya, *Lactobacillus bifidus* menunjukkan kemungkinan



kemampuan untuk mempromosikan pembengkakan sendi pada tikus bebas kuman, dengan aktivasi TLR2 / TLR4 (Bdollahi-Roodsaz, 2008). Penelitian ini menunjukkan jika spesies *Lactobacillus* yang ditemukan pada kelompok RA mungkin didominasi oleh bakteri *Lactobacillus bifidus*.

Spesies bakteri tertentu mampu menghambat pertumbuhan bakteri jenis lain, termasuk patogen salah satunya dengan melepaskan metabolit penghambatan (mis. Asetat dan butirir) dan bakteriosin (Stecher dkk., 2008). Bakteri Gram positif, terutama bakteri asam laktat (BAL) (*Lactobacilli*, *Lactococci*, dan *Pediococci*) dapat menghasilkan peptida antimikroba dan protein dalam ribosom, seperti lactacin B dari *Lactobacillus acidophilus*. Bakteriosin yang diproduksi oleh BAL tidak bersifat sitotoksik (Belguesmia dkk., 2010), dan diberkahi dengan fungsi antagonis serta atribut menguntungkan (Chikindas dkk., 2018). BAL-bakteriosin diketahui mengerahkan aktivitas bakteriostatik atau bakterisidal terhadap organisme yang sensitive (Cavera dkk., 2015). Strain *Lactobacillus* menampilkan aktivitas antibakteri dapat menurunkan ekspresi faktor virulensi patogen enterovirulent (O'Shea dkk., 2012). Hal membuktikan jika bakteri dari strain *Lactobacillus* ternyata mempunyai efek positif untuk menghambat pertumbuhan kelompok bakteri patogen seperti *Clostridium* dan *Enterococcus*.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian ini adalah :

1. Protein CSN1S2 pada susu dan yogurt kambing peranakan ethawah berpengaruh terhadap komposisi mikrobiota pada feses, dimana pemberian susu mampu mengembalikan jumlah total bakteri yang menurun pada perlakuan RA secara signifikan dibandingkan dengan pemberian yogurt.
2. Profil mikrobiota pada feses tikus model RA-CFA berdasarkan hasil amplifikasi gen 16S rRNA dengan PCR diketahui bahwa bakteri yang ditemukan paling dominan adalah kelompok dari *Lactobacillus* baik pada C, CM, CY, RA, RAM, dan RAY. *Lactobacillus* pada tingkat spesies memiliki peran yang berbeda dalam mengontrol pertumbuhan bakteri patogen, dimana salah satunya dapat memicu terjadinya *rheumatoid arthritis*.

5.2 Saran

Saran yang dapat disampaikan dari hasil penelitian yang telah dilakukan yaitu diharapkan masyarakat dapat meningkatkan konsumsi susu kambing peranakan ethawah yang dikenal mampu meningkatkan pertumbuhan bakteri yang baik bagi usus. Uji lanjutan seperti sekuensing dapat dilakukan untuk mengetahui spesies bakteri yang ditemukan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbasi M., M. J. Mousavi., S. Jamalzehi., R. Alimohammadi., M H. Bezvan., H. Mohammadi., & S. Aslani. Strategies toward rheumatoid arthritis therapy; the old and the new. *Journal Cell Physiol*, 1 – 14.
- Adhania, C. C., G. Wiwaha., & P. I. Fianza. 2015. Prevalensi penyakit menular pada fasilitas kesehatan tingkat pertama di kota Bandung tahun 2013 – 2015. *JSK*, Vol 3 (4) : 204 – 211.
- Agans R., L. Rigsbee., H. Kenche., S. Michail., H. J. Khamis., & O. Paliy. 2011. Distal gut microbiota of adolescent children is different from that of adults. *Federation of European Microbiological Sciences*, Vol 77 : 404 – 412.
- Alipour, B., Homayouni-Rad, A., Vaghef-Mehrabany, E., Sharif, S.K., Vaghef Mehraany, L., & Asghari-Jafarabadi, M. 2014. Effects of *Lactobacillus casei* supplementation on disease activity and inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis patients: a randomized double-blind clinical trial. *Int JRheum Dis*, Vol 17:519–27.
- Alsubaie M., W. Alqahtani., W. Alshardi., H. Albishi., S. Mularri., A. Asiri., & M. Somaily. Methotrexate in rheumatoid arthritis patients: common side effects and leading cause of discontinuation. 2018. *International Journal of Medical Research & Health Sciences*, Vol 7 (1) : 116 – 121.
- Amati, L. Marzulli, G., Martulli, M., Tafaro, A., Jirillo, F., Pugliese, V., Martemucci, G., D'Alessandro, A. G., & Jirillo, E. Donkey and goat milk intake and modulation of the human aged immune response. *Current Pharmaceutical Design*. 2010; 16: 864-869.
- Anal A.K., Singh, H. 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends Food Sci Technol*, Vol 18: 242–5.
- Armentero, M.T., Levandis, G., Nappi, G., Bazzini, E., & Blandini, F. Peripheral inflammation and neuroprotection: systemic pretreatment with complete Freund's adjuvant reduces 6-hydroxydopamine toxicity in a rodent model of Parkinson's disease. *Neurobiol*. 2006; 24(3): 492–505.
- Atanasova J. & I. Ivanova. 2010. Antibacterial peptides from goat

