

# **DISERTASI**

**ANALISIS EFEK SENYAWA BIOAKTIF EKSTRAK *Thalassia hemprichii*  
PADA MENCIT BALB/C YANG TERINFEKSI *Salmonella typhi* : KAJIAN  
PATOMEKANISME EKSPRESI mRNA GEN TLR4**

**ANALYSIS OF THE EFFECT OF BIOACTIVE COMPOUNDS OF *Thalassia hemprichii* EXTRACT on BALB/C Mice Injected with *Salmonella typhi* :  
STUDY OF PATOMECHANISM OF TLR4 GENE mRNA EXPRESSION**

**J A F R I A T I  
C013171008**



**PROGRAM STUDI S3 KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2020**

## DISERTASI

### ANALISIS EFEK SENYAWA BIOAKTIF EKSTRAK *Thalassia hemprichii* PADA MENCIT BALB/C YANG TERINFEKSI *Salmonella typhi* : KAJIAN PATOMEKANISME EKSPRESI mRNA GEN TLR4

Disusun dan diajukan oleh

**JAFRIATI**  
**C013171008**

telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Disertasi  
pada tanggal 20 Februari 2020  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui  
Komisi Penasehat,

  
**Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK(K)**  
Promotor

  
**Prof. dr. Rosdiana Natzir, Ph.D, Sp.Biok**  
Ko-Promotor

Ketua Program Studi S3  
Ilmu Kedokteran,

  
**Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp.M(K), M.Med.Ed**  
Ko-Promotor

Dekan Fakultas Kedokteran  
Universitas Hasanuddin

  
**dr. Agussalim Bukhari, M. Med, Ph.D, Sp.GK (K)**

  
**Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp.M(K), M.Med.Ed**

## PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama : Jafriati

NIM : C013171008

Program Studi : Ilmu Kedokteran

menyatakan dengan sebenarnya bahwa disertasi yang berjudul :

**“Analisis Efek Senyawa Bioaktif Ekstrak *Thalassia hemprichii* Pada**

**Mencit Balb/C Yang Terinfeksi *Salmonella typhi* : Kajian**

**Patomekanisme Ekspresi mRNA Gen TLR4”** adalah benar-benar

merupakan hasil karya sendiri, bukan merupakan pengambil alihan tulisan

atau pemikiran orang lain dan sepanjang pengetahuan saya di dalam

naskah disertasi ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah

diajukan/ditulis/diterbitkan sebelumnya, kecuali yang secara tertulis dikutip

dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar

pustaka. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa

sebagian atau keseluruhan tesis/disertasi ini hasil karya orang lain, saya

bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, Februari 2020

Yang menyatakan,

**J A F R I A T I**

## DAFTAR TIM PENGUJI

Promoter : Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, SpMK (K)

Co-Pomotor : Prof. dr. Rosdiana Natsir, Ph.D, Sp.Biok

Co-Pomotor : Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp.M (K), M.Med.Ed

Anggota :

1. Prof. Oslan Jumadi, Ph.D, S.Si, M.Phil
2. Prof. DR. Dirayah R. Husain, DEA
3. Prof. Ahyar Ahmad, Ph.D
4. dr. Rizalinda Sjahril, M.Sc, Ph.D
5. Dr. Eddyman W. Ferial, S.Si, M.Si, CPSR
6. Dr. dr. Burhanuddin Bahar, MS

## KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahim,

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah, SWT yang telah memberikan rahmad dan karunia-NYA sehingga penulis diberikan nikmat kesempatan dan kesehatan untuk dapat menyelesaikan penulisan disertasi dengan judul “**Analisis Efek Senyawa Bioaktif Ekstrak *Thalassia hemprichii* Pada Mencit Balb/C Yang Terinfeksi *Salmonella typhi* : Kajian Patomekanisme Ekspresi mRNA Gen TLR4**”. Disertasi ini merupakan salah satu syarat untuk mencapai gelar kesarjanaan S3 di Universitas Hasanuddin, Progran Studi Ilmu kedokteran.

Selesainya penulisan disertasi ini berkat bantuan berbagai pihak, sehingga penulis ingin menyampaikan rasa hormat, terimakasih dan penghargaan yang tak terhingga pada **Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK(K)** sebagai Promotor, **Prof. dr. Rosdiana Natzir, Ph.D, Sp.Biok** dan **Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp.M (K), M.Med.Ed**, sebagai Co-Promotor yang telah banyak memberikan inspirasi, membantu mengatasi masalah, memberikan bimbingan dan motivasi sampai penulis dapat menyelesaikan disertasi ini.

Terimakasih juga kepada tim penguji eksternal, Prof. **Oslan Jumadi, Ph.D, S.Si, M.Phil.** yang senantiasa memberikan masukan, saran dan motivasi, Prof. **DR. Dirayah R. Husain, DEA** yang memotivasi terus menerus, memberi inspirasi serta banyak memberikan masukan dan arahan, Prof. **Ahyar Ahmad, Ph.D** yang selalu memberikan masukan dan arahan, dr. Rizalinda Sjahril, **M.Sc, Ph.D** yang selalu memberikan masukan dan arahan, **Dr. Eddyman W. Ferial, S.Si, M.Si, CPSR** yang sangat baik dan bersedia

meluangkan waktu untuk berdiskusi dan Dr. dr. **Burhanuddin Bahar, MS** yang memberikan saran.

Di kesempatan ini penulis juga menyampaikan ucapan terimakasih yang sangat dalam sebagai wujud penghargaan yang tulus kepada kedua orang tua tercinta ayahanda H. **La Faeri Mania** dan ibunda **Hj. Djaiya Ote** yang selalu memberikan kasih sayang yang tulus dan selalu memberi dorongan, semangat, bantuan dan doa selama ini kepada penulis, serta kepada bapak mertua **La Ode Suraidi** (alm) dan ibu Mertua **Sitti Karlina (alm)** semoga beliau mendapat tempat yang mulia di sisi Allah, SWT.

Teristimewa kepada suami tercinta **Dr. La Ode Ahmad Jazuli, S.Pd., M.Pd**, terimakasih yang tak terhingga atas segala kesabaran, semangat, motivasi, dukungan moril dan material serta curahan doa selama penulis menempuh pendidikan dan kepada anak kami tersayang **Fonalia Elviranda Jazuli dan La Ode Aselio Maulamifzal Jazuli** terimakasih atas pengorbanan, dukungan, pengertian dan doa kalian selama mengikuti pendidikan. Kepada kakakku tercinta **Jafar, S.Pi** dan Adikku **Anton Faeri Ote, ST** dan **Ryan Fajar Agustin, ST** terimakasih atas kasih sayang, dukungan dan motivasi selama penulis memulai studi sampai tahap akhir. Terimakasih juga buat saudara ipar **La Ode Suciadian, SH, Yusniawati, S.Pd** dan **Yurniawati, A.Md.Keb** atas doa dan dukungannya.

Terimakasih juga kepada staf Laboratorium Immunologi dan Biomolekuler universitas Hasanuddin Makassar yang telah banyak membantu dalam proses penelitian.

Melalui kesempatan ini juga penulis menyampaikan ucapan terimakasih yang setinggi-tingginya :

1. **Prof. Dr. Dwia Aries Tina Pulubuhu, MA** selaku Rektor Universitas Hasanuddin Makassar yang telah memberikan kesempatan bagi penulis

- untuk mengikuti program pendidikan Doktor di Universitas Hasanuddin.
2. **Kementerian Ristek dan DIKTI** yang telah memberikan bantuan beasiswa pendidikan (BPPDN-Dikti) selama penulis mengikuti pendidikan di Universitas Hasanuddin.
  3. **Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp.M (K), M.Med.Ed** sebagai Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hassanuddin yang telah memberikan kesempatan bagi penulis untuk mengikuti program pendidikan Doktor.
  4. **Dr. Agussalim Bukhari, M. Clin, Med, Ph.D, Sp.GK (K)** selaku ketua Program Studi S3 Ilmu Kedokteran Universitas Hassanuddin yang telah memberikan saran dan masukan demi kelancaran penyelesaian disertasi ini.
  6. **Rektor Universitas Halu Oleo dan Dekan Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Halu Oleo** yang telah memberikan ijin kepada penulis untuk mengikuti pendidikan program S3 Ilmu Kedokteran Universitas Hasanuddin serta dukungan sehingga penulis dapat menyelesaikan masa studi.
  7. Kepada pengajar S3 Ilmu Kedokteran Universitas Hassanuddin yang telah memberikan bekal ilmu yang sangat bermanfaat bagi penulis, terimakasih juga kepada pa **Akmal, S.Sos., MAP, Abdul Muin, Amd.FT** dan **Rahmat** yang senantiasa membantu dan memberi motivasi.
  8. Bapak **Ir. H. Samsuddin Rahim, M.Si** (Wakil Ketua DPRD Kota Kendari Periode 2019-2024), **Muhamad Ali, SP.,M.Si** (Anggota DPRD Kabupaten Wakatobi Periode 2019-2024), **Mayor Kamil BC, DR. H. Jalaluddin, MPd** (Kepala Dinas Kelautan dan Perikanan Kab. Wakatobi), **H. Saidi Syamsuddin, SmHK**, dan **Sahibuddin, S.Pd., MM** (Kepala Dinas Badan Kepegawaian Daerah Kab. Wakatobi) yang banyak memberikan dukungan dan motivasi serta doa untuk kelancaran penyelesaian studi kami.

9. Kepada teman-teman seperjuangan Harningsih, Dahniar, Imelda, Tri Damayanty Syamsul, Subair, Andi Tenriola, Wahyuni dan teman-teman mahasiswa S3 angkatan 2017 terimakasih atas kebersamaan dalam suka dan duka, bantuan dan dukungan selama perkuliahan.
10. Teman-teman dosen dan staf Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Halu Oleo, terimakasih atas dorongan, dukungan dan doa selama peneliti mengikuti masa Doktor di Universitas Hasanuddin Makassar.
11. Semua pihak yang telah ikut membantu dalam kelancaran penulisan

Tiada kata yang dapat kami ucapkan selain ungkapan terimakasih yang tak terhingga serta doa kepada Allah, SWT, semoga seluruh bantuan, simpati dan doa yang disampaikan untuk penulis mendapat balasan dan pahala yang berlipat dari yang Allah, SWT da semoga disertasi ini dapat bermanfaat bagi semua masyarakat. Aamiin....

Makassar, Februari 2020  
Penulis

**Jafriati**



## ABSTRAK

**Jafriati.** Analisis Efek Senyawa Bioaktif Ekstrak *Thalassia hemprichii* Pada Mencit Balb/C Yang Terinfeksi *Salmonella typhi* : Kajian Patomekanisme Ekspresi mRNA Gen TLR4 (dibimbing oleh **Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK(K); Prof. dr. Rosdiana Natzir, Ph.D, Sp.Biok dan Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp.M (K), M.Med.Ed.**

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa ekstrak *Thalassia hemprichii* mempengaruhi ekspresi mRNA gen TLR4 pada kelompok mencit BALB/C yang diberikan ekstrak *Thalassia hemprichii* sebelum dan sesudah diinjeksi *Salmonella typhi*.

Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimental dengan menggunakan model *pretest-posttest Control Group Design* yaitu pengaruh eksperimen diukur sebelum dan setelah perlakuan. Penelitian ini dilakukan melalui uji *in vivo* terhadap hewan coba untuk mengetahui pengaruh ekstrak *Thalassia hemprichii*, prosedur ekstraksi RNA dengan metode Boom, prosedur pemeriksaan ekspresi mRNA gen TLR4 dengan metode *RT-PCR* dan pemeriksaan kadar TLR4 dengan metode ELISA.

Hasil penelitian dijelaskan bahwa nilai rerata ekspresi gen untuk kelompok preventif adalah pada pemeriksaan awal (P1) = 5,909 ; (P2) = 5,909 ; (P3) = 8,043 dan (P4) = 8,352, pada kelompok kuratif (ekstrak) nilai rerata ekspresi gen adalah (P1) = 2,180; (P2) = 9,291; (P3) = 3,923; (P4) = 3,578, pada kelompok kuratif (levofloxacin) rerata ekspresi gen diperoleh nilai (P1) = 6,07 ; (P2) = 10,635 ; (P3) = 6,618 ; (P4) = 6,006 dan pada kelompok kuratif (aquadest) rerata ekspresi gen diperoleh nilai (P1) = 5,962 ; (P2) = 10,698 ; (P3) = 12,707 dan (P4) = 13,534. Hasil tersebut menyatakan bahwa pada kelompok preventif ada pengaruh pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* terhadap ekspresi mRNA gen TLR4 pada kelompok mencit BALB/C yang diberikan sebelum diinjeksi *Salmonella typhi* dan pada kelompok kuratif menunjukkan bahwa ada pengaruh pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* terhadap ekspresi mRNA gen TLR4 pada kelompok mencit BALB/C yang diberikan sesudah diinjeksi *Salmonella typhi* serta tidak ada perbedaan pengaruh ekstrak *Thalassia hemprichii* terhadap ekspresi mRNA gen TLR4 pada kelompok mencit BALB/C yang diberikan ekstrak *Thalassia hemprichii* sebelum diinjeksi *Salmonella typhi* dengan kelompok mencit BALB/c yang diberikan ekstrak *Thalassia hemprichii* sesudah diinjeksi *Salmonella typhi*.

Kata kunci : Ekstrak *Thalassia hemprichii*, senyawa bioaktif, mRNA TLR4

## ABSTRACT

**Jafriati** . Analysis of the Effect of Bioactive Compounds of *Thalassia hemprichii* Extract on BALB/C Mice Infected with *Salmonella typhi* : Study of Pathomechanism of TLR4 Gene mRNA Expression (guided by **Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK(K); Prof. dr. Rosdiana Natzir, Ph.D, Sp.Biok dan Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp.M (K), M.Med.Ed).**

This study aims to prove that the *Thalassia hemprichii* extract influences the expression of the TLR4 gene mRNA in the BALB / C mice group given *Thalassia hemprichii* extract before and after injection of *Salmonella typhi*.

This type of research is experimental by using the pretest-posttest Control Group Design model that is the effect of the experiment measured before and after treatment. This research was conducted through in vivo testing on experimental animals to determine the effect of *Thalassia hemprichii* extract, RNA extraction procedure with the Boom method, the procedure of examining the expression of TLR4 gene mRNA with RT-PCR method and examination of TLR4 levels by ELISA method.

The results of the study explained that the mean value of gene expression for the preventive group was at the initial examination (P1) = 5.909; (P2) = 5.909; (P3) = 8.043 and (P4) = 8.335, in the curative group (extract) the mean value of gene expression was (P1) = 2.180; (P2) = 9,291; (P3) = 3,923; (P4) = 3.578, in the curative group (levofloxacin) the mean of gene expression obtained value (P1) = 6.07; (P2) = 10,635; (P3) = 6.618; (P4) = 6,006 and in the curative group (aquadest) the mean of gene expression was obtained value (P1) = 5.962; (P2) = 10.698; (P3) = 12,707 and (P4) = 13,534. The results stated that in the preventive group there was an effect of *Thalassia hemprichii* extract on TLR4 gene mRNA expression in the BALB / C mice group given prior to *Salmonella typhi* injection and in the curative group showed that there was an effect of *Thalassia hemprichii* extract on the expression of TLR4 gene mRNA in the mice group given before *Salmonella typhi* and injected in the curative group showed that there was an effect of *Thalassia hemprichii* extract on mRNA expression of the TLR4 gene BALB / C given after injection of *Salmonella typhi* and there was no difference in the effect of *Thalassia hemprichii* extract on the expression of TLR4 gene mRNA in the BALB / C group of mice given *Thalassia hemprichii* extract before being injected with *Salmonella typhi* with BALB / c mice given *Thalassia hemprichii* extract after being injected with *Thalassia hemprichii* extract before being injected with *Salmonella typhi* with BALB / c mice given *Thalassia hemprichii* extract after being injected with *Salmonella typhi*

**Keywords:** *Thalassia hemprichii* extract, bioactive compounds, TLR4 mRNA

## DAFTAR ISI

|  |      |
|--|------|
| HALAMAN SAMPUL .....   | i    |
| SIDANG TERTUTUP PENELITIAN .....   | ii   |
| PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI .....  | iii  |
| DAFTAR TIM PENGUJI .....   | iv   |
| KATA PENGANTAR .....   | v    |
| ABSTRAK .....  | x    |
| DAFTAR ISI .....   | xi   |
| DAFTAR TABEL .....   | xiii |
| DAFTAR GRAFIK .....  | xiv  |
| DAFTAR GAMBAR .....  | xv   |
| DAFTAR SINGKATAN .....   | xvi  |
| DAFTAR LAMPIRAN .....  | xvii |
| <br>   |      |
| BAB 1 PENDAHULUAN .....  | 1    |
| 1.1. Latar Belakang .....  | 1    |
| 1.2. Rumusan Masalah .....   | 7    |
| 1.3. Tujuan Penelitian .....   | 8    |
| 1.4. Manfaat Penelitian .....  | 9    |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....  | 11   |
| 2.1 Tinjauan Tentang Infeksi <i>Salmonella typhi</i> .....                                       | 11   |
| 2.2 Respon Imun terhadap <i>Salmonella typhi</i> .....   | 27   |
| 2.3 Tinjauan tentang Sistem Imun .....   | 29   |
| 2.4 Tinjauan tentang <i>Toll Like Receptor</i> (TLR) .....                                       | 45   |
| 2.5 Tinjauan Umum tentang Lamun <i>Thalassia hemprichii</i> .....                                | 60   |
| 2.6 Metode Ekstraksi .....   | 72   |
| 2.7 Metode Pemeriksaan Ekspresi mRNA Gen .....   | 75   |
| 2.8 Hubungan <i>Salmonella typhi</i> , Ekstrak <i>Thalassia hemprichii</i><br>Dan gen TLR 4..... | 84   |
| 2.9 Kerangka Teori .....   | 90   |
| 2.10 Kerangka Konsep .....   | 91   |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.11 Definisi Operasional .....  | 92        |
| 2.12 Hipotesis .....   | 92        |
| <b>BAB III METODE PENELITIAN .....</b>   | <b>94</b> |
| 3.1 Jenis dan Desain Penelitian .....  | 94        |
| 3.2 Lokasi dan Waktu Penelitian .....  | 94        |
| 3.3 Subjek Penelitian .....  | 95        |
| 3.4 Protokol Penelitian .....  | 97        |
| 3.5 Etika Penelitian .....   | 114       |
| 3.6 Analisis Data .....  | 114       |
| 3.7 Alur Penelitian .....  | 116       |
| <br>   |           |
| <b>BAB IV. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN</b>   |           |
| 4.1. Hasil Penelitian .....  | 117       |
| 4.1.1. Hasil Uji Fitokimia .....   | 117       |
| 4.1.2. Hasil Uji Antioksidan .....   | 118       |
| 4.1.3. Hasil Uji Kandungan Gizi .....  | 121       |
| 4.1.4. Hasil Deskripsi Perubahan Ekspresi mRNA gen TLR4 dan Jumlah koloni. ....  | 122       |
| 4.1.5. Hasil Deskripsi Perubahan kadar TLR4. ....  | 131       |
| 4.1.6. Hasil uji efek Ekstrak <i>Thalassia hemprichii</i> sebelum injeksi <i>Salmonella thypi</i> (Preventif). ....                | 137       |
| 4.1.7. Hasil uji efek Ekstrak <i>Thalassia hemprichii</i> sesudah injeksi <i>Salmonella thypi</i> (Kuratif). ....                  | 139       |
| 4.1.8. Hasil Uji efek pemberian antibiotik <i>levofloxacin</i> sesudah injeksi <i>Salmonella thypi</i> . ....                      | 141       |
| 4.1.9. Hasil Uji efek pemberian aquadest sesudah injeksi <i>Salmonella thypi</i> . ....  | 143       |
| 4.1.10. Hasil Uji efek pemberian ekstrak <i>Thalassia hemprichii</i> sebelum dengan sesudah injeksi <i>Salmonella thypi</i> . .... | 145       |
| 4.2. Pembahasan .....  | 146       |
| 4.2.1 Uji Fitokimia .....  | 146       |
| 4.2.2 Uji Antioksidan .....  | 148       |

|   |     |
|---|-----|
| 4.2.3 Uji Kandungan Gizi .....  | 151 |
| 4.2.4 Efek Ekstrak <i>Thalassia hemprichii</i> terhadap ekspresi mRNA gen TLR4 sebelum injeksi bakteri <i>Salmonella thypi</i> (Preventif). .....                                     | 152 |
| 4.2.5 Efek Ekstrak <i>Thalassia hemprichii</i> terhadap ekspresi mRNA TLR4 sesudah injeksi bakteri <i>Salmonella thypi</i> (Kuratif). .....   | 154 |
| 4.2.6 Perbandingan Ekspresi mRNA TLR4 pada kelompok yang diberikan Ekstrak <i>Thalassia hemprichii</i> sebelum dan sesudah injeksi bakteri <i>Salmonella thyp</i> .....               | 163 |
| 4.2.7 Hubungan ekspresi mRNA TLR4 dan Kadar TLR4 pada kelompok yang diberikan Ekstrak <i>Thalassia hemprichii</i> sebelum dan sesudah injeksi bakteri <i>Salmonella thypi</i> . ..... | 166 |
| BAB V KESIMPULAN DAN SARAN .....  | 169 |
| 4.1. Kesimpulan .....   | 169 |
| 4.1. Saran .....  | 169 |

## DAFTAR TABEL

|  |     |
|--|-----|
| Tabel 1. Klasifikasi <i>Salmonella</i> menurut Kauffman-White (Tam, 2008).....   | 14  |
| Tabel 2. Cell-associated PRRs pada imunitas innate .....   | 40  |
| Tabel 3. SRMs pada Imunitas Innate .....   | 41  |
| Tabel 4. Klasifikasi TLR, ligan, dan spesies yang dikenali (Emertcan A, <i>et al.</i> , 2011).....   | 47  |
| Tabel 5. Ekspresi TLR pada berbagai sel .....  | 49  |
| Tabel 6. Konversi Perhitungan Dosis (Laurence & Bacharach, 1964).....  | 104 |
| <br>   |     |
| Tabel 4.1. Hasil skrining fitokimia ekstrak <i>Thalassia hemprichii</i>  | 117 |
| Tabel 4.2. Analisis potensi antioksidan ekstrak <i>Thalassia hemprichii</i>  | 118 |
| Tabel 4.3. Kandungan gizi ekstrak <i>Thalassia hemprichii</i> .....  | 121 |
| Tabel 4.4. Hasil analisis deskripsi ekspresi mRNA gen TLR4 pada kelompok yang diberikan ekstrak <i>Thalassia hemprichii</i> sebelum injeksi <i>Salmonella thypi</i> (preventif). .....     | 123 |
| Tabel 4.5. Hasil analisis deskripsi ekspresi mRNA gen TLR4 pada kelompok sampel yang diberi ekstrak <i>Thalassia hemprichii</i> sesudah diinjeksi <i>Salmonella thypi</i> (Kuratif). ..... | 124 |
| Tabel 4.6 Hasil analisis deskripsi ekspresi mRNA gen TLR4 pada kelompok sampel yang diberi antibiotik <i>levofloxacin</i> sesudah diinjeksi <i>Salmonella thypi</i> (kuratif). .....       | 126 |
| Tabel 4.7. Hasil analisis deskripsi ekspresi mRNA gen TLR4 pada kelompok sampel yang diberi aquadest sesudah diinjeksi <i>Salmonella thypi</i> (Kuratif). .....                            | 127 |
| Tabel 4.8. Hasil analisis deskripsi kadar TLR4 pada kelompok yang diberikan ekstrak <i>Thalassia hemprichii</i> sebelum injeksi <i>Salmonella thypi</i> (preventif). .....                 | 131 |

|  |     |
|--|-----|
| Tabel 4.9. Hasil analisis deskripsi kadar TLR4 pada kelompok sampel yang diberi ekstrak <i>Thalassia hemprichii</i> sesudah diinjeksi <i>Salmonella thypi</i> (Kuratif). ..... | 132 |
| Tabel 4.10. Hasil analisis deskripsi kadar TLR4 pada kelompok sampel yang diberi antibiotik <i>levofloxacin</i> sesudah diinjeksi <i>Salmonella thypi</i> (kuratif).....       | 134 |
| Tabel 4.11. Hasil analisis deskripsi kadar TLR4 pada kelompok sampel yang diberi aquadest sesudah diinjeksi <i>Salmonella thypi</i> (Kuratif). .....                           | 135 |
| Tabel. 4.12. Hasil Uji Homogenitas data ekspresi gen.....  | 137 |
| Tabel 4.14. Hasil uji lanjut .....   | 138 |
| Tabel. 4.15. Hasil Uji Homogenitas data .....  | 139 |
| Tabel 4.16. Hasil Analisis of Varians .....  | 140 |
| Tabel 4.17. Hasil uji lanjut .....   | 140 |
| Tabel. 4.18. Hasil Uji Homogenitas data ekspresi gen .....   | 141 |
| Tabel 4.20. Hasil uji lanjut .....   | 142 |
| Tabel. 4.21. Hasil Uji Homogenitas data ekspresi gen .....   | 143 |
| Tabel 4.22. Hasil Analisis of Varians .....  | 143 |
| Tabel 4.23. Hasil uji lanjut .....   | 144 |
| Tabel. 4.24. Hasil Uji Homogenitas data ekspresi gen....   | 145 |
| Tabel 4.25. Hasil Analisis of Varians .....  | 145 |

## DAFTAR GRAFIK

|  |    |
|--|----|
| Grafik 1. Titik-titik amplifikasi <i>Real Time PCR</i> (Yajima, et al., 1998)..... | 81 |
|--|----|



## DAFTAR GAMBAR

|   |    |
|---|----|
| Gambar 1. Mikroskopis kuman <i>Salmonella</i> .....   | 11 |
| Gambar 2. Gambar kuman <i>Salmonella typhi</i> secara skematik (Marleni, 2012) .....  | 13 |
| Gambar 3. Patofisiologi demam tifoid (Marleni, 2012) .....  | 20 |
| Gambar 4. Respon Imun terhadap bakteri(Marleni, 2012). .....  | 20 |
| Gambar 5. Mekanisme imunitas bawaan dan imunitas adaptif (Abbas <i>et al.</i> , 2014). .....  | 30 |
| Gambar 6. Imunitas humoral dan seluler (Abbas <i>et al.</i> 2014) .....   | 35 |
| Gambar 7. Pengenalan TLR terhadap bakteri (Netea G, <i>et al.</i> , 2004) .....   | 54 |
| Gambar 8. <i>Signal-transduction pathways</i> melalui NFκB (Dang Minh Nguyen, <i>et al.</i> , 2002) .....   | 55 |
| Gambar 9. TLR secara spesifik mengenali <i>pathogen- associated molecular patterns (PAMPs)</i> dan/atau komponen sintesis (McIntruff J, <i>et al.</i> , 2005) ..... | 58 |
| Gambar 10. Mekanisme kerja TLR4 terhadap infeksi bakteri gram negatif .....   | 59 |
| Gambar 11. <i>Thalassia hemprichii</i> .....  | 60 |
| Gambar 12. Lamun <i>Thalassia hemprichii</i> .....  | 62 |
| Gambar 13. Struktur Dasar Alkaloid Isoquinolin .....  | 65 |
| Gambar 14. Struktur Dasar Senyawa Flavonoid.....  | 66 |
| Gambar 15. Contoh Struktur Dasar Senyawa Steroid dan Triterpenoid .....   | 67 |
| Gambar 16. Struktur Dasar Senyawa Fenol Hidrokuinon .....   | 68 |
| Gambar 17. Contoh Struktur Senyawa Saponin .....  | 69 |
| Gambar 18. Struktur Sorghum Procyanidin Golongan Tanin .....  | 70 |
| Gambar 19. Alat Real Time PCR .....   | 79 |
| Gambar 20. Mesin ELISA Microplate Reader .....  | 84 |
| Gambar 21. Kerangka teori .....   | 90 |

|   |     |
|---|-----|
| Gambar 22. Kerangka konsep .....  | 91  |
| Gambar 23. Desain Penelitian .....  | .94 |
| Gambar. 23. Alur Penelitian .....   | 116 |
| Gambar 4.1. Perubahan nilai rerata ekspresi mRNA gen TLR4 kelompok preventif .....  | 124 |
| Gambar 4.2. Perubahan nilai rerata ekspresi mRNA gen TLR4 kelompok sampel yang diberi ekstrak <i>Thalassia hemprichii</i> sesudah diinjeksi <i>Salmonella thypi</i> (kuratif) ..... | 125 |
| Gambar 4.3. Perubahan nilai rerata ekspresi mRNA gen TLR4 kelompok sampel yang diberi xviintibiotic <i>levofloxacin</i> sesudah diinjeksi <i>Salmonella thypi</i> (Kuratif) .....   | 127 |
| Gambar 4.4. Perubahan nilai rerata ekspresi mRNA gen TLR4 kelompok sampel yang diberi aquadest sesudah diinjeksi <i>Salmonella thypi</i> (Kuratif). .....                           | 128 |
| Gambar 4.5. Ekspresi mRNA gen TLR4 secara lengkap.....  | 129 |
| Gambar 4.6. Grafik rerata jumlah koloni hasil kultur .....  | 130 |
| Gambar 4.7. Perubahan nilai rerata kadar TLR4 kelompok preventif  | 132 |
| Gambar 4.8. Perubahan nilai rerata kadar TLR4 kelompok sampel yang diberi ekstrak <i>Thalassia hemprichii</i> sesudah diinjeksi <i>Salmonella thypi</i> (kuratif). .....            | 133 |
| Gambar 4.9. Perubahan nilai rerata kadar TLR4 kelompok sampel yang diberi antibiotik <i>levofloxacin</i> sesudah diinjeksi <i>Salmonella thypi</i> (Kuratif). .....                 | 135 |
| Gambar 4.10 Perubahan nilai rerata kadar TLR4 kelompok sampel yang diberi aquadest sesudah diinjeksi <i>Salmonella thypi</i> (Kuratif).....   | 136 |

## DAFTAR SINGKATAN

|                 |   |
|-----------------|---|
| $\mu$ l         | <i>Mikroliter</i>   |
| TLR4            | <i>Toll Like Reseptor 4</i>                                       |
| AMP             | <i>Adenosina monofosfat siklik</i>                                |
| ATCC            | <i>American Type Culture Collection</i>                           |
| ATP             | <i>Adenosina trifosfat</i>  |
| BB              | Berat Badan   |
| <i>S. thypi</i> | <i>Salmonella thypi</i>   |
| CFM             | Colony Forming Unit   |
| ConA            | <i>Concanavalin A</i>   |
| ConA            | <i>Concanavalin A</i>   |
| DC              | <i>Dendritic cell</i>   |
| DNA             | <i>Deoxyribonucleic acid</i>                                      |
| EGCG            | Epigallocatechin gallate  |
| ELISA           | <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>                          |
| ERG             | <i>ETS-related gen</i>  |
| EUCAST          | <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i> |
| FA              | Flour Albus   |

|               |   |
|---------------|---|
| G-SCF         | <i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>  |
| HCs           | <i>Healthy controls</i>                       |
| HPLC          | <i>High performance liquid chromatography</i> |
| HT            | Hijau Terang                                  |
| IFN- $\gamma$ | Interferon gamma                              |
| Ig E          | <i>Immunoglobulin E</i>                       |
| IgA           | <i>Immunoglobulin A</i>                       |
| IgG           | <i>Immunoglobulin G</i>                       |
| IgM           | <i>Immunoglobulin M</i>                       |
| IL            | <i>Interleukin</i>                            |
| IL-1Ra        | <i>Interleukin-1 receptor antagonist</i>      |
| IL-1 $\alpha$ | <i>Interleukin-1 alpha</i>                    |
| IL-1 $\beta$  | <i>Interleukin-1 Beta</i>                     |
| ITS 1         | <i>Internal transcribed spacer 1</i>          |
| ITS 2         | <i>Internal transcribed spacer 2</i>          |
| KOH           | Kalium Hidroksida                             |
| KVV           | Kandidiasis Vulvovaginalis                    |
| L6            | <i>Lysis buffer</i>                           |
| LDL           | <i>Low density lipoprotein</i>                |
| LPS           | <i>Lipoprotein sakarida</i>                   |
| M-CSF         | <i>Macrophage colony-stimulating factor</i>   |
| MIC           | Minimum Inhibitory Concentration              |
| mL            | Mililiter                                     |
|               | <i>Mesenteric Lymph Node</i>                  |
| MLN           | <i>messenger-RNA</i>                          |
| mRNA          | xx  |

|              |                                       |
|--------------|---------------------------------------|
| MS           | <i>Millisecond</i>                    |
| NaCl         | <i>Sodium Chloride</i>                |
| nm           | <i>Nanometer</i>                      |
| NO           | <i>Nitric Oxide</i>                   |
| P.aeruginosa | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>         |
| PBMC         | <i>mononucleated perifer</i>          |
| PCR          | <i>Polymerase Chain Reaction</i>      |
| PDA          | <i>Potato Dextrose Agar</i>           |
| pH           | <i>Potensial Hidrogen</i>             |
| PMN          | <i>Polymorphonuclear neutrophilic</i> |
| RA           | <i>Rheumatoid Arthritis</i>           |
| RNA          | <i>ribonucleic acid</i>               |
| RNS          | <i>Runny Nose Syndrome</i>            |
| ROS          | <i>Reactive Oxygen Species</i>        |
| rRNA         | <i>Ribosome-Ribonucleic Acid</i>      |
| S.ureus      | <i>Staphylococcus aureus</i>          |
| Sel NK       | <i>Natural Killer Cell</i>            |
| Sel T        | <i>Lymphocyte T</i>                   |
| TGF          | <i>Transforming growth</i>            |
| Th           | <i>T helper</i>                       |
| TLR          | <i>Toll like receptor</i>             |
| TMB          | <i>Tetramethylbenzidine</i>           |
| TNF          | <i>Tumor Necrosis Factor</i>          |
| TOP2         | <i>Topoisomerase II</i>               |
| WBC          | <i>White blood cells</i>              |

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 . Dokumentasi Penelitian

Lampiran 2 . Hasil Pemeriksaan Uji Fitokimia (Senyawa Bioaktif)

Lampiran 3 . Hasil Pemeriksaan Polifenol (Tanin)

Lampiran 4 . Hasil Pemeriksaan Aktifitas Antioksidan (DPPH)

Lampiran 5 . Hasil Pemeriksaan Kandungan Gizi ( Analisis Proksimat)

Lampiran 6 . Jumlah Koloni Bakteri (Kultur)

Lampiran 7 . List Berat adan dan Dosis Pengobatan Mencit BAB/C

Lampiran 8 . Hasil Analisis Statistik

Lampiran 9 . Hasil Pemeriksaan Ekspresi mRNA GEN TLR4 (RT-PCR)

Lampiran 10 . Hasil Pemeriksaan Kadar TLR4 (Elisa)

Lampiran 11 . Persetujuan Etik

Lampiran 12 . Izin Penggunaan Laboratorium

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Tubuh manusia dapat terpajan dengan mikroorganisme sehingga menyebabkan penyakit infeksi dari ringan, hingga sepsis dan kematian. *Salmonella enteric serovar typhi* (*S. typhi*) merupakan mikroorganisme kelompok bakteri gram negatif berbentuk batang, masuk dalam kelompok family *Enterobacteriaceae*, yang menyebabkan penyakit demam tifoid (DT), transmisi penyakit ini terjadi melalui makanan dan air yang terkontaminasi. Sanitasi dan Higienitas yang baik menurunkan insiden penyakit, akan tetapi di negara berkembang dan negara maju masih menjadi masalah kesehatan yang serius (Crump and Mintz, 2010).

Demam tifoid adalah salah satu penyebab utama mortalitas dan morbiditas kematian di seluruh dunia, sekitar 21 juta infeksi terjadi setiap tahun dengan mayoritas kematian terjadi pada anak-anak. Data menunjukkan bahwa di Amerika Utara ranking *relative years of life lost* karena demam tifoid hampir sama dengan kanker payudara, prostat dan leukimia, sementara di Asia dan Afrika penyakit ini endemisitasnya relative tinggi (Gunn *et al.*, 2014). Surveillans insiden demam tifoid di lima Negara di Asia menunjukkan bahwa untuk daerah kumuh dan miskin di Indonesia terdapat 81-87 kasus per 100.000 penduduk per

tahun untuk semua kalangan umur. Insiden di Indonesia berada di bawah India dan Pakistan namun jauh di atas China dan Vietnam (Wain *et al.*, 2014).

Di Indonesia, tifoid harus mendapat perhatian serius dari berbagai pihak, karena penyakit ini bersifat endemis dan mengancam kesehatan masyarakat. Permasalahannya semakin kompleks dengan meningkatnya kasus-kasus karier (Carrier) atau relaps dan resistensi terhadap obat-obat yang dipakai, sehingga menyulitkan upaya pengobatan dan pencegahan. Pada tahun 2008, angka kesakitan tifoid di Indonesia dilaporkan sebesar 81,7 per 100.000 penduduk, dengan sebaran menurut kelompok umur 0,0/100.000 penduduk (0-1 tahun), 148,7/100.000 penduduk (2-4 tahun), 180,3/100.000 penduduk (5-15 tahun), dan 51,2/100.000 penduduk ( $\geq$  16 tahun). Angka ini menunjukkan bahwa penderita terbanyak adalah pada kelompok usia 2-15 tahun. Hasil telaahan kasus di rumah sakit di Indonesia menunjukkan adanya kecenderungan peningkatan jumlah kasus tifoid dari tahun ke tahun dengan rata-rata kesakitan 500/100.000 penduduk dan kematian diperkirakan sekitar 0,6-5 % (Elisabeth Purba *dkk.*, 2016).

Tubuh manusia memiliki berbagai mekanisme pertahanan tubuh untuk mengendalikan kolonisasi mikroflora residen, yang cukup efektif mencegah perkembangan penyakit akibat mikroorganisme. Mekanisme pertahanan tersebut terdiri atas pertahanan fisis atau anatomis (kulit, mukosa), mekanis (sel silia pada traktus respiratorius), dan sawar



biokimia (air mata atau saliva), yang selanjutnya dapat menginduksi sistem imun, alami dan adaptif (Modlin R *et al.*, 2008; Albiger B *et al.*, 2007; Emertcan A *et al.*, 2011; Terhorst D *et al.*, 2010).

Pemahaman mengenai respon imun tubuh terhadap *Salmonella* dan intervensi yang bisa diharapkan memberikan kontribusi dalam pemecahan masalah morbiditas dan mortalitas tifoid. Respon inflamasi yang lemah segera setelah infeksi strain *Salmonella* bisa menyebabkan infeksi yang persisten dan memfasilitasi survival pathogen yang lama (Marrel and Falkow., 2004), namun disisi yang lain respon inflamasi yang tidak berlebihan terhadap infeksi *Salmonella* yang sistemik juga meminimalisir kerusakan jaringan karena dimediasi oleh immune (Humayoon Shafiq Satti., 2013). Species *Salmonella*, khususnya *S. Enteric serovar typhi* (*S. typhi*) bisa persisten menetap di dalam tubuh hingga bertahun-tahun dan mengalami reaktivasi kembali. Setelah menginvasi sel M intestinal pada plak Payer, *Salmonella* bisa difagositosis oleh makrofag dan menuju ke limfonodus mesenterika, limpa, sumsum tulang dan kandung empedu dimana mereka bisa menjadi persisten (Humayoon Shafiq Satti, 2013).

Sistem imunitas alami dapat mengenali patogen melalui *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs). Molekul yang dikenali berupa molekul bakteri positif-Gram dan negatif-Gram, DNA dan RNA virus, jamur dan protozoa. Setiap molekul tersebut memiliki target yang spesifik. Salah satu reseptor pengenal utama pola molekul sistem imunitas alami adalah *Toll-like receptors* (TLRs) (Emertcan A *et*

*al.*, 2011; Sato M *et al.*, 2011; Damgaard R *et al.*, 2011). *Toll-like receptor* (TLR) termasuk kelompok glikoprotein yang berfungsi sebagai reseptor permukaan transmembran dan terlibat dalam respons imun alami terhadap mikroorganisme patogen. TLR merupakan komponen kunci pada respons imun alami yang dapat mengenali komponen mikroorganisme. Selanjutnya TLR memulai jalur yang memberi sinyal untuk mengaktifkan sitokin, kemokin, dan peptida antimikroba. TLR dapat meningkatkan perlekatan dan pengaturan kostimulasi molekul yang terlibat dalam respons imun alami dan bawaan (Petry V *et al.*, 2006; Kang S *et al.*, 2006).

Saat ini telah diketahui 11 macam TLR, yang dibagi menjadi dua tipe yaitu: *surface -expressed TLRs*, yang aktif terhadap komponen dinding sel bakteri; dan reseptor intraselular, yang mengenali pola molekul virus. Seluruh TLR memiliki kemiripan struktur dan fungsi, namun memberikan respons yang berbeda terhadap komponen mikroorganisme (Terhorst D *et al.*, 2010). TLR berperan penting dalam berbagai patofisiologi penyakit autoimun, di sistem saraf pusat, paru, traktus gastrointestinal, ginjal, dan kanker (Emertcan A *et al.*, 2011).

Gen TLR4 berperan dalam mengaktivasi respon imun non spesifik. Gen TLR4 mentranskripsi protein yang berfungsi sebagai reseptor permukaan sel fagosit. Protein reseptor ini mampu mengenali lipopolisakarida (LPS) dari bakteri gram negatif, termasuk *Salmonella*, dengan demikian gen TLR4 ini dapat diaktivasi oleh LPS. (Emertcan *et al.*, 2011; Animura *et al.*, 2008; Akira dan Takeda., 2004; Palsson dan

O'Neill., 2004; Akashi *et al.*, 2001). Pada manusia dan tikus, telah dibuktikan bahwa terjadinya mutasi pada gen TLR4, berdampak terhadap penurunan kemampuan individu dalam mengenali LPS dari bakteri *Salmonella sp.* Individu tersebut menjadi peka dan mudah terinfeksi *Salmonella* (Lorenz *et al.*, 2002). Adanya mutasi menyebabkan gen TLR4 membentuk beberapa genotipe.

Lipopolisakarida yang terkandung dalam *Salmonella typhi* mampu menyebabkan demam pada manusia dengan menginjeksi produksi pirogen endogen (*in vitro*). Pirogen endogen adalah polipeptida yang dihasilkan oleh jenis sel penjamu, terutama monosit/makrofag. Pirogen endogen yang dihasilkan baik secara sistemis atau local, berhasil memasuki sirkulasi dan menyebabkan demam pada tingkat pusat termoregulasi di hypothalamus. Sitokin pirogenik utama adalah IL-1, TNF  $\alpha$  dan IL-6. Kadar IL-6 berhubungan lebih besar dengan kejadian demam dan penemuan patologik lainnya dalam berbagai penyakit infeksi dari pada IL-1 atau TNF  $\alpha$ , karena menetapnya IL-6 dalam sirkulasi. (Harrison., 1999).