- and sheep milk proteins. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, Vol 24 (2) : 1799 – 1803.
- Au C. K., T. L. Lai., & C. W. Yim. 2017. Role of microbiome in rheumatic diseases. *Hong Kong Bulletin on Rheumatic Disease*, Vol 2 : 56 – 63.
- Badghaish M. M. O., G. N. M. Qorban., A. S. Albaqam., A. A. Nemer., A. J. Alali., R. F. H. A. Yaqoub., H. A. Alshamrani., O. H. Badahman., R. A. Ansaif., M. A. Alasmari., A. Y. Alghamdi., H. A. S. Alshareed., A. M. Aljadeed., A. A. Almomammed., D. M. Filmбан., & A. S. Alaqi. 2018. Rheumatoid arthritis, pathophysiology and management. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, Vol 70 (11) : 1898 – 1903.
- Bajaj, B. K., Claes, I. J. J., & Lebeer, S. 2015. Functional mechanisms of probiotics. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci*, 4: 321–327.
- Baker J., A. M. D. Falconer., D. J. Wilkinson., G. Nicholas., G. J. Litherland., & A. D. Rowan. 2018. Protein kinase D3 modulates MMP1 and MMP13 expression in human chondrocytes. *PLOS ONE*, Vol 13 (4) : 1 – 19.
- Bdollahi-Roodsaz, S., Joosten, L.A., Koenders, M.I., Devesa, I., Roelofs, M.F., & Radstake, T.R. 2008. Stimulation of TLR2 and TLR4 differentially skews the balance of T cells in a mouse model of arthritis. *J Clin Invest*, Vol 118: 205–16.
- Belguesmia, Y., Y. Choiset, H. Prévost, M. Dalgalarrrondo, J. Chobert, & D. Drider. 2010. Partial purification and characterization of the mode of action of enterocin S37: a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* S37 isolated from poultry feces. *J. Environ. Public Health*:986460
- Brusca S. B., S. B. Abramson., & J. U. Scher. 2014. Microbiome and mucosal inflammation as extra-articular triggers for rheumatoid arthritis and autoimmunity. *Curr Opin Rheumatol*, Vol 26 (1) : 101 – 107.
- Bullock J., S. A. A. Rizvi., A. M. Saleh., S. S. Ahmed., D. P. Do., R. A. Ansari., & J. Ahmed. Rheumatoid arthritis: A Brief overview of the treatment. *Medical Principles and Practice*, Vol 27 : 501 – 507.
- Burrage P. S., K. S. Mix., & C. E. Brinckerhoff. 2006. Matrix metalloproteinases: Role in arthritis. *Frontiers in*

Bioscience, Vol (11) : 529 – 543.

Capinescu B., C. Simionescu., C. Margaritescu., A. Stepan., & R. Ciurea. 2011. Clinical and morphological aspects of sinovitis in early rheumatoid arthritis. *Current Health Sciences Journal*, Vol 37 (1) : 17 – 20.

Cavera, V. L., T. D. Arthur, D. Kashtanov, & M. L. Chikindas. 2015. Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics. *Int. J. Antimicrob. Agents*, Vol 46: 494–501.

Chervonsky, A. V. Microbiota and autoimmunity. 2013. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, Vol 5(3) : 1 -11.

Chikindas, M. L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V. A., & Dicks, L. M. T. 2018. Functions and emerging applications of bacteriocins. *Curr. Opin. Biotechnol*, Vol 49: 23–28.

Chiodini, R.J., E. D. Scot, M. C. William, G. Susan, D. Brian, & G. Angela. 2015. Microbial population differentials between mucosal and submucosal intestinal tissues in advanced Crohn's disease of the ileum. *PLoS ONE*.

Cho, I., & Blaser M. J. 2012. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet*, Vol 13:260–70

Chondrex. 2017. Protocol for Adjuvant-Induced Arthritis (AIA) in rats. www.chondrex.com. Diakses pada tanggal 11 Oktober 2019.

Collado, M., J. Meriluoto, & S. Salminen. 2007. Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. *Lett Appl Microbiol*, Vol 45: 454–460.

Crawford, A. & H. Harris. 2015. Understanding the Effects of Rheumatoid Arthritis. *Journal of Wolters Kluwer*, Vol 6 (60) : 32 – 38.

Deane K. D., M. K. Demoruelle., L. B. Kelmenson., K.A. Kuhn., J. M. Norris., & V. M. Holers. 2017. Genetic and environmental risk factors for rheumatoid arthritis. *Best Practical Research Clinical Rheumatol*, Vol 31 (1) : 3 – 18.

Fatchiyah, F., B. Setiawan., S. Suharjono., & Z. Noor. The anti-osteoporosis effects of CSN1S2 protein of goat milk and yoghurt on a complete Freund's adjuvant-induced rheumatoid arthritis model in rats. 2015. *Biomarkes and Genomic Medicine*, Vol 7 : 139 – 146.

- Fatchiyah., E. L. Arumingtyas., S. Widyarti., & S. Rahayu. 2011. **Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisis**. Erlangga. Jakarta
- Fia F. & Westra J. 2018. Overview of Rheumatoid arthritis therapy: management options in Indonesia. *Tarumanegara Medical Journal*, Vol 1 (1) : 208 – 220.
- Flint H. J., K. P. Scott., P. Louis., & S. H. Duncan. 2012. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature Review Gastroenterology & Hepatology*, Vol 9 : 577 – 589.
- Greppi G. F., P. Roncada., & R. Fortin. 2008. Protein components of goat's milk. *Dairy Goats Feeding and Nutrition*, 71 – 94.
- Gu, Y., J. Yang., & X. Ouyang. 2008. Interleukin 10 suppresses Th17 cytokines secreted by macrophages and T cells. *Eur J Immunol*, Vol 38(7): 1807–1813.
- Guerreiro C. S., A. Calado., J. Sousa., & J. E. Fonseca. 2018. Diet, microbiota, and gut permeability – The unknown triad in rheumatoid arthritis. *Frontiers in Medicine*, Vol 5 (349) : 1 – 7.
- Guo Q., Y. Wang., D. Xu., J. Nossent., N. J. Pavlos., & J. Xu. 2018. Rheumatoid arthritis: pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies. *Bone Research*, Vol 6 (15) : 1 – 14.
- Guo, Q., Y. Wang., D. Xu., J. Nossent., N. J. Pavlos., & Xu. 2018. Rheumatoid arthritis: pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies. *Bone Research*, Vol 6 (15) : 1 – 14.
- Hara A. M. & F. Shanahan. 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Reports*, Vol 7 (7) : 688 – 693.
- He, Z., Z. Yiqiang., M. Gui., L. Ni., & C. Yaosheng. 2010. Could protein tertiary structure influence mammary transgene expression more than tissue specific codon usage?. *Transgenic Res*, Vol 19 : 519 – 533.
- Heidari B. 2011. Rheumatoid Arthritis: Early diagnosis and treatment outcomes. *Caspian Journal International*, 2 (1) : 161 – 171.
- Hemminki K., X. Li., J. Sundquist., & K. Sundquist. 2009. Familial associations of rheumatoid arthritis with autoimmune diseases and related conditions. *Americal College of Rheumatology*, Vol 60 (3) : 661 – 668.