Pengobatan demam tifoid di Negara berkembang sejak tahun 1948 menggunakan antibiotik Kloramfenicol yang merupakan *drug of choice* untuk infeksi *Salmonella typhi*. Keampuhan Kloramfenicol untuk pengobatan demam tifoid telah diakui berdasarkan efektivitasnya dan harganya yang relatif murah. Namun setelah bertahan sekitar 25 tahun dilaporkan beberapa peneliti adanya strain *Salmonella typhi* resisten terhadap kloramfenikol (Bhutta ZA, 2006). Seiring dengan

meningkatnya resistensi bakteri di dunia kesehatan, maka perlu adanya penemuan obat baru. Sumber antibakteri baru dapat diperoleh dari senyawa bioaktif yang terkandung dalam suatu tumbuhan, salah satunya dari lamun (Seagrass). Lamun hijau, merah ataupun coklat merupakan sumber potensial senyawa bioaktif yang sangat bermanfaat bagi pengembangan industri farmasi seperti sebagai anti bakteri, anti tumor, anti kanker atau sebagai reversal agent dan industri agrokimia terutama untuk antifeedant, fungisida dan herbisida (Bachtiar, 2007). Menurut Kordi (2010) bahwa lamun banyak dimanfaatkan oleh masyarakat pesisir sebagai obat luar, salah satunya sebagai bahan antiseptik alami. Hasil penelitian Pringgenies *et al.*, (2011) menunjukkan potensi lamun sebagai antibakteri patogen yang dapat menyebabkan penyakit infeksi. Salah satu penyakit infeksi yang sering terjadi adalah infeksi pada kulit. Bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa* merupakan kuman patogen yang sering menyebabkan infeksi kulit pada manusia, sedangkan *Micrococcus luteus* merupakan bakteri yang sering ditemukan menginfeksi kulit ikan (Refdanita *et al*, 2004).

Lamun dugong (*Thalassia hemprichii*) memiliki jumlah yang cukup berlimpah dan sering dominan pada padang lamun campuran. *Thalassia hemprichii* mengandung senyawa bioaktif yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram positif dan bakteri gram negatif (Jafriati., 2005, Jafriati., 2014). *Thalassia hemprichii* diketahui mengandung senyawa bioaktif potensial sebagai antibakteri, antifungi,

antiprotozoa, antiviral, antifertility, dan bahan obat-obatan yang berpengaruh pada sistem kardiovaskular (Laksmi, *et al.*, 2006). Raja-Kannan, *et al.* (2010) memaparkan *Thalassia hemprichii* juga memiliki potensi bioaktif sebagai antioksidan dan mengandung senyawa golongan fenolik. Hasil penelitian Ravikumar *et al.* (2008) menunjukkan bahwa kandungan senyawa bioaktif pada lamun yang berasal dari perairan selatan India memiliki kemampuan potensi sebagai antibakteri.

Mengingat potensi dan tingginya kandungan senyawa bioaktif pada ekstrak *Thalassia hemprichii*, maka sangat perlu dikaji untuk mengembangkan ekstrak *Thalassia hemprichii* menjadi herbal terstandar yang berefek sebagai antioksidan dan antibakteri, yang dikaji berdasarkan ekspresi mRNA gen TLR4 pada mencit BALB/c yang diinjeksi bakteri *Salmonella typhi* dengan menggunakan metode *RT-PCR*.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Berdasarkan uraian latar belakang tersebut maka masalah penelitian ini adalah :

1. Apakah ada pengaruh pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* terhadap ekspresi mRNA gen TLR4 pada kelompok mencit BALB/C yang diberikan sebelum diinjeksi *Salmonella typhi* ?
2. Apakah ada pengaruh pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* terhadap ekspresi mRNA gen TLR4 pada

kelompok mencit BALB/C yang diberikan sesudah diinjeksi *Salmonella typhi* ?

3. Apakah ada perbedaan pengaruh ekstrak *Thalassia hemprichii* terhadap ekspresi mRNA gen TLR4 pada kelompok mencit BALB/C yang diberikan ekstrak *Thalassia hemprichii* sebelum dan sesudah diinjeksi *Salmonella typhi* ?

### 1.3 Tujuan penelitian

Berdasarkan latar belakang dan rumusan masalah yang telah dikemukakan, maka tujuan penelitian ini adalah :

#### 1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk membuktikan bahwa ekstrak *Thalassia hemprichii* mempengaruhi ekspresi mRNA gen TLR4 pada kelompok mencit BALB/C yang diberikan ekstrak *Thalassia hemprichii* sebelum dan sesudah diinjeksi *Salmonella typhi*.

#### 1.3.2 Tujuan Khusus

Adapun tujuan khusus penelitian ini adalah :

- a. Untuk mengetahui pengaruh ekstrak *Thalassia hemprichii* terhadap ekspresi mRNA gen TLR4 pada kelompok mencit BALB/C yang diberikan ekstrak *Thalassia hemprichii* sebelum diinjeksi *Salmonella typhi*.
- b. Untuk mengetahui pengaruh ekstrak *Thalassia hemprichii* terhadap ekspresi mRNA gen TLR4 pada kelompok mencit

BALB/C yang diberikan ekstrak *Thalassia hemprichii* sesudah diinjeksi *Salmonella typhi*.

- c. Untuk mengetahui perbedaan pengaruh ekstrak *Thalassia hemprichii* terhadap ekspresi mRNA gen TLR4 pada kelompok mencit BALB/C yang diberikan ekstrak *Thalassia hemprichii* sebelum diinjeksi *Salmonella typhi* dengan kelompok mencit BALB/C yang diberikan ekstrak *Thalassia hemprichii* sesudah diinjeksi *Salmonella typhi*.

#### **1.4 Manfaat Penelitian**

Secara garis besar penelitian ini akan memberikan manfaat antara lain :

##### **1.3.3 Bidang Akademik**

- Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai manfaat ekstrak *Thalassia hemprichii* sebagai antioksidan dan mekanisme kerja immunomodulator respon imun melalui ekspresi mRNA gen TLR4 pada infeksi *Salmonella typhi*.
- Sebagai data yang bisa dijadikan dasar untuk penelitian lanjutan tentang ekstrak *Thalassia hemprichii* sebagai antioksidan dan immunomodulator pada infeksi *Salmonella typhi*.

#### 1.3.4 Manfaat Praktis

- Hasil penelitian diharapkan dapat memperkaya batang tubuh keilmuan biomedik khususnya tentang intervensi terapi komplementer dengan pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* pada pasien dengan masalah infeksi *Salmonella typhi*.
- Hasil yang diperoleh dari penelitian ini diharapkan menjadi lebih menguatkan keyakinan pada masyarakat tentang manfaat ekstrak *Thalassia hemprichii*, dan dapat memberikan kontribusi pada unsur pemerintah khususnya Balai Pengobatan Tradisional Depkes sebagai data empiris penggunaan ekstrak *Thalassia hemprichii* sebagai bahan dasar dalam pembuatan obat-obatan untuk penyakit infeksi.



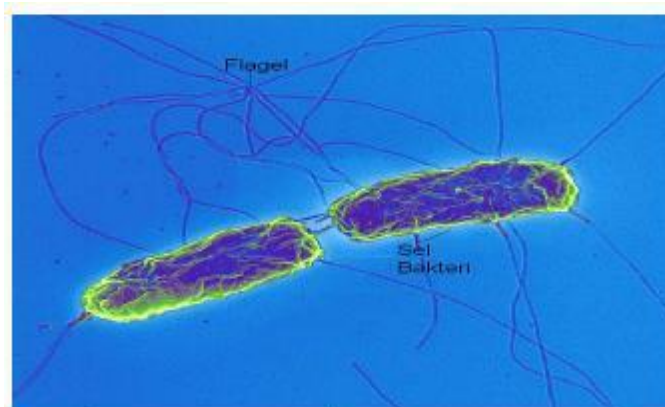
## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Tinjauan Tentang Infeksi *Salmonella typhi*

##### 2.1.1 Sifat kuman *Salmonella typhi*

Etiologi demam tifoid diakibatkan oleh bakteri *Salmonella typhi* atau *Salmonella paratyphi* dari family *Enterobacteriaceae*. Bakteri ini merupakan bakteri gram negatif batang, tidak membentuk spora, motil, berkapsul dan berflagella (bergerak dengan rambut getar). Bakteri ini dapat hidup pada pH 6-8 pada suhu 15-41<sup>0</sup>C (suhu optimal 37<sup>0</sup> C ). Bakteri ini dapat mati dengan pemanasan 54,4<sup>0</sup> C selama satu jam dan suhu 60<sup>0</sup>C selama 15 – 20 menit, pasteurisasi, pendidihan dan khlorinasi. Terjadinya penularan *S. typhi* pada manusia yaitu secara jalur fekal-oral. Sebagian besar akibat kontaminasi makanan atau minuman yang tercemar (Tumbelaka, 2003; WHO, 2003).



**Gambar 1. Mikroskopis kuman *Salmonella***

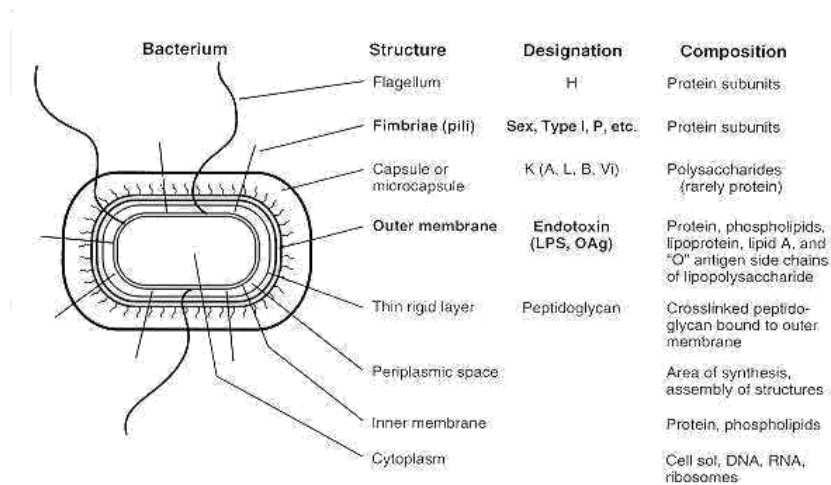
### 2.1.2 Struktur antigen

Struktur antigen *S. typhi* terdiri dari 3 macam antigen, yaitu:

1. Antigen O (Antigenik somatik) merupakan bagian terpenting dalam menentukan virulensi kuman. Bagian ini mempunyai struktur kimia lipopolisakarida disebut endotoksin dan terletak pada lapisan luar dari tubuh kuman. Antigen ini bersifat hidofilik, tahan terhadap pemanasan suhu 100<sup>0</sup>C selama 2-5 jam dan tahan alkohol 96 % dan etanol 96% selama 4 jam pada suhu 37<sup>0</sup>C tetapi tidak tahan terhadap formaldehid.
2. Antigen H (Antigen fl agella) yang terletak pada flagella dan fimbria (pili) dari kuman. Flagel ini terdiri dari badan basal yang melekat pada sitoplasma dinding sel kuman, struktur kimia ini berupa protein yang tahan terhadap formaldehid tetapi tidak tahan terhadap panas dan alkohol pada suhu 60<sup>0</sup>C. Selain itu flagel juga terdiri dari *the hook* dan filamen yang terdiri dari komponen protein polimerase yang disebut flagelin dengan BM 51-57 kDa yang dipakai dalam pemeriksaan asam nukleat kuman *S. typhi* (WHO, 2003).
3. Antigen Vi (permukaan) yang terletak pada kapsul (*envelope*) dari kuman yang dapat melindungi kuman terhadap fagositosis. Struktur kimia proteinnya dapat digunakan untuk mendeteksi adanya karier dan akan

rusak jika diberi pemanasan selama 1 jam pada suhu 60 °C dan pada pemberian asam serta fenol (WHO, 2003).

Ketiga komponen antigen tersebut di atas di dalam tubuh penderita akan menimbulkan pembentukan 3 macam antibodi yang lazim disebut aglutinin.



**Gambar 2. Gambar kuman *Salmonella typhi* secara skematik (Marleni, 2012)**

*Salmonella* diklasifikasikan berdasarkan Kauffman dan White berdasarkan struktur antigen somatiknya dan antigen flagellanya (WHO, 2003).

**Tabel 1. Klasifikasi *Salmonella* menurut Kauffman-White (Tam, 2008)**

| Group | Salmonella serotype   | O Antigens        | H antigens |         |
|-------|-----------------------|-------------------|------------|---------|
|       |                       |                   | Phase 1    | Phase 2 |
| A     | <b>S. Paratyphi A</b> | 1, 2, 12          | a          | –       |
| B     | <b>S. Paratyphi B</b> | 1, 4, (5), 12     | b          | 1, 2    |
|       | S. Stanley            | 1, 4, (5), 12, 27 | d          | 1, 2    |
|       | S. Typhimurium        | 1, 4, (5), 12     | i          | 1, 2    |
| C1    | <b>S. Paratyphi C</b> | 6, 7, (Vi)        | c          | 1, 5    |
|       | S. Choleraesuis       | 6, 7              | c          | 1, 5    |
| C2    | S. Manhattan          | 6, 8              | d          | 1, 5    |
| D     | S. Sendai             | 1, 9, 12          | a          | 1, 5    |
|       | <b>S. Typhi</b>       | 9, 12, Vi         | d          | –       |
|       | S. Dublin             | 1, 9, 12, (Vi)    | g, p       | –       |
| E1    | S. Anatum             | 3, 10             | e, h       | 1, 6    |

Membran luar terdiri atas lipoprotein, fosfolipid, protein membran dan lipopolisakarida (LPS) (Olsen, 2004).

Dinding sel *S. typhi* dibentuk 20% nya oleh lapisan lipoprotein. Sementara itu lapisan fosfolipid dan LPS membentuk 80% dinding sel kuman *S. typhi*. lipopolisakarida yang terdiri dari lipid A, oligosakarida, dan polisakarida yang merupakan bagian terpenting dan utama yang menentukan sifat antigenik dan aktivitas eksotoksin. Lipid A merupakan asam lemak jenuh yang menentukan aktivitas endotoksin dari LPS yang selanjutnya dapat mengakibatkan demam dan reaksi imunologis sang pejamu (Marleni, 2012; Olsen, 2004). *Outer Membran Protein* (OMP) ialah dinding sel terluar membran sitoplasma dan lapisan peptidoglikan yang berfungsi sebagai sawar untuk mengendalikan aktivitas

masuknya cairan ke dalam membran sitoplasma serta berfungsi sebagai reseptor bakteriofag dan bakteriolisin (Marleni, 2012).

### **2.1.3 Demam tifoid**

Demam tifoid akut merupakan penyakit infeksi akut bersifat sistemik yang disebabkan oleh mikroorganisme *Salmonella enterica* serotipe *typhi* yang dikenal dengan *Salmonella typhi* (*S. typhi*). Penyakit ini masih sering dijumpai di negara berkembang yang terletak di subtropis dan daerah tropis seperti Indonesia (Parry, 2004).

Sampai saat ini demam tifoid masih menjadi masalah kesehatan utama didunia karena terkait dengan penyebarannya melalui kesehatan lingkungan, sanitasi dan sumber air yang tidak higienis diperparah dengan meningkatnya permasalahan kepadatan penduduk dan penyebaran yang begitu mudah melalui urbanisasi. Demam tifoid termasuk penyakit menular yang tercantum dalam Undang-undang nomor 6 Tahun 1962 tentang wabah. Kelompok penyakit menular ini merupakan penyakit yang mudah menular dan dapat menyerang banyak orang sehingga dapat menimbulkan wabah (Sudoyo, 2009).

#### 2.1.4 Patogenesis demam tifoid

Perjalanan penyakit *S. typhi* melalui beberapa proses, diawali dengan masuknya kuman melalui makanan dan minuman yang tercemar melalui jalur oral-fekal. Yang kemudian tubuh akan melakukan mekanisme pertahanan melalui beberapa proses respon imun baik lokal maupun sistemik, spesifik dan non-spesifik serta humoral dan seluler (Tumbelaka, 2003). *S. typhi* yang masuk ke saluran cerna tidak selalu akan menyebabkan infeksi, karena untuk menimbulkan infeksi *S. typhi* harus dapat mencapai usus halus. Keasaman lambung ( $\text{pH} \leq 3,5$ ) menjadi salah satu faktor penting yang menghalangi *S. typhi* mencapai usus halus. Namun sebagian besar kuman *S. typhi* dapat bertahan karena memiliki gen *ATR* (*acid tolerance response*). *Achlorhydria* akibat penuaan, gastrektomi, pompa proton inhibitor, pengobatan histamin antagonis reseptor H<sub>2</sub>, atau pemberian antacid dapat menurunkan dosis infeksi yang mempermudah kuman untuk lolos menuju usus halus (Marleni, 2012).

Setelah masuk ke saluran cerna dan mencapai usus halus, *S. typhi* akan menemui dua mekanisme non spesifik yaitu motilitas dan flora normal usus berupa bakteri-bakteri anaerob. Motilitas usus bersifat fisik berupa kekuatan

peristaltik usus untuk menghanyutkan kuman keluar. Di usus halus kuman akan menembus mukosa usus diperantarai *microbial binding* terhadap epitel menghancurkan *Microfold cells* (*M cells*) sehingga sel-sel epitel mengalami deskuamasi, menembus epitel mukosa usus, masuk dalam lamina propria, menetap dan berkembang biak. Kuman akan berkembang biak dalam sel mononuklear sebelum menyebar ke dalam aliran darah (Nasronudin, 2007).

Di dalam sel fagosit mononuklear, kuman masuk menginfeksi *Peyer's patches*, yaitu jaringan limfoid yang terdapat di ileum terminal dan bermultiplikasi, kemudian kuman menembus kelenjar limfoid intestinal dan duktus torasikus masuk ke dalam aliran darah sistemik. Setelah 24-72 jam terjadi bakteriemia primer namun jumlah kuman belum terlalu banyak maka gejala klinis belum tampak. Bakteriemia primer berakhir setelah kuman masuk ke dalam organ *retikuloendotelial system* (*RES*) di hati limpa, kelenjar getah bening mesenterium dan kelenjar limfoid intestinal untuk berkembang biak. Di organ ini kuman menjalani masa inkubasi selama 10-14 hari, dalam organ RES kuman berkembang pesat dan kembali masuk ke peredaran darah dan menimbulkan bakteriemia sekunder. Pada saat terjadi bakteriemia sekunder, dapat ditemukan gejala-gejala klinis dari demam tifoid (Marleni, 2012; WHO,2003).

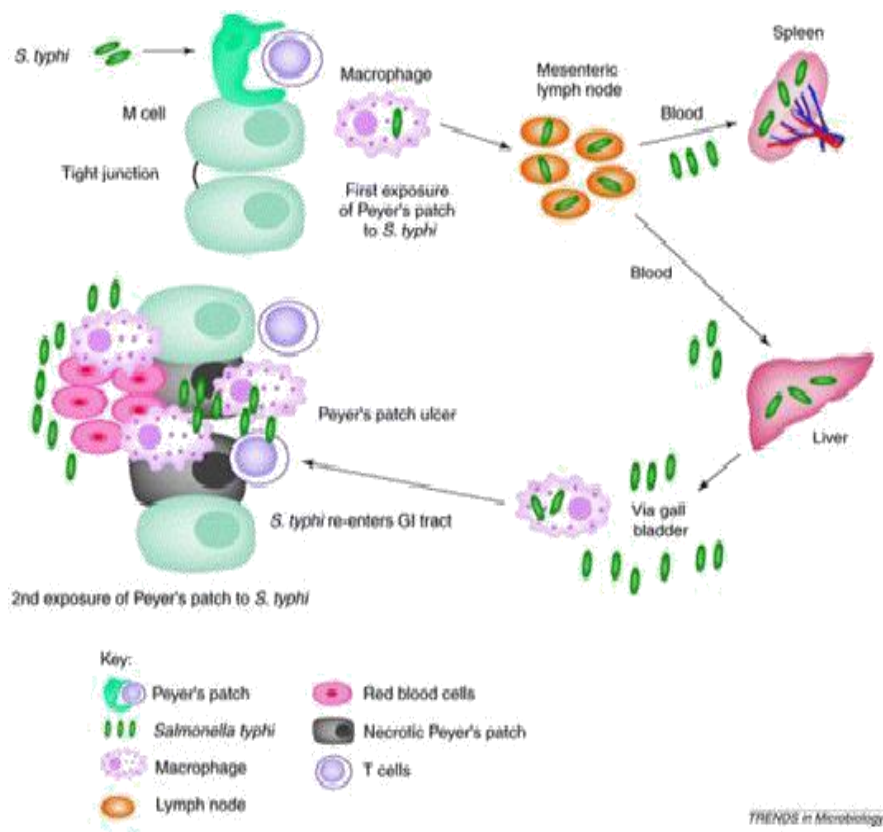
Pada dinding sel *S. typhi* terdapat pirogen LPS (endotoksin) dan sedikit peptidoglikan. Endotoksin merupakan pirogen eksogen yang sangat poten untuk merangsang respons imun makrofag dan sel lain untuk menginduksi sekresi sitokin. Sebagai reseptor, Komponen CD14 akan berikatan dengan LPS. Ikatan tersebut kemudian berikatan pula dengan kelompok molekul *Toll-like receptors* (TLR). Aktivasi yang terjadi akan menstimulasi produksi sitokin dan aktivasi reseptor sitokin : reseptor sitokin tipe I (untuk IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15) ; reseptor sitokin tipe II (untuk 1FN- $\alpha/\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-10); reseptor TNF (untuk TNF, CD4OL, Fas); reseptor superfamili immunoglobulin (IL-1, M-CSF). Laju infeksi demam tifoid sangat ditentukan oleh aktivitas aktivasi reseptor tersebut. Berbagai sitokin tersebut mengikuti sirkulasi sistemik, menginduksi produksi prostaglandin, memengaruhi stabilitas pusat termoregulasi berefek terhadap pengaturan suhu tubuh dan menyebabkan demam (Marleni, 2012).

Sitokin tersebut pula yang menimbulkan dampak pada pusat nafsu makan menyebabkan nafsu makan menurun, memengaruhi ambang nyeri, sehingga timbul nyeri pada kepala, sendi, otot-otot, dan nyeri pada daerah saluran cerna. Sitokin memengaruhi perubahan pada *plaque peyeri*, inflamasi pada mukosa saluran cerna, menyebabkan

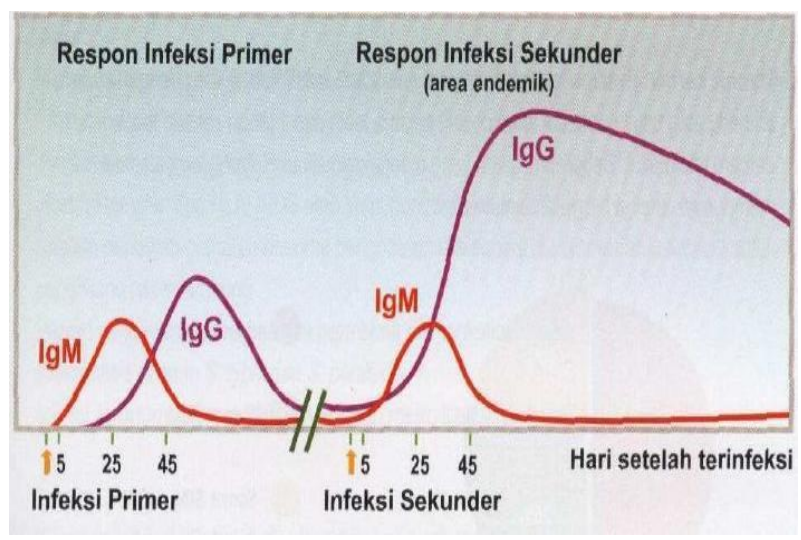


motilitas saluran cerna terganggu, sehingga muncul keluhan mual, muntah, diare, nyeri abdomen, perdarahan, perdarahan, perforasi, sedangkan konstipasi terjadi pada tahap lanjut. Kondisi patologis akibat infeksi merangsang hiperaktivitas RES dan menimbulkan pembengkakan hati dan limpa (Pastoor, 2007).

Pentingnya imunitas dalam penegakan diagnosis ditunjukkan dari kenaikan titer antibodi terhadap antigen *S. typhi*. Peran imunitas seluler yaitu dalam penyembuhan penyakit. Pada infeksi primer, respon humoral melalui sel limfosit B akan berdiferensiasi menjadi sel plasma yang akan merangsang terbentuknya immunoglobulin (Ig). Pada infeksi akut, yang pertama terbentuk antibodi O (IgM) yang muncul pada hari ke 3-4 demam, kemudian disusul antibodi pada infeksi kronik yaitu antibodi flagela H (IgG) (Sudoyo, 2009).



**Gambar 3. Patofisiologi demam tifoid (Marleni, 2012)**



**Gambar 4. Respon Imun terhadap bakteri (Marleni, 2012).**

### 2.1.5 Manifestasi klinis demam tifoid

Manifestasi klinis demam tifoid seringkali tidak khas dan sangat bervariasi dari gejala ringan seperti demam yang tidak terlalu tinggi, malaise dan batuk kering. sesuai dengan patogenesis demam tifoid sampai dengan bentuk klinis yang berat baik berupa gejala sistemik panas tinggi, gejala septik yang lain, ensefalopati atau timbul komplikasi gastrointestinal berupa perforasi usus atau perdarahan. Hal ini menyebabkan sulit untuk melakukan penegakan diagnosis berdasarkan gambaran klinisnya saja (Darmowandoyo, 2003; Tumbelaka, 2003).

Keluhan demam merupakan gejala klinis terpenting yang muncul pada semua penderita demam tifoid. Demam muncul secara tiba-tiba kemudian dalam 1-2 hari menjadi parah dengan tipe demam *step ladder temperature chart* yang ditandai dengan demam timbul kemudian naik secara bertahap tiap harinya dan mencapai titik tertinggi pada akhir minggu pertama, setelah itu demam akan bertahan tinggi dan pada minggu keempat demam akan turun perlahan. Bersamaan dengan munculnya gejala demam sering ditemukan pula keluhan gastrointestinal seperti muntah, mual, diare dan pada tahap lanjut terjadi konstipasi dan dapat muncul gambaran peritonitis akibat perforasi usus. Manifestasi gejala mental kadang-kadang mendominasi

gambaran klinis, seperti konfusi, stupor, psikotik atau koma. Gejala lain yang tidak spesifik seperti batuk, malaise, sakit kepala, menggigil sering muncul pada awal perjalanan penyakit (Pastoor, 2007).

Pada pemeriksaan fisik penderita tampak sakit sedang hingga berat. Apatis dan delirium terjadi pada 10-45%, bradikardi relatif 15-10% penderita, *rose spot* (bercak makulopapular) ukuran 1-6 mm dapat timbul pada dada dan abdomen (40-80%) dan dalam waktu relatif singkat (2-3 hari). Pada awal minggu kedua, dapat timbul hepatomegali. Pemeriksaan abdomen didapatkan nyeri lokal, terkadang disertai penurunan bising usus atau terjadi distensi abdomen (Choo,1999).

#### **2.1.6 Pemeriksaan penunjang diagnosis demam tifoid**

Menurut WHO (2003), seseorang dikatakan mengalami demam tifoid bila disertai demam ( $\geq 38^{\circ}\text{C}$ ) yang berlangsung selama tiga hari dengan konfirmasi laboratorium kultur *S. typhi* positif (darah, tulang sumsum, usus cairan). Seseorang mungkin mengalami demam tifoid bila disertai demam ( $\geq 38^{\circ}\text{C}$ ) selama tiga hari dengan serodiagnosis positif atau tes deteksi antigen *S. typhi* tetapi tanpa isolasi. Sedangkan seseorang dikatakan karier kronis bila terdapat *S. typhi* dalam feses selama lebih dari satu tahun setelah onset akut tifoid (WHO, 2003).

## 1. Pemeriksaan Darah Tepi

Anemia dapat ditemukan pada penderita demam tifoid, jumlah leukosit normal, bisa menurun atau meningkat, anemia sering terjadi adalah anemia normokrom normositik yang terjadi diakibatkan asupan yang terbatas karena terganggunya absorpsi, hambatan pembentukan darah di sum-sum tulang dan penghancuran sel darah merah.

Diduga akibat infeksi *S. typhi* terjadi perpindahan leukosit dari sirkulasi ke dinding pembuluh darah sehingga leukosit dalam sirkulasi berkurang sehingga penderita mengalami leukopenia (20-25%). Leukopenia dengan jumlah 3000-4000/mm<sup>3</sup> dapat ditemukan pada fase demam. Jumlah leukosit < 2000 /mm<sup>3</sup> merupakan tanda prognosis buruk (House, 2001).

Penelitian beberapa ilmuwan mendapatkan bahwa hitung jumlah dan jenis leukosit serta laju endap darah tidak mempunyai nilai sensitivitas, spesifisitas dan prediksi yang cukup tinggi untuk dipakai dalam membedakan antara penderita demam tifoid atau bukan, akan tetapi adanya leukopenia dan limfositosis relatif menjadi dugaan kuat diagnosis demam tifoid (Marleni 2012).

## 2. Biakan *Salmonella typhi*

Penegakan diagnosis pasti demam tifoid dapat ditegakkan bila ditemukan bakteri *S. typhi* terdapat pada biakan darah, urine, feses, sumsum tulang, cairan duodenum dan *rose spot* (Tumbelaka, 2003). Hasil biakan darah yang positif memastikan demam tifoid akan tetapi hasil negatif tidak menyingkirkan demam tifoid, Kegagalan untuk mengisolasi organisme dapat disebabkan oleh beberapa faktor :

(1) keterbatasan media laboratorium, (2) penggunaan antibiotik, (3) volume spesimen, jumlah yang dianjurkan 10-15 ml, atau (4) waktu pengumpulan, pasien dengan riwayat demam selama 7 sampai 10 hari menjadi lebih mungkin memiliki kultur darah positif (Tumbelaka, 2003; WHO, 2003).

Aspirasi sum-sum tulang adalah *gold standard* untuk diagnosis demam tifoid karena bakteri dalam sumsum tulang ini lebih sedikit dipengaruhi oleh antibiotika daripada dalam darah. Namun prosedur yang digunakan sangat invasif dan tidak digunakan dalam praktek sehari-hari. Aspirasi duodenum juga telah terbukti sangat memuaskan sebagai tes diagnostik tetapi belum diterima secara luas karena toleransi yang kurang baik pada

aspirasi duodenum, terutama pada anak-anak (WHO, 2003).

### 3. Identifikasi kuman secara molekuler

Metode serologi lainnya adalah identifikasi bakteri *S. typhi* dengan mendeteksi DNA (asam nukleat) gen flagelin bakteri *S. typhi* dalam darah dengan teknik hibridisasi asam nukleat atau amplifikasi DNA dengan cara *polymerase chain reaction* (PCR) melalui identifikasi antigen Vi yang spesifik untuk *S. typhi*. Penelitian oleh Haque, dkk (1999) mendapatkan spesifisitas PCR sebesar 100% dengan sensitivitas yang 10 kali lebih baik daripada penelitian sebelumnya dimana mampu mendeteksi 1-5 bakteri/mL darah. Penelitian lain oleh Massi dkk (2003) mendapatkan sensitivitas sebesar 63% bila dibandingkan dengan kultur darah (13.7%) dan pemeriksaanWidal (35.6%) (Massi et al., 2003).

Kelemahan yang sering dihadapi pada penggunaan metode PCR adalah risiko kontaminasi yang menyebabkan hasil positif palsu yang terjadi bila prosedur teknis tidak dilakukan secara teliti dan adanya bahan-bahan dalam spesimen yang bisa menghambat proses PCR (hemoglobin dan heparin dalam spesimen darah serta bilirubin dan garam empedu dalam spesimen feses), biaya mahal dan prosedur

rumit. Usaha untuk melacak DNA dari spesimen klinis masih belum memberikan hasil yang memuaskan sehingga saat ini penggunaannya masih terbatas dalam laboratorium penelitian (Bourbeau, 2001).

### **2.1.7 Pengobatan**

Obat-obat anti mikroba yang sering digunakan untuk demam tifoid adalah klomfenikol, tiamfenikol, kotrimosazol, ampisilin, amoksisilin, sefalosporin generasi ke-tiga, golongan fluorokuinolon dan Azitromisin. Kloramfenikol adalah yang paling sering digunakan (Widodo, 2009)

Kloramfenikol bekerja dengan menghambat sintesis protein kuman. Obat ini terikat pada ribosom dan menghambat enzim peptidiltransferase sehingga ikatan peptide tidak terbentuk pada proses sintesis protein kuman. Setelah pemberian oral, kloramfenikol bisa diserap dengan cepat. Kadar puncak dalam darah bisa tercapai dalam waktu 2 jam. Didalam hati, kloramfenikol mengalami konjugasi dengan asam glukoronat oleh enzim glukoronil transferase. Oleh karena itu, pemakaian dalam jangka waktu panjang bisa menyebabkan gangguan faal hati (Setiabudy, 2007).

Ampisilin bekerja dengan menghambat sintesis dinding sel sementara golongan fluorokuinolon bekerja dengan menghambat sintesis asam nukleat.



## 2.2 Respon Imun terhadap *Salmonella typhi*

Bakteri *Salmonella typhi* merupakan bakteri intraseluler dan cirri khas dari bakteri intraseluler adalah kemampuannya untuk hidup bahkan berkembang biak dalam fagosit. Mikroba tersebut mendapat tempat tersembunyi yang tidak dapat ditemukan oleh antibody dalam sirkulasi sehingga untuk eliminasinya memerlukan mekanisme immune selular (Baratawidjaja, 2006). Bakteri *Salmonella enteric* adalah bakteri gram negatif yang bisa menginvasi secara luas dan menyebabkan infeksi kronik dan akut. Hal ini karena kemampuannya bereplikasi dan bertahan dari fagosit sel epitelial sel, sel dendritik dan makrofag pada system immune (Gunn, et al., 2014).

Spesies *Salmonella*, khususnya *Salmonella enteric serovar typhi* bisa persisten/menetap di dalam tubuh hingga bertahun-tahun dan mengalami reaktivasi kembali. Setelah menginvasi sel M intestinal pada plak peyer. *Salmonella* bisa difagositosis oleh makrofag dan menuju ke limfonodus mesenterika, limpa, sumsum tulang dan kandung empedu dimana mereka bisa menetap disana (Humayoon Shafiq Satti, 2013). Bakteri yang persisten bisa melepaskan diri dari surveillans imun dan beresiko terhadap komplikasi.

Pada saat infeksi *Salmonella* terjadi , sitokin proinflamasi interleukin (IL-1 $\beta$  dan interleukin6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  disintesis dan terjadi inflamasi sitemik. IFN- $\gamma$  juga dikenal sebagai *macrophage activating factor* (MAF) berperan penting dalam infeksi persisten yang

dipengaruhi oleh durasi aktivasi makrofag juga sangat penting terhadap resisten host terhadap infeksi. Sekresi IFN- $\gamma$  tergantung pada IL-18.

Setelah sitokin diekskresi maka aktivasi Th1 dan Th2 dimulai. Aktivasi klasik bakteri atau IFN- $\gamma$  akan mengantarkan perubahan profil sekresi sel melalui produksi organik nitrat seperti *nitric oxide* (NO). Keberadaan *Salmonella* pada sel menyebabkan sekresi sitokin dan reaksi inflamasi atau program kematian sel melalui apoptosis. Sinyal dari sitokin yang diinjeksi oleh interaksi sel host dan bakteri adalah hal yang krusial dalam perkembangan *Salmonellosis*. Keseimbangan antara sitokin proinflamasi dan anti inflamasi akan mengontrol pencegahan kerusakan host karena inflamasi yang berlebihan (Hurley, et al., 2014)

Makrofag merupakan hal yang esensial untuk mekanisme pertahanan melawan berbagai infeksi. Beberapa jenis sitokin yang mempengaruhi fungsi makrofag. IFN- $\gamma$  diproduksi oleh antigen spesifik sel T helper yang mengaktivasi makrofag. Aktivasi ini merupakan hal yang penting dalam melawan pathogen intraseluler yang bisa survive dalam makrofag. Fungsi makrofag bisa terhalang oleh IL-4, IL-10 dan TGF- $\beta$ . Secara khusus, IL-10 adalah sitokin anti inflamasi yang bisa menghambat produksi *reactive oxygen intermediate* dan aktivasi makrofag. Makrofag adalah sumber utama produksi IL-10. Beberapa bakteri pathogen intraseluler termasuk *Salmonella* menjadikan makrofag sebagai target infeksi sehingga IL-

10 berperan penting dalam adaptasi bakteri pathogen intraseluler untuk survive dalam makrofag dan mencegah pertahanan host dengan deaktivasi makrofag (Uchiya, et al., 2004).

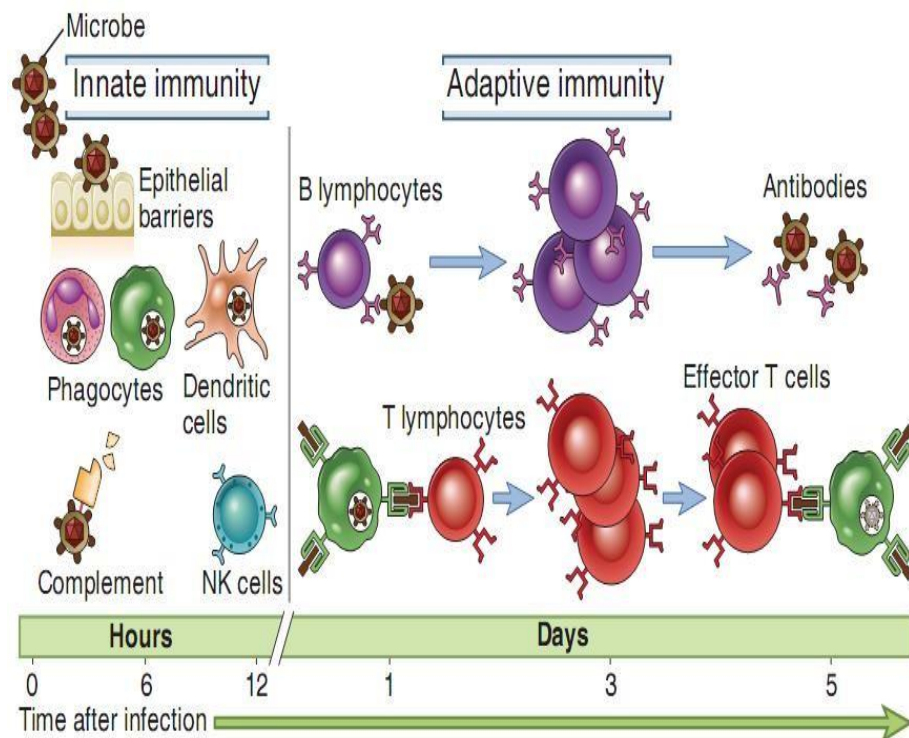
### **2.3 Tinjauan tentang Sistem Imun**

Imunitas didefinisikan sebagai pertahanan terhadap penyakit, terutama penyakit infeksi. Kumpulan sel-sel, jaringan dan molekul-molekul yang berperan dalam pertahanan infeksi disebut sistem imun, sedangkan reaksi terkoordinasi sel-sel dan molekul tersebut dalam pertahanann terhadap infeksi, disebut sebagai respon imun. Immunologi adalah ilmu yang mempelajari sistem imun, termasuk respon terhadap mikroba pathogen, dan kerusakan jaringan serta peranannya pada penyakit (Abbas, Lichtman, and Pillai 2014).

Fungsi fisiologi system imun yang paling penting adalah mencegah serta membasmi penyakit. Pentingnya system imun dalam kesehatan secara dramatis digambarkan melalui pengamatan yang sering yang menunjukkan bahwa seseorang dengan kelainan respon imun akan rentan terhadap infeksi berat dan seringkali mengancam nyawa. Sebaliknya, merangsang respon imun terhadap mikroba melalui vaksinasi adalah metode paling efektif untuk melindungi seseorang dari infeksi ( Abbast, et al., 2014).

### 2.3.1 Imunitas Alami dan Adaptif

Mekanisme pertahanan inang terdiri dari imunitas alami, yang memberikan perlindungan segera terhadap infeksi, dan imunitas adaptif yang berkembang lebih lambat namun memberikan perlindungan yang lebih spesialisik terhadap infeksi (**Gambar 5**).



**Gambar 5.** Mekanisme imunitas bawaan dan imunitas adaptif (Abbas *et al.*, 2014). Mekanisme imunitas bawaan merupakan pertahanan awal melawan infeksi. Sedangkan respon imun adaptif timbul setelahnya dan dimediasi oleh limfosit dan produknya. Antibodi mengemblok infeksi dan mengeliminasi mikroba, eradikasi mikroba ekstrasel dilakukan oleh sel T. Kinetika respon imun bawaan dan adaptif berbeda tergantung dari jenis infeksi.

Imunitas alami (natural immunity dan native immunity) selalu ada pada individu-individu sehat, dan disiapkan untuk menghambat masuknya mikroba dan untuk mengeliminasi mikroba yang berhasil memasuki jaringan inang (host) secara cepat. Imunitas adaptif (disebut juga imunitas spesifik atau imunitas dapatan) memerlukan ekspansi dan diferensiasi limfosit sebagai respon terhadap mikroba sebelum memberikan pertahanan yang efektif. Imunitas ini beradaptasi terhadap adanya infeksi mikroba.

Pertahanan lini pertama pada imunitas alami dilakukan oleh barrier epitel kulit dan mukosa serta oleh sel dan antibiotik alami yang berada di epitel, yang semuanya berfungsi untuk menghambat masuknya mikroba. Bila mikroba menghancurkan epitel dan memasuki jaringan atau sirkulasi, mereka diserang oleh fagosit, limfosit spesifik yang disebut sel limfoid alami misalnya sel Natural Killer (NK), dan beberapa protein plasma, termasuk protein dari sistem komplemen.

Keseluruhan mekanisme imunitas alami ini secara spesifik mengenali dan bereaksi terhadap mikroba. Selain memberikan pertahanan awal terhadap infeksi, respon imun alami meningkatkan respon imun adaptif terhadap agen-agen infeksius.

Sistem imun adaptif terdiri atas limfosit dan produk-produknya, misalnya antibodi. Respon imun adaptif terutama penting terhadap pertahanan mikroba infeksius yang bersifat patogenik terhadap manusia (yaitu dapat menyebabkan penyakit) dan mampu melawan imunitas alami. Sementara mekanisme imunitas alami mengenali struktur-struktur yang sama-sama dimiliki oleh berbagai kelas mikroba, sel-sel imunitas adaptif (limfosit), mengekspresikan reseptor yang secara spesifik mengenali berbagai molekul yang diproduksi oleh mikroba serta molekul-molekul non infeksius.

Setiap bahan yang secara spesifik dapat dikenali oleh limfosit dan antibody disebut antigen. Respon imun adaptif seringkali menggunakan sel-sel serta molekul dari sistem imun alami untuk mengeliminasi mikroba, dan fungsi imunitas adaptif untuk memperkuat mekanisme antimikroba imunitas alami.

Dua tipe reaksi utama terhadap sistem imun alami adalah inflamasi dan pertahanan anti virus. Inflamasi terdiri dari akumulasi dan aktivasi leukosit dan protein plasma pada lokasi infeksi atau kerusakan jaringan. Sel-sel dan protein tersebut bertindak bersama untuk membunuh terutama mikroba ekstraseluler dan eliminasi jaringan yang rusak. Pertahanan imun alami terhadap virus intraseluler diperantarai oleh sel *Natural Killers (NK)* yang membunuh sel

yang terinfeksi virus dan oleh sitokin yang disebut interferon tipe 1 yang menghambat replikasi virus di dalam sel inang.

Sistem imun alami memberi respon yang sama terhadap pertemuan kembali dengan sebuah mikroba, sedangkan sistem imun adaptif berespons lebih efisien pada tiap pertemuan kembali dengan suatu mikroba. Dengan kata lain sistem imun alami tidak mengingat pertemuan pertama dengan mikroba dan akan kembali ke dasar setelah setiap pertemuan, sehingga memori merupakan gambaran utama pada sistem imun adaptif.

Sistem imun adaptif menggunakan strategi berikut untuk memerangi sebagian besar mikroba :

- Antibodi yang disekresi akan mengikat mikroba ekstraseluler, menghambat kemampuan mereka untuk menginfeksi sel inang dan merangsang penelanan serta penghancuran oleh fagosit.
- Fagosit menelan mikroba dan membunuh mereka, dan sel T helper memperkuat kemampuan mikrobisidal fagosit.
- Sel T helper mengarahkan leukosit untuk menghancurkan mikroba dan meningkatkan fungsi pertahanan epitel untuk mencegah masuknya mikroba.
- Limfosit T sitotoksik membunuh sel yang terinfeksi mikroba.