- Hooper L.V., L. R. Dan., & M. J. Andrew. 2012. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*, Vol 336 (6086) : 1268-1273.
- Ivanov I. I., K. Atarashi., N. Manel., E. L. Brodie., T. Shima., U. Karaoz., D. Wei., K. C. Goldfarb., C. A. Santee., S. V. Lynch., T. Tanoue., A. Imaoka., K. Itoh., K. Takeda., Y. Umesaki., K. Honda., & D. R. Littman. 2009. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell*, Vol 139 (3) : 485 – 498.
- Jandhyala S. M., R. Talukdar., C. Subramanyam., H. Vuyyuru., M. Sasikala., & D. N. Reddy. 2015. Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology*, Vol 21 (29) : 8787 – 8803.
- Jeong Y., J. W. Kim., H. J. You., S. J. Park., J. Lee., J. H. Ju., M. S. Park., H. Jin., M. L. Cho., B. Kwon., S. H. Park., & G. E. Ji. 2019. Gut microbial composition and function are altered in patients with early rheumatoid arthritis. *Journal of Clinical Medicine*, Vol 8 (693) : 1 – 10.
- Jorgensen, J.H., M .A. Pfaller., K.C. Carroll, G. Funke, M.L. Landry., S.S. Richter., & D.W. Warnock. 2015. **Manual of Clinical Microbiology, 11th Edition. Vol. 1.**
- Jousimies-Somer, H.R., S.P. Citron, D. Baron, E.J. Wexler, & H.M. Finegold. 2002. **Wadsworth-KTL Anaerobic Bacteriology Manual, 6th ed.** Star Publishing Company. New York.
- Kamada N, S.U. Seo, G. Y. Chen., & G. Nunez. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. 2013. *Nat Rev Immunol*, Vol (13) : 32135.
- Kamada, N., Kim, Y.G., Sham, H.P., Vallance, B.A., Puente, J.L., Martens, E.C., Nunez, G. 2012. Regulated virulence controls the ability of a pathogen to compete with the gut microbiota. *Science*, Vol 336: 1325 – 1329.
- Kourilovitch M., C. G. Maldonado., & E. O. Prado. 2014. Diagnosis and classification of rheumatoid arthritis. *Journal of Autoimmunity*, Vol 48 : 26 – 30.
- Kristensen N.B, T. Bryrup., K.H. Allin., T. Nielsen., T.H. Hansen., & O. Pedersen. 2016. Alterations in fecal microbiota composition by probiotic supplementation in healthy adults: a systematic review of randomized controlled trials.

Genome Medicine, Vol 8(1):52.

Lad S. S., K. D. Aparnathi., B. Mehta., & S. Velpula. 2017. Goat milk in human nutrition and health. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, Vol 6 (5) : 1781 – 1792.

Lamichhane S., P. Sen., A. M. Dicjens., M. Oresic., & H. C. Bertram. 2018. Gut metabolome meets microbiome: A methodological perspective to understand the relationship between host and microbe. *Methods*, 1 – 10.

Lee, J. H., Y. Park, J. R. Choi., E. K. Lee., & H. S. Kim. 2010. Comparisons of three automated systems for genomic DNA extraction in a clinical diagnostic laboratory. *Yonsei Med J*, Vol 51(1) : 104-110.

Lee, P. Y., J. Costumbrado., C. Y. Hsu & Y. H. Kim. 2012. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. 2012. *Journal of Visualized Experiments*, Vol 62: 1-5.

Levy, M., A. Kolodziejczyk., A. Cristoph, & E. Elinav. 2017. Dysbiosis and the immune system. *Nature review immunology*, Vol 17 :219-232.

Lien, T.H, Chang, M.H., & Wu, J. F. 2011. Effects of the infant stool color card screening program on 5-year outcome of biliary atresia in Taiwan. *Hepatology*, Vol 53: 202–8.

Liu, X., B. Zeng., J. Zhang., W. Li., F. Mou., & H. Wang. 2016. Role of the gut microbiome in modulating arthritis progression in mice. *Sci Rep*, Vol 6: 30594.

Lozupone, C. A., Stombaugh, J.I., & Gordon, J.I. 2012. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, Vol 489:220–30.

Lubberts E., L. V. D. Berselaar., B. O. Walgreen., P. Schwarzenberger., C. J. J. C. D. Roo., J. K. Kolls., L. A. B. Joosten., & W. B. V. D. Berg. 2003. IL-17 Promotes bone erosion in murine collagen-induced arthritis through loss of the receptor activator of NF- κ B ligand/osteoprotegerin balance. *The Journal of Immunology*, Vol 170 : 2655 – 2622.

Luckey, D., A. Gomez, J. Murray, B. White, & V. Taneja, 2013. Bugs & us: the role of the gut in autoimmunity. *The Indian Journal of Medical Research*, Vol 138 (5): 732– 743.

Maeda, Y. & K. Takeda. 2017. Role of gut microbiota in rheumatoid

- arthritis. *Journal of Clinical Medicine*, Vol 6 (60) : 1 – 7.
- McCaw A. P., A. J. Ewald., & Z. Werb. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nature Publishing Group*, Vol 8 : 221 – 233.
- Moran E. M., R. Mullan., J. McCormick., M. Connolly., O. Sullivan., O. FitzGerald., B. Bresnihan., D. J. Veale., & U. Fearon. 2009. Human rheumatoid arthritis tissue production of IL-17A drives matrix and cartilage degradation: synergy with tumour necrosis factor- α , Oncostatin M and response to biologic therapies. *Arthritis Research & Therapy*, Vol 11 (4) : 1 – 12.
- Moreno, Jose. 2015. Prevotella copri and the microbial pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Reumatology Clinical*, Vol 11 (2) : 61 – 63.
- Negi S, H. Singh, & A. Mukhopadhyay, “Gut bacterial peptides with autoimmunity potential as environmental trigger for late onset complex diseases: in-silico study. *PLoS One*, Vol 12 (e0180518).
- Nzilibili, S. M. M., M. K. H. Ekodiyanto., P. Hardjanto., & A. Yudianto. 2018. Concentration and purity DNA spectrophotometer: sodium monofluorophosphate forensic impended effect. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, Vol 8 (34): 1-7.
- O’Shea, E.F., Cotter, P.D., Stanton, C., Ross, R.P., & Hill C. Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: bacteriocins and conjugated linoleic acid. *Int. J. Food Microbiol*, Vol 152: 189–205.
- Petersen, C. & R. L. June. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. 2014. *Cellular microbiology* 16(7) : 1024-1033.
- Pfeuffer, M. & J. Schrenzenmeir. Milk and the metabolic syndrome. *Obes. Rev*, Vol 8: 109–118.
- Pickard J. M., M. Y. Zeng., R. Caruso., & G. Nunez. 2017. Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses and inflammatory disease. *Immunol Rev*, Vol 279 (1) : 70 – 89.
- Pretorius, E., O. O. Akeredolu., P. Soma., & D. B. Kell. 2017. Major involvement of bacterial components in rheumatoid arthritis