Respon imun adaptif berkembang dalam tahapan-tahapan, yang masing-masing sesuai dengan reaksi tertentu limfosit (Abbas., et al. 2014).

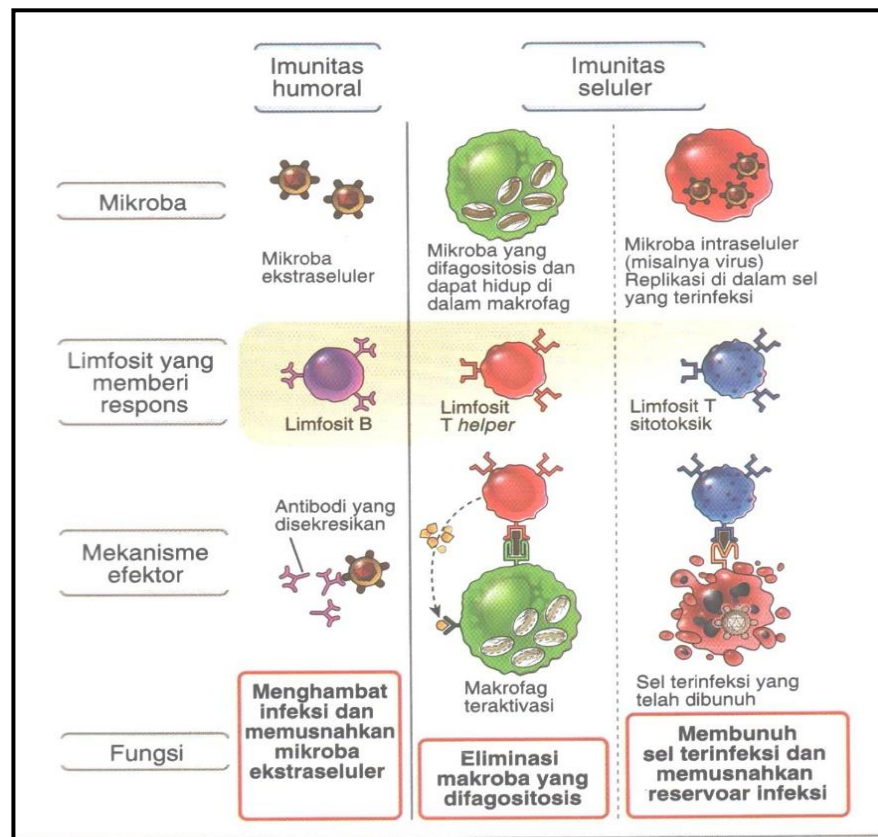
### **2.3.2 Imunitas Humoral dan Imunitas Seluler**

Dua jenis imunitas adaptif yaitu imunitas humoral dan imunitas seluler, diperantarai oleh sel-sel dan molekul yang berbeda dan masing-masing dirancang untuk memberikan pertahanan terhadap mikroba ekstra dan intra seluler (Gambar)

#### **1. Imunitas Humoral**

Imunitas humoral diperantarai oleh protein yang dinamakan antibodi, yang diproduksi oleh sel-sel yang disebut limfosit B. Antibodi masuk ke dalam sirkulasi dan cairan mukosa, lalu menetralsir dan mengeliminasi mikroba serta toksin mikroba yang berada diluar sel-sel inang, dalam darah, cairan ekstraseluler yang berasal dari plasma dan di dalam lumen dari organ-organ mukosa, seperti traktus gastrointestinalis dan traktus respiratorius (**Gambar 6**).





**Gambar 6. Imunitas humoral dan seluler (Abbas *et al.* 2014)**

Salah satu fungsi terpenting antibody adalah menghentikan mikroba yang berada pada permukaan mukosa dan dalam darah agar tidak mendapatkan akses menuju sel-sel inang dan tidak membentuk koloni di dalam sel serta jaringan ikat inang. Melalui cara ini, antibody mencegah infeksi berkembang. Antibodi tidak dapat mencapai mikroba yang hidup dan membelah di dalam sel yang terinfeksi.

## 2. Imunitas Seluler

Pertahanan terhadap mikroba intraseluler tersebut dinamakan imunitas seluler karena prosesnya diperantarai oleh sel-sel yang disebut sel limfosit T. Beberapa limfosit T mengaktifasi fagosit untuk menghancurkan mikroba yang telah dimakan oleh sel fagosit ke dalam fagosit intraseluler. Limfosit T lainnya membunuh berbagai jenis sel inang yang terinfeksi mikroba infeksius di dalam sitoplasmanya. Dalam kedua kasus tersebut, sel T mengenali antigen yang ditampilkan pada permukaan sel, yang menunjukkan adanya mikroba di dalam sel tersebut.

Terdapat beberapa perbedaan penting antara sel B dan sel T. Sebagian besar sel T hanya mengenali antigen protein saja, sedangkan sel B dan antibody mampu mengenali berbagai jenis molekul, yaitu protein, karbohidrat, asam nukleat dan lemak.

Imunitas pada seseorang dapat diinduksi oleh infeksi atau vaksinasi (imunitas aktif) atau diberikan pada seseorang melalui transfer antibody atau limfosit dari seseorang yang terimunisasi aktif (imunitas pasif) (Abbas AK, Lichtman AH, 2014; Abbas, et al.. 2014).

### 2.3.3 Pengenalan Mikroba oleh Imunitas Alami

Kemampuan patogen memasuki tubuh manusia (untuk mencari kehidupan) dan kemampuan tubuh manusia untuk mendeteksi kedatangannya (sebagai musuh manusia) adalah bentuk keadilan Tuhan terhadap semua makhluknya (manusia dan patogen sama-sama makhluk Tuhan). Pada patogen telah ada penanda dalam bentuk molekul yang akan dikenal oleh pertahanan manusia (sistem imunitas *innate*) sehingga kedatangan musuh ini dapat diantisipasi manusia dan makhluk Tuhan lainnya. Karakteristik molekul penanda pada patogen yaitu :

#### 1. *Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs)*

Penanda ini hanya ada pada mikroba yang membahayakan manusia, tidak ada pada sel manusia (mamalia). PAMPs ini berbeda-beda tergantung jenis patogen (virus, bakteri gram negative, bakteri gram positif, dan jamur), tetapi satu jenis PAMPs dapat ditemukan pada jenis patogen yang berbeda (**Tabel 2**). Penanda ini hanya ada pada mikroba patogen sehingga menjadi pembeda yang membuat imunitas alami hanya berespon terhadap mikroba patogen dan tidak terhadap sel sendiri.

Penanda-penanda itu adalah molekul-molekul yang sangat vital untuk kehidupan patogen bersangkutan

sehingga sepanjang zaman tidak bisa berubah (mutasi) misalnya *double-stranded* RNA pada virus, LPS (lipopolisakarida) pada bakteri gram negative, *lipoteichoic acid* pada bakteri gram positif. Kecepatan evolusi pada mikroba lebih cepat dari manusia sehingga mutasi lebih gampang terjadi pada mikroba. Akan tetapi telah diciptakan PAMPs yang tidak dapat bermutasi sejak imunitas innate berkembang, PAMPs tidak berubah sampai sekarang.

## 2. *Damaged-Associated Molecular Patterns (DAMPs)*

Imunitas innate dapat mengenal molekul endogenous yang diproduksi atau dilepas oleh sel yang rusak atau mati. Kematian atau kerusakan sel dapat terjadi akibat infeksi atau sebab lain seperti racun kimia, trauma, terbakar, atau iskemia/hipoksia (steril injury).

Ada dua perangkat pada imunitas innate untuk mengenal PAMPs atau DAMPs yaitu :

### a. *Pattern Recognition Receptors (PRRs)*

Beragam-tipe reseptor seluler yang dapat mengikat PAMPs dan DAMPs berada pada berbagai sel yang berperan dalam imunitas innate seperti fagosit (makrofag, neutrophil, dan sel dendritik) dan sel epitel yang membatasi tubuh dengan dunia luar.

Patogen yang berbeda dapat memiliki PAMPs yang sama sehingga spesifisitas imunitas innate tidak spesifik terhadap antigen patogen tertentu seperti imunitas adaptif, tetapi spesifik PAMPs. Oleh karena itu mikroba yang berbeda tetapi memiliki PAMPs yang sama dapat dikenal oleh reseptor yang sama seperti terlihat pada **Tabel 2**.

**Tabel 2. Cell-associated PRRs pada imunitas innate**

| PRRs   | Lokasi  | Contoh                                      | PAMP / DAMP ligands  |
|--|---|---|--|
| <b><i>Toll-like receptors (TLRs)</i></b>     | Membran plasma dan membrane endosomal sel dendritic, fagosit, sel B, sel endotel, dll | TLR 1-9                                     | LPS, peptidoglikan, produk sel rusak   |
| <b><i>NOD-like receptors (NLRs)</i></b>      | Sitoplasma fagosit, sel epitel dan sel lain   | NOD1/2<br>NLRP <i>family (inflammasome)</i> | Flagelin, LPS, Kristal urat, produk sel rusak  |
| <b><i>RIG-like receptors (RLRs)</i></b>      | Sitoplasma fagosit dan sel lain   | RIG-1, MDA-5                                | RNA virus  |
| <b><i>C-type lectin like receptors</i></b>   | Membrane plasma fagosit   | Reseptor mannose Dektin                     | Karbohidrat pada permukaan mikroba dengan terminal mannose dan fructose, Glukan pada dinding sel jamur |
| <b><i>Scavenger receptor</i></b>             | Membran plasma fagosit  | CD36  | <i>Microbial diacylglycerides</i>  |
| <b><i>N-formyl met-leu-phe receptors</i></b> | Membran plasma fagosit  | FPR dan FPRL 1                              | Peptida mengandung residu N-formylmethionyl  |

NOD, *nucleotide oligomerization domain-containing protein*; RIG-1, *retinoic acid-inducible gene 1*; MDA-5, *melanoma differentiation-associated gene 5*

b. *Soluble Recognition Molecules* (SRMs)

Berbagai protein dalam darah dan cairan ekstraseluler yang dapat mengenal PAMPs. Protein-protein ini berperan memfasilitasi pembersihan mikroba dari darah atau cairan ekstraseluler dengan cara meningkatkan penangkapan mikroba oleh sel-sel imunitas innate dan mengaktifkan pembunuhan kuman ekstraseluler (**Tabel 3**).

**Tabel 3. SRMs pada Imunitas Innate**

| SRMs                      | Lokasi  | Contoh                              | PAMP ligands   |
|---------------------------|---------|-------------------------------------|--|
| <i>Pentraxins</i>         | Plasma  | <i>C-reactive protein</i>           | <i>Microbial phosphorylcholine</i> dan <i>phosphatidylethanolamine</i>                                 |
| <i>Collectins</i>         | Plasma  | <i>Mannose-binding lectin</i>       | Karbohidrat pada permukaan mikroba dengan terminal mannose dan fructose.                               |
|                           | Alveoli | Surfactant proteins (SP-A dan SP-B) | Berbagai struktur mikroba  |
| <i>Ficolins</i>           | Plasma  | <i>Ficolin</i>                      | <i>N-Acetylglucosamine</i> dan <i>lipoteichoic acid</i> yang ada pada dinding sel bakteri gram positif |
| <i>Complement</i>         | Plasma  | C3                                  | Permukaan mikroba misalnya LPS   |
| <i>Natural antibodies</i> | Plasma  | IgM                                 | <i>Phosphorylcholine</i> pada membrane bakteri dan membrane sel apoptotic                              |

#### 2.3.4 Stimulasi Respon Imunitas Alami Melawan Mikroba

Jika mikroba hinggap dikulit maka ia akan terlempar oleh aliran udara dan keringat dipermukaan kulit, atau dibunuh oleh peptide antimikroba (misal  $\beta$  defensin) yang ada pada kulit. Jika mikroba ingin masuk melalui saluran napas maka mikroba akan dihalangi oleh bulu hidung. Kalau berhasil masuk lebih dalam, akan bertemu musin yang akan membungkusnya, kemudian dikirim keluar melalui “escalator” silia epitel saluran napas, atau bertemu dengan antibakteri  $\beta$ -defensin dan cathelicidins yang akan membunuhnya. Kalau berhasil masuk lebih dalam lagi sampai alveolus, sudah menunggu makrofag alveolar yang akan menelannya. Demikian adalah contoh simulasi “pergulatan” mikroba sebagai penyerang dengan sistem pertahanan imunitas alami manusia.

Kerusakan fisik epitel (misalnya luka) akan mempermudah mikroba masuk melewatinya, sesampainya di jaringan di bawah epitel (subepitelial) telah ditunggu oleh sel dendritic dermal, makrofag dan sel mast yang berjaga. Mikroba dikenal kedatangannya karena memiliki penanda PAMPs yang segera akan berikatan dengan reseptor (misalnya TLR) dari ketiga jenis penjaga subepitelial. Pada saat reseptor-reseptor itu menangkap ligannya (PAMPs) maka muncullah sinyal aktivasi yang akan mengaktifkan ketiga sel



imunitas innate ini. Ketiga jenis sel tersebut kemudian melepas sejumlah sitokin proinflamasi seperti IL-1 (oleh sel dendritic dan makrofag), TNF $\alpha$  (oleh sel dendritic dan makrofag) dan histamine (oleh sel mast), untuk memicu respon inflamasi di jaringan subepitelial yang didatangi mikroba itu.

Sitokin TNF $\alpha$  dan IL-1 yang dilepas oleh makrofag bersama dengan histamine dan TNF $\alpha$  dari sel mast menuju ke endotel pembuluh darah untuk memicu peran endotel menghentikan neutrophil yang lewat. Endotel berespon dengan mengeluarkan molekul adhesi ke permukaannya (selektin dan ligan integrin) untuk menahan neutrophil. Selanjutnya neutrophil difasilitasi oleh endotel melalui peningkatan permeabilitas kapiler untuk keluar dari aliran darah menuju ke jaringan yang ada mikroba.

Mikroba yang lolos masuk ke jaringan dan ditangkap oleh fagosit (makrofag, neutrophil, dan sel dendritic) akan difagositosis sehingga mikroba berada dalam vakuol yang disebut fagosom (endosom). Fagosom ini segera menyatu dengan lisosom yang didalamnya ada enzim lisozim membentuk fagolisosom, maka bertemulah mikroba dengan enzim pencerna protein ini sehingga mikroba dicerna dan hancur. Memang ada mikroba yang tidak mempan oleh lisozim, karena dinding selnya terdiri atas lemak (misal

mikobakterium), tetapi fagosit masih punya senjata penghancur lain berupa radikal bebas yaitu *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan *Nitrite Oxyde* (NO).

Sel dendritik yang menangkap mikroba dan menghancurkannya dalam fagolisosom, terutama bertugas memperkenalkan sejumlah antigen yang ada pada mikroba yang sudah dihancurkan itu, ke sel T naif yang menunggu (menjaga) dilimfonodus. Untuk itu sel dendritic memajang antigen-antigen itu di permukaannya, menggunakan molekul *major histocompatibility complex* (MHC) dan dibawa ke limfonodus terdekat lewat aliran limfe untuk dipresentasikan kepada sel T naif (peran sebagai *Antigen Presenting Cell*, APC). Proses ini akan memulai respon imunitas adaptif (*Cell Mediated Immunity*, CMI).

Sebagian dari kuman atau bahan kuman sudah hancur akan hanyut terbawa aliran limfe menuju limfonodus. Disana sudah menunggu sel B naif dan sel dendritic folikular yang akan menangkapnya. Jika sel B naif sudah mengenal kehadiran antigen maka mulailah respon imunitas adaptif (imunitas humoral).

## 2.4 Tinjauan tentang *Toll Like Receptor* (TLR)

### a. Sejarah dan definisi

Penamaan *Toll-like receptors* (TLRs) berasal dari kemiripan struktur dan fungsi pada reseptor trans-membran yang ditemukan pada lalat *Drosophila melano-gaster*. Dinamai *Toll*, yang dalam bahasa Jerman berarti “fantastis” atau “aneh”. Analisis rangkaian gen memperlihatkan adanya *encoded* protein transmembran dengan domain intrasitoplasmik baru yang mirip dengan reseptor interleukin- 1 (IL-1) pada tikus. Selain mengatur perkembangan tahap embrionik, bentuk mutan *Toll* juga mengganggu pertahanan antijamur dari lalat. Selanjutnya diketahui bahwa defek pada jalur *Toll* menyebabkan gangguan respons imun terhadap penyebab infeksi lainnya. Janeway dkk. pada tahun 1997, menemukan homolog reseptor *Toll* *Drosophila* pada manusia. Saat ini dikenal sebagai TLR4, yang terdiri atas domain intra-sitoplasmik *Toll-like receptors/ IL-1 receptors*, namun domain ekstraselular imunoglobulin (Ig) mirip dengan reseptor IL-1. Terlihat kemiripan struktur pada reseptor lalat, yang terdiri atas *leucine -rich repeats*. Kemiripan ini menunjukkan suatu metode lama reseptor pengenalan yang dipertahankan melalui evolusi dan digunakan oleh manusia dan serangga. Saat TLR pertama kali ditemukan untuk mengenal *pathogen-associated molecular patterns*, TLR merupakan reseptor terpenting dalam pengenalan pola mikroorganisme pada sistem imunitas alami (Petry V, et al., 2006, Kang S, et al., 2006).

TLR merupakan reseptor transmembran yang dikodekan oleh *germline* dengan karakteristik berupa *leucin-rich domain* (LRR) ekstraselular dan domain intraseluler atau sitoplasmik yang homolog dengan *interleukin-1 receptor* (TIR) (Albiger B., et al, 2007, Carpenter S., et al, 2007, Zoste M., et al, 2011). LRR ditemukan pada sejumlah protein dan terlibat dalam pengenalan ligan dan trans-duksi sinyal. Domain LRR dipisahkan dari region transmembran oleh domain LRR *carboxy-terminal*. Domain TIR dibutuhkan untuk *intracellular signaling*. TLR diekspresikan oleh berbagai sel misalnya makrofag dan sel dendritik (Carpenter S, et al., 2007). TLR berfungsi sebagai *pathogen recognition receptors* (PRRs), mengenali *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) yang unik pada mikroba dan penting dalam pertahanan diri mikroba. Ligasi PAMPs pada TLR akan menginduksi sel imun dan mengaktifkan sejumlah jalur dalam imunitas alami yaitu inflamasi, koagulasi dan kematian sel (Elson G, et al., 2006). Pengenalan PAMPs ini menyebabkan sistem imunitas alami mampu membedakan antara bahan *self* dan *non-self* (Valins W, et al., 2010)

## b. Klasifikasi TLR

Sebagian besar spesies mamalia diperkirakan memiliki 10 hingga 15 tipe TLR. Tiga belas TLR ditemukan pada manusia dan tikus (Emertcan A., et al, 2011, Elson G., et al, 2006). Tabel 2 memperlihatkan 11 TLR yang telah diketahui, dengan ligan dan spesiesnya.

**Tabel 4. Klasifikasi TLR, ligan, dan spesies yang dikenali (Emertcan A, et al., 2011).**

| TLR <i>subfamily</i> | Ligan                        | Spesies                       |
|----------------------|------------------------------|-------------------------------|
| TLR1 + TLR2          | <i>Triacyl lipopeptides</i>  | Bakteri                       |
| TLR2                 | Zymosan                      | Jamur                         |
| TLR3                 | dsDNA                        | Virus                         |
| TLR4                 | <i>Lipopolysaccharide</i>    | Bakteri negatif-Gram          |
| TLR5                 | Flagellin                    | Bakteri                       |
| TLR6+ TLR2           | <i>Diacyl lipopeptides</i>   | Mikoplasma                    |
| TLR7                 | ssRNA                        | Virus, pejamu                 |
| TLR8                 | ssRNA                        | Virus, pejamu                 |
| TLR9                 | DNA, hemozin                 | Bakteri, virus,<br>Plasmodium |
| TLR 10               | Tidak diketahui              | Bakteri                       |
| TLR11                | <i>Profilin-like protein</i> | Toksoplasma, bakteri          |

TLR mengenali dan merespons molekul mikroba yang berbeda, sehingga sistem imun alami dapat membedakan patogen dan menginduksi respons kaskade yang sesuai. Masing-

masing TLR mengenali berbagai pengulangan produk mikroba, contohnya pasangan ligan-reseptor seperti TLR4 dan lipopolisakarida (LPS), TLR5 dan flagelin, TLR1/TLR2/TLR6 dan lipoprotein, serta TLR3/TLR7/TLR8/TLR9 dan asam nukleat tertentu (Petry V, et al., 2006, Ehrentraut H, et al., 2011).

Sel imun yang mengekspresikan TLR antara lain monosit, makrofag, granulosit, sel natural killer, dan sel B, sel T. Sel non-imun juga mengekspresikan TLR misalnya keratinosit, fibroblast, dan sel epitel. TLR terutama ditemukan pada sel yang memulai respons imun primer, yaitu di permukaan sel, membran plasma sel, serta kompartemen intrasel, berupa retikulum endoplasmik dan endosom (Emertcan A, et al., 2011, Elson G, et al., 2006)

### **c. TLR pada epidemis, dermis dan subkutan**

Tiga populasi sel utama yaitu keratinosit, *antigen presenting cells* (APC), dan melanosit berperan dalam mengenali mikroba di epidermis. Dermis didominasi oleh fibroblast dan *dermal dendritic cells*. Ekspresi TLR setiap sel tersebut bervariasi. Keratinosit, mengekspresikan TLR1, TLR2, TLR3, dan TLR 5; sel Langerhans mengekspresikan TLR2 dengan kadar yang tinggi, TLR3, TLR4, TLR8; dengan kadar sedang dan TLR10; serta sedikit dari TLR1, TLR5, TLR6, TLR7 dan TLR9. Melanosit mengekspresikan TLR4 dan terlihat memberikan respons terhadap induksi matriks metalloproteinase yang berhubungan dengan ligan. Fibroblas manusia yang berasal dari kulit yang terkelupas terlihat

mengekspresikan TLR3 dan TLR4, tapi tidak mengekspresikan TLR2 dan TLR9 (Terhorst, et al., 2010; Valians W, et al., 2010; Sandor F, et al., 2005).

Sel lain yang mengekspresikan TLR misalnya monosit/makrofag, sel dentritik, sel limfosit B dan T, sel mast, sel endotel, dan jaringan adipose (Valians W, et al., 2010). Adapala dkk. melakukan penelitian pada tikus percobaan yang mengalami obesitas dan mendapatkan makanan tinggi lemak dibandingkan dengan tikus berat badan normal serta mendapatkan diet normal. Hasilnya ekspresi TLR2 dan TLR4 meningkat pada jaringan adiposa tikus yang obesitas (Adapala V, et al., 2011).

**Tabel 5. Ekspresi TLR pada berbagai sel**

|    | TLR1 | TLR2 | TLR3 | TLR4 | TLR5 | TLR6 | TLR7 | TLR8 | TLR9 | TLR10 | TLR11 |
|----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|
| KC | +    | +    | +    | +    | +    | +    | -    | -    | -    | +     | NK    |
| LC | +/-  | +    | +    | +    | +/-  |      | +/-  | +    | +/-  | +     | NK    |
| MC | NK   | NK   | NK   | +    | NK   | NK   | NK   | NK   | NK   | NK    | NK    |
| DC | +    | +    | -    | +    | +    | +    | -    | +    | +    | NK    | NK    |
| Fb | NK   | +    | +    | +    | +    | NK   | -    | -    | -    | NK    | NK    |

DC : *dendritic cell*; Fb : *fibroblast*; KC:*keratinocyte*;

LC :*Langerhans cell*; MC: *melanocyte*; NK: *not known*;

+: *normal expression*; -: *no expression*; +/-: *low expression*.

#### d. Spesifik ligan TLR

Pengenalan komponen dinding sel bakteri merupakan peran dari 5 jenis TLR yaitu TLR 1,2,4,5, dan 6, yang disebut juga sebagai TLR ekstraselular karena ekspresinya pada permukaan sel dan domain ekstra selular (Terhorst D, et al., 2010). TLR4 merupakan reseptor yang pertama kali ditemukan pada manusia (Albiger B, et al., 2007; Terhorst, et al., 2010) dan dapat mengenali lipopolisakarida bakteri negative Gram. TLR4 juga dapat mengenali protein yang dikode oleh virus pada traktus respiratorius, dan *self-protein* seperti protein *heat-shock* dan  $\beta$ -defensin. Selain itu, protein matriks yaitu fibronektin dan fibrinogen protein plasma juga dikenali melalui TLR4 (Albiger B, et al., 2007; Terhorst, et al., 2010).

TLR2 dapat mengenali banyak ligan, misalnya lipopeptida bakteri, zimosan jamur, protein parasit dan virus serta *lipoteichoic acid* (LTA) bakteri positif-Gram. TLR 2 dan TLR4 terdapat pada permukaan sel dan dapat mengenali bakteri (Liadaki K, et al., 2011). Banyaknya pengenalan ligan ini terjadi karena pembentukan heterodimer TLR2 dengan dua TLR lain, yakni TLR1 atau TLR6, yang dapat mendis-kriminasikan sedikit perubahan struktur ligan. Heterodimer TLR1/TLR2 dapat mengenali *triacylated lipoprotein*, sedangkan TLR2/TLR6 dapat mengenali *diacylated lipoprotein*. TLR5 dapat mendeteksi domain terbatas pada monomer flagelin, protein struktur utama yang



membentuk flagella pada bakteri negatif-Gram. Flagella merupakan organel penggerak yang berperan pada virulensi, kemo-taksis, adhesi dan invasi permukaan pejamu.

TLR9 mengenali asam nukleat yaitu hipometilasi CpG, yang umumnya terdapat pada DNA prokariotik dan tidak terdapat pada genom eukariotik. TLR9 juga diaktivasi oleh hemozoin, hem yang terdiri dari produk degradasi hemoglobin eritrosit yang terinfeksi oleh parasit malaria. TLR3, TLR7, dan TLR8 dapat mengenali asam nukleat misalnya TLR9, tapi lebih baik dalam pengenalan RNA *single-stranded* (ss) dan *double-stranded* (ds) dibandingkan DNA (Albiger B, et al., 2007; Petry V, et al., 2006).

#### **e. Penandaan TLR**

Jalur penandaan TLR terdiri atas, jalur yang tergantung pada *myeloid differentiation factor 88* (MyD88) yang umum terhadap semua TLR, dan jalur yang tidak tergantung pada *myeloid differentiation factor 88* (MyD88) yang selektif terhadap TLR3 dan TLR4 (Albiger B, et al., 2007; Terhorst, et al., 2010). Jalur yang tergantung pada *myeloid differentiation factor 88* (MyD88) akan menginduksi sitokin inflamasi atau TRIF (*Toll-IL-1R domain containing adaptor-inducing interferon  $\beta$* ) yang akan menginduksi produksi interferon tipe 1 yang juga merupakan sitokin inflamasi (Emertcan A, et al., 2011). TLR 3 dan TLR 4 akan mengaktifkan jalur yang tidak bergantung pada MyD88, yang akan menyebabkan produksi IFN- $\beta$  (McIntruff J, et al., 2005). Aktivasi

MyD88 memulai kaskade penandaan, yang menyebabkan aktivasi berkesinambungan kinasi dan translokasi faktor transkripsi sentral dari *nuclear factor* (NF)- $\kappa$ B dan *interferon regulatory factor* (IRF)-3. Akhirnya MyD88 berhubungan dengan *toll/interleukin* (IL)-1 *receptor* (TIR) *adaptor-containing adapter protein* terhadap kompleks yang akan menarik *IL-1 receptor-associated kinase* dan *tumor necrosing factor* (TRAF)-6, yang selanjutnya akan mengaktivasi kompleks I $\kappa$ B Kinase (IKK) (Albiger B., et al, 2007; Terhorst, et al., 2010).

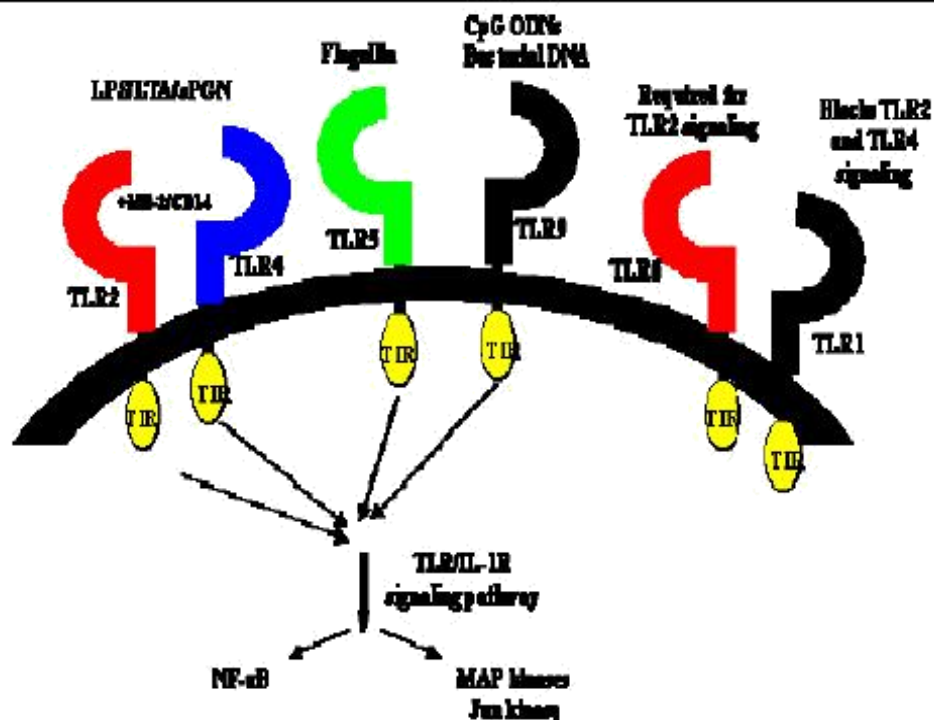
Pada penandaan MyD88, molekul adaptor TIR *domain-containing adaptor-inducing interferon* (IFN)- $\beta$  (TRIF) ditarik ke bagian intrasel TLR3 secara langsung atau ke TLR4 melalui *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM), yang selanjutnya menyebabkan aktivasi *tank-binding kinase 1* (TBK-1) dan TRAF-6. Keduanya merupakan tempat terjadinya induksi respons imun yang didominasi oleh (NF)- $\kappa$ B atau respons imun yang didominasi oleh IRF-3 dengan pola aktivasi IFN tipe 1 (Albiger B, et al., 2007; Terhorst., et al, 2010).

#### **f. Konsekuensi aktivasi TLR**

Aktivasi ligan TLR akan mengaktifasi fagositosis patogen dan respons inflamasi terhadap kandungan fagosom. Beberapa TLR, yaitu TLR2 dan TLR4, mampu membantu penempatan fagosom, yang merupakan kontak paling dini sistem imun terhadap antigen mikroba yang berpotensi merusak. Karakteristik terpenting aktivasi TLR adalah terbentuknya kondisi proinflamasi yang disajikan oleh sitokin dan kemokin tertentu, didominasi oleh TNF $\alpha$  dan IL-12 pada (NF)- $\kappa$ B dan IFN  $\alpha/\beta$  pada IRF-3 penanda ligan TLR (Terhorst, et al., 2010).

#### **g. Pengenalan TLR terhadap bakteri**

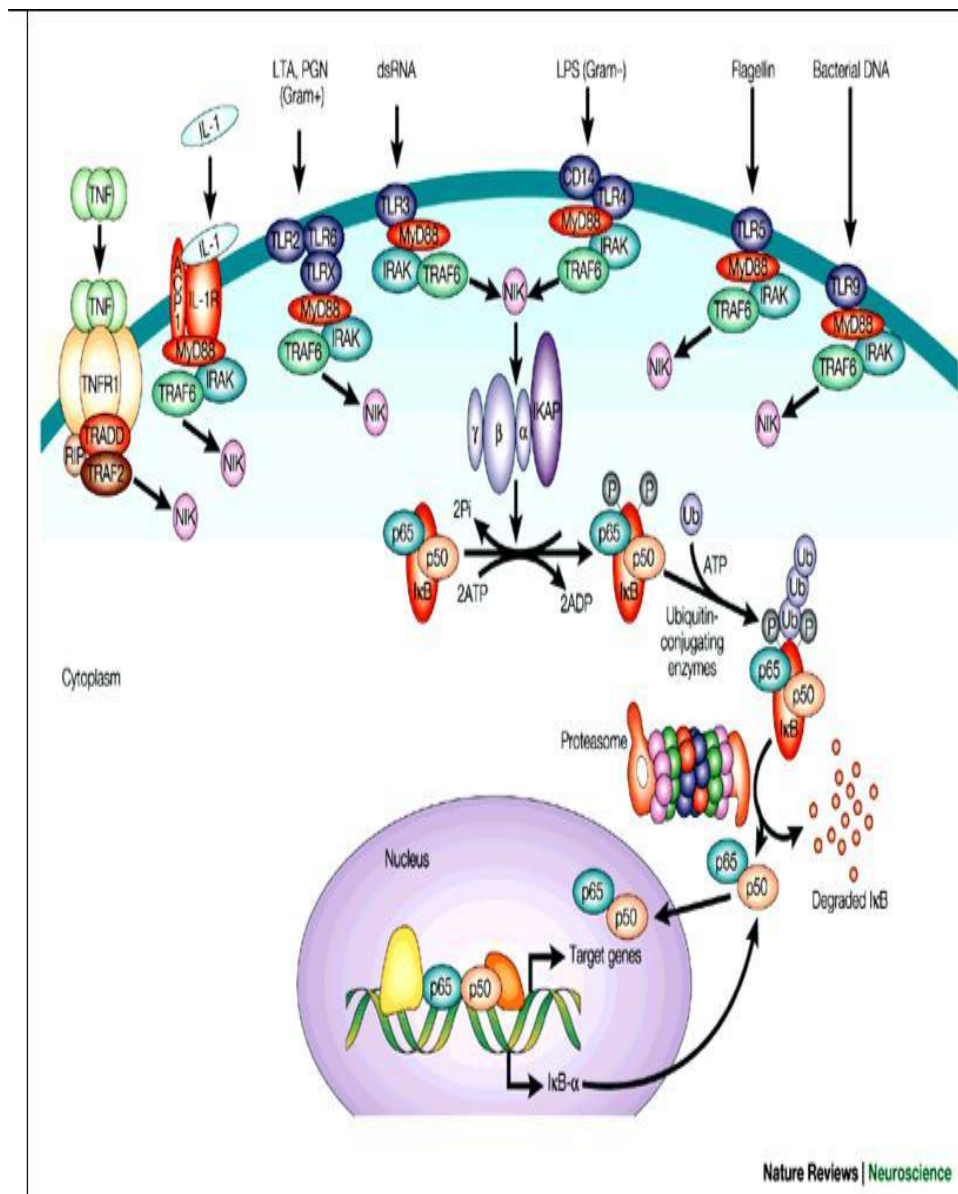
Pemahaman tentang peranan reseptor dan protein tambahan yang terlibat dalam imunitas terhadap bakteri merupakan hal penting terhadap intervensi pengobatan infeksi bakteri. Identifikasi TLR merupakan langkah maju memahami mikroorganisme, terutama bakteri. Ekspresi TLR berbeda tergantung atas tipe sel. Fungsi TLR yang telah diketahui berupa pengenalan PAMPs eksogen dan ligan endogen, dengan tambahan protein intraseluler yang termasuk dalam kelompok *nucleotide-binding oligo-merization domain* (NOD) serta diidentifikasi sebagai PRR untuk produk degradasi peptidoglikan (Elson G, et al., 2006). Berikut adalah gambar pengenalan TLR terhadap bakteri (**Gambar. 7**)



Gambar 7. Pengenalan TLR terhadap bakteri (Netea G, et al., 2004)

Keterangan :

Komponen mikroba yang telah dikenali dan terikat pada CD14, TLR melalui MD-2, TIR/IL-1R akan mengaktifkan NF-κB MAP kinases melalui Jun kinases. TLR2 mengenali mikroba melalui lipopeptida, TLR1, TLR6 bekerjasama dengan TLR2 untuk membedakan *triacyl* dan *diacyl* lipopeptida. TLR4 merupakan reseptor terhadap LPS, mannan. TLR9 spesifik pada pengenalan CpG DNA. TLR3 untuk pengenalan dsRNA virus, sedangkan TLR7 dan TLR8 dikhususkan pada pengenalan flagela.



**Gambar 8. Signal-transduction pathways melalui NFκB (Dang Minh Nguyen, et al., 2002)**

Keterangan :

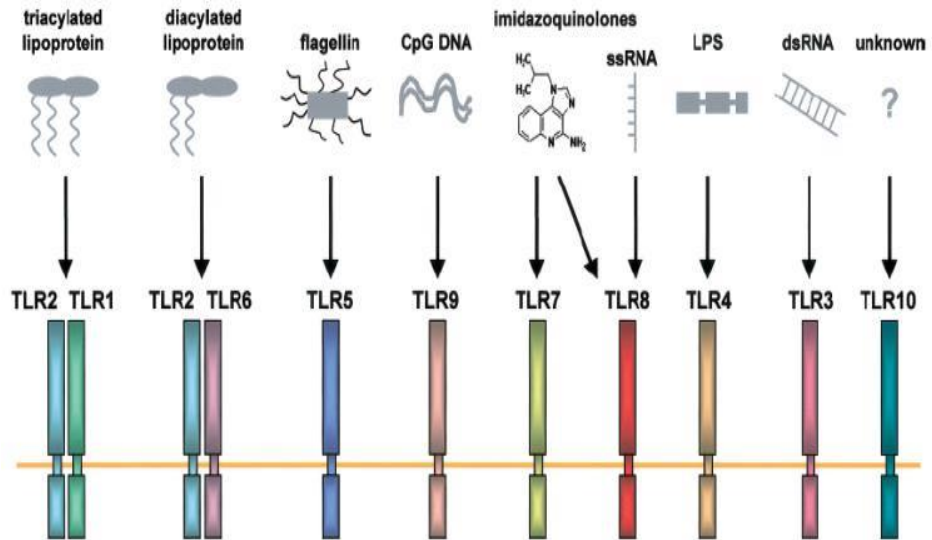
Komponen mikroba dikenali dan diikat reseptor CD14, TLR yang mengaktifkan MyD88, TRAF6, IRAK, faktor transkripsi seperti NF-κB yang translokasi dalam inti sel dan mempengaruhi ekspresi gen

Selama pengenalan dari struktur mikroba, signal TLRs akan menyebabkan perlekatan ligan pada permukaan sel yang menimbulkan reaksi cytoplasmic signaling molecules, dimana pertama kali adalah protein adapter MyD88 (Myeloid differentiation factor 88) dan mengaktifasi molekul signaling seperti IRAK (IL-1 receptor associated kinase) dan TRAF6 (TNF receptor associated factor). Kinase yang disebut sebagai reseptor IL-1 dihubungkan dengan kinase (IRAK) termasuk dalam signaling kompleks ini. IRAK menyebabkan terjadinya autophosphorilasi, aktivasi signal molekul yang lain seperti reseptor TNF- $\alpha$  (TNF-R). Gen yang diekspresikan dalam respons oleh TLR penting dalam menimbulkan komponen yang berbeda-beda dalam respons imun innate, disini termasuk sitokin inflamatori (TNF, IL-1, IL-8 dan IL-12), endothelial adhesion molecules (E -selection), dan protein yang berperan dalam mekanisme pembunuhan mikroba (termasuk iNOS). Gen yang secara khusus diekspresikan tergantung tipe sel. Faktor transkripsi, seperti AP-1 (Activating Protein-1) melalui jun kinase dan NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor  $\kappa$ B) yang diaktivasi dan ditranslokasi di nukleus, akan menstimulasi produksi sitokin dan aktivitas fagositosis (**Gambar 8**) (Abbas AK, et al., 2000; Akira Shizuo, 2000).

Bakteri negatif-Gram dapat dikenali dan mengaktifkan RPR TLR4, sedangkan bakteri positif-Gram dikenali dan mengaktifkan

TLR2. TLR2 membentuk heterodimer dengan TLR1 dan TLR6. Terdapat perbedaan jalur pengaktifan sinyal TLR oleh MyD88 (bersama MAL) dan *TRIF adapter protein* (bersamaan dengan TRAM). Aktivasi TLR4 menyebabkan penarikan MyD88 dan TRIF, tetapi pengaktifan TLR2 hanya menyebabkan penarikan MyD88. Aktivasi TLR4 menyebabkan koinduksi *nitric oxide synthesis* (NOSII) dan TNF- $\alpha$ , sedangkan aktivasi TLR2 hanya mengaktifkan TNF- $\alpha$ . NOSII dan TNF- $\alpha$  merupakan gen kunci pada imunitas alami dan inflamasi (Paul-Clark M, et al., 2006).

TLR4 menjadi mediator respons *host* terhadap *lipopolysaccharide* (LPS) bakteri negative Gram. TLR2 menjadi mediator respons terhadap peptidoglikan bakteri gram-positif. Heterodimer TLR2/1 selanjutnya akan menjadi mediator respons terhadap lipoprotein *tri-acylated* dan heterodimer TLR2/6 merupakan mediator terhadap lipoprotein *di-acylated*. Tidak semua TLR menjadi respons alami terhadap komponen dinding sel bakteri. Contohnya adalah TLR9 yang memediasi respons terhadap *unmethylated* CpG DNA yang terdapat pada genom bakteri sedangkan TLR5 menjadi mediator respons *host* terhadap flagellin bakteri (**Gambar 9**) (McIntruff J, et al., 2005).



**Gambar 9.** TLR secara spesifik mengenali *pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)* dan/atau komponen sintesis (McIntruff J, et al., 2005)

Keterangan:

Terdapat 10 TLR yang diekspresikan pada manusia dan berbagai ligan terhadap mikroba yang dikenalnya yaitu:

- TLR2 dan TLR1 mengenali *triacylated protein* bakteri.
- TLR2 dan TLR6 mengenali *diacylated protein* bakteri.
- TLR5 mengenali flagellin bakteri.
- TLR7 mengenali ssRNA virus.
- TLR8 mengenali ssRNA virus.
- TLR9 mengenali CpGDNA virus.
- TLR10 belum diketahui.

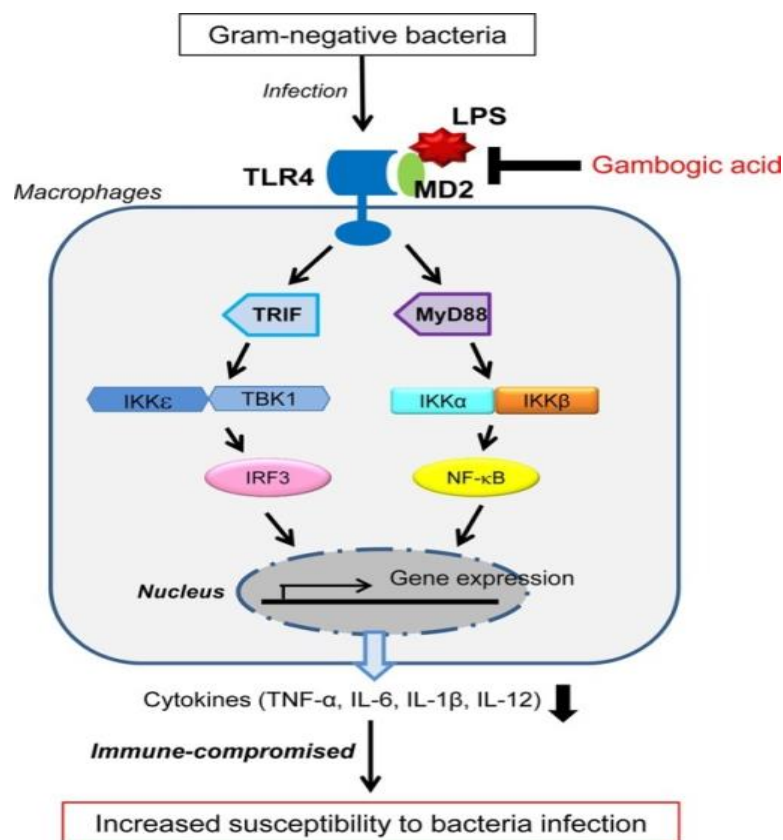
#### **h. Toll Like Receptor 4 (TLR4)**

Gen TLR4 berperan dalam mengaktifasi respon imun non spesifik. Gen TLR4 mentranskripsi protein yang berfungsi sebagai reseptor permukaan sel fagosit. Protein reseptor ini mampu mengenali lipopolisakarida (LPS) dari bakteri gram negatif,



termasuk *Salmonella*, dengan demikian gen TLR4 ini dapat diaktivasi oleh LPS. (Emertcan, *et al.*, 2011; Animura, *et al.*, 2008; Akira dan Takeda, 2004; Palsson dan O'Neill, 2004; Akashi, *et al.*, 2001). Mekanisme kerja TLR4 terlihat pada **Gambar 10**.