- and its accompanying oxidative stress, systemic inflammation and hypercoagulability. *Experimental Biology and Medicine*, Vol 242 : 355 – 373.
- Quigley, E.M.M. 2011. Therapies aimed at the gut microbiota and inflammation: antibiotics, prebiotics, probiotics, synbiotics, antiinflammatory therapies. *Gastroenterol Clin North Am*, Vol 40 (1):207–22
- Quigley, L., O. O'Sullivan, C. Stanton, T.P. Beresford, R.P. Ross, G.F. Fitzgerald, P.D. Cotter. 2013. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol Rev*, Vol 37:664–698.
- RISKESDAS. 2018. Hasil utama Riskesdas 2018. www.depkes.go.id. Diakses pada tanggal 23 Agustus 2019.
- Rohmah R. N., E. E. Widjajanto., & F. Fatchiyah. 2015. Protective effect of CSN1S2 protein of goat milk on ileum microstructure and inflammation in Rat – CFA induced rheumatoid arthritis. *Asian Pasific Journal of Tropical Disease*, Vol 5 (7) : 564 – 568.
- Rudan, I., S. Sidhu., A. Papan., S. Jiao Meng., Y. Xin Wei., W. Wang., R.M. C. Page., A. R. Demaio., H. Nair., D. Sridhar., E. Theodoratou., B. Dowman., D. Adeloje., A. Majeed., J. Car., H. Campbell., W. Wang., & K. Y. Chan. 2015. Prevalence of rheumatoid arthritis in low- and middle income countries: A systematic review and analysis. *Journal of Global Health*, Vol 5 (1) : 1 – 10.
- Seksik, P., Rigottier-Gois, L., & Gramet, G. 2003. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut*, Vol 52(2): 237–242.
- Serino, M., Luche, E., Chabo, C., Amar, J., & Burcelin, R. Intestinal microflora and metabolic diseases. *Diabetes Metab*, Vol 35(4): 262-72.
- Shen, Z.H., Zhu, C.X., Quan, Y.S., Yang, Z.Y., Wu, S., Luo, W.W., Tan, B., Wang, X.Y. 2018. Relationship between intestinal microbiota and ulcerative colitis: Mechanisms and clinical application of probiotics and fecal microbiota transplantation. *World J. Gastroenterol*, Vol 24: 5–14.
- Singh R. K., H. W. Chang., D. Yan., K. M. Lee., D. Ucmak., K. Wong., M. Abrouk., B. Fahnik., M. Nakamura., T. H. Zhu., T. Bhutani., & W. Liao. 2017. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *Journal of*

Translational Medicine, vol 15 (73) : 1 – 17.

Sneekhalatha U., M. Anburajan., B. Venkatraman., & M. Menaka. 2012. Evaluation of complete Freund's adjuvant-induced arthritis in a Wistar rat model. *Zeltschrift fur Rheumatologie*, 1 – 7.

Stecher, B. & Hardt, W.D. 2008. The role of microbiota in infectious disease. *Trends Microbiol*, Vol 16:107-114.

Thomas, C. & J. Versalovic. 2010. Probiotics-host communication: modulation of signaling pathways in the intestine. *Gut Microbes*, Vol 1: 148–163.

Tripsila L. F., S. Suharjono., A. Christianto., & F. Fatchiyah. 2016. The comparing of antimicrobial activity of CSN1S2 protein of fresh milk and yoghurt goat breed Ethawah inhibited the pathogenic bacteria. *Mater Sociomed*, Vol 28 (4) : 244 – 248.

Turck, Dominique. 2013. Cow's milk and goat's milk. *World Rev Nutr Diet*, Vol 108 : 56 – 62.

Versalovic, J., K.C. Carrol, G. Funke, J. H. Jorgensen, M.L.Landry, & D.W. Warnock. 2011. **Manual of Clinical Microbiology. 10th edition.** ASM Press. Washington DC.

Vincenti M. P. & C. E. Brinckerhoff. 2001. The potential of signal transduction inhibitors for the treatment of arthritis: is it all just JNK?. *The Journal of Clinical Investigation*, Vol 108 (2) : 181 – 183.

Whyara, K. A. C., E. L. Souza., E. M. Beltrao-Filho., G. K. V. Vasconcelos., T. Santi-Gadelha., C. A. A. Gadelha., O. L. Franco., R. C. R. E. Queiroga., & M. Magnani. Comparative protein composition analysis of goat milk produced by the Alpine and Saanen Breeds in Northeastern Brazil and related antibacterial activities. *PLOS ONE*, Vol 9 (3) : 1 – 8.

Wilfinger, W. W. Karol & Chomczynski, P. 2018. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. 2018. *Biotechniques*, Vol 22 (3) : 474 – 478.

Wu X., B. He., J. Liu., H. Feng., Y. Ma., D. Li., B. Guo., C. Liang., L. Dang., L. Wang., J. Tian., H. Zhu., L. Xiao., C. Lu., A. Lu., & G. Zhang. 2016. Molecular Insight into gut microbiota and rheumatoid arthritis. *International Journal*

of *Molecular Science*, Vol 17 : 1 – 11.

X. Zhang, D. Zhang, & H. Jia. 2015. The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. *Nature Medicine*, Vol 21 (8) : 895–905.

Xu B. & J. Lin. 2017. Characteristics and risk factors of rheumatoid arthritis in the United States: an NHANES analysis. *Peer Journal*, 1 – 17.

Yusuf F., S. Ilyas., H. A. R. Damanik., & Fatchiyah. 2016. Microbiota composition, HSP70 and Caspase-3 expression as marker for colorectal cancer patients in Aceh, Indonesia. *The Indonesian Journal of Internal Medicine*, Vol 48 (4) : 289 – 299.

Zeng, M.Y., Inohara, N., Nunez, G. 2017. Mechanisms of inflammation-driven bacterial *dysbiosis* in the gut. *Mucosal Immunol*, Vol 10: 18–26.

Zhang X., D. Zhang., H. Jia., Q. Feng., D. Wang., D. Liang., X. Wu., J. Li., L. Tang., Y. Li., Z. Lan., B. Chen., Y. Li., H. Zhong., H. Xie., Z. Jie., W. Chen., S. Tang., X. Xu., X. Wang., X. Cai., S. Liu., Y. Xia., J. Li., X. Qiao., J. Y. A. Aama., H. Chen., L. Wang., Q. J. Wu., F. Zhang., W. Zheng., Y. Li., M. Zhang., G. Luo., W. Xue., L. Xiao., J. Li., W. Chen., X. Xu., Y. Yin., H. Yang., J. Wang., K. Kristiansen., L. Liu., Q. Huang., Y. Li., & J. Wang. 2015. The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. *Nature Medicine*, Vol 21 (8) : 895 – 906.

Zheng X., F. Huang., & A. Zhao. 2017. Bile acid is significant host factor shaping the gut microbiome of diet induced obese mice. *B, C Biology*. 15(1) :120.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Komposisi Media PYG

PYG Medium, Modifikasi	
Composition per 961.0mL:	
Yeast extract.....	10.0g
Beef extract.....	5.0g
Glucose	5.0g
Peptone	5.0g
Trypticase™.....	5.0g
K2HPO4.....	2.0g
L-Cysteine·HCl	0.5g
Resazurin	1.0mg
Salt solution	40.0mL
Hemin solution.....	10.0mL
Tween™ 80.....	1.0mL
Vitamin K1 solution	0.2mL
pH 7.2 ± 0.2 at 25°C	
Salt Solution:	
Composition per liter:	
NaHCO3.....	10.0g
NaCl.....	2.0g
K2HPO4.....	1.0g
KH2PO4.....	1.0g
MgSO4·7H2O.....	0.5g
CaCl2·2H2O	0.25g

Lampiran 2. Buffer Lysis

Komposisi Buffer Lysis (1mL)	
EDTA	25mM
Tris HCL pH8.....	10mM
NaCl.....	100mM
SDS.....	1%
Proteinase – K.....	5mg/mL

Lampiran 3. Hasil Uji Deskriptif One-Way ANOVA

Descriptives

Jumlah Sel Total

Bakteri

					95% Confidence Interval			
					for Mean			
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound	Minimum	Maximum
C	3	2.85E5	259609.964	1.499E5	-359573.57	930240.23	44000	560000
CM	3	4.65E4	28762.012	1.661E4	-24915.47	117982.13	21600	78000
CY	3	1.53E5	136445.349	7.878E4	-185615.70	492282.37	50000	308000
RA	3	6.17E4	61654.954	3.560E4	-91492.73	214826.06	13000	131000
RAM	3	8.03E5	869034.714	5.017E5	-1356135.24	2961468.57	208000	1800000
RAY	3	3.23E5	223428.587	1.290E5	-232360.71	877694.04	163000	578000
Total	18	2.79E5	418069.030	9.854E4	70799.16	486600.84	13000	1800000

ANOVA

Jumlah Sel Total Bakteri

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.180E12	5	2.359E11	1.580	.239
Within Groups	1.792E12	12	1.493E11		
Total	2.971E12	17			