Pada manusia dan tikus, telah dibuktikan bahwa terjadinya mutasi pada gen TLR4, berdampak terhadap penurunan kemampuan individu dalam mengenali LPS dari bakteri *Salmonella sp.* Individu tersebut menjadi peka dan mudah terinfeksi *Salmonella* (Lorenz, *et al.*, 2002). Adanya mutasi menyebabkan gen TLR4 membentuk beberapa genotipe.

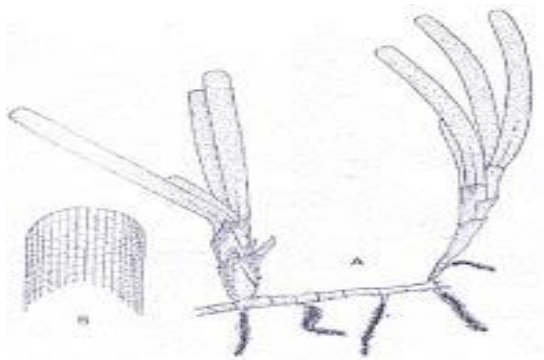


**Gambar 10. Mekanisme kerja TLR4 terhadap infeksi bakteri gram negatif**

## 2.5 Tinjauan Umum tentang Lamun *Thalassia hemprichii*

### 2.5.1 Morfologi dan klasifikasi

*Thalassia hemprichii* merupakan salah satu jenis lamun yang tumbuh di perairan tropik dan penyebarannya cukup luas (Thomascik, et. Al., 1997). Menurut Kiswara (1992) lamun jenis ini sangat umum dan banyak ditemukan di daerah rataan terumbu, baik yang tumbuh sendiri-sendiri (monospesifik) maupun yang tumbuh bersama-sama dengan lamun jenis lain atau tumbuhan lain (mixed vegetasi). Fortes (1993 dalam Latuconsina, 2002) mengatakan bahwa *Thalassia hemprichii* mempunyai rimpang (rhizoma) yang berwarna coklat atau hitam dengan ketebalan 1 – 4 mm dan panjang 3 – 6 cm. Setiap nodus ditumbuhi oleh satu akar dimana akar dikelilingi oleh rambut kecil yang padat. Setiap tegakan mempunyai 2 – 5 helaian daun dengan apeks daun yang membulat, panjang 6 – 30 cm dan lebar 5 – 10 mm (**Gambar 11 dan 12**).



**Gambar 11.** *Thalassia hemprichii*

Sebaran kedalam relatif sempit, dari daerah eulitoral sampai kedalaman 4 – 5 m, walaupun juga ditemukan pada kedalaman 30 m. sering merupakan spesies yang melimpah di daerah intertidal rata-rata terumbu karang yang menerima hempanan energi yang tinggi dengan substrat pasir dan pecahan-pecahan karang yang kasar (Thomascik, et al., 1997). Philips dan Menez (1988) dalam Latuconsina (2002) mengemukakan bahwa pada prinsipnya jenis ini didapatkan di daerah sub tidal dari pasang rendah sampai kedalaman 5 m. juga dapat tumbuh di daerah intertidal sampai pinggiran mangrove.

Berikut klasifikasi *Thalassia hemprichii* menurut Den Hartog (1970); Philips dan Menez (1988 dalam Latuconsina 2002) :

Divisio : Anthophyta  
Kelas : Monocotyledonia  
Ordo : Helobiae  
Famili : Hydrocaritaceae  
Sub Famili : Vallisnerioideae  
Genus : Thalassia  
Spesies : *Thalassia hemprichii*



**Gambar 12. Lamun *Thalassia hemprichii***

Dalam Hertanto (2008) disebutkan beberapa parameter lingkungan yang mempengaruhi hidup lamun yaitu kecerahan untuk intensitas cahaya dalam melaksanakan fotosintesis, kisaran temperatur yang optimum bagi spesies lamun adalah 28-30 C, salinitas optimum adalah 35%, substrat dengan tipe lumpur sampai sedimen dasar yang terdiri dari endapan lumpur halus sebesar 40%, dengan kecepatan arus sekitar 0,5 m/detik<sup>-1</sup>.

### **2.5.2 Senyawa metabolit**

Metabolit sekunder adalah senyawa hasil metabolisme sekunder yang tidak dibutuhkan bagi pertumbuhan organisme akan tetapi dibutuhkan bagi kelangsungan hidupnya yaitu senyawa yang digunakan

untuk menangkal serangan predator dan untuk bertahan terhadap lingkungannya Metabolit ini dihasilkan dalam jumlah yang kecil (bisa mencapai ng/g atau  $10^{-9}$  g/g bahan), dan dalam kondisi tertentu (*stressing*), serta tidak diproduksi secara universal tetapi hanya pada spesies atau *strain* spesifik (Wink 1999 dalam Sudibyo 2002). Fungsi metabolit ini bagi organisme penghasil belum secara jelas diketahui, namun diduga senyawa tersebut dibutuhkan untuk mempertahankan kelangsungan hidupnya (toksin, antifungal, antibakteri, antibodi, dll) serta dibutuhkan untuk pengaturan proses reproduksi, sporulasi dan metabolisme sekunder lainnya (seperti vitamin, hormon, pigmen, dll) (Quenner *and* Day 1986, Dewick 1999 dalam Sudibyo 2002). Beberapa senyawa metabolit sekunder :

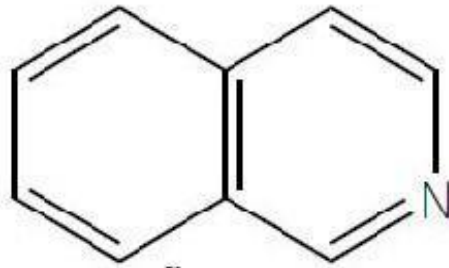
#### A. Alkaloid

Alkaloid merupakan golongan zat tumbuhan sekunder yang terbesar. Umumnya alkaloid mencakup senyawa bersifat basa yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen, biasanya dalam gabungan sebagai bagian dari sistem siklik. Alkaloid biasanya tanpa warna tetapi beberapa senyawa yang kompleks aromatik berwarna (contoh berberin berwarna kuning dan betanin berwarna merah). kebanyakan berbentuk kristal tetapi hanya sedikit yang berupa cairan (misalnya nikotina) pada suhu kamar (Harborne 1987).

Beberapa contoh senyawa alkaloid yang telah umum dikenal menurut Putra (2007) dalam Permatasari (2011) dalam bidang farmakologi diantaranya adalah nikotin (stimulan pada saraf otonom), morfin (analgesik), kodein (analgesik dan obat batuk), kokain (analgesik), piperin (*antifeedant*), quinine (obat malaria), vinkristin (obat kanker), ergotamine (analgesik untuk migrain), reserpin (pengobatan simptomatis disfungsi ereksi), mitraginin (analgesik dan antitusif), serta vinblastin (antineoplastik dan obat kanker).

Sifat fisik dari alkaloid kebanyakan alkaloid yang telah diisolasi berupa padatan kristal dengan titik lebur tertentu atau mempunyai kisaran dekomposisi. Sifat kimia alkaloid adalah basa. Kebiasaan alkaloid menyebabkan senyawa tersebut sangat mudah mengalami dekomposisi, terutama oleh panas dan sinar dengan adanya oksigen. Hasil dari reaksi ini sering berupa N-oksida. Dekomposisi alkaloid selama atau setelah isolasi dapat menimbulkan berbagai persoalan jika penyimpanan berlangsung dalam waktu yang lama. Pembentukan garam dengan senyawa organik (tartarat, sitrat) atau anorganik (asam hidroklorida atau sulfat) sering mencegah dekomposisi. Oleh karena itu dalam perdagangan alkaloid lazim berada dalam bentuk

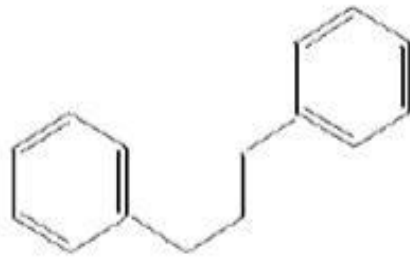
garamnya (Nadjeb 2006). Berikut contoh struktur alkaloid isoquinolin (**Gambar 13**).



**Gambar 13. Struktur Dasar Alkaloid Isoquinolin**

#### B. Flavonoid

Flavonoid terutama senyawa yang larut dalam air dan dapat diekstraksi dengan etanol 70%. Flavonoid berupa senyawa fenol, karena itu warnanya berubah bila ditambahkan basa atau ammonia sehingga mudah dideteksi pada kromatogram atau dalam larutan. Senyawa ini mengandung sistem aromatik yang terkonjugasi dan daerah itu menunjukkan pita serapan kuat pada daerah spektrum ultra violet (V) dan spectrum tampak. Terbentuknya warna merah, kuning atau jingga di lapisan amil alkohol pada uji fitokimia menunjukkan adanya flavonoid (Harbone 1987). Berikut struktur dasar dari flavonoid (**Gambar 14**)



**Gambar 14. Struktur Dasar Senyawa Flavonoid**

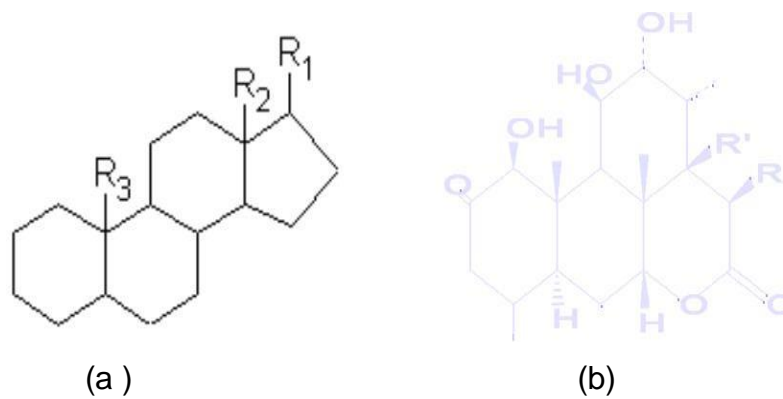
Flavonoid memiliki banyak kegunaan baik bagi tumbuhan maupun manusia. Flavonoid digunakan tumbuhan sebagai penarik serangga dan binatang lain untuk membantu proses penyerbukan dan penyebaran biji. Sedangkan bagi manusia, dalam dosis kecil flavon bekerja sebagai stimulan pada jantung, dan flavon yang terhidroksilasi bekerja sebagai diuretik dan sebagai antioksidan pada lemak (Sirait 2007).

### C. Triterpenoid/Steroid

Sterol dan triterpena memiliki kerangka dasar sistem cincin siklopentana perhidrofenantrena. Tiga senyawa yang disebut fitosterol mungkin terdapat pada setiap tumbuhan tingkat tinggi yaitu sitosterol, stigmasterol, dan kampesterol yang terdapat dalam tumbuhan tingkat rendah, contohnya ergosterol yang terdapat dalam khamir dan sejumlah fungi. Sterol lain terutama terdapat dalam tumbuhan tingkat rendah kadang-kadang terdapat juga dalam tumbuhan tingkat



tinggi misalnya fukosterol, yaitu steroid utama pada alga coklat dan juga terdeteksi pada kelapa (Harborne 1987). Kedua senyawa ini strukturnya ditampilkan dalam gambar berikut (**Gambar 15**)

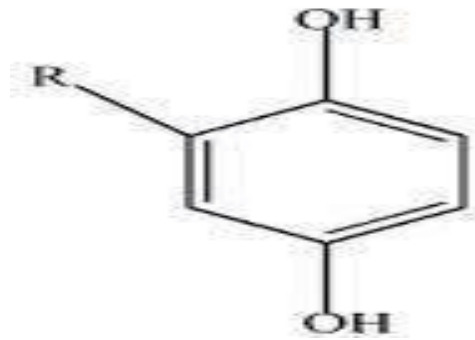


**Gambar 15. Contoh Struktur Dasar Senyawa Steroid dan Triterpenoid**

(a) Steroid, (b) Quassinoid triterpenoid

#### E. Fenol hidrokuinon

Komponen fenolat merupakan struktur aromatik yang berkaitan dengan satu atau lebih gugus hidroksil, beberapa mungkin digantikan dengan gugus metal atau glikosil. Komponen fenolat bersifat larut air selama komponen tersebut berikatan dengan gula membentuk glikosida, dan biasanya terdapat dalam vakuola sel. Berikut struktur dasar dari senyawa fenol hidrokuinon (**Gambar 16**).

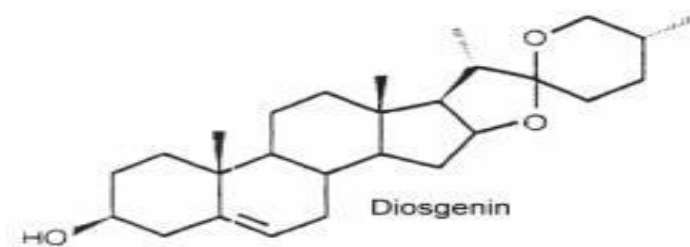


**Gambar 16. Struktur Dasar Senyawa Fenol Hidrokuinon**

Flavonoid merupakan kelompok yang terbesar diantara kompoen fenolat alami yang strukturnya telah diketahui, tetapi fenol monosiklik sederhana, fenilpropanoid dan fenolat quinon juga terdapat dalam jumlah besar. Pigmen quinon alami berada pada kisaran warna kuning muda atau hitam. Kuinon adalah senyawa berwarna mempunyai kromofor dasar seperti kromofor pada benzokuinon. Senyawa ini diidentifikasi menjadi 4 kelompok yaitu benzokuinon, naftokuinon, antrakuinon, dan kuinon isoprenoid. Tiga kelompok pertama biasanya terhidroksilasi dan bersifat senyawa fenol (Harborne, 1987). Sedangkan benzakuinon terdiri atas dua gugus karbonil yang berkonjugasi dengan dua ikatan rangkap karbon-karbon (Ketaren, 1986).

#### D. Saponin

Saponin merupakan senyawa aktif permukaan dan bersifat seperti sabun. Saponin dapat dideteksi berdasarkan kemampuannya membentuk busa dan menghemolisis sel darah. Dari segi ekonomi, saponin penting karena kadang-kadang menimbulkan keracunan pada ternak (**Gambar 17**) (Harborne, 1987).



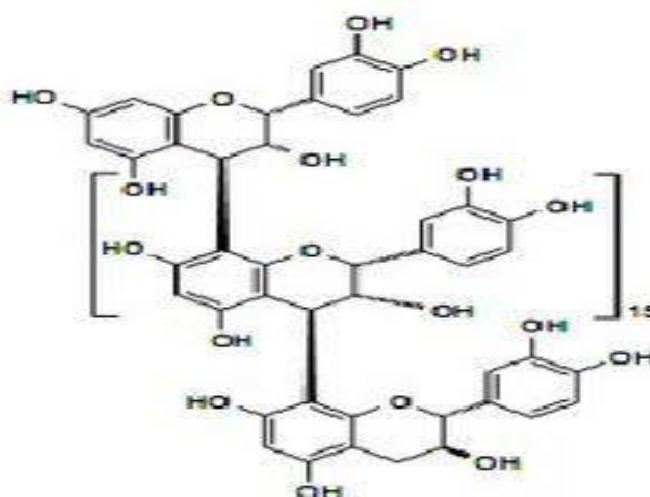
**Gambar 17. Contoh Struktur Senyawa Saponin**

Sebagian besar saponin bereaksi netral (larut dalam air), beberapa ada yang bereaksi asam (sukar larut dalam air), dan sebagian kecil ada yang bereaksi basa. Saponin dapat membentuk senyawa kompleks dengan kolesterol. Saponin bersifat toksik terhadap ikan dan binatang berdarah dingin lainnya. Hal inilah yang menyebabkan saponin banyak dimanfaatkan

sebagai racun ikan. Saponin yang beracun disebut sapotoksin (Sirait, 2007).

#### F. Tanin

Tanin adalah senyawa organik yang terdiri dari campuran senyawa polifenol kompleks, dibangun dari elemen C, H, dan O serta sering membentuk molekul besar dengan berat molekul lebih besar dari 2000. Tanin dapat dijumpai pada hampir semua jenis tumbuhan hijau di seluruh dunia baik tumbuhan tingkat tinggi maupun tingkat rendah dengankadar kualitas yang berbeda-beda (Shut 2002 dalam Putri 2011). Berikut merupakan contoh struktur golongan senyawa tanin (**Gambar 18**).



**Gambar 18. Struktur Sorghum Procyanidin Golongan Tanin**

Senyawa ini memiliki sifat antara lain dapat larut dalam air atau alkohol karena tanin banyak mengandung

fenol yang memiliki gugus OH, dapat mengikat logam berat, serta adanya zat yang bersifat antirayap dan jamur. Tanin yang terdapat pada kulit kayu dan kayu dapat berfungsi sebagai penghambat kerusakan akibat serangga dan jamur, karena memiliki sifat antiseptik (Shut, 2002 dalam Putri, 2011).

### **2.5.3 Kandungan senyawa bioaktif**

Lamun *Thalassia hemprichii* merupakan salah satu jenis tumbuhan perairan yang telah diketahui mengandung steroid/triterpenoid, flavonoid, saponin, dan tanin (Kusmardiyani dan Elfahmi, 2000). Seperti organisme perairan tropis lainnya, lamun memproduksi produk alam metabolit sekunder berupa antioksidan sehingga lamun ini sangat prospektif digunakan sebagai sumber obat-obatan dan sebagai makanan kesehatan yakni dapat mencegah munculnya berbagai penyakit degeneratif (Setyat, *et al.*, 2003).

*Thalassia hemprichii* yang dikoleksi dari Pamban, Tamil Madu, India diketahui mengandung senyawa bioaktif potensial sebagai antibakteri, antifungi, antiprotozoa, *antiviral*, *antifertility*, dan bahan obat-obatan yang berpengaruh pada sistem *cardiovascular* (Laksmi, *et al.*, 2006). Raja-Kannan, *et al.*, (2010) memaparkan *Thalassia*

*hemprichii* juga memiliki potensi bioaktif sebagai antioksidan dan mengandung senyawa golongan fenolik.

## **2.6 Metode Ekstraksi**

### **2.6.1 Tujuan Ekstraksi**

Tujuan ekstraksi adalah untuk menarik komponen kimia yang terdapat pada bahan alam baik pada tanaman, hewan maupun biota laut dengan pelarut organik tertentu. Proses ekstraksi ini berdasarkan pada kemampuan pelarut organik untuk menembus sel dan masuk rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut dalam pelarut organik dan karena adanya perbedaan konsentrasi di dalam dan luar sel, mengakibatkan terjadinya difusi pelarut organik yang mengandung zat aktif keluar sel. Proses ini berlangsung terus menerus sampai terjadi keseimbangan konsentrasi zat aktif di dalam dan di luar sel (Dirjen POM, 1986)

### **2.6.3 Jenis-jenis Metode Ekstraksi**

Jenis-jenis metode ekstraksi bahan alam yang sering digunakan adalah :

#### **a. Ekstraksi secara maserasi**

Maserasi dilakukan dengan cara memasukkan 10 bagian simplisia dengan derajat halus yang cocok ke dalam sebuah bejana, kemudian ditambahkan 75 bagian cairan penyari, ditutup dan dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya sambil diaduk sekali-kali, dicuci

ampasnya dengan penyari sampai diperoleh 100 bagian, penyarian diakhiri setelah hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) tidak memperlihatkan adanya noda, lalu dipindahkan ke bejana tertutup terlindung dari cahaya, dibiarkan selama 2 hari kemudian endapannya dipisahkan (Dirjen POM, 1995).

b. Ekstraksi secara soxhletasi

Ekstraksi dengan cara ini pada dasarnya adalah ekstraksi secara berkesinambungan, dimana cairan penyari dipanaskan hingga mendidih, uap penyari akan naik melalui pipa samping, kemudian diembunkan oleh pendingin tegak. Cairan penyari turun untuk menyari zat aktif dalam simplisia. Selanjutnya bila cairan penyari mencapai sifon, maka seluruh cairan penyari akan turun ke labu alas bulat dan terjadi pada sirkulasi. Demikian seterusnya sampai zat aktif yang terdapat dalam simplisia tersaring seluruhnya yang ditandai dengan jernihnya cairan yang lewat pada pipa sifon (Dirjen POM, 1995).

c. Ekstraksi secara perkolasi

Perkolasi dilakukan dengan cara membasahi simplisia dengan cairan penyari, dimasukkan ke dalam bejana tertutup sekurang-kurangnya 3 jam. Simplisia dipindahkan sedikit demi sedikit ke dalam bejana perkolator, kemudian dituangi cairan penyari, bejana perkolator ditutup dan

dibiarkan selama 24 jam, kemudian kran perkolator dibuka dengan kecepatan menetes 1 ml/menit, sampai diperoleh 100 bagian. Ekstrak yang diperoleh dipindahkan ke dalam bejana tertutup, dibiarkan selama 2 hari di tempat yang terlindung dari cahaya dan endapan yang terbentuk dipisahkan (Dirjen POM, 1995).

d. Ekstraksi secara refluks

Ekstraksi secara refluks pada dasarnya adalah ekstraksi berkesinambungan. Bahan yang akan diekstraksi direndam dalam cairan penyari dalam labu alas bulat yang dilengkapi dengan pendingin tegak, lalu sampel dan cairan penyari dipanasi sampai mendidih. Cairan penyari akan menguap, uap tersebut akan diembunkan oleh pendingin tegak dan akan turun kembali menyari zat aktif dalam simplisia tersebut. Demikian seterusnya sampai terjadi pencarian sempurna (Dirjen POM, 1995).

e. Ekstraksi secara penyulingan

Penyulingan dapat dipertahankan untuk menyari serbuk simplisia yang mengandung komponen kimia yang mempunyai titik didih yang lebih rendah pada tekanan udara normal, yang pada pemanasan biasa dapat terjadi kerusakan zat aktif. Untuk mencegah hal-hal tersebut maka penyarian dilakukan dengan cara penyulingan (Dirjen POM, 1995).



Metode ekstraksi yang dipilih dalam penelitian ini adalah metode maserasi, karena metode ini cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diusahakan, serta dapat menghindari kerusakan senyawa kimia yang terdapat dalam simplisia akibat pemanasan (Dirjen POM, 1986).

## **2.7 Metode Pemeriksaan Ekspresi mRNA Gen**

### **2.7.1 Ekspresi Asam Nukleat**

Volume sampel sekitar 100 µg/ul darah dimasukkan ke dalam 900 µl larutan "L6" yang terdiri dari 120g Guanidium thyocyanate (GuSCN) (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland, cat no. 50990) dalam 100 ml 0.1 M Tris HCl, pH 6.4, 22 ml 0.2 M Ethylen Diamine Tetra Acetat (EDTA) pH 8.0 dan 2.6g Triton X-100 (Packard, Instrumens) dengan konsentrasi akhir 50 mM Tris HCl, 5 M GuSCN, 20 mM EDTA, 0.1 % Triton X-100 Selanjutnya ditambahkan suspensi diatom 20 µl yang terdiri dari 50 ml H<sub>2</sub>O dan 500 µl dari 32 % (w/v) "Celite" ("diatom") (Jansen Chimica, Beerse, Belgium, 10.846.79). Dimana 20 µl suspensi diatom ini dapat mengikat 10 µg RNA darah, kemudian dilakukan *vortex* dan disentrifugasi di dalam tabung *ependorf* 1.5 ml dengan kecepatan 13.000 rpm selama 15 detik. Supernatan dibuang dan sedimen dicuci dengan larutan "L2" yang terdiri dari 120 g GuSCN dalam 100 ml 0.1 M Tris HCl, pH 6.4 yaitu dengan menambahkan 1 ml

larutan "L2". Selanjutnya dilakukan *vortex* dan disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 15 detik, kemudian pencucian diulangi sebanyak 2 kali dengan menggunakan larutan "L2", dilanjutkan dengan pencucian dengan 1 ml etanol 70% sebanyak 2 kali dan 1 ml aseton. Hasilnya kemudian dipanaskan dalam *waterbath* pada suhu 56°C selama 10 menit dan ditambahkan 60 µl larutan "TE" yang terdiri dari 1 mM EDTA dalam 10 mM Tris HCL pH 8.0, kemudian dilakukan *vortex* dan dilanjutkan sentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 2 menit, kemudian diinkubasi dalam *oven* selama 10 menit pada suhu 56°C. Kemudian dilakukan *vortex* dan sentrifugasi ulang selama 30 detik pada kecepatan 13.000 rpm dan diambil supernatannya. *Supernatan* dari proses ini akan diperoleh hasil ekstraksi nukleotida dan disimpan pada suhu -80°C sebelum dilakukan analisis PCR. (Mochammad Hatta. Henk L Smits. 2007 dan Rene B.et al.,1990)

**Ekspresi mRNA gen dengan metode *Real Time Polymerase Chain Reaction* (RT PCR).**

Proses pemeriksaan gen spesifik oligonukleotida primer untuk beta actin ( $\beta$  actin) sebagai primer forward : CAACTGTGCCCATCTACGA dan primer reverse : GTTTCATGGATGCCACAGGA sebagai "housekeeping gene" (internal control). Cara untuk mendeteksi gen mRNA HGMB1 dengan menggunakan primer spesifik forward

5"-GGAGGAGCAATAAGAAGAAGC-3" dan Reverse 5" CATCTTCCTCCTCTTCCTTC - 3". Protokol PCR, dilakukan penggandaan DNA dengan siklus 94°C selama 3 menit, siklus diulang 38 kali dengan 94°C (30 detik) dan reverse primer: CATCTTCCTCCTCTTCCTTC sesuai dengan protokol Zetterström CK. (Zetterström CK.et.al., 2006). Proses Real-time reverse transcription-PCR (QRT-PCR) menggunakan Green QRT-PCR master mix kit, satu tahap. Protokol ini dioptimalkan untuk instrumen Mx4000. Protokol disesuaikan menggunakan instrumen dengan mengubah pengenceran pewarna berdasarkan petunjuk manual dan mengikuti instrumen pabrik yang direkomendasikan untuk program siklus RT-PCR. Referensi pewarna pasif dimasukkan dalam tabung reaksi, diencerkan 1 : 500. Larutan yang mengandung pewarna dijauhkan dari cahaya. Kemudian mengencerkan 2 x SYBR @Green QRT-PCR master mix dan disimpan di atas es serta mengikuti pencairan awal master mix, bagian yang tidak digunakan disimpan pada 40° C dengan catatan, menghindari siklus beku-cair yang berulang. SYBR @Green adalah senyawa yang berfluorescent yang digunakan untuk mewarnai DNA yang mengandung bahan N',N'-dimethyl-N-[4-[(E)-(3-methyl-1,3-benzothiazol-2-ylidene) methyl]-1 phenylquinolin-1-ium-2-yl]-N-propylpropane-1,3-diamine (IUPAC). Tabung reaksi percobaan disiapkan dengan menambahkan

komponen-komponen berikut. Disiapkan campuran reagen dalam tabung reaksi menggunakan beberapa komponen seperti di bawah ini. Campuran reagen dengan mengambil volume akhir 25 µl (termasuk RNA percobaan) 12,5 µl dari 2 x SYBR Green QRT-PCR master mix ditambah x µl dari primer awal (konsentrasi dioptimalkan) ditambah lagi Nuklease – bebas PCR – tingkat H2 x µl primer akhir (konsentrasi dioptimalkan) dan juga 0,375 µl larutan pewarna referens dari tahap 1 (pilihan) serta 1,0 µl dari Reverse transcriptase (RT) yang membawa enzim modular polymerase dan ribonuclease H (RNase H) campuran enzim blok dengan 50 µl total volume reaksi juga dapat digunakan. Tabung reaksi dicampur secara perlahan agar tidak terbentuk gelembung (tidak dirotasi), kemudian distribusikan campuran ke tabung reaksi percobaan dengan menambahkan x µl RNA percobaan pada setiap tabung reaksi. Tabung reaksi dicampur secara perlahan agar tidak terbentuk gelembung (tidak dirotasi).

Kemudian tabung reaksi disentrifus dengan singkat dan reaksi ditempatkan dalam instrumen dan program PCR siap dijalankan dengan menggunakan mesin Realtime PCR seperti (**Gambar 19**) (CFX Connect system, Biorad Laboratories, Real Time PCR 96 well 0.1 ml, USA) (Zetterström CK, et.al., 2006).



**Gambar 19. Alat Real Time PCR**

PCR adalah suatu teknik yang melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus) dan pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda. Untai ganda DNA templat (unamplified DNA) dipisahkan dengan denaturasi termal dan kemudian didinginkan hingga mencapai suatu suhu tertentu untuk memberi waktu pada primer menempel (anneal primers) pada daerah tertentu dari target DNA. Polimerase DNA digunakan untuk memperpanjang primer (extend primers) dengan adanya dNTPs (dATP, dCTP, dGTP dan dTTP) dan buffer yang sesuai. Umumnya keadaan ini dilakukan antara 20 – 40 siklus. Target DNA yang diinginkan (short "target" product) akan meningkat secara eksponensial setelah siklus keempat dan DNA non-target (long product) akan meningkat secara linier seperti tampak pada bagan di atas (Newton and Graham, 1994).

### 2.7.2 Perhitungan Kurva kalibrasi dengan Ct (Cycle threshold)

Pengukuran kuantifikasi relatif ekspresi pada gen Human maka dibuat kalibrasi kurva dimana RNA  $\beta$ -actin, sebagai „housekeeping” enzim, digunakan sebagai control endogen. Kurva kalibrasi sebagai xy (scatter) dan plot mewakili log dari jumlah input (log ng mRNA total awal) sebagai sumbu x dan Ct sebagai sumbu y. Persamaan yang berasal dari garis kurva kalibrasi. Dua rumus untuk log gen dan beta actin adalah sebagai berikut: Konsentrasi ekspresi mRNA gen = - slope X log (ng mRNA sampel awal) + Ct (r= 0.998).

Contoh :

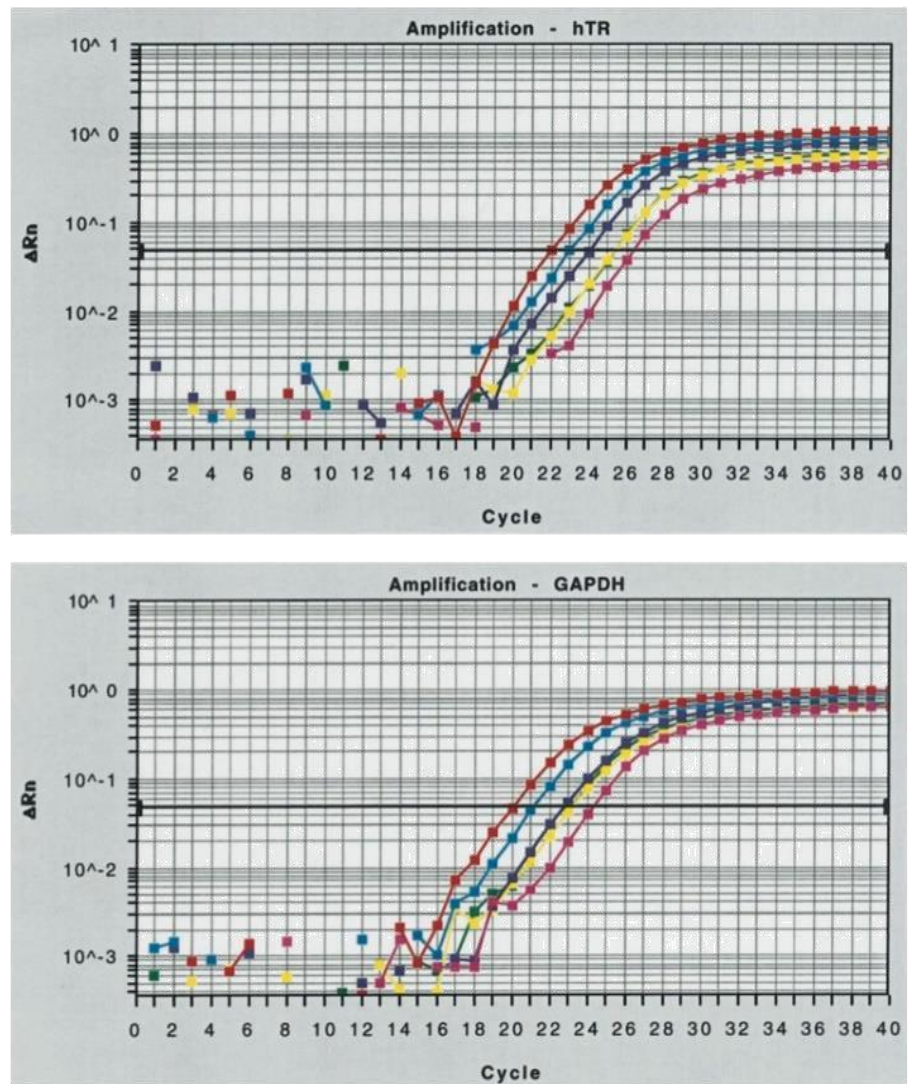
$$\text{Konsentrasi ekspresi mRNA gen} = -3.26x + 28.63 \text{ (r=0,999)}$$

$$\text{Konsentrasi ekspresi mRNA gen beta actin} = -3.19x + 26.46 \text{ (r= 0.997).}$$

Biasanya berat sampel awal sekitar 50 ng mRNA (= log50 = 1.698).

Bila nilai Ct sampel adalah dimasukkan kedalam rumus untuk gen HMGB 1 atau beta actin maka konsentrasi gen atau beta actin dapat dihitung. Untuk menormalkan perbedaan dalam jumlah total RNA ditambahkan ke setiap reaksi, beta actin adalah terpilih sebagai kontrol RNA endogen. Normalisasi konsentrasi gen, jumlah dengan sendirinya dapat digunakan untuk membandingkan jumlah relatif gen di

berbagai sampel, ditentukan dengan membagi konsentrasi mRNA gen oleh konsentrasi beta actin (Zetterström CK. et.al. 2006). Perhitungan kurva mRNA gen tersebut akan menghasilkan grafik amplifikasi mRNA gen dan beta actin (**Grafik. 1**)



**Grafik 1. Titik-titik amplifikasi *Real Time PCR* (Yajima, et al., 1998)**

Untuk membandingkan 2 sampel gen Setelah RT-PCR maka dilakukan kuantisasi amplifikasi gen dengan menentukan ambang siklus (Ct). Kuantisasi relatif ekspresi gen HMGB 1 dievaluasi

menggunakan metode perbandingan Ct. Nilai  $\Delta Ct$  ditentukan dengan cara mengurangkan target Ct masing-masing sampel dengan nilai Ct dari  $\beta$ -actinnya. Perhitungan  $\Delta\Delta Ct$  ialah nilai rata-rata  $\Delta Ct$  sampel ASC sebagai kalibrator dikurangi nilai rata-rata  $\Delta Ct$  sampel kelompok normal. Kelipatan perubahan dari ekspresi dari gen target yang setara dengan  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

RUMUS : Perbedaan kelipatan dalam membandingkan ekspresi gen 1 dengan ekspresi gen 2 =  $[2^{-\Delta\Delta Ct}]$

dan diketahui :

$\Delta\Delta Ct = \{ \text{rata-rata (triplicate) Ct } (\Delta Ct_1) \text{ sampel 1} \} - \{ \text{rata-rata (triplicate) Ct } (\Delta Ct_2) \text{ sampel 2} \}$  (Yajima et al,1998;Tang and Chen 2009).

### **Cara kerja *Enzyme linked Immunosorbent Assay* (ELISA) untuk menentukan kadar protein TLR4 pada serum**

Sampel serum penderita disiapkan bersama seluruh reagen sesuai dengan KIT yang digunakan yang diperlukan dalam suhu kamar sebelum digunakan. Setiap sampel dilakukan secara rangkap tiga untuk menjamin kebenaran atau validitas hasil ELISA. Kemudian diisi paknya semua reagen, dilusi standar dan sampel serum penderita. Buka mikroplate strip dan buat susunan dari sampel sesuai dengan jumlah sampel yang akan dimasukkan kedalam sumur. Tahap pertama dilakukan penambahan 100  $\mu\text{L}$  assay diluent yang berisi protein penyangga kedalam setiap sumur.



Selanjutnya ditambahkan 100  $\mu$ L cairan standar yang berisi recombinant human protein TLR4 dari KIT yang telah ditentukan atau dilusi sampel dari serum penderita kedalam setiap sumur. Selanjutnya dilakukan inkubasi selama 2 jam pada suhu kamar. Isap cairan disetiap sumur dan dicuci dengan cairan Phosphate Buffered Saline (PBS) steril. Proses pencucian ini dilakukan 4 kali secara berturut turut. Kemudian ditambahkan 200  $\mu$ L cairan „conjugate” yang berisi streptavidin „*horseradish peroxidase*” (HRP) kedalam setiap sumur dan tutup dengan penutup plastik dan inkubasi selama 2 jam pada suhu kamar. Cairan diisap dan selanjutnya dilakukan pencucian ulang sebanyak 4 kali dengan menggunakan cairan PBS steril. Proses berikutnya ditambahkan 200  $\mu$ L larutan substrat yang berisi cairan 3,3",5,5"-Tetramethylbenzidine (TMB) kedalam setiap sumur dan inkubasi selama 20 menit pada suhu kamar yang mana mikroplate disimpan pada keadaan gelap untuk menghindari cahaya. Setelah selesai diinkubasi reaksi dihentikan dengan menambahkan 50  $\mu$ L cairan larutan penghenti yang berisi H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kedalam setiap sumur dan dibaca dengan menggunakan ELISA Reader 270 (Biomerieux, Perancis) (**Gambar 20**) dengan panjang gelombang sebesar 450 nm dalam waktu 30 menit . Selanjutnya, dibaca konsentrasi protein gen HMGB 1 dengan satuan pg/ml (MybioSource, USA)



**Gambar 20. Mesin ELISA Microplate Reader**

## **2.8 Hubungan *Salmonella typhi*, Ekstrak *Thalassia hemprichii* dan Gen TLR 4.**

Demam tifoid akut merupakan penyakit infeksi akut bersifat sistemik yang disebabkan oleh mikroorganisme *Salmonella enterica* serotipe *typhi* yang dikenal dengan *Salmonella typhi* (*S. typhi*). Pada dinding sel *S. typhi* terdapat pirogen LPS (endotoksin) dan sedikit peptidoglikan. Endotoksin merupakan pirogen eksogen yang sangat potensi untuk merangsang respons imun makrofag dan sel lain untuk menginduksi sekresi sitokin. Mikroba dikenal kedatangannya karena memiliki penanda PAMPs (bakteri gram negatif adalah lipopolisakarida atau LPS) yang segera akan berikatan dengan reseptor TLR yakni TLR4 khusus untuk LPS.

Infeksi *Salmonella typhi* pada manusia, disebabkan oleh system imunitas tubuh yang mengalami penurunan aktifitas (defisiensi), sehingga system imunitas tubuh tidak mampu

membunuh dan menghancurkan (meregulasi) bakteri *S. typhi*. Hal ini mengakibatkan *Salmonella typhi* yang berada dalam peredaran darah dapat bertahan hidup, berkembang, melakukan invasi serta merusak sel-sel tubuh. (Urgrinovic, et al., 2003; Diepen, et al., 2005; Cummings, et al., 2005). Sistem imunitas tubuh yang memiliki peran utama dalam meregulasi bakteri *Salmonella typhi* adalah Sel T CD4+ dan sel T CD8+ (Lapaquea, et al., 2008; Warrington, et al., 2011). Abbas dan Lichtman (2011) mengemukakan bahwa sel T CD4+ atau sering disebut Sel T *Helper* mengaktifkan makrofag untuk meningkatkan fagositosis terhadap mikroba yang berada di vesikula sedangkan Sel T CD8+ atau yang disebut dengan sel T Cytotoxic T Lymphocyte (CTL) membunuh sel yang mengandung mikroba atau protein mikroba dalam sitoplasma sehingga menghilangkan reservoir infeksi. Proses fagositosis oleh makrofag melepaskan sejumlah sitokin, diantaranya pirogen endogen IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ . Sitokin ini mencapai organ sirkumventrikuler otak yang ada pada organ ini berdekatan dengan area pre optik dan organ vaskulosa lumina terminalis melalui prostaglandin PGE-2 yang mengakibatkan demam (Silbernagel S, 2006).

*Thalassia hemprichii* merupakan salah satu jenis tumbuhan perairan yang telah diketahui mengandung steroid/triterpenoid, flavonoid, saponin, dan tanin (Kusmardiyani dan Elfahmi, 2000).

Steroid sebagai antiinflamasi berhubungan dengan membran lipid dan sensitivitas terhadap komponen steroid yang

menyebabkan kebocoran pada liposom (Madduluri dkk, 2013). Steroid dapat berinteraksi dengan membran fosfolipid sel yang bersifat permeable terhadap senyawa-senyawa lipofilik sehingga menyebabkan integritas membran menurun serta morfologi membran sel berubah yang menyebabkan sel rapuh dan lisis (Ahmed, 2007).

Flavonoid sebagai antimikroba dapat dibagi menjadi tiga yaitu menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sel dan menghambat metabolisme energi ( Hendra, dkk., 2011). Flavonoid menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri, mikrosom, dan lisosom sebagai hasil interaksi antara flavonoid dengan DNA bakteri (Cushnie, dkk., 2005). Mekanisme kerja flavonoid menghambat fungsi membrane sel adalah membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler (Nuria dkk, 2009). Flavonoid dapat menghambat metabolisme energi dengan cara menghambat penggunaan oksigen oleh bakteri. Flavonoid menghambat pada sitokrom C reduktase sehingga pembentukan metabolisme terhambat (Cushnie dkk, 2005). Kandungan lain yang terdapat dalam ekstrak *Thalassia hemprichii* yaitu flavonoid dimana senyawa ini berfungsi sebagai antiinflamasi dan antioksidan. Flavonoid yang bersifat hidrofilik membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler dan dengan dinding sel bakteri, serta dapat merusak membran sel bakteri. Senyawa fenolik dalam ekstrak *Thalassia hemprichii*

bertanggung jawab untuk aktivasi anti-inflamasi. Mekanisme ini melibatkan penindasan kegiatan pro inflamasi COX-2 dan/ atau diinjeksi nitrat oksida sintesa (\*iNOS\*) melalui senyawa fenolik atau flavonoid. Ekstrak *Thalassia hemprichii* telah didokumentasikan untuk terlibat dalam regulasi protein seperti dekarboksilase ornithine, tyrosine kinase, iNOS dan COX-2 (Zakiah J, et al., 2013).