Hasil uji menunjukkan nilai signifikansi >0.0

Lampiran 4. Uji Lanjutan Tukey**Multiple Comparisons**

Jumlah Sel Total Bakteri

Tukey HSD

(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
C	CM	238800.000	3.155E5	.970	-820893.80	1298493.80
	CY	132000.000	3.155E5	.998	-927693.80	1191693.80
	RA	223666.667	3.155E5	.977	-836027.13	1283360.46
	RAM	-517333.333	3.155E5	.591	-1577027.13	542360.46
	RAY	-373333.333	3.155E5	1.000	-1097027.13	1022360.46
CM	C	-238800.000	3.155E5	.970	-1298493.80	820893.80
	CY	-106800.000	3.155E5	.999	-1166493.80	952893.80



RA	-	-	-	-	-
	15133.3	3.155E5	1.000	-1074827.13	1044560.46
	33				
RAM	-	-	-	-	-
	756133.	3.155E5	.231	-1815827.13	303560.46
	333				
RAY	-	-	-	-	-
	276133.	3.155E5	.946	-1335827.13	783560.46
	333				
CY	C	-	-	-	-
		132000.	3.155E5	.998	-1191693.80
		000			927693.80
	CM	106800.	3.155E5	.999	-952893.80
		000			1166493.80
	RA	91666.6	3.155E5	1.000	-968027.13
		67			1151360.46
	RAM	-	-	-	-
		649333.	3.155E5	.368	-1709027.13
		333			410360.46
	RAY	-	-	-	-
		169333.	3.155E5	.993	-1229027.13
		333			890360.46
RA	C	-	-	-	-
		223666.	3.155E5	.977	-1283360.46
		667			836027.13
	CM	15133.3	3.155E5	1.000	-1044560.46
		33			1074827.13



CY		-				
		91666.6	3.155E5	1.000	-1151360.46	968027.13
		67				
RAM		-				
		741000.	3.155E5	.248	-1800693.80	318693.80
		000				
RAY		-				
		261000.	3.155E5	.957	-1320693.80	798693.80
		000				
RAM	C	517333.	3.155E5	.591	-542360.46	1577027.13
		333				
	CM	756133.	3.155E5	.231	-303560.46	1815827.13
		333				
	CY	649333.	3.155E5	.368	-410360.46	1709027.13
		333				
RA		741000.	3.155E5	.248	-318693.80	1800693.80
		000				
	RAY	480000.	3.155E5	.659	-579693.80	1539693.80
		000				
RAY	C	37333.3	3.155E5	1.000	-1022360.46	1097027.13
		33				
	CM	276133.	3.155E5	.946	-783560.46	1335827.13
		333				
CY		169333.	3.155E5	.993	-890360.46	1229027.13
		333				
RA		261000.	3.155E5	.957	-798693.80	1320693.80
		000				

RAM	-				
	480000.	3.155E5	.659	-1539693.80	579693.80
	000				

Lampiran 5. Komposisi mix solution PCR

No.	Komposisi	Volume (µl)
1	Primer F	0,5
2	Primer R	0,5
3	ddH2O	3,5
4	Go Tag Green	5
5	Template DNA	0,5
	Total	10

Lampiran 6. Program PCR Thermalcycler

Tahapan	Temperatur	Waktu (s)	Siklus
Pra denaturation	95°C	180	31
Denaturation	95 °C	30	31
Annealing	55 °C	30	31
Extension	72 °C	60	31
Post extension	72 °C	300	31

HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI

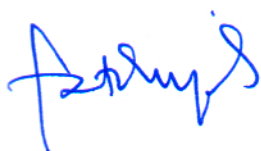
KOMPOSISI MIKROBIOTA USUS DARI FESES TIKUS (*Rattus norvegicus*) *RHEUMATOID ARTHRITIS* INDUKSI CFA DIBERI PERLAKUAN SUSU DAN YOGURT KAMBING ETHAWAH

ADHYA DAVA ALIGARH YAHYA
165090101111039

diseminarkan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 03 Juli 2020
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam Bidang Biologi

Menyetujui

Pembimbing 1



Prof.Dra. Fatchiyah, M.Kes., Ph.D
NIP. 196311271989032001

Pembimbing 2



Eko Suyanto, S.Si., M.Sc
NIP. 198601312018031001

Mengetahui

Ketua Program Studi S-1 Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya



Dian Siswanto, S.Si., M.Sc., M.Si., Ph.D
NIP. 197703202005011002