Senyawa saponin akan merusak membran sitoplasma dan membunuh sel (Assani, 1994). Senyawa steroid/triterpenoid juga memiliki potensi sebagai senyawa antibakteri. Senyawa steroid/triterpenoid menghambat pertumbuhan bakteri dengan mekanisme penghambatan terhadap sintesis protein karena terakumulasi dan menyebabkan perubahan komponen-komponen penyusun sel bakteri itu sendiri. Senyawa terpenoid mudah larut dalam lipid sifat inilah yang mengakibatkan senyawa ini lebih mudah menembus dinding sel bakteri Gram positif dan sel bakteri Gram negatif (Rosyidah, et al., 2010).

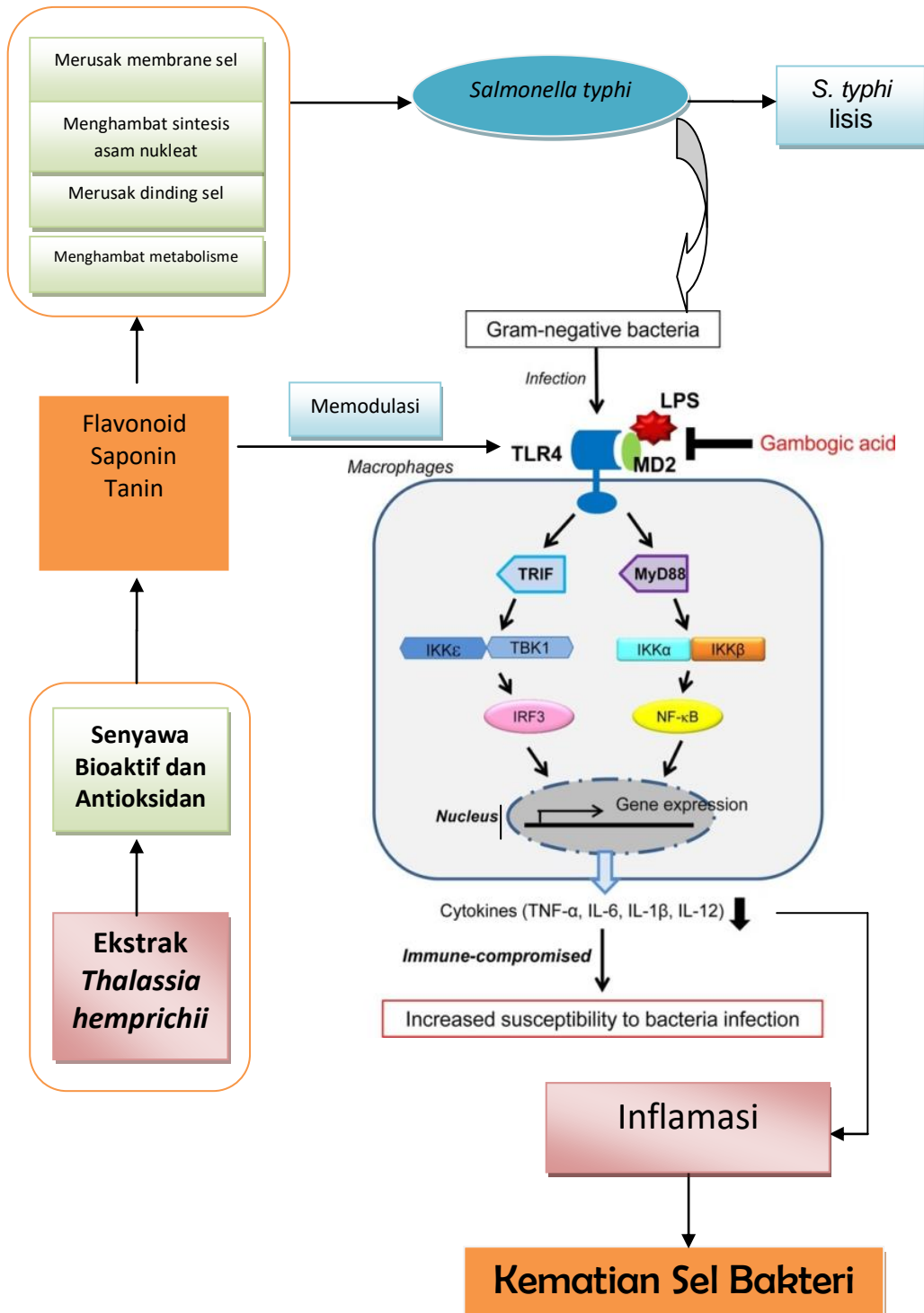
Tanin memiliki persenyawaan fenol yang memiliki gugus hidroksil di dalamnya maka mekanisme dalam meniadakan bakteri dengan memanfaatkan perbedaan polaritas antara lipid dengan gugus hidroksil. Apabila sel bakteri semakin banyak mengandung lipid maka dibutuhkan konsentrasi yang tinggi untuk membuat bakteri tersebut lisis. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa kandungan molekul tanin yang terdapat dalam ekstrak *Thalassia hemprichii* akan membentuk kompleks dengan protein melalui kekuatan nonspesifik

seperti ikatan hidrogen dan afek hidrofobik sebagaimana pembentukan ikatan kovalen. Cara kerja antimikroba berhubungan dengan kemampuan tanin dan saponin untuk menginaktivasi adhesin mikroba (molekul yang menempel pada sel inang) yang terdapat pada permukaan sel, enzim yang terikat pada membran sel dan protein transport sel, selain itu tanin juga membentuk kompleks dengan lipopolisakarida (LPS) untuk memudahkan perlekatan dengan TLR 4. Tanin yang membentuk kompleks dengan lipopolisakarida pada bakteri dapat dengan mudah melekat pada TLR 4 sehingga meningkatkan respons imun innate, disini termasuk sitokin inflamatori (TNF, IL-1, IL-8 dan IL-12), endothelial adhesion molecules (E-selection), dan protein yang berperan dalam mekanisme pembunuhan mikroba (termasuk iNOS).

Hasil RT-PCR pada penelitian yang dilakukan di China membuktikan bahwa flavonoid menurunkan regulasi tingkat gen inflamasi termasuk interleukin-1 beta (IL-1), interleukin-6 (IL-6), dan tumor necrosis factor alpha (TNF). Penelitian lebih lanjut menunjukkan bahwa hepatoproteksi yang diinduksi oleh flavonoid menghambat TLR4 / MyD88 dan mengaktifkan jalur signaling Sirt1 / Nrf2. Blokade dari TLR4 jalur oleh flavonoid menghambat aktivitas transkripsi NF- $\kappa$ B dan AP-1 dan reaksi inflamasi (Tao X., *et al*, 2016). Kandungan Fenolat memiliki mekanisme aksi penghambatan senyawa fenolat pada mikroorganisme dikarenakan oleh gangguan pada integritas membran sel dan sintesis komponen struktural

bakteri. Aktivitas antimikroba dari senyawa fenolik terkait dengan inaktivasi enzim seluler, yang tergantung pada tingkat penetrasi zat ke dalam sel atau disebabkan oleh perubahan permeabilitas membran. Permeabilitas membrane yang meningkat merupakan faktor utama dalam mekanisme antimikroba, dimana senyawa dapat mengganggu membran dan menyebabkan hilangnya integritas sel dan kematian sel akhirnya (Cetin Karaca H, 2011).

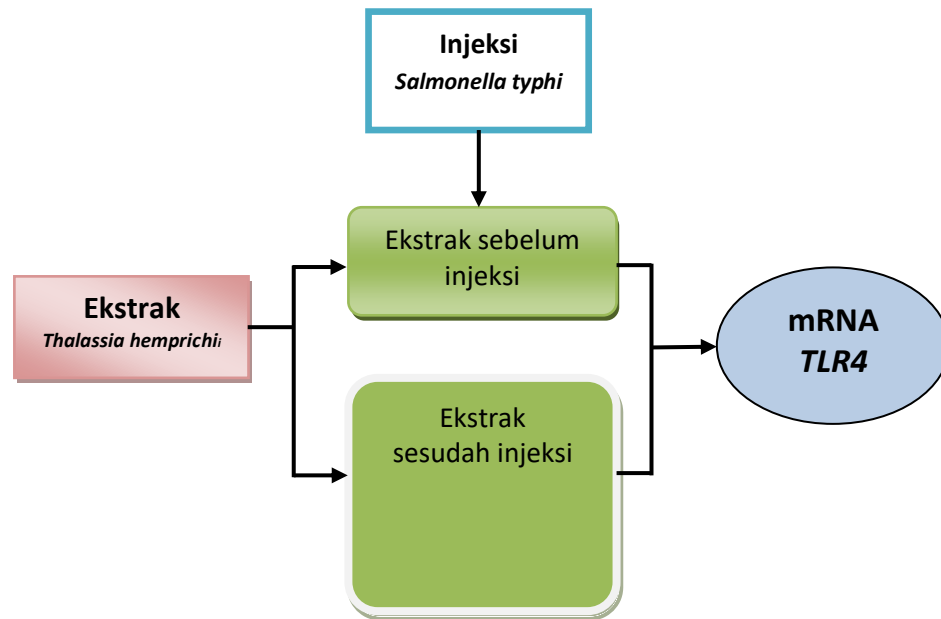
## 2.8 Kerangka Teori



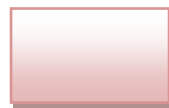
Gambar 21. Kerangka teori



## 2.8 Kerangka Konsep



Keterangan :



: Variabel independen



: Variabel antara



: Variabel dependen

Gambar 22. Kerangka konsep

## 2.9 Definisi Operasional

- a. Pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* sebelum injeksi adalah perlakuan pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* sebelum injeksi bakteri *Salmonella typhi*.
- b. Pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* setelah injeksi adalah perlakuan pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* sesudah injeksi bakteri *Salmonella typhi*.
- c. Ekstrak *Thalassia hemprichii* adalah ekstrak yang mengandung senyawa bioaktif yang diperoleh dari lamun *Thalassia hemprichii* melalui ekstraksi secara maserasi.
- d. Mencit BALB/c adalah hewan uji/percobaan, jenis kelamin jantan, yang sehat, berusia 10 – 12 minggu, berat badan 25 – 35. Mencit diadaptasi selama 7 hari sebelum dilakukan intervensi yang disimpan dalam kandang standar.
- e. Ekspresi gen TLR4 adalah akumulasi protein TLR4 yang diukur dengan serum darah dengan menggunakan realtime PCR.

## 2.9 Hipotesis

Hipotesis penelitian yang diajukan adalah sebagai berikut:

- a. Ada pengaruh pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* terhadap ekspresi mRNA gen TLR4 pada kelompok mencit BALB/C yang diberikan **sebelum** diinjeksi *Salmonella typhi*.
- b. Ada pengaruh pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* terhadap ekspresi mRNA gen TLR4 pada kelompok mencit BALB/C yang diberikan **sesudah** diinjeksi *Salmonella typhi*.

- c. Ada perbedaan pengaruh pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* terhadap ekspresi mRNA gen TLR4 pada kelompok mencit BALB/C yang diberikan **sebelum** dan **sesudah** diinjeksi *Salmonella typhi*.

Hipotesis statistiknya adalah:

a.  $H_0 : \mu_{d1} = 0$

$H_1 : \mu_{d1} \neq 0$

b.  $H_0 : \mu_{d2} = 0$

$H_1 : \mu_{d2} \neq 0$

c.  $H_0 : \mu_{d1} = \mu_{d2}$

$H_1 : \mu_{d1} \neq \mu_{d2}$

Keterangan :

- $H_0 : \mu_{d1} = 0$  : Tidak ada pengaruh pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* terhadap ekspresi mRNA gen TLR4 pada kelompok mencit BALB/C yang diberikan **sebelum** diinjeksi *Salmonella typhi*.

$H_1 : \mu_{d1} \neq 0$  : Ada pengaruh pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* terhadap ekspresi mRNA gen TLR4 pada kelompok mencit BALB/C yang diberikan **sebelum** diinjeksi *Salmonella typhi*

- $H_0 : \mu_{d2} = 0$  : Tidak ada pengaruh pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* terhadap ekspresi mRNA gen TLR4 pada kelompok mencit BALB/C yang diberikan **sesudah** diinjeksi *Salmonella typhi*

$H_1 : \mu_{d2} \neq 0$  : ada pengaruh pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* terhadap ekspresi mRNA gen TLR4 pada kelompok mencit BALB/C yang diberikan **sesudah** diinjeksi *Salmonella typhi*.

- $H_0 : \mu_{d1} = \mu_{d2}$  : Tidak Ada perbedaan pengaruh pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* terhadap ekspresi mRNA gen TLR4 pada kelompok mencit BALB/C yang diberikan **sebelum** dan **sesudah** diinjeksi *Salmonella typhi*

$H_1 : \mu_{d1} \neq \mu_{d2}$  : Ada perbedaan pengaruh pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* terhadap ekspresi mRNA gen TLR4 pada kelompok mencit BALB/C yang diberikan **sebelum** dan **sesudah** diinjeksi *Salmonella typhi*

-



- b. Preparasi dan ekstraksi sampel dilakukan di Laboratorium Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Halu Oleo Kendari.
- c. Pengujian senyawa bioaktif dan aktivitas antioksidan dilakukan di Laboratorium Biokimia, Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin.
- d. Pengujian kandungan gizi ekstrak *Thalassia hemprichii* dilakukan di Laboratorium Kimia Makanan Ternak, Jurusan Nutrisi dan Makanan Ternak, Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin.
- e. Perlakuan pada hewan uji dilaksanakan di Laboratorium Animal Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin.
- f. Pemeriksaan Biomolekuler, Pemeriksaan *Real Time PCR* dan *ELISA* dilakukan di Laboratorium Biomolekuler dan Imunologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin.

### **3.2.2 Waktu penelitian**

Penelitian ini dilakukan pada bulan November 2018 sampai dengan Juli 2019. Pemilihan waktu tersebut dengan pertimbangan bahwa telah diselesaikannya tahapan pra penelitian yakni pembuatan proposal penelitian yang merupakan syarat untuk dapat melakukan penelitian.

### **3.3 Subjek Penelitian**

Subjek penelitian adalah mencit jantan strain BALB/C yang diperoleh dari Laboratorium Hewan Fakultas Kedokteran UNHAS ,

yang sehat berusia 10-12 minggu, berat badan mencit BALB/C 25-35 gram. Untuk menghindari bias karena variasi umur dan berat badan, maka pengelompokan sampel dilakukan secara acak. Besar sampel minimal dalam penelitian ini diperoleh berdasarkan rumus besar sampel untuk penelitian eksperimen dari Federer (Wahyuningrum, 2012), yaitu :

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

Keterangan :

n = jumlah sampel dalam kelompok perlakuan

t = jumlah kelompok perlakuan

Perhitungan :

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

$$4(n-1) \geq 15$$

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq (15+4)$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

$$n \geq 5$$

Berdasarkan perhitungan diatas, besar sampel minimal yang diperlukan adalah 5. Besar sampel dalam penelitian ini sebanyak 20 ekor tmencit BALB/C. Sampel dibagi dalam 4 kelompok secara random dengan jumlah yang sama (n = 5) pada setiap kelompoknya. Strain ini dipilih karena telah dilaporkan dalam beberapa penelitian sebelumnya sensitive terhadap *Salmonella* dan dapat menimbulkan respon imunitas seluler (Hormaeche, et al., 1981). Sebelum perlakuan, mencit diadaptasi selama 7 hari sebelum dilakukan intervensi yang disimpan dalam kandang standard agar kondisi fisik dan psikis mencit stabil dalam ruangan dengan sirkulasi udara yang

cukup dan dipertahankan suhu ruangan pada kondisi standar (suhu  $28 \pm 20^\circ\text{C}$ ). Kelembaban udara  $50 \pm 10\%$  dan lampu ruangan dengan siklus 12 jam menyala dan 12 jam dipadamkan. Kandang mencit terbuat dari kawat berukuran 90 inci atau  $96,8 \text{ cm}^2$  dengan tinggi kandang 5 inci atau  $12,7 \text{ cm}^2$ . Kandang dibersihkan setiap hari. Selama dalam pemeliharaan mencit, diberikan makan diet standar alamiah dan diberi minum secukupnya secara ad libitum.

### **Kriteria Sampel**

- 1) Kriteria inklusi :
  - a) Mencit BALB/C, Jantan
  - b) Umur 10-12 minggu
  - c) Berat 25-35 gram
  - d) Tidak sakit, aktivitas dan tingkah laku normal
- 2) Kriteria eksklusi :
  - a) Mencit tampak sakit (gerakan tidak aktif)
  - b) Mencit mati selama eksperimen berlangsung (drop out)

## **3.4 Protokol Penelitian**

### **3.4.1 Bahan dan peralatan**

Bahan yang akan digunakan dalam penelitian adalah :

- a. Lamun *Thalassia hemprichii*
- b. Hewan uji, mencit strain BALB/c umur 10-12 minggu, berat 25-35 gram
- c. Makanan hewan (Pellet)
- d. Bakteri *Salmonella thypi* ( $3 \times 10^3$  ml/CFU)



- e. Obat Levofloxacin 750 mg yang dikonversi ke dosis mencit (factor konversi 0,0026) menjadi 98 mk/kg BB.
- f. Aquadest
- g. Handscoon

Lamun yang digunakan adalah lamun *Thalassia hemprichii* yang diperoleh dari perairan Wakatobi. Sebelum digunakan dalam penelitian ini, terlebih dahulu diekstraksi dan dilakukan uji fitokimia, uji aktivitas antioksidan dan uji kandungan gizi. Jenis lamun ini banyak di perairan Wakatobi. Lamun memiliki banyak kelebihan karena tidak perlu disintesis dan selalu tersedia oleh alam.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- a. Kandang hewan uji
- b. Timbangan digital
- c. Sonde lambung
- d. Kanul mulut
- e. Alat bedah hewan percobaan (scalpel, pinset, gunting, jarum dan meja lilin)
- f. Gelas ukur 100 cc dan pengaduk
- g. Mikropipet dan spoit 1 mL dan 5 mL
- h. Alat untuk pengukuran PCR
- i. ELISA

### 3.4.2 Prosedur Penelitian

#### a. Pengambilan, preparasi dan ekstraksi bahan baku

Pengambilan sampel lamun *Thalassia hemprichii* dilakukan pada saat surut. Lamun yang telah diambil diberi label dan disimpan dalam *coolbox* yang telah berisi es batu untuk menjaga kesegaran lamun selama perjalanan menuju laboratorium.

Preparasi lamun *Thalassia hemprichii* dimulai dengan proses pencucian, pengeringan dan penggilingan. Lamun segar dicuci dengan menggunakan air tawar. Sampel dikeringkan di tempat yang terlindung dari sinar matahari secara langsung selama  $\pm 10$  hari. Lamun yang telah kering dihaluskan dan dimasukkan ke dalam kantong plastik kemudian ditimbang dengan timbangan analitik dan disimpan dalam kondisi kering untuk selanjutnya dilakukan proses ekstraksi.

Tahap selanjutnya adalah ekstraksi bahan aktif. Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode maserasi (Quinn, 1988 dalam Darusman *et al.* 1995). Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini yaitu pelarut ethanol. Sampel yang telah dihancurkan ditimbang sebanyak 150 gram dan dimaserasi dengan pelarut ethanol sebanyak 1100 mL selama 48 jam. Hasil maserasi yang berupa

larutan kemudian disaring dengan kertas saring sehingga didapat filtrat dan residu. Filtrat yang diperoleh dievaporasi hingga pelarut memisah dengan ekstrak menggunakan *Rotary Vacuum Evaporator* pada suhu kurang dari 50°C. Ekstrak ini kemudian diformulasikan dengan menambahkan pengencer atau aquadest sebagai pelarut.

Selanjutnya dilakukan uji fitokimia (senyawa bioaktif) ekstrak *Thalassia hemprichii*.

#### **b. Uji Fitokimia (Chanwitheesuk, et al., 2004)**

##### **▪ Alkaloid**

Sampel sebanyak 3 mL ditambahkan dengan 3 mL HCl 1%, kemudian dipanaskan sambil diaduk sekitar 10 menit. Setelah itu dipipet sebanyak 1 mL ke dalam 2 tabung berbeda. Tabung I ditambahkan beberapa tetes reagen Dragendorff (hasil uji positif ditandai dengan timbulnya endapan berwarna jingga). Tabung II ditambahkan beberapa tetes reagen Mayer (hasil uji positif ditandai dengan timbulnya endapan berwarna krim kekuningan).

##### **▪ Flavanoid**

Tabung I diisi sampel sebanyak 1 mL kemudian ditambahkan beberapa tetes  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  (hasil uji positif ditandai dengan timbulnya endapan kuning). Tabung II diisi sampel sebanyak 1 mL kemudian

ditambahkan beberapa tetes  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (hasil uji positif ditandai dengan timbulnya endapan jingga).

- **Terpenoid**

Sampel sebanyak 5 mL ditambahkan 2 mL  $\text{CHCl}_3$  kemudian ditambahkan 3 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat secara perlahan melalui dinding tabung (hasil uji positif ditandai dengan terbentuknya cincin merah pada *interface*).

- **Steroid**

Sampel sebanyak 5 mL ditambahkan 2 mL anhidrida asetat kemudian ditambahkan 2 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat secara perlahan melalui dinding tabung (hasil uji positif ditandai dengan perubahan warna ungu menjadi biru atau hijau).

- **Saponin**

Sampel sebanyak 2,5 mL ditambahkan beberapa tetes akuades kemudian dikocok dengan kencang (hasil uji positif ditandai dengan timbulnya buih/busa yang bertahan lebih dari 30 detik).

- **Tanin**

Sampel sebanyak 2 mL ditambahkan 2 mL akuades kemudian ditambahkan beberapa tetes  $\text{FeCl}_3$  (hasil uji positif ditandai dengan timbulnya endapan berwarna hijau).

**c. Uji aktivitas Antioksidan (IC<sub>50</sub>) Metode DPPH (Dubois, et al., 1956)**

▪ **Pembuatan Larutan Induk 500 ppm**

Sampel ditimbang sebanyak 0,005 g, kemudian dilarutkan dalam 10 mL metanol sehingga diperoleh sampel 500 ppm.

▪ **Pengujian Antioksidan (IC<sub>50</sub>)**

Sampel 500 ppm dipipet sebanyak 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; dan 1,6 mL ke dalam tabung reaksi berbeda untuk variasi konsentrasi berturut-turut 10, 20, 40, 80, dan 160 ppm, kemudian ditambahkan 1 mL DPPH 0,4 mM, kemudian dicukupkan volume larutan 5 mL dengan metanol, kemudian dihomogenkan, didiamkan pada tempat gelap selama 30 menit, kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum (515 nm).

**d. Uji Total Polifenol/Tanin (Chanwitheesuk dkk., 2004)**

▪ **Preparasi Sampel**

Sampel ditimbang sebanyak 0,05 g, kemudian ditambahkan 10 mL akuades panas (80 °C). Setelah itu didiamkan selama 10 menit, kemudian disaring sehingga diperoleh filtrat sampel. Sampel diencerkan jika perlu.

▪ **Pengujian Total Polifenol/Tanin**

Sampel sebanyak 5 mL ditambahkan 0,25 mL pereaksi Follin 50%, kemudian ditambahkan 0,5 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> jenuh, lalu didiamkan selama 30 menit. Setelah itu campuran diukur pada panjang gelombang maksimum (680 nm) menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Tanin digunakan sebagai standar dan akuades digunakan sebagai blanko.

**e. Uji Komponen Gizi**

Untuk analisis komponen gizi yang terkandung dalam ekstrak *Thalassia hemprichii* melalui analisis proksimat. Parameter yang dianalisis terdiri atas Air, Abu, Lemak, Protein, Karbohidrat, Vitamin C, Beta Caroten, Polifenol, Calsium, Magnesium dan Zink.

**f. Dosis ekstrak *Thalassia hemprichii***

Dosis ekstrak *Thalassia hemprichii* yang digunakan adalah 500 mg. Konversi dosis ekstrak *Thalassia hemprichii* pada manusia dengan berat badan 70 Kg ke mencit dengan berat rata-rata 25 gram.

$$\begin{aligned}\text{Nilai konversi} &= 0,0026 \times 500 \text{ mg/Kg BB mencit} \\ &= 1,3 \text{ mg/Kg BB mencit}\end{aligned}$$

$$\text{Dosis untuk satu ekor mencit} = 1,3 \times 1000/25 = 52 \text{ mg}$$

**Tabel Konversi Perhitungan Dosis (Laurence & Bacharach, 1964)**

| Ditambah / Dicari | Mencit<br>20 g | Tikus<br>200 g | Marmut<br>400 g | Kelinci<br>1,5 kg | Kucing<br>1,5 kg | Kera<br>4 kg | Anjing<br>12 kg | Manusia<br>70 kg |
|-------------------|----------------|----------------|-----------------|-------------------|------------------|--------------|-----------------|------------------|
| Mencit<br>20 g    | 1,0            | 7,0            | 12,23           | 27,8              | 29,7             | 64,1         | 124,2           | 387,9            |
| Tikus<br>200 g    | 0,14           | 1,0            | 1,74            | 3,9               | 4,2              | 9,2          | 17,8            | 56,0             |
| Marmut<br>400 g   | 0,08           | 0,57           | 1,0             | 2,25              | 2,4              | 5,2          | 10,2            | 31,5             |
| Kelinci<br>1,5 kg | 0,04           | 0,25           | 0,44            | 1,0               | 1,08             | 2,4          | 4,5             | 14,2             |
| Kucing<br>1,5 kg  | 0,03           | 0,23           | 0,41            | 0,92              | 1,0              | 2,2          | 4,1             | 13,0             |
| Kera<br>4 kg      | 0,016          | 0,11           | 0,19            | 0,42              | 0,43             | 0,1          | 1,9             | 6,1              |
| Anjing<br>12 kg   | 0,008          | 0,06           | 0,1             | 0,22              | 1,24             | 0,52         | 1,0             | 3,1              |
| Manusia<br>70 kg  | 0,0026         | 0,018          | 0,031           | 0,07              | 0,076            | 0,16         | 0,32            | 1,0              |

**g. Pemberian *Levofloxacin***

*Levofloxacin* merupakan obat thypoid yang menggunakan single dose pada manusia 750 mg/Kg BB tanpa komplikasi yang paling efektif. Dosis pada hewan menggunakan faktor konversi manusia-hewan (0,0026). Perhitungan dosis dikalikan dan kemudian mendapatkan 1,95/20 gram dan didapatkan untuk 1 mencit adalah 98 mg/10 ml. *Levofloxacin* yang diemulsikan diberikan secara oral menggunakan sonde lambung, khususnya mencit berupa dispo 3 cc yang dimodifikasi pada ujung jarum ditumpulkan dengan timah.

#### **h. Uji Bakteri *Salmonella typhi***

Uji untuk memastikan pemberian bakteri *Salmonella Enterica typhi*  $10^3$  bisa menginfeksi mencit yang digunakan sebagai sampel diuji dengan menggunakan metode Spread Plate Method dengan media *Mac Conkey* dan dilanjutkan dengan uji biokimia.

Uji pendahuluan ini sejalan dengan Brooks, dkk (2012) dalam buku Mikrobiologi kedokteran menyebutkan bahwa dosis infeksi rata-rata untuk menghasilkan infeksi klinis maupun sub klinis adalah  $10^5 - 10^8$  namun  $10^3$  saja sudah bisa bagi *Salmonella typhi*. Sebuah studi yang menginfeksi *Salmonella* pada mencit C57BL/6 ternyata pada dosis  $10^4$ , hanya sekitar 40 % yang bertahan hidup dan pada hari ke 5-6 hanya 20 % yang bisa bertahan hidup (Depaolo et al., 2005).

#### **i. Kultur dan Perhitungan Jumlah Koloni**

Metode *Plate Count Agar* (PCA) adalah suatu teknik untuk menumbuhkan mikroorganisme di dalam Medium Agar dengan cara mencampurkan Medium Agar yang masih cair dengan stok kultur bakteri sehingga sel-sel tersebut tersebar merata dipermukaan agar. Metode ini dilakukan dengan mengencerkan sampel cairan peritoneal sebanyak 0,5 mL ke dalam 4,5 mL garam fisiologis (NaCl 0,9 %). Pengenceran dilakukan tiga kali yaitu dengan



mencampurkan 0,5 cc sampel bakteri *Salmonella thypi* yang diambil dari cairan peritoneal hewan coba dan mencampurkannya dengan 4,5 mL NaCl 0,9 % agar biakan yang didapatkan tidak terlalu padat atau memenuhi cawan karena biakan yang terlalu padat akan mengganggu proses pengamatan bakteri. Sekitar 1 mL suspense dituang ke dalam cawan petri steril ukuran 59x15 mm, dilanjutkan dengan menuangkan media penyubur Nutrien Agar hangat (45°C) kemudian ditutup rapat dan diinkubasi selama 2x24 jam pada suhu 37°C, kemudian menghitung jumlah bakteri *Salmonella thypi* yang ditemukan. Perhitungan jumlah bakteri yang tumbuh pada Media Agar dilakukan sebanyak dua kali setiap kelompok, yaitu : untuk kelompok preventif dilakukan pengambilan sampel pada hari ke-3 setelah injeksi dan 10 hari setelah injeksi, sedangkan untuk kelompok kuratif dilakukan pengambilan sampel pada hari ke-3 setelah injeksi dan setelah pengobatan.

### **3.4.3 Perlakuan pada Subjek Penelitian**

Mencit BALB/c dipertahankan atau diadaptasi selama 7 hari pada suhu dan lingkungan yang normal dan diberikan diet standar. Hal ini untuk memastikan hewan uji sudah teradaptasi dengan baik dan siap digunakan untuk penelitian.

Mencit Balb/c sebanyak 20 ekor dibagi menjadi 4 kelompok dengan random, masing-masing kelompok kecil terdiri dari 5 ekor.

- a. Kelompok 1 (K1) : Kelompok mencit yang diberikan ekstrak *Thalassia hemprichii* sebelum injeksi bakteri *Salmonella typhi* (Preventif).
- b. Kelompok 2 (K2) : Kelompok mencit yang diberikan ekstrak *Thalassia hemprichii* sesudah injeksi bakteri *Salmonella typhi* (Kuratif).
- c. Kelompok 3 (K3) : Kelompok mencit yang diberikan levofloxacin sesudah injeksi bakteri *Salmonella typhi* (Kuratif).
- d. Kelompok 4 (K4) : Kelompok mencit yang diberikan aquades sesudah injeksi bakteri *Salmonella typhi* (Kuratif).

Intervensi pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* pada kelompok sebelum injeksi bakteri *Salmonella typhi* selama 10 hari, pada hari ke-11 dilakukan injeksi bakteri *Salmonella typhi* ( $0,2 \text{ ml} \times 10^3 \text{ ml/CFU}$ ) secara intraperitoneal. Ekstrak *Thalassia hemprichii* diberikan secara oral. Dosis yang digunakan adalah 500 mg/Kg BB mencit per hari. Mencit ditimbang setiap hari dan dosis yang diberikan disesuaikan dengan berat badan mencit. Ekstrak *Thalassia hemprichii* yang diemulsikan diberikan secara oral dengan menggunakan

sonde lambung, khusus mencit berupa dispo 3 cc yang dimodifikasi pada ujung jarum ditumpulkan timah.

Pemeriksaan sampel darah untuk mengukur ekspresi mRNA gen TLR4 khususnya kelompok yang diberikan ekstrak *Thalassia hemprichii* sebelum injeksi bakteri (kelompok preventif), Pemeriksaan awal (P1) dilakukan sebelum perlakuan, Pemeriksaan kedua (P2) dilakukan setelah 10 hari pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii*, Pemeriksaan ketiga (P3) dilakukan setelah hari ke-3 injeksi bakteri dan pemeriksaan keempat (P4) dilakukan pada hari ke-10 setelah injeksi bakteri. Sedangkan untuk kelompok yang diberikan ekstrak *Thalassia hemprichii* sesudah injeksi *Salmonella typhi* (kelompok kuratif) : Pemeriksaan awal (P1) dilakukan sebelum perlakuan, Pemeriksaan kedua (P2) dilakukan setelah hari ke-3 injeksi bakteri, pemeriksaan ketiga (P3) dilakukan pada hari ke-7 setelah injeksi bakteri dan pemeriksaan keempat (P4) dilakukan pada hari ke-7 setelah pengobatan. Begitu pula untuk kelompok yang diberikan *levofloxacin* dan aquades, perlakuan sama dengan kelompok yang diberikan ekstrak *Thalassia hemprichii* setelah injeksi *Salmonella typhi* (kelompok kuratif).

**3.4.4 Prosedur ekstraksi RNA dengan metode Boom (Hatta and Smits, 2007; Boom et al, 1990) :**

1. Sampel darah segar 100  $\mu$ l dicampurkan dengan 900  $\mu$ l larutan buffer lisis L6 pada tube yang mempunyai penutup berupa sekrup.
2. Campuran ini disentrifuge pada 12.000 rpm selama 10 menit.
3. Sedimen sampel yang telah dipekatkan ini dihomogenkan selama 30 menit.
4. Sebelum ditambahkan suspensi diatom, campuran buffer L6 yang telah mengandung RNA hasil ekstraksi disentrifuge selama 2-3 menit pada kecepatan 12.000 rpm dengan tujuan agar RNA mengendap dibagian dasar tabung.
5. Suspensi diatom 20  $\mu$ L ditambahkan kedalam tabung. Suspensi diatom harus selalu dirotasi dan diaduk dengan menggunakan gyratory shaker dengan kecepatan 100 rpm selama 10 menit.
6. Campuran diatom dan buffer L6 dirotasi kembali menggunakan sentrifuge dengan mikrosentrifuge eppendorf pada kecepatan 12.00 rpm selama 12 detik.
7. Supernatan yang terbentuk dari setiap tabung dipisahkan dengan menggunakan penghisap yang terbuat dari pipet

pasteur dan dihubungkan dengan vacuum pump untuk mencegah hilangnya diatom dalam suspensi tadi.

8. Sekitar 10  $\mu$ L dari suspensi tersebut dipisahkan.
9. Supernatan dicuci sebanyak dua kali menggunakan 1 ml buffer pencuci L2 ditambahkan sebanyak 1 ml, dirotasi dan disentrifuge pada kecepatan 12.000 rpm selama 15 detik kemudian supernatan dibuang.
10. Endapan dicuci kembali dengan 1 ml etanol 70% sebanyak dua kali lalu dirotasi dan disentrifuge pada kecepatan 12.000 rpm selama 15 detik.
11. Supernatan dibuang, endapan dicuci lagi dengan 1 ml aseton, dirotasi dan disentrifuge pada kecepatan 12.000 rpm selama 15 detik kemudian supernatan dibuang kembali.
12. Aseton yang tersisa dalam endapan (sedimen) diuapkan dengan membuka penutup tabung dan dipanaskan dengan oven pada suhu 50-55°C selama  $\pm$  10 menit.
13. Setelah sedimen mengering, TE buffer elusi ditambahkan sebanyak 60 ml kemudian dirotasi secara merata sehingga sedimen dan suspensi tersebut dapat larut.
14. Tabung diinkubasi dalam oven pada suhu 56°C selama 10 menit.
15. Campuran tersebut disentrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm selama 30 menit.

16. Supernatan diambil secara hati-hati sebanyak 40-50  $\mu$ L dari supernatan dan dimasukkan ke dalam tabung yang baru.

17. Hasil ekstraksi disimpan pada suhu  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.4.5 Prosedur pemeriksaan ekspresi mRNA gen TLR4 dengan metode *RT-PCR***

1) Total RNA diisolasi/diekstraksi dari sampel darah yang diperoleh dengan metode Boom.

2) Kuantitatif RT-PCR dengan menggunakan mesin PCR Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent Company, Santa Clara, CA, United States) dengan mengikuti instruksi produk.

3) Terlebih dahulu dibuat PCR-mix dengan primer yang spesifik dari TLR4 (Oligo Macrogen, Korea) yaitu primer forward : 5'-GCTCCTGCTGGCTCCTTCTCA-3', dan primer reverse : 5'-GCCGCAGCCTCGTTCATCTT-3' (Li et al, 2016) dan sebagai house keeping gen adalah primer GAPDH yaitu primer forward : 5'-CCCATCACCATCTTCCAGGAG-3' and primer reverse : 5'-GTTGTCATGGATGACCTTGCC-3' (Wakahara., et al, 2007).

4) Sebanyak 2,5  $\mu$ l ekstrak DNA ditambahkan ke dalam 22,5  $\mu$ l campuran PCR primer forward/reverse.

- 5) Parameter siklus termal adalah 30 detik pada suhu 95°C dan 40 siklus denaturasi pada suhu 95°C selama 10 detik, kemudian annealing 60°C selama 15 detik dan ekstensi pada suhu 72°C selama 40 detik.
- 6) Perhitungan kurva kalibrasi untuk menentukan profil ekspresi mRNA gen TLR4.

Semua pemeriksaan diulang 3 kali dan data dianalisis dengan sistem deteksi instrument MX4000 menggunakan metode perbandingan ambang batas siklus (using the comparative threshold cycle method).

#### **3.4.6 Pemeriksaan kadar TLR4 dengan metode ELISA (No. L5-F21475)**

1. Sampel darah diambil sebanyak 1 ml menggunakan needle 19-21 gauge lalu darah dimasukkan kedalam tube sampel. Darah disentrifuge dan disimpan pada suhu -80°C.
2. Siapkan sampel plasma (setelah disentrifuge selama 15 menit, 1000xg, 2-8°C) dan reagen TLR4 dalam ruangan dengan suhu kamar 28±2°C.
3. Cuci plate sebanyak 2x sebelum menambahkan standar atau sampel kedalam sumur. Cuci dengan menambahkan ±350µl wash buffer menggunakan botol semprot. Diamkan selama 1-2 menit setelah dicuci, aspirasi untuk menghilangkan sisa wash buffer yang tersisa kemudian balikkan plate dan tekan hingga kertas absorbant bersih.

4. Tambahkan 100µl sampel kedalam setiap sumur, tutup dengan penutup plastik lalu inkubasi selama 90 menit pada suhu 37°C.
5. Aspirasi lalu cuci setiap lubang selama 2 menit seperti prosedur pencucian sebelumnya.
6. Tambahkan 100µl dari 1x larutan biotinylated detection antibody kedalam setiap sumur, tutup dengan penutup plastik lalu inkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C.
7. Aspirasi cairan dari setiap sumur dan cuci 3 kali seperti prosedur pencucian sebelumnya.
8. Tambahkan 100µl dari 1x larutan HRP-streptavidin conjugate kedalam setiap sumur, tutup dengan penutup plastik lalu inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C.
9. Aspirasi cairan dari masing-masing sumur dan cuci 5 kali seperti prosedur pencucian sebelumnya.
10. Tambahkan 90µl larutan TMB substrat ke setiap sumur, tutup dengan penutup plastik yang baru lalu inkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C.
11. Tambahkan 50µl stop solution ke masing-masing sumur.
12. Kadar TLR4 dibaca dengan menggunakan Elisa Reader 270 (BioMerieux, Perancis) dengan panjang gelombang 450 nm selama 30 menit dengan satuan ng/ml.
13. Setiap sampel dilakukan secara duplicate untuk menjamin kebenaran/validitas hasilnya.



### 3.5 Etika Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan setelah mendapatkan Rekomendasi Persetujuan Etik dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Nomor : 740/UN4.6.4.5.31/PP36/2019. Penelitian akan memperhatikan aspek-aspek yang berhubungan dengan prinsip etika penelitian pada hewan coba (Balls *et al*,1995; Ridwan, 2013), antara lain :

#### 1. *Replacement* (Penggantian)

Adalah keperluan memanfaatkan hewan coba sudah diperhitungkan secara seksama baik dari pengalaman terdahulu maupun literatur untuk menjawab pertanyaan penelitian dan tidak dapat digantikan oleh makhluk hidup lain seperti sel atau biakan jaringan.

#### 2. *Reduction* (Pengurangan)

Diartikan sebagai pemanfaatan hewan dalam penelitian sesedikit mungkin tetapi tetap mendapatkan hasil optimal.

#### 3. *Refinement* (Perbaikan)

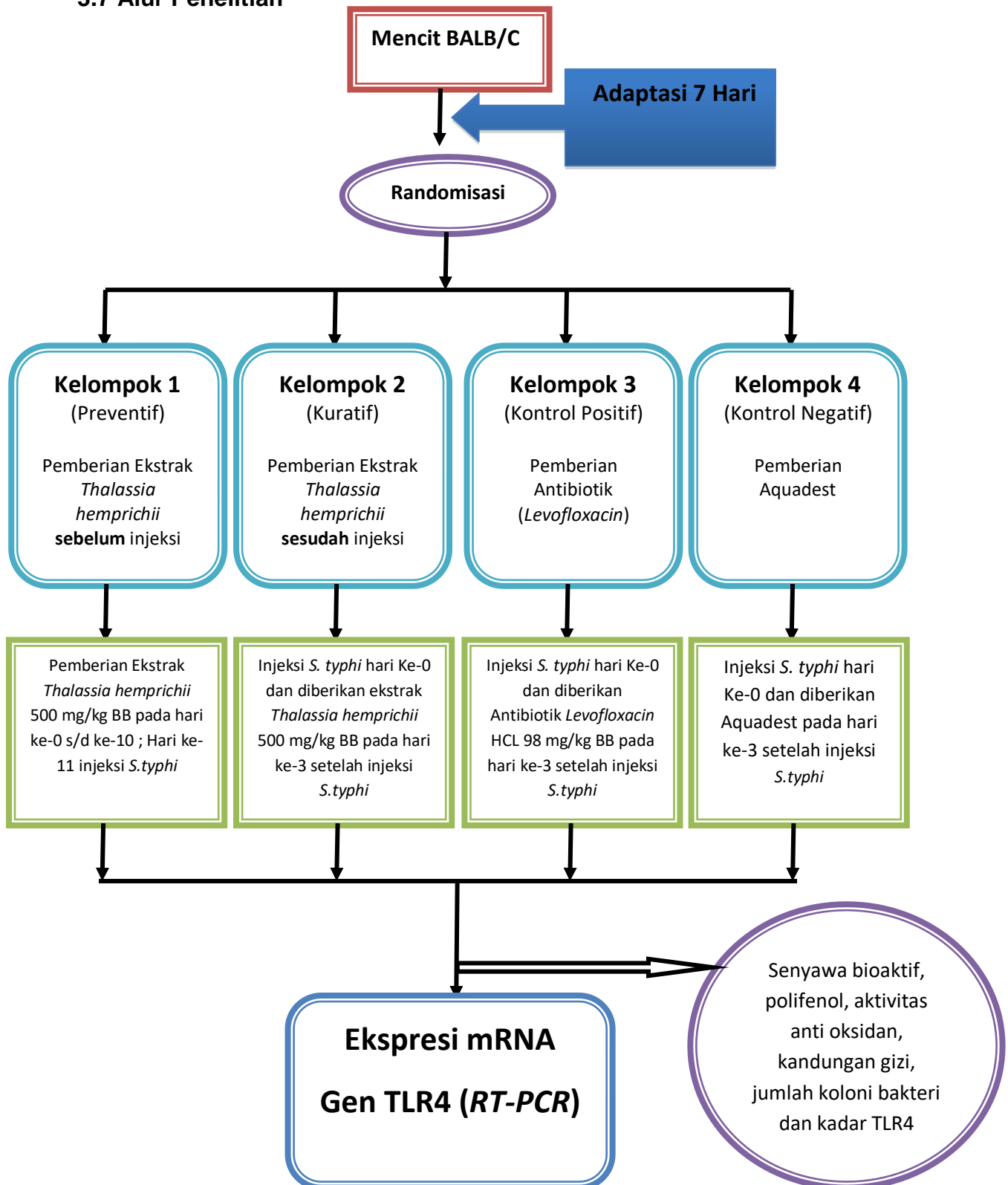
Adalah memelihara hewan dengan baik, tidak menyakiti hewan serta meminimalisasi perlakuan yang menyakitkan sehingga menjamin kesejahteraan hewan coba sampai akhir penelitian.

### 3.6 Analisis Data

Data penelitian dianalisis dengan teknik statistik deskriptif dan inferensial. Statistik deskriptif dilakukan untuk menggambarkan

data ekspresi gen TLR-4, kandungan fitookimia dan kadar gen TLR-4 dalam bentuk nilai mean, standar deviasi, minimum dan maximum yang disajikan melalui tabel dan grafik dengan menggunakan program Microsoft Excel, sedangkan statistik inferensial dilakukan untuk menguji efek ekstrak *Thalassia hemprichii* terhadap ekspresi gen TLR-4 menggunakan one way ANOVA test dan uji lanjut Bonferoni test pada taraf kepercayaan 99% dengan bantuan computer program SPSS versi 21.

### 3.7 Alur Penelitian



Gambar. 23. Alur Penelitian

## BAB IV

### HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

#### 4.1. Hasil Penelitian

##### 4.1.1. Hasil Uji Fitokimia

Kandungan senyawa bioaktif atau fitokimia pada ekstrak *Thalassia hemprichii* telah ditentukan secara kualitatif. Hasil analisis fitokimia pada ekstrak *Thalassia hemprichii* menunjukkan adanya kandungan senyawa fitokimia meliputi flavonoid, saponin, polifenol dan tanin (Tabel 4.1). Pengujian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia, Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin dengan menggunakan Spektrofotometri UV.

**Tabel 4.1. Hasil skrining fitokimia ekstrak *Thalassia hemprichii***

| No. | Uji Fitokimia       | Hasil  | Kesimpulan |
|-----|---------------------|--|------------|
| 1   | Alkaloid            | Dengan pereaksi Dragendroff tidak terbentuk endapan jingga | (-)        |
|     |                     | Dengan pereaksi Mayer tidak terbentuk endapan kuning       | (-)        |
| 2   | Flavonoid           | Fluoresensi kuning intensif                                | (+)        |
| 3   | Triterpenoid        | Tidak terbentuk cincin kecoklatan                          | (-)        |
| 4   | Saponin             | Terbentuk busa setinggi 1,5 cm selama 30 detik             | (+)        |
| 5   | Tanin dan Polifenol | Hitam kehijauan  | (+)        |

*Sumber data : Data Primer, 2019*

Keterangan : (+) = mengandung senyawa yang dimaksud;

(-) = tidak mengandung senyawa yang dimaksud.

#### 4.1.2. Hasil Uji Antioksidan

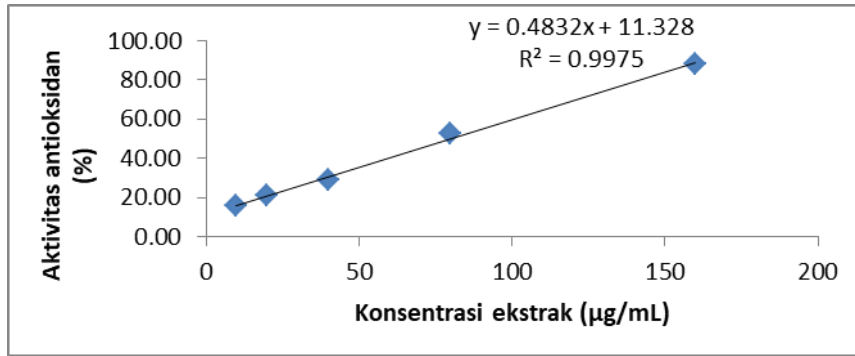
Pengujian aktivitas antioksidan pada ekstrak *Thalassia hemprichii* dilakukan dengan menggunakan metode *diphenylpicrylhydrazil* (DPPH) *free radical scavenging assay*. Metode dengan menggunakan DPPH merupakan metode yang paling umum digunakan untuk pengujian antioksidan (Molyneux, 2004). Pengujian aktifitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH diinterpretasikan kedalam parameter IC50 atau konsentrasi penghambatan 50. Hasil dari pengujian antioksidan ekstrak *Thalassia hemprichii* ditunjukkan pada Tabel 4.2.

**Tabel 4.2. Analisis potensi antioksidan ekstrak *Thalassia hemprichii***

##### 1. SEMPLI

| No | Konsentrasi (µg/mL) | Absorbansi (A) $\lambda = 515$ nm | Aktivitas Antioksidan (%) |
|----|---------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| 1  | 10                  | 0.355                             | 16.08                     |
| 2  | 20                  | 0.335                             | 20.80                     |
| 3  | 40                  | 0.299                             | 29.31                     |
| 4  | 80                  | 0.201                             | 52.48                     |
| 5  | 160                 | 0.085                             | 87.75                     |
| 6  | Control             | 0.387                             |                           |

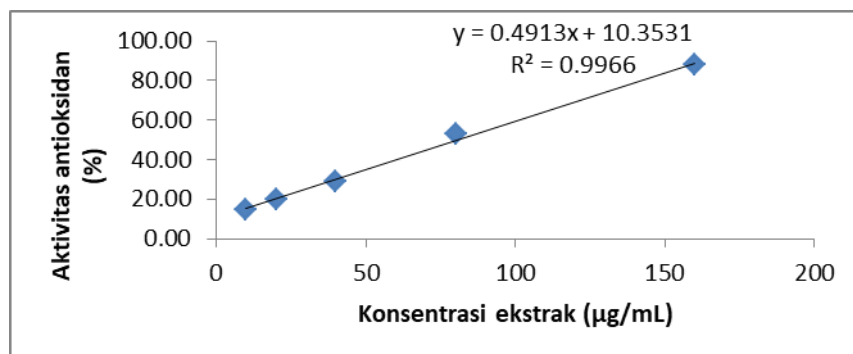
| No | Konsentrasi (µg/mL) | Aktivitas Antioksidan (%) | Nilai IC-50 (µg/mL) |
|----|---------------------|---------------------------|---------------------|
| 1  | 10                  | 16.08                     | 80.0331             |
| 2  | 20                  | 20.80                     |                     |
| 3  | 40                  | 29.31                     |                     |
| 4  | 80                  | 52.48                     |                     |
| 5  | 160                 | 87.75                     |                     |



## 2. DUPLO

| No | Konsentrasi (µg/mL) | Absorbansi (A) λ = 515 nm | Aktivitas Antioksidan (%) |
|----|---------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1  | 10                  | 0.360                     | 14.89                     |
| 2  | 20                  | 0.340                     | 19.62                     |
| 3  | 40                  | 0.300                     | 29.08                     |
| 4  | 80                  | 0.200                     | 52.72                     |
| 5  | 160                 | 0.085                     | 87.75                     |
| 6  | Control             | 0.387                     |                           |

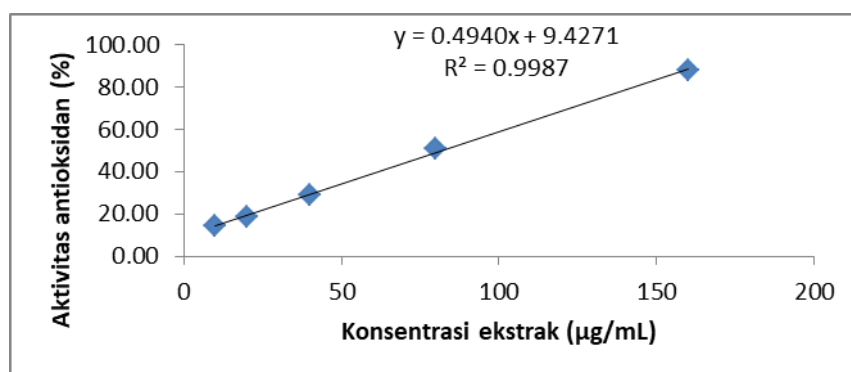
| No | Konsentrasi (µg/mL) | Aktivitas Antioksidan (%) | Nilai IC-50 (µg/mL) |
|----|---------------------|---------------------------|---------------------|
| 1  | 10                  | 14.89                     | 80.6979             |
| 2  | 20                  | 19.62                     |                     |
| 3  | 40                  | 29.08                     |                     |
| 4  | 80                  | 52.72                     |                     |
| 5  | 160                 | 87.75                     |                     |



### 3. TRIPLO

| No | Konsentrasi (µg/mL) | Absorbansi (A) λ = 515 nm | Aktivitas Antioksidan (%) |
|----|---------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1  | 10                  | 0.362                     | 14.42                     |
| 2  | 20                  | 0.344                     | 18.68                     |
| 3  | 40                  | 0.302                     | 28.61                     |
| 4  | 80                  | 0.208                     | 50.83                     |
| 5  | 160                 | 0.085                     | 87.75                     |
| 6  | Control             | 0.387                     |                           |

| No | Konsentrasi (µg/mL) | Aktivitas Antioksidan (%) | Nilai IC-50 (µg/mL) |
|----|---------------------|---------------------------|---------------------|
| 1  | 10                  | 14.42                     | 82.1314             |
| 2  | 20                  | 18.68                     |                     |
| 3  | 40                  | 28.61                     |                     |
| 4  | 80                  | 50.83                     |                     |
| 5  | 160                 | 87.75                     |                     |



Sumber data : Data Primer, 2019

#### 4.1.3. Hasil Uji Kandungan Gizi

Pengujian kandungan gizi ekstrak *Thalassia hemprichii* diperoleh nilai seperti yang ada pada Tabel 4.3 berikut :

**Tabel 4.3. Kandungan gizi ekstrak *Thalassia hemprichii***

| <b>Parameter</b> | <b>Satuan</b> | <b>Nilai Kandungan Gizi Ekstrak <i>Thalassia hemprichii</i></b> |
|------------------|---------------|---|
| Air              | %             | 11.09   |
| Abu              | %             | 2.07  |
| Protein Kasar    | %             | 23.96   |
| Lemak Kasar      | %             | 57.64   |
| Karbohidrat      | %             | 7.22  |
| Vitamin C        | %             | 4.26  |
| Beta Caroten     | %             | 0.18  |
| Polifenol        | %             | 0.99  |
| Calsium          | %             | 0.42  |
| Magnesium        | %             | 0.37  |
| Zink             | %             | 108.82  |

*Sumber data : Data Primer, 2019*

Hasil pemeriksaan kandungan ekstrak *Thalassia hemprichii* menunjukkan bahwa kandungan air atau kadar air 11.09 %, Abu 2.07 %, Protein Kasar 23.96 %, Lemak Kasar 57.64 %, Karbohidrat 7.22 %, Vitamin C 4.26 %, Beta Caroten 0.18 %, Polifenol 0.99 %, Calsium 0.42 %, Magnesium 0.37 % dan Zink 108.82 %.



#### 4.1.4. Hasil Deskripsi Perubahan Ekspresi mRNA gen TLR4.

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisa efek ekstrak *Thalassia hemprichii* pada ekspresi mRNA gen TLR4 pada mencit Strain BALB/C yang diinjeksi *Salmonella typhi*.

Dari 20 ekor mencit BALB/C yang telah diadaptasi dan memenuhi kriteria sampel dibagi secara random masing-masing 5 ekor perkelompok intervensi, yang terdiri dari : Kelompok I (K1) : Kelompok mencit yang diberikan ekstrak *Thalassia hemprichii* sebelum diinjeksi *Salmonella typhi*, Kelompok 2 (K2) : Kelompok mencit yang diberikan ekstrak *Thalassia hemprichii* sesudah diinjeksi *Salmonella typhi*, Kelompok 3 (K3) : Kelompok mencit yang diberikan antibiotic (levofloxacin) sesudah diinjeksi *Salmonella typhi* dan Kelompok 4 (K4) : Kelompok mencit yang diberikan aquadest sesudah diinjeksi *Salmonella typhi*. Intervensi tersebut diberikan selama beberapa hari, kemudian pengambilan sampel darah dilakukan sebanyak 4 kali setiap mencit untuk diamati jumlah ekspresi mRNA gen TLR4. Adapun hasil analisis statistiknya ditampilkan dengan sistematika sebagai berikut :

**a). Kelompok dengan pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* sebelum injeksi *Salmonella typhi* (Preventif)**

Ekspresi mRNA gen TLR4 hasil pemeriksaan pada kelompok sampel yang diberi ekstrak *Thalassia hemprichii* sebelum diinjeksi *Salmonella thypi* (preventif) terangkum dalam tabel berikut :

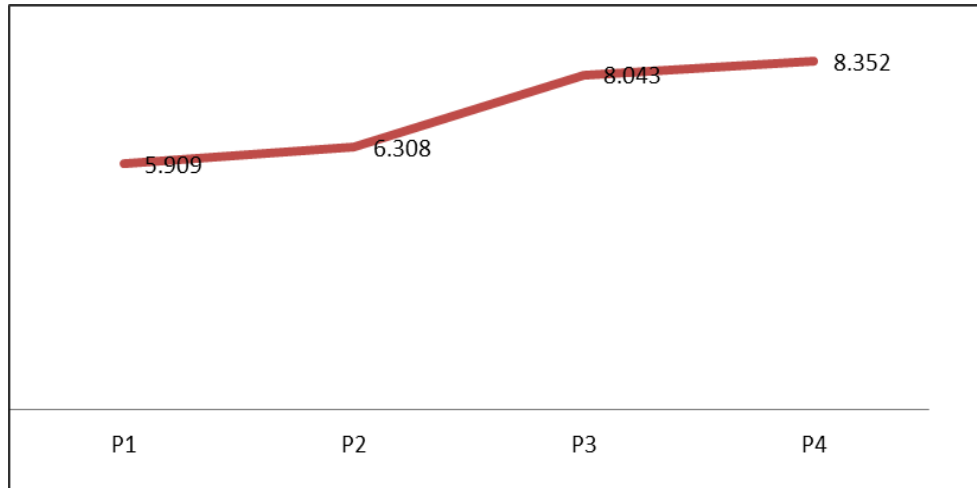
Tabel 4.4. Hasil analisis deskripsi ekspresi mRNA gen TLR4 pada kelompok yang diberikan ekstrak *Thalassia hemprichii* sebelum injeksi *Salmonella typhi* (preventif).

| <b>Pemeriksaan</b> | <b>Mean</b> | <b>SD</b> | <b>Min</b> | <b>Max</b> |
|--------------------|-------------|-----------|------------|------------|
| P1                 | 5,909       | 0,35      | 5,43       | 6,28       |
| P2                 | 6,308       | 0,52      | 5,7        | 6,86       |
| P3                 | 8,043       | 0,3       | 7,71       | 8,5        |
| P4                 | 8,352       | 0,23      | 7,99       | 8,62       |

Sumber data : Data Primer, 2019

Berdasarkan tabel 4.4 diatas dapat dijelaskan bahwa ekspresi gen pada pemeriksaan awal (P1) diperoleh nilai rerata = 5,909 ; Standar Deviasi (SD) = 0,35; Min = 5,43 dan max = 6,28, pemeriksaan kedua (P2) diperoleh nilai rerata = 5,909 ; Standar Deviasi (SD) = 0,52; Min = 5,7 dan max = 6,86, pemeriksaan ketiga (P3) diperoleh nilai rerata = 8,043 ; Standar Deviasi (SD) = 0,3; Min = 7,71 dan max = 8,5, serta pemeriksaan keempat (P4) diperoleh nilai rerata = 8,352 ; Standar Deviasi (SD) = 0,23; Min = 7,99 dan max = 8,62.

Adapun nilai rerata perubahan ekspresi mRNA Gen TLR4 pada kelompok preventif dari semua pemeriksaan dinyatakan dalam diagram grafik berikut :



Gambar 4.1. Perubahan nilai rerata ekspresi mRNA gen TLR4 kelompok preventif.

**b). Kelompok dengan Pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* sesudah injeksi *Salmonella typhi* (Kuratif).**

Ekspresi mRNA gen TLR4 hasil pemeriksaan pada kelompok sampel yang diberi ekstrak *Thalassia hemprichii* sesudah diinjeksi *Salmonella typhi* (kuratif) terangkum dalam tabel berikut :

Tabel 4.5. Hasil analisis deskripsi ekspresi mRNA gen TLR4 pada kelompok sampel yang diberi ekstrak *Thalassia hemprichii* sesudah diinjeksi *Salmonella typhi* (Kuratif).

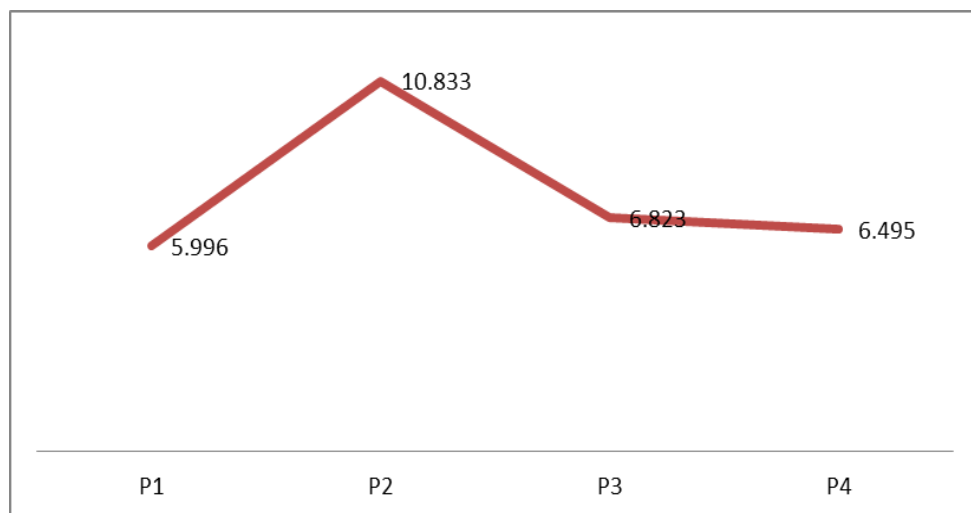
| Pemeriksaan | Mean   | SD   | Min   | Max   |
|-------------|--------|------|-------|-------|
| P1          | 5,996  | 0,34 | 5,57  | 6,38  |
| P2          | 10,833 | 0,49 | 10,22 | 11,47 |
| P3          | 6,823  | 0,37 | 6,44  | 7,29  |
| P4          | 6,495  | 0,32 | 6,18  | 6,89  |

Sumber data : Data Primer, 2019

Berdasarkan tabel 4.5 diatas dapat dijelaskan bahwa ekspresi gen pada pemeriksaan awal (P1) diperoleh nilai rerata = 5,996 ; Standar Deviasi (SD) = 0,34; Min = 5,57 dan max = 6,38, pemeriksaan kedua (P2)

diperoleh nilai rerata = 10,833 ; Standar Deviasi (SD) = 0,49; Min = 10,22 dan max = 11,47, pemeriksaan ketiga (P3) diperoleh nilai rerata = 6,823 ; Standar Deviasi (SD) = 0,37; Min = 6,44 dan max = 7,29, serta pemeriksaan keempat (P4) diperoleh nilai rerata = 6,493 ; Standar Deviasi (SD) = 0,32; Min = 6,18 dan max = 6,89.

Adapun nilai rerata perubahan ekspresi mRNA gen TLR4 pada kelompok sampel yang diberi ekstrak *Thalassia hemprichii* sesudah diinjeksi *Salmonella typhi* dari semua pemeriksaan dinyatakan dalam diagram grafik berikut :



Gambar 4.2. Perubahan nilai rerata ekspresi mRNA gen TLR4 kelompok sampel yang diberi ekstrak *Thalassia hemprichii* sesudah diinjeksi *Salmonella typhi* (kuratif).

**c). Kelompok dengan Pemberian Antibiotik *Levofloxacin* sesudah injeksi *Salmonella typhi*.**

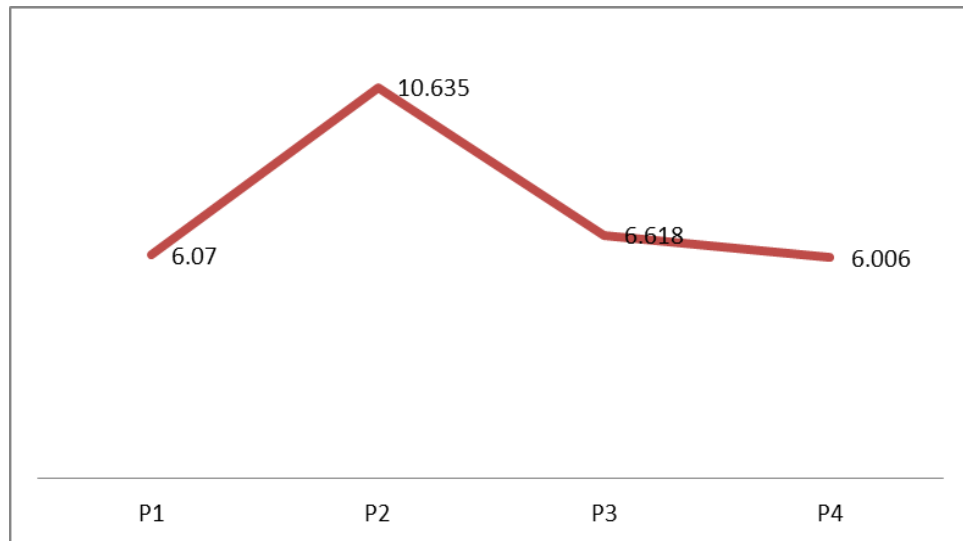
Ekspresi mRNA gen TLR4 hasil pemeriksaan pada kelompok sampel yang diberi antibiotik *levofloxacin* sesudah diinjeksi *Salmonella typhi* (kuratif) terangkum dalam tabel berikut :

Tabel 4.6 Hasil analisis deskripsi ekspresi mRNA gen TLR4 pada kelompok sampel yang diberi antibiotik *levofloxacin* sesudah diinjeksi *Salmonella thypi* (kuratif).

| <b>Pemeriksaan</b> | <b>Mean</b> | <b>SD</b> | <b>Min</b> | <b>Max</b> |
|--------------------|-------------|-----------|------------|------------|
| P1                 | 6,07        | 0,51      | 5,51       | 6,78       |
| P2                 | 10,635      | 0,44      | 10,03      | 11,16      |
| P3                 | 6,618       | 0,33      | 6,15       | 7,02       |
| P4                 | 6,006       | 0,42      | 5,57       | 6,57       |

Berdasarkan tabel 4.6 diatas dapat dijelaskan bahwa ekspresi gen pada pemeriksaan awal (P1) diperoleh nilai rerata = 6,07 ; Standar Deviasi (SD) = 0,51; Min = 5,51 dan max = 6,78, pemeriksaan kedua (P2) diperoleh nilai rerata = 10,635 ; Standar Deviasi (SD) = 0,44; Min = 10,03 dan max = 11,16, pemeriksaan ketiga (P3) diperoleh nilai rerata = 6,618 ; Standar Deviasi (SD) = 0,33; Min = 6,15 dan max = 7,02, serta pemeriksaan keempat (P4) diperoleh nilai rerata = 6,006 ; Standar Deviasi (SD) = 0,42; Min = 5,57 dan max = 6,57.

Adapun nilai rerata perubahan ekspresi mRNA gen TLR4 pada kelompok yang diberi antibiotik *levofloxacin* sesudah diinjeksi *Salmonella typhi* dari semua pemeriksaan dinyatakan dalam diagram grafik berikut :



Gambar 4.3. Perubahan nilai rerata ekspresi mRNA gen TLR4 kelompok sampel yang diberi antibiotik *levofloxacin* sesudah diinjeksi *Salmonella typhi* (Kuratif).

**d). Kelompok dengan pemberian *Aquadest* sesudah injeksi *Salmonella typhi*.**

Ekspresi mRNA gen TLR4 hasil pemeriksaan pada kelompok sampel yang diberi aquadest sesudah diinjeksi *Salmonella typhi* (kuratif) terangkum dalam tabel berikut :

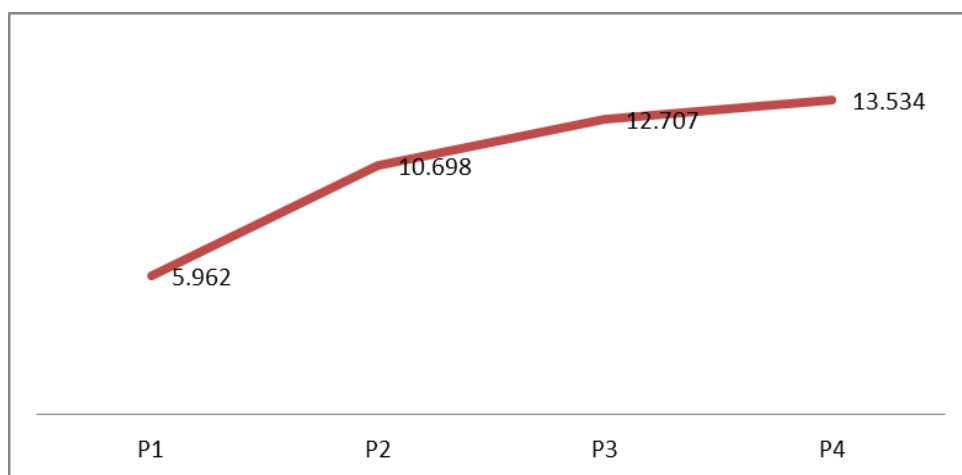
Tabel 4.7. Hasil analisis deskripsi ekspresi mRNA gen TLR4 pada kelompok sampel yang diberi aquadest sesudah diinjeksi *Salmonella typhi* (Kuratif).

| Pemeriksaan | Mean   | SD    | Min   | Max   |
|-------------|--------|-------|-------|-------|
| P1          | 5,962  | 0,48  | 5,4   | 6,61  |
| P2          | 10,698 | 0,411 | 10,13 | 11,2  |
| P3          | 12,707 | 0,42  | 12,15 | 13,21 |
| P4          | 13,534 | 0,3   | 13,09 | 13,89 |

Berdasarkan tabel 4.7 diatas dapat dijelaskan bahwa ekspresi gen pada pemeriksaan awal (P1) diperoleh nilai rerata = 5,962 ; Standar

Deviasi (SD) = 0,48; Min = 5,4 dan max = 6,61, pemeriksaan kedua (P2) diperoleh nilai rerata = 10,698 ; Standar Deviasi (SD) = 0,411; Min = 10,13 dan max = 11,2, pemeriksaan ketiga (P3) diperoleh nilai rerata = 12,707 ; Standar Deviasi (SD) = 0,42; Min = 12,15 dan max = 13,21, serta pemeriksaan keempat (P4) diperoleh nilai rerata = 13,534 ; Standar Deviasi (SD) = 0,3; Min = 13,09 dan max = 13,89.

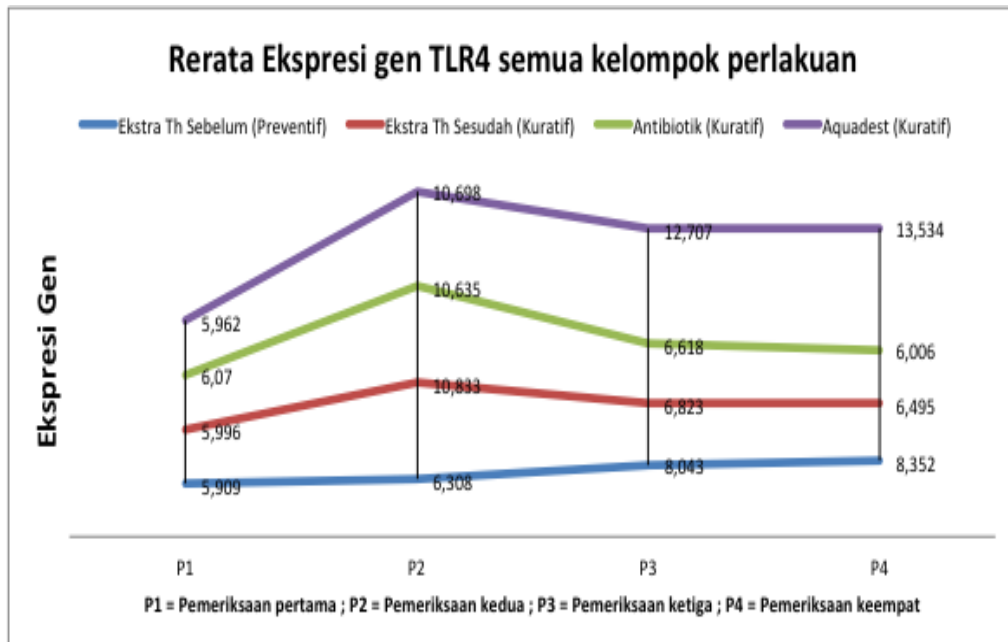
Adapun nilai rerata perubahan ekspresi mRNA gen TLR4 pada kelompok yang diberi aquadest sesudah diinjeksi *Salmonella typhi* dari semua pemeriksaan dinyatakan dalam diagram grafik berikut :



**Gambar 4.4. Perubahan nilai rerata ekspresi mRNA gen TLR4 kelompok sampel yang diberi aquadest sesudah diinjeksi *Salmonella typhi* (Kuratif).**

Secara lengkap rerata ekspresi mRNA gen TLR4 keempat kelompok yakni Kelompok mencit yang diberikan ekstrak *Thalassia hemprichii* sebelum injeksi bakteri *Salmonella typhi* (Preventif), Kelompok mencit yang diberikan ekstrak *Thalassia hemprichii* sesudah injeksi bakteri *Salmonella typhi* (Kuratif), Kelompok mencit yang diberikan levofloxacin

sesudah injeksi bakteri *Salmonella typhi* (Kuratif), Kelompok mencit yang diberikan aquades sesudah injeksi bakteri *Salmonella typhi* (Kuratif) direpresentasikan pada grafik berikut :



**Gambar 4.5. Ekspresi mRNA gen TLR4 secara lengkap.**

#### 4.1.5. Hasil Deskripsi Perubahan kadar TLR4.

Adapun hasil analisis statistik kadar TLR4 ditampilkan dengan sistematika sebagai berikut :

##### a). Kelompok dengan pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* sebelum injeksi *Salmonella typhi* (Preventif)

Kadar TLR4 hasil pemeriksaan pada kelompok sampel yang diberi ekstrak *Thalassia hemprichii* sebelum diinjeksi *Salmonella typhi* (preventif) terangkum dalam tabel berikut :



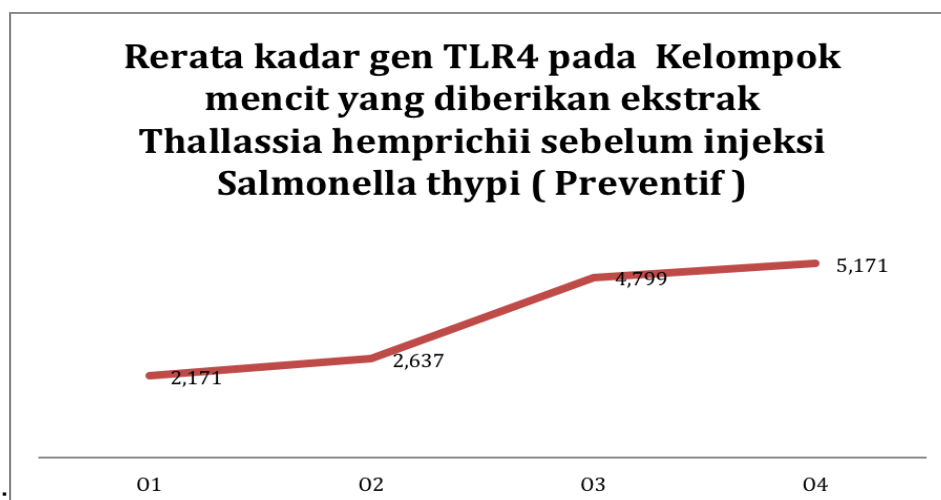
Tabel 4.8. Hasil analisis deskripsi kadar TLR4 pada kelompok yang diberikan ekstrak *Thalassia hemprichii* sebelum injeksi *Salmonella typhi* (preventif).

| Pemeriksaan | Mean  | SD          | Min   | Max   |
|-------------|-------|-------------|-------|-------|
| P1          | 2,171 | 0,527802128 | 1,490 | 2,748 |
| P2          | 2,637 | 0,546000547 | 2,049 | 3,308 |
| P3          | 4,799 | 0,722628938 | 4,146 | 5,964 |
| P4          | 5,171 | 0,371316862 | 4,752 | 5,684 |

Sumber data : *Data Primer, 2019*

Berdasarkan tabel 4.8. diatas dapat dijelaskan bahwa kadar TLR4 pada pemeriksaan awal (P1) diperoleh nilai rerata = 2,171; Standar Deviasi (SD) = 0,527802128 ; Min = 1,490 dan max = 2,748, pemeriksaan kedua (P2) diperoleh nilai rerata = 2,637; Standar Deviasi (SD) = 0,546000547; Min = 2,049 dan max = 3,308, pemeriksaan ketiga (P3) diperoleh nilai rerata = 4,799; Standar Deviasi (SD) = 0,722628938; Min = 4,146 dan max = 5,964, serta pemeriksaan keempat (P4) diperoleh nilai rerata = 5,171; Standar Deviasi (SD) = 0,371316862; Min = 4,752 dan max = 5,684.

Adapun perubahan nilai rerata kadar TLR4 pada kelompok preventif dari semua pemeriksaan dinyatakan dalam diagram grafik berikut



Gambar 4.7. Perubahan nilai rerata kadar TLR4 kelompok preventif.

**b). Kelompok dengan Pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* sesudah injeksi *Salmonella typhi* (Kuratif).**

Kadar TLR4 hasil pemeriksaan pada kelompok sampel yang diberi ekstrak *Thalassia hemprichii* sesudah diinjeksi *Salmonella typhi* (kuratif) terangkum dalam tabel berikut :

Tabel 4.9. Hasil analisis deskripsi kadar TLR4 pada kelompok sampel yang diberi ekstrak *Thalassia hemprichii* sesudah diinjeksi *Salmonella typhi* (Kuratif).

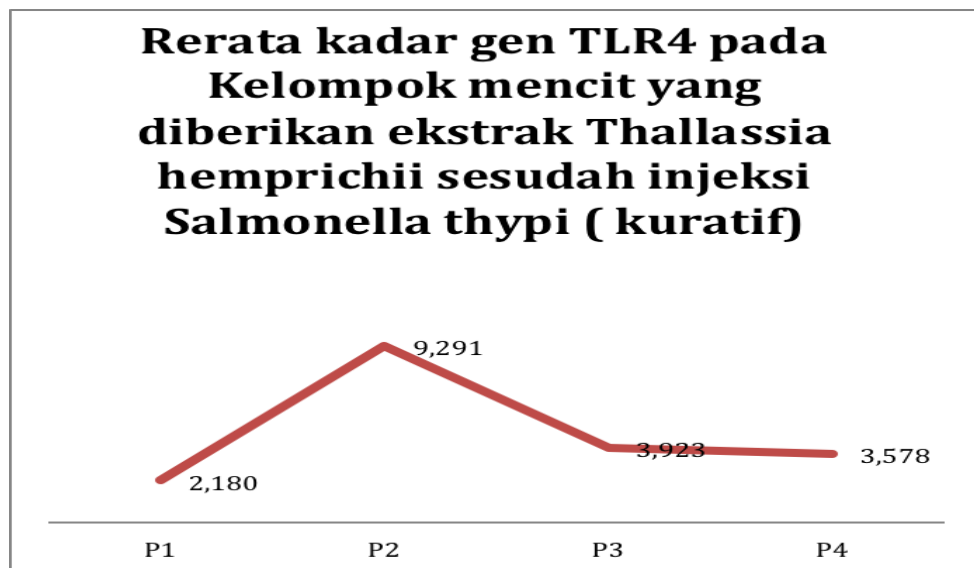
| Pengamatan | Mean  | SD          | Min   | Max    |
|------------|-------|-------------|-------|--------|
| P1         | 2,180 | 0,491371771 | 1,677 | 2,935  |
| P2         | 9,291 | 0,799379377 | 8,387 | 10,297 |
| P3         | 3,923 | 0,646002949 | 3,168 | 4,705  |
| P4         | 3,578 | 0,685149987 | 2,655 | 4,426  |

Sumber data : Data Primer, 2019

Berdasarkan tabel 4.9 diatas dapat dijelaskan bahwa kadar TLR4 pada pemeriksaan awal (P1) diperoleh nilai rerata = 2,180; Standar

Deviasi (SD) = 0,491371771; Min = 1,677 dan max = 6,38, pemeriksaan kedua (P2) diperoleh nilai rerata = 9,291; Standar Deviasi (SD) = 0,799379377; Min = 10,22 dan max = 11,47, pemeriksaan ketiga (P3) diperoleh nilai rerata = 3,923; Standar Deviasi (SD) = 0,646002949; Min = 3,168 dan max = 4,705, serta pemeriksaan keempat (P4) diperoleh nilai rerata = 3,578; Standar Deviasi (SD) = 0,685149987; Min = 2,655 dan max = 4,426.

Adapun perubahan nilai rerata kadar TLR4 pada kelompok sampel yang diberi ekstrak *Thalassia hemprichii* sesudah diinjeksi *Salmonella typhi* dari semua pemeriksaan dinyatakan dalam diagram grafik berikut :



Gambar 4.8. Perubahan nilai rerata kadar TLR4 kelompok sampel yang diberi ekstrak *Thalassia hemprichii* sesudah diinjeksi *Salmonella typhi* (kuratif).

**c). Kelompok dengan Pemberian Antibiotik *Levofloxacin* sesudah injeksi *Salmonella typhi*.**

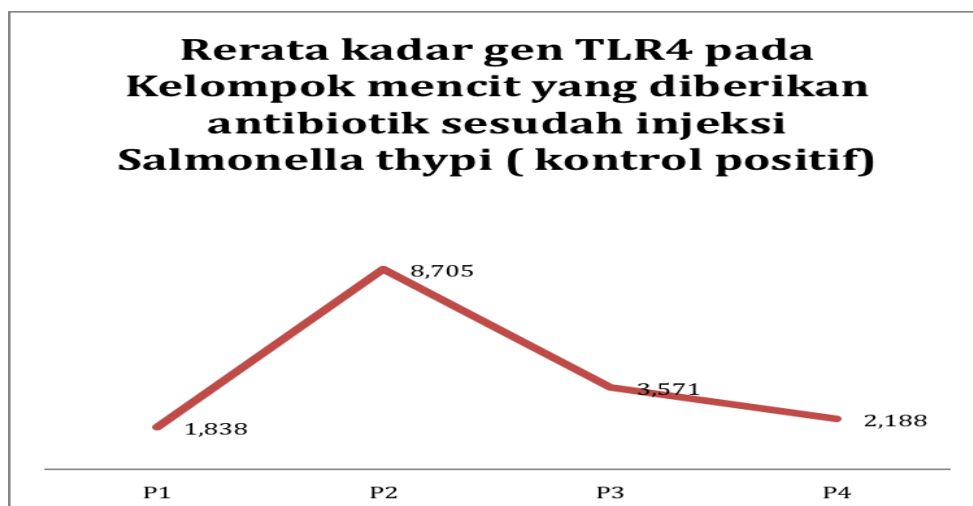
Kadar TLR4 hasil pemeriksaan pada kelompok sampel yang diberi antibiotik *levofloxacin* sesudah diinjeksi *Salmonella typhi* (kuratif) terangkum dalam tabel berikut :

Tabel 4.10. Hasil analisis deskripsi kadar TLR4 pada kelompok sampel yang diberi antibiotik *levofloxacin* sesudah diinjeksi *Salmonella typhi* (kuratif).

| Pemeriksaan | mean  | SD          | Min   | Max   |
|-------------|-------|-------------|-------|-------|
| P1          | 1,838 | 0,683187149 | 1,063 | 2,676 |
| P2          | 8,705 | 0,805224396 | 7,746 | 9,682 |
| P3          | 3,571 | 0,462759055 | 3,045 | 4,105 |
| P4          | 2,188 | 0,81843962  | 1,201 | 3,276 |

Berdasarkan table 4.10. diatas dapat dijelaskan bahwa kadar gen pada pemeriksaan awal (P1) diperoleh nilai rerata = 1,838 ; Standar Deviasi (SD) = 0,683187149; Min = 1,063 dan max = 2,676, pemeriksaan kedua (P2) diperoleh nilai rerata = 8,705; Standar Deviasi (SD) = 0,805224396; Min = 7,746 dan max = 9,682, pemeriksaan ketiga (P3) diperoleh nilai rerata = 3,571 ; Standar Deviasi (SD) = 0,462759055; Min = 3,045 dan max = 4,105, serta pemeriksaan keempat (P4) diperoleh nilai rerata = 2,188; Standar Deviasi (SD) = 0,81843962; Min = 1,201 dan max = 3,276.

Adapun nilai rerata perubahan kadar TLR4 pada kelompok yang diberi antibiotik *levofloxacin* sesudah diinjeksi *Salmonella typhi* dari semua pemeriksaan dinyatakan dalam diagram grafik berikut :



Gambar 4.9. Perubahan nilai rerata kadar TLR4 kelompok sampel yang diberi antibiotik *levofloxacin* sesudah diinjeksi *Salmonella typhi* (Kuratif).

**d). Kelompok dengan pemberian *aquadest* sesudah injeksi *Salmonella typhi*.**

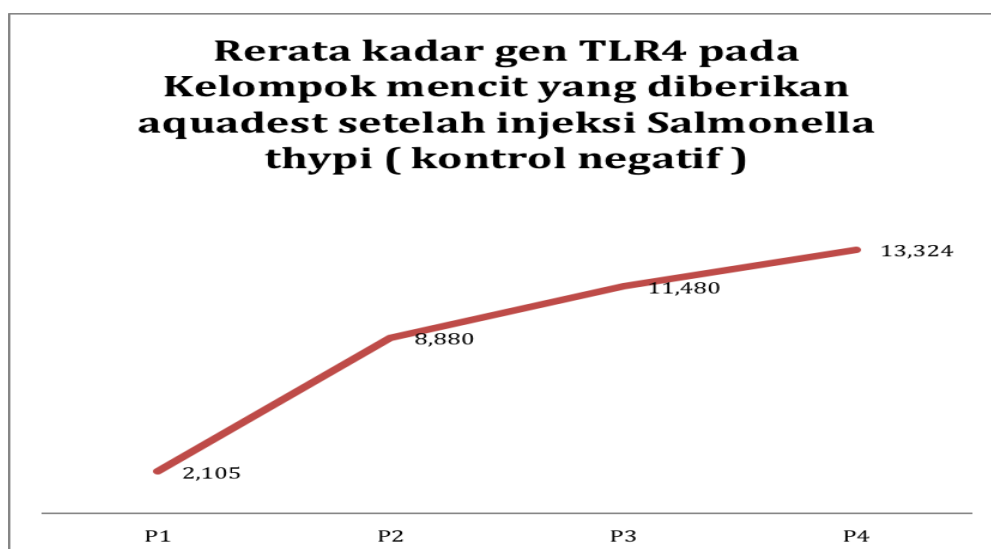
Kadar TLR4 hasil pemeriksaan pada kelompok sampel yang diberi *aquadest* sesudah diinjeksi *Salmonella typhi* (kuratif) terangkum dalam tabel berikut :

Tabel 4.11. Hasil analisis deskripsi kadar TLR4 pada kelompok sampel yang diberi *aquadest* sesudah diinjeksi *Salmonella typhi* (Kuratif).

| Pemeriksaan | Mean   | SD          | Min    | Max    |
|-------------|--------|-------------|--------|--------|
| P1          | 2,105  | 0,56694917  | 1,478  | 2,815  |
| P2          | 8,880  | 0,783968976 | 8,253  | 10,143 |
| P3          | 11,480 | 0,641985952 | 10,650 | 12,310 |
| P4          | 13,324 | 0,513257734 | 12,724 | 13,969 |

Berdasarkan tabel 4.11. diatas dapat dijelaskan bahwa kadar TLR4 pada pemeriksaan awal (P1) diperoleh nilai rerata = 2,105 ; Standar Deviasi (SD) = 0,56694917; Min = 1,478 dan max = 2,815, pemeriksaan kedua (P2) diperoleh nilai rerata = 8,880; Standar Deviasi (SD) = 0,783968976; Min = 8,253 dan max = 10,143, pemeriksaan ketiga (P3) diperoleh nilai rerata = 11,480 ; Standar Deviasi (SD) = 0,641985952; Min = 10,650 dan max = 12,310, serta pemeriksaan keempat (P4) diperoleh nilai rerata = 13,324; Standar Deviasi (SD) = 0,513257734; Min = 12,724 dan max = 13,969.

Adapun nilai rerata perubahan kadar TLR4 pada kelompok yang diberi aquadest sesudah diinjeksi *Salmonella typhi* dari semua pemeriksaan dinyatakan dalam diagram grafik berikut :



Gambar 4.10 Perubahan nilai rerata kadar TLR4 kelompok sampel yang diberi aquadest sesudah diinjeksi *Salmonella typhi* (Kuratif).

**4.1.6. Hasil uji efek Ekstrak *Thalassia hemprichii* sebelum injeksi *Salmonella typhi* (Preventif).**

Hasil analisis statistik dengan pengolahan SPSS versi 22 diperoleh output :

a). Uji Homogenitas

**Tabel. 4.12. Hasil Uji Homogenitas data ekspresi gen  
Test of Homogeneity of Variances**

Ekspresi

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| 1.917            | 3   | 16  | .168 |

Berdasarkan Tabel 4.12. diperoleh nilai sig = 0,168 >  $\alpha = 0,01$  artinya data ekspresi mRNA gen TLR4 pada kelompok yang diberi ekstrak *Thalassia hemprichii* sebelum injeksi *Salmonella typhi* adalah homogen.

b). Anova

Hasil teknik analisis one way ANOVA pada taraf signifikan  $\alpha=0,01$  atau 99% dituangkan dalam tabel berikut:

**Tabel 4.13. Hasil Analisis of Varians  
ANOVA**

Ekspresi

|                | Sum of Squares | Df | Mean Square | F      | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Between Groups | 22.457         | 3  | 7.486       | 54.977 | .000 |
| Within Groups  | 2.179          | 16 | .136        |        |      |
| Total          | 24.636         | 19 |             |        |      |

Selanjutnya sebagai uji lanjut (*post hoc comparisons*) menggunakan uji bonferroni dengan taraf kepercayaan 99% ( $\alpha = 0,01$ ) dirangkum dalam tabel berikut :

**Tabel 4.14. Hasil uji lanjut**

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: Ekspresi  
Bonferroni

| (I) Preventif                       | (J) Preventif                       | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig.  | 99% Confidence Interval |             |
|-------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------|------------|-------|-------------------------|-------------|
|                                     |                                     |                       |            |       | Lower Bound             | Upper Bound |
| Sebelum Perlakuan                   | 10 hari setelah perlakuan Ekstra Th | -.398800              | .233376    | .641  | -1.27921                | .48161      |
|                                     | hari ke-3 setelah diinfeksi ST      | -2.134200*            | .233376    | .000  | -3.01461                | -1.25379    |
|                                     | hari ke -10 setelah diinfeksi ST    | -2.442800*            | .233376    | .000  | -3.32321                | -1.56239    |
| 10 hari setelah perlakuan Ekstra Th | Sebelum Perlakuan                   | .398800               | .233376    | .641  | -.48161                 | 1.27921     |
|                                     | hari ke-3 setelah diinfeksi ST      | -1.735400*            | .233376    | .000  | -2.61581                | -.85499     |
|                                     | hari ke -10 setelah diinfeksi ST    | 2.044000*             | .233376    | .000  | 2.92441                 | 1.16359     |
| hari ke-3 setelah diinfeksi ST      | Sebelum Perlakuan                   | 2.134200              | .233376    | .000  | 1.25379                 | 3.01461     |
|                                     | 10 hari setelah perlakuan Ekstra Th | 1.735400*             | .233376    | .000  | .85499                  | 2.61581     |
|                                     | hari ke -10 setelah diinfeksi ST    | -.308600              | .233376    | 1.000 | -1.18901                | .57181      |
| hari ke -10 setelah diinfeksi ST    | Sebelum Perlakuan                   | 2.442800              | .233376    | .000  | 1.56239                 | 3.32321     |
|                                     | 10 hari setelah perlakuan Ekstra Th | 2.044000*             | .233376    | .000  | 1.16359                 | 2.92441     |
|                                     | hari ke-3 setelah diinfeksi ST      | .308600               | .233376    | 1.000 | -.57181                 | 1.18901     |

\*. The mean difference is significant at the 0.01 level.



#### 4.1.7. Hasil uji efek Ekstrak *Thalassia hemprichii* sesudah injeksi *Salmonella typhi* (Kuratif).

Hasil analisis statistik dengan pengolahan SPSS versi 22 diperoleh output :

##### a). Uji Homogenitas varians

**Tabel. 4.15. Hasil Uji Homogenitas data  
Test of Homogeneity of Variances**

Ekspresi Gen

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| .475             | 3   | 16  | .704 |

Berdasarkan Tabel 4.15. diperoleh nilai sig = 0,704 >  $\alpha = 0,01$  artinya data ekspresi gen mRNA TLR4 pada kelompok-kelompok pengamatan yang diberi ekstrak *Thalassia hemprichii* sesudah injeksi *Salmonella typhi* adalah homogen.

##### b). Anova

Hasil teknik analisis one way ANOVA pada taraf signifikan  $\alpha = 0,01$  atau 99% dituangkan dalam tabel berikut :

**Tabel 4.16. Hasil Analisis of Varians**

**ANOVA**

Ekspresi Gen

|                | Sum of Squares | Df | Mean Square | F           | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|-------------|------|
| Between Groups | 74.165         | 3  | 24.722      | 16<br>7.077 | .000 |
| Within Groups  | 2.367          | 16 | .148        |             |      |
| Total          | 76.532         | 19 |             |             |      |

Selanjutnya Sebagai uji lanjut (*post hoc comparisons*) dengan uji bonferroni dengan taraf kepercayaan 99% ( $\alpha = 0,01$ ) dirangkum dalam table berikut :

**Tabel 4.17. Hasil uji lanjut**

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: Ekspresi Gen  
Bonferroni

| (I) Kuratif_1                          | (J) Kuratif_1                          | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig.  | 99% Confidence Interval |             |
|--|--|-----------------------|------------|-------|-------------------------|-------------|
|  |  |                       |            |       | Lower Bound             | Upper Bound |
| Sebelum perlakuan                      | 3 hari setelah diinfeksi St            | -4.836800*            | .243282    | .000  | -5.75458                | -3.91902    |
|  | 7 hari setelah perlakuan ekstraksi Th  | -.827000              | .243282    | .022  | -1.74478                | .09078      |
|  | 14 hari setelah perlakuan ekstraksi Th | -.498800              | .243282    | .343  | -1.41658                | .41898      |
| 3 hari setelah diinfeksi St            | Sebelum perlakuan                      | 4.836800              | .243282    | .000  | 3.91902                 | 5.75458     |
|  | 7 hari setelah perlakuan ekstraksi Th  | 4.009800*             | .243282    | .000  | 3.09202                 | 4.92758     |
|  | 14 hari setelah perlakuan ekstraksi Th | 4.338000*             | .243282    | .000  | 3.42022                 | 5.25578     |
| 7 hari setelah perlakuan ekstraksi Th  | Sebelum perlakuan                      | .827000               | .243282    | .022  | -.09078                 | 1.74478     |
|  | 3 hari setelah diinfeksi St            | -4.009800*            | .243282    | .000  | -4.92758                | -3.09202    |
|  | 14 hari setelah perlakuan ekstraksi Th | .328200               | .243282    | 1.000 | -.58958                 | 1.24598     |
| 14 hari setelah perlakuan ekstraksi Th | Sebelum perlakuan                      | .498800               | .243282    | .343  | -.41898                 | 1.41658     |
|  | 3 hari setelah diinfeksi St            | -                     | .24        | .     | -                       | -           |
|  | 7 hari setelah perlakuan ekstraksi Th  | 4.338000*             | .3282      | .000  | 5.25578                 | 3.42022     |
|  |  | -                     | .24        | 1     | -                       | .58         |
|  |  | .328200               | .3282      | .000  | 1.24598                 | .958        |

\*. The mean difference is significant at the 0.01 level.

**4.1.8. Hasil Uji efek pemberian antibiotik *levofloxacin* sesudah injeksi *Salmonella typhi***

Hasil analisis statistik dengan pengolahan SPSS versi 22 diperoleh output :

a). Uji Homogenitas varians

**Tabel. 4.18. Hasil Uji Homogenitas data ekspresi gen  
Test of Homogeneity of Variances**

Ekspresi Gen

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| .355             | 3   | 16  | .786 |

Berdasarkan Tabel 4.18. diperoleh nilai sig = 0,786 >  $\alpha = 0,01$  artinya data ekspresi mRNA gen TLR4 pada kelompok yang diberi levofloxacin sesudah injeksi *Salmonella typhi* adalah homogen.

b). Anova

Hasil teknik analisis one way ANOVA pada taraf signifikan  $\alpha=0,01$  atau 99% dituangkan dalam tabel berikut :

**Tabel 4.19. Hasil Analisis of Varians**

**ANOVA**

Ekspresi Gen

|                | Sum of Squares | Df | Mean Square | F       | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|------|
| Between Groups | 73.848         | 3  | 24.616      | 131.953 | .000 |
| Within Groups  | 2.985          | 16 | .187        |         |      |
| Total          | 76.833         | 19 |             |         |      |

Selanjutnya Sebagai uji lanjut (*post hoc comparisons*) menggunakan uji bonferroni dengan taraf kepercayaan 99% ( $\alpha = 0,01$ ) dirangkum dalam tabel berikut :

**Tabel 4.20. Hasil uji lanjut**

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: eksGEN  
Bonferroni

| (I) Obat                                    | (J) Obat                                    | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig.  | 99% Confidence Interval |             |
|---|---|-----------------------|------------|-------|-------------------------|-------------|
|   |   |                       |            |       | Lower Bound             | Upper Bound |
| sebelum perlakuan                           | 3 hari sesudah diinjeksi ST                 | -4.565400*            | .273167    | .000  | -5.59593                | -3.53487    |
|   | 7 hari sesudah pemberian Obat Levofloxacin  | -.549000              | .273167    | .370  | -1.57953                | .48153      |
|   | 14 hari sesudah pemberian obat Levofloxacin | .063200               | .273167    | 1.000 | -.96733                 | 1.09373     |
| 3 hari sesudah diinjeksi ST                 | sebelum perlakuan                           | 4.565400*             | .273167    | .000  | 3.53487                 | 5.59593     |
|   | 7 hari sesudah pemberian Obat Levofloxacin  | 4.016400*             | .273167    | .000  | 2.98587                 | 5.04693     |
|   | 14 hari sesudah pemberian obat Levofloxacin | 4.628600*             | .273167    | .000  | 3.59807                 | 5.65913     |
| 7 hari sesudah pemberian Obat Levofloxacin  | sebelum perlakuan                           | .549000               | .273167    | .370  | -.48153                 | 1.57953     |
|   | 3 hari sesudah diinjeksi ST                 | -4.016400*            | .273167    | .000  | -5.04693                | -2.98587    |
|   | 14 hari sesudah pemberian obat Levofloxacin | .612200               | .273167    | .237  | -.41833                 | 1.64273     |
| 14 hari sesudah pemberian obat Levofloxacin | sebelum perlakuan                           | -.063200              | .273167    | 1.000 | -1.09373                | .96733      |
|   | 3 hari sesudah diinjeksi ST                 | -4.628600*            | .273167    | .000  | -5.65913                | -3.59807    |
|   | 7 hari sesudah pemberian Obat Levofloxacin  | -.612200              | .273167    | .237  | -1.64273                | .41833      |

\*. The mean difference is significant at the 0.01 level.

**4.1.9. Hasil Uji efek pemberian aquadest sesudah injeksi *Salmonella typhi*.**

Hasil analisis statistik dengan pengolahan SPSS versi 22 diperoleh output :

a). Uji Homogenitas varians

**Tabel. 4.21. Hasil Uji Homogenitas data ekspresi gen  
Test of Homogeneity of Variances**

EKSPgEn

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| .606             | 3   | 16  | .621 |

Berdasarkan Tabel 4.21. diperoleh nilai sig = 0,621 >  $\alpha = 0,01$  artinya data ekspresi gen TLR4 pada kelompok yang diberi aquadest sesudah injeksi *Salmonella typhi* adalah homogen.

b). Anova

Hasil teknik analisis one way ANOVA pada taraf signifikan  $\alpha=0,01$  atau 99% dituangkan dalam tabel berikut :

**Tabel 4.22. Hasil Analisis of Varians**

**ANOVA**

EKSPgEn

|                | Sum of Squares | Df | Mean Square | F       | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|------|
| Between Groups | 172.567        | 3  | 57.522      | 339.668 | .000 |
| Within Groups  | 2.710          | 16 | .169        |         |      |
| Total          | 175.276        | 19 |             |         |      |

Selanjutnya Sebagai uji lanjut (*post hoc comparisons*) dengan uji bonferroni dengan taraf kepercayaan 99% ( $\alpha = 0,01$ ) dirangkum dalam tabel berikut :

**Tabel 4.23. Hasil uji lanjut**

**Multiple Comparisons**  
Dependent Variable: EKSPgEn  
Bonferroni

| (I)<br>Aquadest                          | (J) Aquadest                    | Mean<br>Difference<br>(I-J) | Std. Error | Sig. | 99% Confidence<br>Interval |                |
|--|---------------------------------|-----------------------------|------------|------|----------------------------|----------------|
|  |                                 |                             |            |      | Lower<br>Bound             | Upper<br>Bound |
| sebelum<br>perlakuan                     | 3 hari sesudah diinjeksi ST     | -4.736400                   | .260268    | .000 | -5.71826                   | -3.75454       |
|  | 7 hari sesudah diberi aquadest  | -6.745800*                  | .260268    | .000 | -7.72766                   | -5.76394       |
|  | 14 hari sesudah diberi aquadest | -7.572800*                  | .260268    | .000 | -8.55466                   | -6.59094       |
| 3 hari<br>sesudah<br>diinjeksi<br>ST     | sebelum perlakuan               | 4.736400                    | .260268    | .000 | 3.75454                    | 5.71826        |
|  | 7 hari sesudah diberi aquadest  | -2.009400*                  | .260268    | .000 | -2.99126                   | -1.02754       |
|  | 14 hari sesudah diberi aquadest | -2.836400*                  | .260268    | .000 | -3.81826                   | -1.85454       |
| 7 hari<br>sesudah<br>diberi<br>aquadest  | sebelum perlakuan               | 6.745800                    | .260268    | .000 | 5.76394                    | 7.72766        |
|  | 3 hari sesudah diinjeksi ST     | 2.009400*                   | .260268    | .000 | 1.02754                    | 2.99126        |
|  | 14 hari sesudah diberi aquadest | -.827000                    | .260268    | .035 | -1.80886                   | .15486         |
| 14 hari<br>sesudah<br>diberi<br>aquadest | sebelum perlakuan               | 7.572800                    | .260268    | .000 | 6.59094                    | 8.55466        |
|  | 3 hari sesudah diinjeksi ST     | 2.836400*                   | .260268    | .000 | 1.85454                    | 3.81826        |
|  | 7 hari sesudah diberi aquadest  | .827000                     | .260268    | .035 | -.15486                    | 1.80886        |

\*. The mean difference is significant at the 0.01 level.

**4.1.10. Hasil Uji efek pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* sebelum dengan sesudah injeksi *Salmonella typhi*.**

a). Uji Homogenitas varians

**Tabel. 4.24. Hasil Uji Homogenitas data ekspresi gen  
Test of Homogeneity of Variances**

Ekspresi Gen

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| 5.531            | 1   | 38  | .024 |

Berdasarkan Tabel 4.24. diperoleh nilai sig = 0,024 >  $\alpha = 0,01$  artinya data ekspresi mRNA gen TLR4 pada kelompok yang diberi ekstrak *Thalassia hemprichii* sebelum dan sesudah injeksi *Salmonella typhi* adalah homogen.

b). Anova

Hasil teknik analisis one way ANOVA pada taraf signifikan  $\alpha=0,01$  atau 99% dituangkan dalam tabel berikut :

**Tabel 4.25. Hasil Analisis of Varians  
ANOVA**

Ekspresi Gen

|                | Sum of Squares | Df | Mean Square | F    | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|------|------|
| Between Groups | 1.472          | 1  | 1.472       | .553 | .462 |
| Within Groups  | 101.168        | 38 | 2.662       |      |      |
| Total          | 102.640        | 39 |             |      |      |

Berdasarkan Tabel 4.25. diperoleh nilai Sig. = 0,462 >  $\alpha=0,01$ , sehingga dapat dikatakan bahwa rerata ekspresi mRNA gen TLR4 pada kelompok yang diberi ekstrak *Thalassia hemprichii* sebelum dengan sesudah injeksi *Salmonella typhi* adalah tidak berbeda. Oleh karena tidak terdapat perbedaan kelompok sebelum dan sesudah injeksi *Salmonella typhi* maka tidak dapat diteruskan pada uji lanjut (*poshot*).

## 4.2. Pembahasan

### 4.2.1 Uji Fitokimia

Hasil uji fitokimia pada Tabel 4.1 menunjukkan bahwa ekstrak *Thalassia hemprichii* memiliki kandungan senyawa bioaktif meliputi flavonoid, saponin dan tanin. Ekstrak *Thalassia hemprichii* dengan pelarut ethanol memperlihatkan respon positif terhadap uji flavonoid (Tabel. 4.1). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak mengandung senyawa bioaktif golongan flavonoid. Flavonoid dapat menghambat DNA gyrase, sehingga menyebabkan sintesis asam nukleat terganggu. Senyawa golongan flavonoid dilaporkan berperan aktif sebagai *antifouling*, dan berperan sebagai isolate terhadap penempelan organisme (Cushnie, T.P.Tim. Lamb, Andrew J., 2005). Penelitian lain menunjukkan *Thalassia hemprichi* memiliki potensi untuk menginhibisi bakteri pathogen and strain jamur (Nisa, Humeera., 2015). Flavonoid merupakan senyawa polifenol proaktif dalam kebanyakan tanaman dan tidak dapat disintesis atau diproduksi oleh manusia (Knekt P., et al., 2002). Ekstrak *Thalassia hemprichii* dengan pelarut ethanol memperlihatkan respon positif terhadap uji saponin (Tabel.



4.1). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak mengandung senyawa bioaktif golongan saponin. Saponin dapat menghambat DNA polymerase sehingga sintesis asam nukleat terganggu (McClure, R., & Massari, P., 2014). Ekstrak *Thalassia hemprichii* dengan pelarut ethanol memperlihatkan respon positif terhadap uji tanin (Tabel. 4.1). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak mengandung senyawa bioaktif golongan tanin. Tanin dapat menghambat pembentukan polipeptida dinding sel bakteri yang menyebabkan lisisnya dinding sel sehingga sel bakteri mati (Boakye, A. A., 2015). Tanin adalah senyawa organik yang terdiri dari campuran senyawa polifenol kompleks, dibangun dari elemen C, H, dan O serta sering membentuk molekul besar dengan berat molekul lebih besar dari 2000. Tanin dapat dijumpai pada hampir semua jenis tumbuhan hijau di seluruh dunia baik tumbuhan tingkat tinggi maupun tingkat rendah dengan kadar kualitas yang berbeda-beda (Puri, Pramadita Aristi., 2011). Menurut Malanggi *et al.* (2012), kandungan tanin yang semakin banyak maka aktivitas antioksidannya juga semakin besar karena tanin tersusun dari senyawa polifenol yang memiliki aktivitas penangkap radikal bebas. Mekanisme kerja antibakteri tanin mempunyai daya antibakteri dengan cara memprepitasi protein. Efek antibakteri tanin melalui reaksi dengan membran sel, inaktivasi enzim dan inaktivasi fungsi materi genetik. Mekanisme kerja tanin sebagai antibakteri adalah menghambat enzim reverse transkriptase dan DNA topoisomerase sehingga sel bakteri tidak dapat terbentuk (Sari, F.P. dan S. M. Sari, 2011). Tanin memiliki aktivitas antibakteri yang berhubungan dengan kemampuannya untuk

menginaktifkan adhesin sel mikroba, menginaktifkan enzim, dan mengganggu transport protein pada lapisan dalam sel (Madduluri., et al., 2013). Tanin juga mempunyai target pada polipeptida dinding sel sehingga pembentukan dinding sel menjadi kurang sempurna. Hal ini menyebabkan sel bakteri menjadi lisis karena tekanan osmotik maupun fisik sehingga sel bakteri akan mati (Kartika, Angga Raka Gde, 2016). Kompleksasi dari ion besi dengan tanin dapat menjelaskan toksisitas tanin. Mikroorganisme yang tumbuh di bawah kondisi aerobik membutuhkan zat besi untuk berbagai fungsi, termasuk reduksi dari prekursor ribonukleotida DNA. Enzim reverse transkriptase dan DNA topoisomerase sel bakteri tidak dapat terbentuk oleh kapasitas pengikat besi yang kuat oleh tannin (Ngajow, Mercy, 2013).

Penentuan kadar polifenol yang dilakukan pada ekstrak *Thalassia hemprichii* menunjukkan bahwa pada konsentrasi metanol 90% didapatkan kadar tanin sebesar 10.25 % (simplo), kemudian dilakukan pengulangan (duplo) dan memperoleh nilai yang tidak jauh berbeda yaitu 10,31 %. Polifenol mempunyai khasiat sebagai antibakteri dan antiinflamasi (Coppo, E., & Marchese, A. 2014., Laganà, P, et al.,2019). Polifenol dapat menekan over ekspresi mediator inflamasi melalui intervensi persinyalan TLR4/NFκB/STAT. Polifenol aktif (quercetin) kelas flavonoid melalui intervensi persinyalan TLR4/NFκB dapat menurunkan IL-6 sehingga memberikan efek *down regulates* produksi enzim inflamasi (Azam, S., et al., 2019).

#### 4.2.2 Uji Antioksidan

Aktivitas antioksidan diuji dengan menggunakan metode DPPH diinterpretasikan kedalam parameter IC50 atau konsentrasi penghambatan 50. Hasil uji tersebut sebagaimana Tabel 4.2 diatas menunjukkan bahwa nilai persentase absorbansi semakin rendah seiring dengan peningkatan jumlah konsentrasi ekstrak. yakni pada konsentrasi 10 µg/mL memiliki nilai absorbansi 0.355, konsentrasi 20 µg/mL dengan nilai absorbansi 0.335, konsentrasi 40 µg/mL dengan nilai absorbansi 0.299, konsentrasi 80 µg/mL dengan nilai absorbansi 0.201, konsentrasi 160 µg/mL dengan nilai absorbansi 0.085. Berbeda halnya dengan aktivitas antioksidan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak, maka semakin besar presentasi aktivitas antioksidan yakni konsentrasi 10 µg/mL memiliki nilai aktifitas antioksidan 16.08 %, konsentrasi 20 µg/mL dengan nilai aktifitas antioksidan 20.80 %, konsentrasi 40 µg/mL dengan nilai aktifitas antioksidan 29.31 %, konsentrasi 80 µg/mL dengan nilai aktifitas antioksidan 52.48 %, konsentrasi 160 µg/mL dengan nilai aktifitas antioksidan 87.75 %. Hasil uji tersebut, sebagaimana Amrun dan Umiyah (2005) berpendapat bahwa adanya penurunan absorbansi menunjukkan peningkatan kemampuan peredaman radikal bebas DPPH. Lebih lanjut, Hanani (2005) mengungkapkan bahwa aktivitas antioksidan dari suatu ekstrak dinyatakan dalam persentase peredaman terhadap radikal bebas DPPH. Sehingga dapat diartikan bahwa semakin besar konsentrasi

ekstrak mengakibatkan aktivitas antioksidan semakin besar atau persentase absorbansi semakin kecil.

Terkait hal tersebut, Santosa.,et al. (2012) mengungkapkan bahwa ekstrak lamun *Thalassia hemprichii*, *Cymodocea rotundata*, *Enhalus acoroides* dari Indonesia mengandung lebih banyak senyawa fenolik, sehingga menunjukkan aktivitas peredaman radikal bebas DPPH yang tinggi. Demikian pula Neelima, C.S.S.,et al. (2015) mengungkapkan bahwa di antara spesies lamun yang diselidiki, *Thalassia hemprichii* dan *Cymodocea serrulata* memiliki aktivitas peredaman DPPH yang tinggi.

Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak *Thalassia hemprichii* menggunakan metode DPPH yang dilakukan dengan pengulangan tiga kali berturut-turut diperoleh nilai IC<sub>50</sub> = 80,0331; 80, 6979 ; 82,1214 yang tergolong antioksidan kuat, sebagaimana Molyneux (2004) menyatakan bahwa suatu senyawa memiliki aktivitas antioksidan yang kuat bila nilai IC<sub>50</sub> = (50 ppm - 100 ppm). Molyneux (2004) menggolongkan aktivitas antioksidan berdasarkan nilai IC<sub>50</sub>, yaitu sangat kuat (IC<sub>50</sub> < 50 ppm), kuat (50 ppm - 100 ppm), sedang (100 ppm -150 ppm), lemah (150 ppm - 200 ppm), dan sangat lemah (IC<sub>50</sub> > 200 ppm). Lebih lanjut, Molyneux berpendapat bahwa semakin kecil nilai IC<sub>50</sub> maka aktivitas antioksidan semakin tinggi. *Thalassia hemprichii* juga memiliki metabolit sekunder yang unik yang tidak hanya dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan, namun memiliki peran sebagai antikanker, analisis secara invitro menggunakan sel HeLa menunjukkan bahwa ekstrak semipolar dan polar menunjukkan potensi sebagai anti kanker, tingkat letalitas sel dengan

ekstrak semipolar lebih tinggi daripada ekstrak polar, tetapi tidak berbeda dengan obat kanker doxorubicin (Hawas W Usama, 2016). Saat ini fitokimia telah menjadi fokus intens kepentingan penelitian, karena menguntungkan bagi kesehatan termasuk antikarsinoma, antiatherogenik, antiulser, anti trombotik, anti inflamasi, immunomodulatory, antimikroba, vasodilatory, dan efek analgesic. Oleh karena itu, pencarian untuk eksplorasi antioksidan alami terutama yang berasal dari tumbuhan telah sangat meningkat dalam beberapa tahun terakhir (Rao, et al., 2014).

#### **4.2.3 Uji Kandungan Gizi**

Hasil uji kandungan ekstrak *Thalassia hemprichii* (Tabel 4.3) menunjukkan bahwa kandungan air atau kadar air pada ekstrak adalah 11.09 %. Kadar air merupakan salah satu karakteristik yang sangat penting pada bahan pangan, karena air dapat mempengaruhi penampakan tekstur, dan cita rasa pada bahan pangan. Kadar air dalam bahan pangan ikut menentukan kesegaran dan daya awet bahan pangan tersebut, kadar air yang tinggi mengakibatkan mudahnya bakteri, kapang, dan khamir untuk berkembang biak, sehingga akan terjadi perubahan pada bahan pangan (Winarno, 2009). Kandungan Abu pada ekstrak adalah 2.07 %. Kandungan abu yang terkandung dalam suatu bahan menunjukkan jumlah mineral yang terkandung dalam bahan tersebut. Kandungan Protein Kasar pada ekstrak adalah 23.96 %. Tingginya nilai protein berhubungan erat dengan senyawa bioaktif yang dikandung oleh lamun tersebut (Coria M, et al., 2015). Topotubun (2005) mengatakan

bahwa bila kadar air suatu produk lebih kecil atau berkurang, maka nilai protein meningkat dan sebaliknya. Lemak Kasar yang terdapat pada ekstrak adalah 57.64 %. Thril, et al., 2009 menyebutkan bahwa jika lamun yang memiliki komponen asam lemak tidak jenuh lebih besar dibandingkan dengan asam lemak jenuh, maka dapat dikonsumsi dengan baik dan aman bagi kesehatan manusia. Kandungan karbohidrat pada ekstrak diperoleh nilai sebesar 7.22 %. Karbohidrat merupakan kandungan kimia yang umum terdapat pada bahan makanan dan merupakan sumber kalori yang paling utama. Karbohidrat merupakan kalori utama bagi hampir seluruh penduduk dunia (Winarti, 2006). Kandungan lain yang dimiliki ekstrak *Thalassia hemprichii* adalah Vitamin C 4.26 %, Beta Caroten 0.18 %, Polifenol 0.99 %, Calcium 0.42 %, Magnesium 0.37 % dan Zink 108.82 %.

#### **4.2.4 Efek Ekstrak *Thalassia hemprichii* terhadap ekspresi mRNA gen TLR4 sebelum injeksi bakteri *Salmonella typhi* (Preventif).**

Pada kelompok dengan pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* sebelum injeksi bakteri *Salmonella typhi*, dalam penelitian ini secara statistik dengan uji anova pada taraf kepercayaan 99 % (Tabel. 4.13) diperoleh nilai .sig (p-value) = 0.000 <  $\alpha$  = 0.01 atau dengan kata lain  $H_0$  ditolak artinya ada perbedaan ekspresi mRNA gen TLR4 pada kelompok-kelompok pemeriksaan atau dengan kata lain ada pengaruh ekstrak *Thalassia hemprichii* sebelum injeksi *Salmonella typhi* terhadap ekspresi mRNA gen TLR4, dengan peningkatan rerata mean dari pemeriksaan sebelum perlakuan (P1) = 5,909; setelah 10 hari pemberian ekstrak (P2) =

6,308; setelah 3 hari injeksi (P3) = 8,043 sampai hari ke-10 post injeksi (P4) = 8,352 (lihat Gambar 4.1). Dari hasil tersebut terlihat bahwa besarnya peningkatan ekspresi mRNA gen TLR4 setelah injeksi berbeda antara kedua kelompok pemeriksaan P3 dan P4 artinya ekstrak *Thalassia hemprichii* yang diberikan sebelum injeksi mempunyai efek terhadap ekspresi mRNA gen TLR4, yaitu menekan kenaikan ekspresi mRNA gen TLR4.

Hasil kultur untuk kelompok preventif, terjadi penurunan jumlah bakteri dari 3 hari setelah injeksi 20,50 menjadi 3,6 pada hari ke-10 sesudah injeksi artinya pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* sebelum injeksi *Salmonella typhi* dapat menurunkan pertumbuhan bakteri. Hal ini menandakan bahwa pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* sebelum injeksi bakteri ke dalam tubuh merupakan intervensi yang dapat dilakukan sehingga proses inflamasi – infeksi yang disebabkan pertumbuhan bakteri patogen berbahaya dapat dikendalikan. Penurunan jumlah bakteri ini juga diperkuat dengan adanya kandungan senyawa metabolit ekstrak *Thalassia hemprichii* berupa flavonoid, saponin dan tannin yang mampu menekan pertumbuhan bakteri patogen walaupun pemberian dilakukan sebelum injeksi bakteri (secara preventif).

Perpaduan metabolik sekunder yang dikandung tanaman bekerja sama melindungi tumbuhan, dan jika dikonsumsi oleh mamalia tetap berkoordinasi menghasilkan efek bagi tubuh. Flavonoid dilaporkan mampu memodulasi mediator inflamasi yang diproduksi makrofag mencit yang sedang terinfeksi. Makrofag yang terinfeksi bakteri menghasilkan

spektrum luas sitokin inflamasi dan chemokines. Dua hari pasca infeksi ditandai dengan produksi yang signifikan IL-6, TNF, dan IL-8. Sitokin inflamasi dan kemokin berperan untuk perekrutan dan kemostran dari neutrophil dan leukosit lainnya. Neutrofil memiliki kemampuan untuk hancurkan EBs yang mudah diakses dan ketika direkrut dalam jumlah besar dilepaskan molekul matrix metalloprotease (MMPs) dan neutrophil elastase yang telah terbukti berkontribusi dalam kerusakan jaringan (Yilma, A. N, et al., 2013).

Hasil uji lanjut (*pos Hoc Test*) menggunakan Bonferroni diperoleh nilai .sig (p-value) = 0.000 <math>\alpha = 0.01</math> (Tabel 4.14) menunjukkan bahwa ekspresi mRNA TLR4 pada pemeriksaan awal (P1) dengan hari ke-3 (P3) dan hari ke-10 (P4) sesudah diinjeksi *Salmonella typhi* adalah signifikan atau pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* mempengaruhi ekspresi mRNA TLR4. Hal ini membuktikan bahwa pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* sebelum injeksi memberi pengaruh pada sistem imun. Rao, et al., (2014) mengatakan bahwa konsumsi obat herbal melindungi dan menyembuhkan sejumlah penyakit dan telah menjadi pengobatan utama pada zaman prasejarah hingga ditemukannya obat sintetik di abad ke-19. Manfaat kesehatan telah diturunkan dari senyawa bioaktif yang umum ditemukan pada bagian tanaman yang dapat dimakan seperti buah, sayuran, bunga, daun dan telah terbukti memberikan perlindungan terhadap resiko berbagai penyakit (Loganayaki N, et al., 2010). Menariknya, bagian-bagian dari tanaman tersebut banyak diketahui mengandung sejumlah besar antioksidan fenolik (Yen GC, et al., 2002).



#### 4.2.5 Efek Ekstrak *Thalassia hemprichii* terhadap ekspresi mRNA TLR4 sesudah injeksi bakteri *Salmonella typhi* (Kuratif).

Pada kelompok dengan pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* sesudah injeksi *Salmonella typhi*, dalam penelitian ini secara statistik dengan uji anova pada taraf kepercayaan 99% (tabel. 4.16) diperoleh nilai .sig (p-value) = 0.000 <  $\alpha$  = 0.01 atau dengan kata lain  $H_0$  ditolak artinya ada perbedaan ekspresi mRNA gen TLR4 pada setiap pemeriksaan sesudah injeksi bakteri *Salmonella typhi* terhadap ekspresi mRNA TLR4, dengan perubahan rerata mean dari pemeriksaan sebelum injeksi (P1) sampai dengan hari ke-14 post pengobatan (P4) (lihat Gambar 4.1). Dari hasil tersebut terlihat bahwa besarnya peningkatan ekspresi mRNA TLR4 setelah injeksi mengalami peningkatan signifikan pada pemeriksaan awal (P1) = 5,996 dan pada pemeriksaan kedua (P2) setelah 3 hari diinjeksi adalah 10,833. Seperti yang sudah dikemukakan sebelumnya bahwa peningkatan ekspresi mRNA TLR4 terjadi pada kondisi tubuh yang mengalami infeksi bakteri. Hal ini sebanding dengan rerata jumlah bakteri setelah 3 hari infeksi yaitu 27,67. Perubahan terjadi setelah pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* selama 7 hari yakni memberikan efek penurunan ekspresi mRNA TLR4, hal ini terlihat pada hasil pemeriksaan ke-3 (P3) = 6,823 (pemeriksaan dilakukan 7 hari setelah therapy ekstrak *Thalassia hemprichii*) dan terus menurun sampai pada pemeriksaan ke-4 (P4) = 6,495 (pemeriksaan hari ke-14 setelah therapy ekstrak *Thalassia hemprichii*) dan sebanding dengan penurunan rerata jumlah bakteri setelah therapy yakni 5,67. Hal ini membuktikan bahwa ekstrak *Thalassia*

*hemprichii* berpotensi sebagai antibakteri dan bekerja sebagai bakterisid atau bakteriostatik.

Penurunan ekspresi mRNA TLR4 setelah tujuh hari pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* menunjukkan adanya penurunan lipopolisakarida (LPS) dalam darah mencit, yang menandakan adanya proses penyembuhan infeksi *Salmonella typhi* dalam tubuh mencit. Royle, M. C., et al (2003) mengatakan bahwa hal yang sangat vital dalam stimulasi respon imun non spesifik dalam melawan lipopolisakarida yang merupakan bagian dari *Salmonella typhi* adalah aktivasi TLR4. Adanya lipopolisakarida akan menstimulasi TLR4 kemudian menyebabkan translokasi nuclear dari NF $\kappa$ B dan sitokin TNF- $\alpha$  serta inducible No synthase (iNOS).

Salah satu mekanisme herbal sebagai *complementary and alternative medicine* (CAM) dalam meningkatkan imunitas atau kekebalan tubuh adalah memodulasi respon patogen/pengaturan sel T (Venkatesha, S. H., et al, , 2011). Lebih lanjut, Venkatesha, S.H., et al (2011) mengatakan bahwa mekanisme lain fungsi herbal dalam meningkatkan imunitas atau kekebalan tubuh adalah dengan memodifikasi tingkat dan kualitas respon imunitas sel T, sel B dan sitokin. Tanaman yang berfungsi sebagai herbal CAM dapat meningkatkan imunitas atau kekebalan tubuh dengan mekanisme mengubah keseimbangan antara inflamasi dan anti inflamasi pada sitokin. Fungsi imunomodulator dari tanaman obat ditentukan oleh komponen aktif yang terkandung dalam sel tanaman. *Thalassia hemprichii* merupakan tanaman

yang mengandung senyawa metabolit berupa flavonoid, saponin dan tannin. Mekanisme antibakteri senyawa fenolik dan terpenoid adalah merusak struktur dinding sel, mengganggu kerja transport aktif dan kekuatan proton di dalam membrane sitoplasma bakteri. Senyawa tersebut akan mendenaturasi dan menginaktifkan protein seperti enzim. Oleh karena itu dinding sel bakteri akan mengalami kerusakan karena terjadinya penurunan permeabilitas yang memungkinkan terganggunya transport ion-ion organik penting yang akan masuk ke sel bakteri, sehingga dapat mengakibatkan terganggunya metabolisme atau matinya sel bakteri (Bota, W., Martosupono, M., & Rondonuwu, F. S., 2015).

Flavonoid sebagai antibakteri adalah membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membrane sel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler (Cowan, 1999; Nuria, et al., 2009; Bobbarala, 2012). Flavonoid juga berperan dalam menghambat metabolisme energy dengan cara yang mirip dengan menghambat system respirasi, karena dibutuhkan energy yang cukup untuk penyerapan aktif berbagai metabolit dan untuk biosintesis makromolekul. Flavonoid juga dapat merusak membrane sitoplasma, yang dapat menyebabkan kebocoran metabolit penting dan menonaktifkan system enzim bakteri. Kerusakan ini memungkinkan nukleotida dan asam amino merembes keluar dan mencegah masuknya bahan aktif ke dalam sel, sehingga menyebabkan kematian bakteri. Senyawa saponin dapat merusak membrane sitoplasma. Kerusakan pada membrane sitoplasma mengakibatkan penurunan permeabilitas

membrane sel, dan transportasi zat yang tidak terkontrol ke dalam sel akan terlepas dari sel. Zat yang ada dalam sel seperti enzim ion organik, asam amino dan nutrisi keluar dari sel. Ketika sel melepaskan enzim bersama dengan zat-zat seperti air dan nutrisi menyebabkan terhambatnya metabolisme yang berakibat menurunnya ATP yang dibutuhkan untuk pertumbuhan dan proliferasi sel, sehingga menghambat pertumbuhan sel bakteri dan menyebabkan kematian sel. Tanin sebagai antibakteri adalah menghambat enzim reverse transcriptase dan DNA topoisomerase sehingga sel bakteri tidak dapat terbentuk. Tanin memiliki aktifitas antibakteri yang berhubungan dengan kemampuannya untuk menginaktivkan adhesi sel mikroba juga menginaktivkan enzim, dan mengganggu transport protein pada lapisan dalam sel. Tanin juga mempunyai target pada polipeptida dinding sel sehingga pembentukan dinding sel menjadi kurang sempurna. Hal ini menyebabkan sel bakteri menjadi lisis karena tekanan osmotik maupun fisik sehingga sel bakteri akan mati.

Hasil uji lanjut (*post Hoc Test*) menggunakan Bonferroni diperoleh nilai  $.sig$  ( $p$ -value) = 0.000  $< \alpha = 0.01$  (Tabel 4.17) menunjukkan bahwa ekspresi mRNA TLR4 pada pemeriksaan awal (P1) dengan hari ke-3 setelah diinjeksi *Salmonella typhi* (P2) adalah signifikan, hari ke-7 setelah pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii*, dan hari ke-14 setelah pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* adalah signifikan atau pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* mempengaruhi ekspresi mRNA TLR4. *Thalassia hemprichii* sebagai salah satu tanaman obat dari Family

*Hydrocaritaceae* mengandung senyawa antara lain flavonoid, saponin dan tannin. Ekstraksi *Thalassia hemprichi* yang dilanjutkan dengan uji fitokimia menunjukkan bahwa *Thalassia hemprichi* memiliki beberapa senyawa bioaktif yang dapat menjadi antikanker, antibakteri dan antifungi (Jebasingh, S. E. J., et al., 2016).

Penurunan ekspresi TLR4 setelah hari ke-7 pada kelompok yang diberikan ekstrak *Thalassia hemprichii* sesudah injeksi *Salmonella typhi* menunjukkan adanya penurunan lipopolisakarida (LPS) dalam darah mencit yang menandakan adanya proses penyembuhan dari infeksi *Salmonella typhi* dalam tubuh mencit. Sebaliknya pada kelompok yang diberikan Aquadest (K4), ekspresi TLR4 terus meningkat setelah hari ketujuh sampai hari ke-14. Hal ini menunjukkan bahwa lipopolisakarida masih tetap tinggi dalam darah mencit.

Pada kelompok dengan pemberian antibiotik *Levofloxacin* sesudah injeksi *Salmonella typhi* dalam penelitian ini secara statistik dengan uji anova pada taraf kepercayaan 99% (tabel. 4.19) diperoleh nilai .sig (p-value) = 0.000 <  $\alpha$  = 0.01 artinya ada perbedaan ekspresi gen TLR4 pada kelompok-kelompok pemeriksaan sesudah injeksi bakteri *Salmonella typhi* terhadap ekspresi mRNA TLR4, dengan perubahan rerata mean dari pemeriksaan sebelum injeksi (P1) sampai dengan hari ke-14 post pengobatan (P4) (lihat Gambar 4.1). Dari hasil tersebut terlihat bahwa besarnya peningkatan ekspresi mRNA TLR4 setelah injeksi mengalami peningkatan signifikan pada pemeriksaan awal (P1) = 6,07 dan pada pemeriksaan kedua (P2) setelah 3 hari diinjeksi adalah 10,635. Seperti

yang sudah dikemukakan sebelumnya bahwa peningkatan ekspresi mRNA TLR4 terjadi pada kondisi tubuh yang mengalami infeksi bakteri. Hal ini sebanding dengan rerata jumlah bakteri setelah 3 hari infeksi yaitu 28,00. Perubahan terjadi setelah pemberian levofloxacin selama 7 hari yakni memberikan efek penurunan ekspresi mRNA TLR4, hal ini terlihat pada hasil pemeriksaan ke-3 (P3) = 6,618 (pemeriksaan dilakukan 7 hari setelah levofloxacin) dan terus menurun sampai pada pemeriksaan ke-4 (P4) = 6,006 (pemeriksaan hari ke-14 setelah diberikan levofloxacin) dan sebanding dengan penurunan rerata jumlah bakteri setelah pemberian levofloxacin yakni 1,67. Hal ini terjadi karena efek levofloxacin sebagai antibiotik.

Hasil uji lanjut (*pos Hoc Test*) menggunakan Bonferroni diperoleh nilai .sig (p-value) = 0.000 <  $\alpha$  = 0.01 (Tabel 4.20) menunjukkan bahwa ekspresi mRNA TLR4 pada pemeriksaan awal (P1) dengan hari ke-3 setelah diinjeksi *Salmonella typhi* (P2) adalah signifikan, hari ke-7 setelah pemberian levofloxacin, dan hari ke-14 setelah pemberian levofloxacin adalah signifikan atau pemberian levofloxacin mempengaruhi ekspresi mRNA TLR4.

Pada kelompok dengan pemberian *aquadest* sesudah injeksi *Salmonella typhi* dalam penelitian ini secara statistik dengan uji anova pada taraf kepercayaan 99% (tabel. 4.22) diperoleh nilai .sig (p-value) = 0.000 <  $\alpha$  = 0.01 artinya ada perbedaan ekspresi gen TLR4 pada kelompok-kelompok pemeriksaan sesudah injeksi bakteri *Salmonella typhi* terhadap ekspresi mRNA TLR4, dengan perubahan rerata mean dari

pemeriksaan sebelum injeksi (P1) sampai dengan hari ke-14 post pengobatan (P4) (lihat Gambar 4.1). Dari hasil tersebut terlihat bahwa besarnya peningkatan ekspresi mRNA TLR4 setelah injeksi mengalami peningkatan signifikan pada pemeriksaan awal (P1) = 5,962 dan pada pemeriksaan kedua (P2) setelah 3 hari diinjeksi adalah 10,698. Seperti yang sudah dikemukakan sebelumnya bahwa peningkatan ekspresi mRNA TLR4 terjadi pada kondisi tubuh yang mengalami infeksi bakteri. Hal ini sebanding dengan rerata jumlah bakteri setelah 3 hari infeksi yaitu 27,83. Peningkatan ekspresi mRNA TLR4 terus meningkat pada pemeriksaan ke-3 (P3) = 12,707 (pemeriksaan dilakukan 7 hari setelah pemberian aquadest) dan terus meningkat sampai pada pemeriksaan ke-4 (P4) = 13,534 (pemeriksaan hari ke-14 setelah pemberian aquades) dan sebanding dengan rerata jumlah bakteri yang jumlahnya hampir sama dengan jumlah bakteri setelah 3 hari di injeksi yakni 26,17. Hal ini disebabkan karena aquades tidak menandung senyawa antibakteri.

Hasil uji lanjut (*pos Hoc Test*) menggunakan Bonferroni diperoleh nilai .sig (p-value) = 0.000 <math>\alpha = 0.01</math> (Tabel 4.23) menunjukkan bahwa ekspresi mRNA TLR4 pada pemeriksaan awal (P1) dengan hari ke-3 setelah diinjeksi *Salmonella typhi* (P2) adalah signifikan, hari ke-7 setelah pemberian aquadest, dan hari ke-14 setelah pemberian aquadest adalah signifikan atau pemberian levofloxacin mempengaruhi ekspresi mRNA TLR4.

.Penurunan ekspresi mRNA TLR4 setelah hari ke-7 pada kelompok yang diberikan ekstrak *Thalassia hemprichii* (K2) sesudah injeksi

*Salmonella typhi* dan kelompok yang diberikan levofloxacin (K3) menunjukkan adanya penurunan lipopolisakarida (LPS) dalam darah mencit yang sebanding dengan ekspresi mRNA TLR4 menandakan adanya proses penyembuhan dari infeksi *Salmonella typhi* dalam tubuh mencit. Sebaliknya pada kelompok yang diberikan Aquadest (K4), ekspresi mRNA TLR4 terus meningkat setelah hari ketujuh sampai hari ke-14. Hal ini menunjukkan bahwa lipopolisakarida masih tetap tinggi dalam darah mencit.

Royle, M. C., et al., (2003) mengungkapkan bahwa hal yang sangat vital dalam stimulasi respon imun non spesifik dalam melawan lipopolisakarida yang merupakan bagian dari *Salmonella typhi* adalah aktivasi TLR4. Adanya lipopolisakarida akan menstimulasi TLR4 kemudian menyebabkan translokasi nuclear dari NF $\kappa$ B dan sitokin TNF- $\alpha$  serta inducible NO synthase (iNOS). Komponen bakteri yang berperan sebagai *stimulating innate immunity*, antara lain : lipopolisakarida (LPS), peptidoglikan, lipoprotein (lipopeptida), dan DNA bakteri (Emertcan *et al.* 2011). Komponen-komponen ini disebut sebagai *ligand*, yang kemudian berikatan dengan reseptor TLRs (Kabelitz 2007).

Salah satu anggota dari *TLRs genes* adalah gen TLR4, yang mentranskripsi reseptor TLR4. *Ligand* dari reseptor TLR4 adalah LPS dari bakteri gram negatif, termasuk *Salmonella sp.* (Akashi *et al.* 2001; Akira dan Takeda 2004). Pada bakteri, LPS adalah endotoksin. Apabila bakteri ini berhasil menginfeksi tubuh, maka komponen inilah yang menyebabkan inflamasi atau peradangan (Gantois *et al.* 2009). Dengan demikian peran



reseptor TLR4 adalah sangat penting untuk mengontrol sejak awal terjadinya peradangan akibat infeksi bakteri *Salmonella sp.*

#### **4.2.6 Pengaruh Ekspresi mRNA TLR4 pada kelompok yang diberikan Ekstrak *Thalassia hemprichii* sebelum dan sesudah injeksi bakteri *Salmonella typhi* .**

Dari hasil analisis uji statistik (Tabel 4.25) dengan one way ANOVA pada taraf signifikan  $\alpha=0,01$  atau 99% didapatkan nilai  $\text{sig}=0,462 > \alpha=0,01$  atau dengan kata lain  $H_0$  diterima artinya tidak terdapat perbedaan rerata ekspresi mRNA gen TLR4 sebelum dan sesudah diinjeksi bakteri *Salmonella typhi*. Hal tersebut menunjukkan bahwa secara preventif maupun kuratif pemberian Ekstrak *Thalassia hemprichii* memiliki efek yang sama terhadap Ekspresi mRNA gen TLR4 pada hewan uji yang terinfeksi bakteri *Salmonella typhi*. Pada kelompok preventif mampu menekan ekspresi mRNA TLR4 dan pada kelompok kuratif mampu menurunkan ekspresi mRNA TLR4. Efek preventif dan kuratif ekstrak *Thalassia hemprichii* terhadap bakteri adalah sama-sama sebagai antibakteri *Salmonella typhi*. Ekstrak *Thalassia hemprichii* sebagai antibakteri berbeda dengan antibiotik. Ekstrak *Thalassia hemprichii* sebagai tanaman dapat digunakan sebelum invasi bakteri ataupun sesudah invasi bakteri. Obat herbal terfokus pada penyebab sakit dan butuh waktu menyatu dalam metabolisme tubuh beberapa hari hingga beberapa minggu. Obat tradisional menghasilkan efek samping yang lebih kecil dan bahan mudah di dapat, bahkan dapat menetralkan efek samping dari zat aktif yang membahayakan tubuh.

LPS pada *Salmonella typhi* terikat oleh LPS-binding protein (LBP) dalam darah dan kemudian mengaktifkan *Toll Like Receptor-4* (TLR4). TLR4 yang teraktivasi akan merekrut protein adaptor MyD88. Kemudian MyD88 merekrut IRAK4, IRAK1 dan IRAK2. IRAK kinase kemudian memfosforilasi dan mengaktifkan protein TRAF6 sehingga memungkinkan NFκB berdifusi ke dalam inti sel dan mengaktifkan transkripsi dan induksi akibat sitokin inflamasi. Selain jalur MyD88, juga ada jalur lain dalam mengaktifkan TLR4 yaitu jalur Trif-dependent. Kedua TLR3 dan TLR4 memanfaatkan jalur Trif-dependent, dimana masing-masing dipicu oleh dsRNA dan LPS. Untuk TLR3, dsRNA menyebabkan aktivasi reseptor, merekrut Trif adapter. Trif mengaktifkan kinase TBK1 dan RIPK1, yang menciptakan cabang di jalur sinyal. Kompleks sinyal Trif?TBK1 memfosforilasi IRF3 memungkinkan translokasi ke dalam nucleus dan produksi interferon tipe I. Sementara itu, aktivasi RIPK1 menyebabkan terjadinya proses polyubiquitinasi dan aktivasi TAK1 dan NFκB transkripsi dengan cara yang sama sebagai jalur MyD88-dependent.

TLR4 adalah satu-satunya TLR yang menggunakan keempat adapter. Kompleks yang terdiri dari TLR4, MD2 dan LPS merekrut TIR yang mengandung adapter TIRAP dan MyD88 dan dengan demikian memulai aktivasi NFκB (fase awal) dan MAPK. TLR4-MD2-LPS kompleks kemudian mengalami endositosis dan di endosome membentuk kompleks sinyal dengan TRAM dan Trif adapter. Jalur Trif-dependent ini lagi menyebabkan aktivasi IRF3 dan produksi interferon tipe I, tetapi juga menyebabkan aktivasi NFκB fase akhir. Kedua fase awal dan akhir dari

aktivasi NF $\kappa$ B diperlukan untuk produksi sitokin inflamasi. Respon inflamasi dimediasi oleh berbagai molekul pensinyalan. Aktivasi TLR menghasilkan produksi molekul pensinyalan lipida seperti molekul pensinyalan prostaglandin dan protein (atau peptide) seperti sitokin, yang semuanya berkontribusi terhadap respon inflamasi. Beberapa sitokin yang diproduksi oleh makrofag teraktivasi adalah dikenal sebagai kemokin. Beberapa diantaranya menarik netrofil, yang merupakan sel pertama yang direkrut dalam jumlah besar ke tempat infeksi baru. Kemudian menarik monosit dan sel dendritik. Sel dendritik mengambil antigen dari pathogen yang menyerang dan membawa mereka ke kelenjar getah bening di dekatnya, dimana mereka menyajikan antigen ke limfosit untuk mengerahkan kekuatan sistem kekebalan adaptif. Sitokin lainnya memicu demam, kenaikan suhu tubuh. Pada keseimbangan, demam membantu sistem kekebalan tubuh dalam melawan infeksi, karena kebanyakan bakteri dan pathogen virus tumbuh lebih baik pada suhu yang lebih rendah, sementara respon imun adaptif lebih kuat pada suhu yang lebih tinggi. Beberapa molekul pensinyalan proinflamasi merangsang sel endotel untuk mengekspresikan protein yang memicu pembekuan darah di pembuluh darah kecil setempat. Dengan menutup pembuluh darah dan memotong aliran darah, respon ini dapat membantu mencegah pathogen memasuki aliran darah dan menyebabkan infeksi ke bagian tubuh yang lain.

#### **4.2.7 Hubungan Ekspresi mRNA TLR4 dan Kadar TLR4 pada kelompok yang diberikan Ekstrak *Thalassia hemprichii* sebelum dan sesudah injeksi bakteri *Salmonella typhi*.**

Pada kelompok yang diberikan ekstrak *Thalassia hemprichii* sebelum injeksi (Preventif), terlihat pada tabel 4.8 diatas dapat dijelaskan bahwa kadar TLR4 pada pemeriksaan awal (P1) diperoleh nilai rerata = 2,171, pemeriksaan kedua (P2) diperoleh nilai rerata = 2,637; pemeriksaan ketiga (P3) diperoleh nilai rerata = 4,799 dan pemeriksaan keempat (P4) diperoleh nilai rerata = 5,171. Hal ini memperlihatkan hubungan yang linear antara peningkatan kadar TLR4 dengan peningkatan ekspresi mRNA gen TLR4. Infeksi di dalam tubuh akan berakibat munculnya berbagai respon imun yang diawali dengan meningkatnya sel fagosit. Sel fagosit seperti neutrofil maupun makrofag akan bergerak kearah rangsangan, selanjutnya memfagositosis sel yang di anggap asing tersebut. Kandungan lipopolisakarida pada dinding sel bakteri *Salmonella typhi* merupakan sinyal bagi makrofag untuk melakukan aktivasi. Aktivasi makrofag ini mempunyai kemampuan yang tinggi dalam melakukan penelanan benda asing melalui proses fagositosis. Meningkatnya jumlah makrofag ke tempat infeksi ini berasal dari migrasi makrofag ke sumber rangsangan (Besung INK, dkk., 2016).

Pada kelompok yang diberikan ekstrak *Thalassia hemprichii* sesudah injeksi (Kuratif) terlihat pada tabel 4.9. diatas bahwa kadar TLR4 pada pemeriksaan awal (P1) diperoleh nilai rerata = 2,180, pemeriksaan kedua (P2) diperoleh nilai rerata = 9,291, pemeriksaan ketiga (P3)

diperoleh nilai rerata = 3,923 dan pemeriksaan keempat (P4) diperoleh nilai rerata = 3,578. Hal ini memperlihatkan hubungan yang linear antara peningkatan kadar TLR4 dengan peningkatan ekspresi mRNA gen TLR4. Pada saat terinfeksi bakteri, ekspresi mRNA gen TLR4 meningkat seiring dengan peningkatan kadar TLR4 dan setelah pengobatan dengan pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii*, terjadi penurunan kadar ekspresi mRNA gen TLR4 yang diikuti pula dengan penurunan kadar TLR4.

Pada kelompok yang diberikan *levofloxacin* sesudah injeksi (Kuratif) terlihat pada tabel 4.10 diatas bahwa kadar TLR4 pada pemeriksaan awal (P1) diperoleh nilai rerata = 1,838, pemeriksaan kedua (P2) diperoleh nilai rerata = 8,705, pemeriksaan ketiga (P3) diperoleh nilai rerata = 3,571 dan pemeriksaan keempat (P4) diperoleh nilai rerata = 2,188. Hal ini memperlihatkan hubungan yang linear antara peningkatan kadar TLR4 dengan peningkatan ekspresi mRNA gen TLR4. Pada saat terinfeksi bakteri, ekspresi mRNA gen TLR4 meningkat seiring dengan kadar TLR4 dan setelah pengobatan dengan pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii*, terjadi penurunan kadar ekspresi mRNA gen TLR4 yang diikuti pula dengan penurunan kadar TLR4.

Pada kelompok yang diberikan *IAquadest* sesudah injeksi (Kuratif) terlihat pada tabel 4.11 diatas bahwa kadar TLR4 pada pemeriksaan awal (P1) diperoleh nilai rerata = 2,105, pemeriksaan kedua (P2) diperoleh nilai rerata = 8,880, pemeriksaan ketiga (P3) diperoleh nilai rerata = 11,480 dan pemeriksaan keempat (P4) diperoleh nilai rerata = 13,324. Hal ini memperlihatkan hubungan yang linear antara peningkatan kadar TLR4

dengan peningkatan ekspresi mRNA gen TLR4. Hongyong *et al.* (2012) dalam penelitiannya melaporkan bahwa penurunan ekspresi gen TLR4 berdampak pada penurunan jumlah bakteri di dalam darah.

## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 4.1. Kesimpulan

1. Ada pengaruh pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* terhadap ekspresi mRNA gen TLR4 pada kelompok mencit BALB/C yang diberikan **sebelum** diinjeksi *Salmonella typhi*.
2. Ada pengaruh pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* terhadap ekspresi mRNA gen TLR4 pada kelompok mencit BALB/C yang diberikan **sesudah** diinjeksi *Salmonella typhi*.
3. Tidak ada perbedaan pengaruh ekstrak *Thalassia hemprichii* terhadap ekspresi mRNA gen TLR4 pada kelompok mencit BALB/C yang diberikan ekstrak *Thalassia hemprichii* **sebelum** dan **sesudah** diinjeksi *Salmonella typhi*.

#### 4.1. Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan secara uji klinis terkait dengan efek ekstrak *Thalassia hemprichii* sebagai antiinflamasi, immunomodulator antimikroba khususnya pada kasus thypoid atau pada kasus penyakit infeksi lainnya.
2. Perlu ada dukungan dari Balai Besar Pengobatan Obat Tradisional Depkes RI agar memberikan ruang dan dukungan bagi peneliti-peneliti selanjutnya yng berhubungan dengan obat herbal.

3. Dari hasil penelitian ini, dapat dikembangkan untuk penelitian yang lebih kompleks dan hasilnya dapat digunakan untuk peningkatan ilmu biomedik.



## DAFTAR PUSTAKA

- Abasht, B., M.G. Kaiser, J. van der Poel, S.J. Lamont. (2009). Genetic lines differ in Toll-like receptor gene expression in spleens of chicks inoculated with *Salmonella enterica* serovar *enteritidis*. *Poult Sci* 88: 744– 749.
- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pober, J. S. (2000). B cell activation and antibody production. *Cellular and molecular immunology*, 1, 243-67.
- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2014). *Basic immunology: functions and disorders of the immune system*. Elsevier Health Sciences.
- Adapala, V. J., Buhman, K. K., & Ajuwon, K. M. (2011). Novel anti-inflammatory role of SLPI in adipose tissue and its regulation by high fat diet. *Journal of inflammation*, 8(1), 5.
- Ahmed, Bahar. Chemistry Of Natural Products. New Delhi: Department of Pharmaceutical Chemistry Faculty of Science Jamia Hamdard. 2007.
- Akashi, S.Y., H. Nagai, M. Ogata, K. Oikawa, S. Fukase, K. Kusumoto, M. Kawasaki, S. Nishijima, M. Hayashi, Kimoto, K. Miyake. 2001. Human MD-2 confers on mouse Toll-like receptor-4 species-specific lipopoly-saccharide recognition. *Int. Immunol.* 13:1595-1599.
- Akira, S. (2000). The role of IL-18 in innate immunity. *Current opinion in immunology*, 12(1), 59-63.
- Akira, S., K. Takeda. 2004. TLR signaling pathways. *Nature Reviews Immunology* 4: 499-511.
- Albiger B, Dahlberg S, Henriques-Normark B, Normark S. Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: fokus on the Toll-like receptors. *Journal of Internal Medicine*. 2007;261:1-10.
- Animura, N.S., F. Saitoh, S. Matsumoto, T. Akashi, and K. Miyake. 2008. Roles for LPS-dependent interaction and relocation of TLR4 and TRAM in TRIF-signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 368: 94–99.
- Assani, S. 1994. Mikrobiologi Kedokteran. Jakarta : Fakultas kedokteran Universitas Indonesia.
- Azam, S., Jakaria, M., Kim, I. S., Kim, J., Haque, M. E., & Choi, D. K. (2019). Regulation of Toll-Like Receptor (TLR) Signaling

Pathway by Polyphenols in the Treatment of Age-Linked Neurodegenerative Diseases: Focus on TLR4 Signaling. *Frontiers in immunology*, 10.

Bachtiar, A. 2007. Penelusuran Sumber Daya Hayati Laut (Alga) Sebagai Biotarget Industri. [Makalah], Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Padjadjaran, Jatinagor.

Baratawidjaja, K. G. (2006). Basic immunology 7th eds. *Faculty of Medicine, Indonesia University. Jakarta.*

Bhutta ZA. Current concepts in the diagnosis and treatment of typhoid fever. *BMJ*. 2006;333:78-82.

Boakye, A. A., Wireko-Manu, F. D., Agbenorhevi, J. K., & Oduro, I. (2015). Antioxidant activity, total phenols and phytochemical constituents of four underutilised tropical fruits.

Boom, T. V., & Cronan Jr, J. E. (1990). Nonsense mutants defining seven new genes of the lipid-containing bacteriophage PR4. *Virology*, 177(1), 11-22.

Bota, W., Martosupono, M., & Rondonuwu, F. S. (2015). Potensi Senyawa Minyak Sereh Wangi (citronella oil) dari Tumbuhan *Cymbopogon nardus* L. sebagai Agen Antibakteri. *Prosiding Semnastek*.

Bourbeau, P. P., & Pohlman, J. K. (2001). Three days of incubation may be sufficient for routine blood cultures with BacT/Alert FAN blood culture bottles. *Journal of clinical microbiology*, 39(6), 2079-2082.

Carpenter S, O'Neill L. How important are Toll-like receptors for antimicrobial responses? Journal compilation. 2007;9:1891-901.

Cetin-Karaca H. Evaluation of Natural Antimicrobial Duenolic Compounds Against Foodborne. 2011

Chanwitheesuk, A., Teerawutgulrag, A., & Rakariyatham, N. (2005). Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. *Food chemistry*, 92(3), 491-497.

Choo, P. W., Rand, C. S., Inui, T. S., Lee, M. L. T., Cain, E., Cordeiro-Breault, M., ... & Platt, R. (1999). Validation of patient reports, automated pharmacy records, and pill counts with electronic monitoring of adherence to antihypertensive therapy. *Medical care*, 846-857.

- Coppo, E., & Marchese, A. (2014). Antibacterial activity of polyphenols. *Current pharmaceutical biotechnology*, 15(4), 380-390.
- Crump, J. A, and Mintz, E. D. 2010. Global Trends in Typhoid and Paratyphoid Fever. *Clin.Infect. Dis.*, 50(2):241-246.
- Cushnie, T.P.Tim. Lamb, Andrew J. Antimicrobial Activity of Flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2005;26;343-356.
- Damgaard R. Inhibitor of apoptosis (IAP) proteins in regulation of inflammation and innate immunity. *Discovery Medicine* 2011:1-5.
- Den Hartog, C. (1970). The sea-grasses of the world. *North-Holland, Amsterdam*.
- Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. 1995. Cara Pembuatan Siraplisia, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta. 1-32.
- Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. 1986. Sediaan Galenik, Edisi II, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Bhakti Husada, Jakarta. 1-12.
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal.Chem.* 28:350-356.
- Ehrentraut H, Meyer R, Schwederski M, Ehrentraut S, Velten M, Grohe C. Systemically administered ligands of Toll-like receptor 2, -4, and -9 induce distinct inflammatory responses in the Murine Lung. *Mediators of inflammation* 2011:1-11.
- Elisabeth Purba, I., Wandra, T., Nugrahini, N., Nawawi, S., & Kandun, N. (2016). Program pengendalian demam tifoid di Indonesia: tantangan dan peluang. *Media Penelitian dan Pengembangan Kesehatan*, 26(2), 99-108.
- Elson G, Dunn-Siegrist I, Daubeuf B, Pugin J. Gram-negative and Gram-positive bacteria Contribution of Toll-like receptors to the innate immune response. *Blood*. 2006;109:1574-82.
- Emertcan A, Öztürk F, Gündüz K. Toll-like receptors and skin. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2011;11:1-7.
- Gunn, J.S., Marshall, J.M., Baker, S., Dongol, S., Charles, R.C. & Ryan, E.T. 2014. Salmonella chronic carriage : epidemiology,

diagnosis, and gallbladder persistence. *Trends Microbiol*, 22, 648-55

Hanani, E., A. M. Abdul., dan S. Ryany. 2005. Identifikasi Senyawa Antioksidan Dalam Spons *Callyspongia* SP Dari Kepulauan Seribu. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, II (3). Halaman 130

Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. ITB, Bandung.

Harrison, P. J. (1999). The neuropathology of schizophrenia: a critical review of the data and their interpretation. *Brain*, 122(4), 593-624.

Hatta, M., & Smits, H. L. (2007). Detection of *Salmonella typhi* by nested polymerase chain reaction in blood, urine, and stool samples. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 76(1), 139-143.

Hawas W Usama, 2016, Genetic Regulation and manipulation for natural product discovery. *Aplied Microbiology and Biotechnology*.

Hendra R, Ahmad S, Sukari A, Shukor MY, Oskoueian E. Flavonoid analyses and antimicrobial activity of various parts of *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl fruit. *Int J Mol Sci*. 2011;12: 3422-3431.

Hertanto, Y. (2008). Sebaran dan Asosiasi Perifiton pada Ekosistem Padang Lamun (*Enhalus acoroides*) di Perairan Pulau Tidung Besar, Kepulauan Seribu, Jakarta Utara. [Skripsi]. *Institut Pertanian Bogor*.

Hery Winarsi. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Kanisius. Hal. 189-90

House, J. S. (2001). Social isolation kills, but how and why?. *Psychosomatic medicine*, 63(2), 273-274.

Humayoon Shafiq Satti, S. H., and Qamar Javed. 2013. Association of Interlukin-6 Gene Promoter Polymorphism with Coronary Artery Disease in Pakistani Families. *Journal ListScientific World Journal*. V. 2013; 2013 Dec 2. Doi :101155/2013/538365, 5, 538365.

Hurley, D., Mccusker, M.P., Fanning, S & Martins, M. 2014. *Salmonella*-host Interaction – Modulation of the Host Innate Immune System. *Front Immunol*, 5, 481.

Jafriati. 2005. Potensi dan Penentuan Senyawa Bioaktif Bakteri Symbion Penghasil Antibiotika dari Rumpun Laut *Thalassia*

*hemprichii* dari Perairan Pulau Barrang Lompo Sulawesi Selatan. Pascasarjana Universitas Hasanuddin.

- Jafriati. 2013. Potensi Senyawa Penghasil Antibiotika dari Lamun *Thalassia hemprichii* yang tumbuh di perairan Wakatobi. Bappeda Kabupaten Wakatobi.
- Jafriati. 2014. Isolasi Bakteri penghasil Antibiotika dari *Thalassia hemprichii* yang tumbuh di Pulau Barrang Lompo Sulawesi Selatan. Jurnal Ilmiah Kesehatan Masyarakat ISSN : 2088-0928, Vol. 5, No 2, Edisi Agustus 2014, Halaman 39-46, Webside: <http://www.uho.ac.id/karya-ilmiah.php>.
- Jebasingh, S. E. J., Lakshmikandan, M., Sivaraman, K., & Uthiralingam, M. (2016). Assessment of Antibacterial, Antifungal Property and Purification of Bioactive Compounds from Seagrass, *Thalassia hemprichii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 86(4), 905-910.
- Kang S, Kauls L, Gaspari A. Toll-like receptors: applications to dermatologic disease. *J Am Acad Dermatol*. 2006;54:951-83.
- Kartika, Angga Raka Gde, 2016, Potensi Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia*) sebagai penghambat bakteri *Vibrio harveyi*, *Journal of Marine and Aquatic Sciences* Vol 2 No 2 49-53
- Kiswara W. 1992. Vegetasi lamun (seagrass) di rataan terumbu Pulau Pari, Pulau-pulau Seribu, Jakarta. *Oseanologi di Indonesia*. 25:31-49.
- Knekt, P., Kumpulainen, J., Järvinen, R., Rissanen, H., Heliövaara, M., Reunanen, A., ... & Aromaa, A. (2002). Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *The American journal of clinical nutrition*, 76(3), 560-568.
- Kordi, K. 2010. A to Z Budi Daya Biota Akuatik untuk Pangan, Kosmetik dan Obat-obatan. Penerbit Andi, Yogyakarta: 226 hlm.
- Kusmardiyani, S. dan Elfahmi. 2000. *Phytochemical Studies of Thalassia hemprichii* (Ehrenb.) Aschers [Prosiding]. Dalam: ISMB 2000. Perhimpunan Bioteknologi Laut, Jakarta, 51-55.
- Laganà, P., Anastasi, G., Marano, F., Piccione, S., Singla, R. K., Dubey, A. K., ... & Haddad, M. A. (2019). Phenolic Substances in Foods: Health Effects as Anti-Inflammatory and Antimicrobial Agents. *Journal of AOAC International*.

- Lakshmi V, Goel AK, Srivastava MN, Kulshreshta DK, Raghubir R. 2006. Bioactivity of marine organism: part IX – screening of some marine flora from Indian Coasts. *IJEB*, Vol 44; 137 – 141.
- Latuconsina, M.U., 2002. *Studi Kepadatan dan Laju Pertumbuhan Lamun Enhalus acoroide dan Thalassia hemprichii di Pulau Barrang Lompo dan Pulau Bone Batang*. Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan. Universitas Hasanuddin.
- Laurence, D. R., & Bacharach, A. L. (Eds.). (1964). *Evaluation of drug activities: pharmacometrics* (Vol. 1, pp. 160-162). New York: Academic press.
- Liadaki K, Petinaki E, Skuolakis C, Tsirevelou P, Klapsa D. Toll-like receptor 4 Gene (TLR4), but not TLR2, polymorphisms modify the risk of tonsillar disease due to *streptococcus pyogenes* and *haemophilus influenza*. *Clinical and vaccine immunology*. 2011;18:217-22.
- Loganayaki, N., Rajendrakumaran, D., & Manian, S. (2010). Antioxidant capacity and phenolic content of different solvent extracts from banana (*Musa paradisiaca*) and mustai (*Rivea hypocrateriformis*). *Food Science and Biotechnology*, 19(5), 1251-1258.
- Lorenz, E., J.P. Mira, K.L. Frees, D.A. Schwartz. 2002. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med*. 162: 1028-1032.
- Madduluri, Suresh. Rao, K. Babu. Sitaram, B. In Vitro Evaluation Of Antibacterial Activity of Five Indegenous Plants Extract Against Five Bacterial Pathogens of Human. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2013:5(4): 679-684.
- Malangngi LP, Sangi MS, Paendong JJE. 2012. Penentuan kandungan tanin dan uji aktivitas antioksidan ekstrak biji buah alpukat (*Persea americana* Mill.). *Journal MIPA Universitas Sam Ratulangi* 1(1): 5-10.
- Marleni, N., Gray, S., Sharma, A., Burn, S., & Muttil, N. (2012). Impact of water source management practices in residential areas on sewer networks—a review. *Water Science and Technology*, 65(4), 624-642.
- Massi, M, N., Toshiro S, Akinobu G, Acharya B, Mochammad H, Masato K, 2003. Rapid Diagnosis of Typhoid Fever bt PCR Assay Using One Pair of Primers from Flagellin Gene of *Salmonella typhi*. *Jurnal Infect Chermother* 9; 233-237

- Merrell, D. S. & Folkow, S. 2004. Frontal and stealth attack strategies in microbial pathogenesis. *Nature*, 430, 250-6.
- McClure, R., & Massari, P. (2014). TLR-dependent human mucosal epithelial cell responses to microbial pathogens. *Frontiers in immunology*, 5, 386.
- McIntruff J, RL M, Kim J. The role of Toll-like receptors in the pathogenesis and treatment of dermatological disease. *J Invest Dermatol*. 2005;125:1-8
- Mochammad Hatta and Henk L Smits. 2007. Detection of *Salmonella typhi* by nested Polymerase Chain Reaction in blood, urine and stool samples. *American J. Tropical Medicine Hygiene*. vol : 76;139-143
- Modlin R, Kim J, Maurer D, Bangert D, Stingl D. Innate and adaptive immunity in the skin. In: Freedberg I, Eisen A, Wolff A, et al, editor. *Dermatology in general medicine*. New York: Mc.Graw-Hill; 2008:95-126.
- Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical dyphenylpicrylhydrazil (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journals of Science and Technology*. 26:211-219.
- Nasronudin, *Immunopatogenesis molekuler, Diagnosis dan Penatalaksanaan Demam Tifoid Masa Kini*, in *Penyakit Infeksi di Indonesia Solusi Kini & Mendatang 2007*, Surabaya: Airlangga University Press: Indonesia.
- Neelima, C.S.S. and Seenivasan, R., 2015. DPPH radical scavenging activity of selected Seagrasses from South East Coast of India. *Int. J Adv. Res*, 3, pp.950-956.
- Newton, C., & Graham, A. (1994). PCR, Bios Scientific.
- Ngajow, Mercy, 2013, Pengaruh Anti Bakteri ekstrak Kuit Batang Matoa (*Pometia pinnata*) terhadap bakteri *S. Aureus* secara in-vitro. *Jurnal Mipa Unsrat*.
- Nguyen, G., Delarue, F., Burcklé, C., Bouzahir, L., Giller, T., & Sraer, J. D. (2002). Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *The Journal of clinical investigation*, 109(11), 1417-1427.
- Nisa, Humeera, 2015, Fungal Endophytes as prolific source of Phytochemicals and other Bioactive Natural Products: a Review. *Microbial Phathogenesis Vol 82*
- Nuria, Maulita cut, Faizaitun, Arvin, Sumantri, Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Jarak Pagar (*Jatropha Curcas L*)

Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* Atcc 25923, *Escherichia coli* Atcc 25922, Dan *Salmonella typhi* Atcc 1408, *Mediagro*. 2009;5(2):26–37.

Olsen SJ et al. 2004. Evaluation of rapid diagnostic tests for typhoid fever. *Journal of Clinical Microbiology*. 1885-1889.

Palsson-McDermott, E.M., and L.A. O'Neill. 2004. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor Toll-like receptor-4. *Immunology* 113: 153-162.

Parry, C. M. (2004). The treatment of multidrug-resistant and nalidixic acid-resistant typhoid fever in Viet Nam. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 98(7), 413-422.

Pastoor, R., Hatta, M., Abdoel, T. H., & Smits, H. L. (2008). Simple, rapid, and affordable point-of-care test for the serodiagnosis of typhoid fever. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 61(2), 129-134.

Paul-Clark M, Mc Master S, Belcher E, Sorrentino R, Anandarajah J, Fleet M. Differential effects of Gram-positive versus Gram-negative bacteria on NOSII and TNF $\alpha$  in macrophages: role of TLRs in synergy between the two. *British Journal of Pharmacology* 2006;148:1067–75.

Petry V, Gaspari A. Toll-like receptors and dermatology. *International Journal of Dermatology*. 2006:558-70.

Philips, R.C. and E.G. Menez. 1988. *Seagrasses*. Smithsonian Institution Press, Washington D.C. 104 pp.

Pringgencies, D., N.L. Ekasari dan Gunawan. 2011. Potensi Beberapa Ekstrak Rumput Laut sebagai Antibakteri Upaya Sebagai Bahan Antibakteri Makanan. Dalam: Prosiding Seminar Nasional Aplikasi Pemanfaatan Rumput Laut dan Bahan Hayati Laut dalam Bidang Pangan dan Energi di Semarang 29 Januari 2011. Semarang, 133-142 hlm.

Purba, I.E., Wandura, T., Nugrahini, N., Nawawi, S., dan Kandum, M. (2016). Program Pengendalian Demam Tifoid di Indonesia: Tantangan dan Peluang. *Media Litbangkes*, Vol. 26 No.2

Puri, Pramadita Aristi, 2011, Kandungan Fenol, Komponen Fitokimia dan Aktivitas Anti Oksidan Lamun Dugong (*Thalassia hemprichii*), *Jurnal Teknologi Hasil Perairan*

Raja-Kannan RR, Arumugam R, Meenakhshi S, Anantharaman P. 2010. Thin layer chromatography analysis of antioxidant



constituents from seagrasses of Gulf of Mannar Biosphere Reserve, South India. *IJCRGG*. Vol (2)3; 1526 – 1530.

- Rao, U. M., Mohd, K. S., Muhammad, A., Ahmad, B. A., Mohamad, M., & Ali, R. M. (2014). Taxonomical, Phytochemical and Pharmacological Reviews of *Musa sapientum* var. *Paradisiaca*. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 7(11), 12.
- Ravikumar, S., Thajuddin, N, P. Suganthi, S. Jacob Inbaneson and Vinodkumar, 2008. *Bioactive potential of seagrass bacteria against human bacterial pathogens*. *Journal of Environmental Biology* 31 387-389
- Refdanita, Maksum, R., Nurgani, A., dan Endang, P. 2004. Faktor yang Mempengaruhi Ketidaksesuaian Penggunaan Antibiotika dengan Uji Kepekaan di Ruang Intensif Rumah Sakit Fatmawati Jakarta Tahun 2001-2002. *Makara, Kesehatan* 8 (1): 21-26.
- Rosyidah, K., Nurmuhaimina, Komari, M.D.Astuti. 2010. Aktivitas Antibakteri Fraksi Saponin dari Kulit Batang Tumbuhan Kasturi *Mangifera casturi*. *Bioscientiae*, 7 (2): 25-31.
- Royle, M. C., Töttemeyer, S., Alldridge, L. C., Maskell, D. J., & Bryant, C. E. (2003). Stimulation of Toll-like receptor 4 by lipopolysaccharide during cellular invasion by live *Salmonella typhimurium* is a critical but not exclusive event leading to macrophage responses. *The Journal of Immunology*, 170(11), 5445-5454.
- Sandor, F., & Buc, M. (2005). Toll-like receptors. III. Biological significance and impact for human medicine. *Folia Biol (Praha)*, 51(6), 198-203.
- Santoso, J., Anwariyah, S., Rumiantin, R.O., Putri, A.P., Nabila Ukhty & Yumiko Yoshie-Stark (2012). Phenol content, antioxidant activity and fibers profile of four tropical sea grasses from Indonesia. *Journal of coastal development*. 15:189-196.
- Sari, F.P. dan S. M. Sari, 2011, Ekstraksi Zat Aktif Antimikroba dari Tanaman Yodium (*Jatropha multifida* Linn) sebagai Bahan Baku Alternatif Antibiotik Alami. Semarang: Fakultas Teknik Universitas Diponegoro.
- Sato M, Kawagoe T, Meguro A, Ota M. Toll-like receptor 2 (TLR2) gene polymorphisms are not associated with sarcoidosis in the Japanese population. *Molecular vision*. 2011;17:731-6.
- Schuler P. (1990), "Natural Antioxidant Exploited Commercially", dalam *Husdon B.J.F., Food Antioxidants*, New York: Elsevier Applied Science

- Setiabudy, R. (2007). Farmakologi dan Terapi Edisi 5. *Departemen Farmakologi dan Terapeutik. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.*
- Sudoyo, S., & Alwi, S. Setiati. 2009. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Jilid III Edisi V. Jakarta Pusat: InternaPublishing.*
- Tam, F.C.H., et al., *New rapid test for paratyphoid a fever: usefulness, cross-detection, and solution.* Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2008. 62(2): p. 142-150.
- TaoX, Sun X, Xu L, Yin L, Han X, Qi Y., et al, Total Flavonoids from Rosa Laevigata Michx Fruit Ameliorates Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury through Inhibition of Oxidative Stress, 2016.
- Terhorst D, Kalali B, Ollert M, Ring J, Mempel M. The role of toll-like receptors in host defenses and their relevance to dermatologic diseases. *Am J Clin Dermatol.* 2010;11:1-10.
- Tomascik, T., Mah, A.J., Nontji, A., dan Moosa, M.K., 1997. *The Ecologi Of Indonesian Seas. Part two.* The Ecologi of Indonesia Series. Volume VII.
- Tumbelaka, *Tata Laksana Demam Tifoid Pada Anak. Pediatrics Update. Naskah lengkap Pendidikan Kedokteran Berkelanjutan.* Ilmu Kesehatan Anak IDAI Jaya, 2003.
- Uchiya, K., Groisman, E. A. & Nikai, T. 2004. Involvement of Salmonella Pathogenicity Island 2 in the up-Regulation of Interleukin-10 Expression in Macrophages; role of Protein Kinase A Signal Pathway. *Infect Immun,* 72, 1964-73
- Valins W, Amini S, Berman B. The expression of Toll-like receptors in dermatological diseases and the therapeutic effect of current and newer topical Toll-like receptor modulators. *J Clin Aesthet Dermatol.* 2010;9:20–9.
- Venkatesha, S. H., Rajaiah, R., Berman, B. M., & Moudgil, K. D. (2011). Immunomodulation of autoimmune arthritis by herbal CAM. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2011.*
- Wain, J., Hendriksen, R. S., Mikoleit, M. L., Keddy, K. H. & Ochiai, R. L. 2014. Typhoid Fever. *Lancet*
- WHO, 2003. Background Document: The Diagnosis, Treatment and Prevention Of Typhoid Fever. Communicable Disease Surveillance and Response Vaccines and Biologicals.

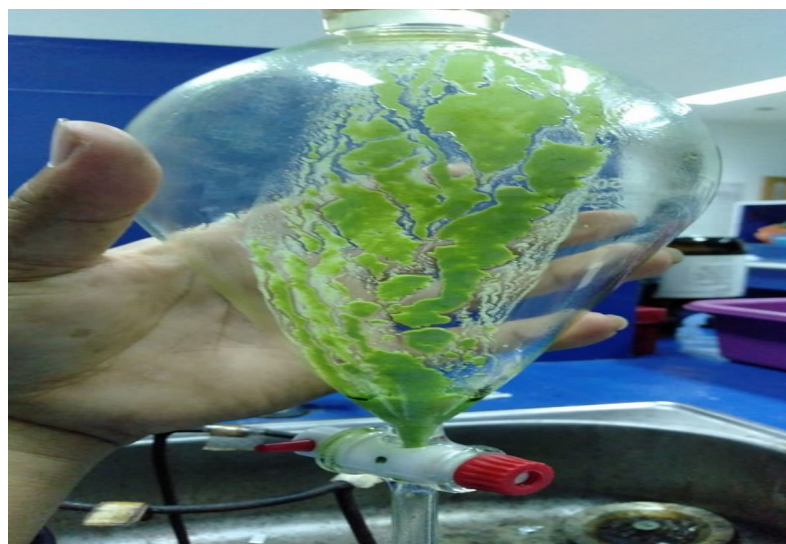
- Widodo, D. 2009. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam* Vol. III. Jakarta: Interna Publishing. 2797-2806.
- Yen, G. C., Duh, P. D., & Tsai, H. L. (2002). Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food chemistry*, 79(3), 307-313.
- Yilma, A. N., Singh, S. R., Dixit, S., & Dennis, V. A. (2013). Anti-inflammatory effects of silver-polyvinyl pyrrolidone (Ag-PVP) nanoparticles in mouse macrophages infected with live *Chlamydia trachomatis*. *International journal of nanomedicine*, 8, 2421.
- Zetterström, C. K., Strand, M. L., & Söder, O. (2006). The high mobility group box chromosomal protein 1 is expressed in the human and rat testis where it may function as an antibacterial factor. *Human Reproduction*, 21(11), 2801-2809.
- Zoste M, Bouwman L, Marijke K, Putten J. Cleavage and activation of a Toll-like receptor by microbial proteases. *PNAS* 2011;108:4968-73.

**LAMPIRAN 1:**  
**DOKUMENTASI PENELITIAN**

## DOKUMENTASI FOTO SAMPEL DAN EKSTRAKSI



*Thalassia hemprichii*



**Proses Ekstraksi**

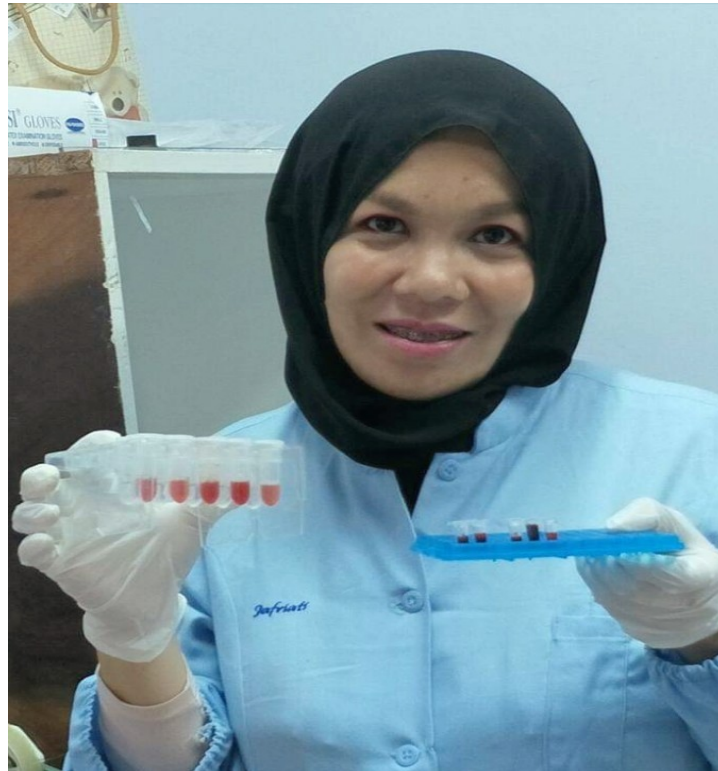


**Pengambilan Sampel Darah mencit BALB/C**



**Proses Pemeriksaan Ekspresi mRNA gen TLR4**





Serum Darah Hewan Uji Mencit BALB/C

**LAMPIRAN 2:**  
**HASIL PEMERIKSAAN UJI FITOKIMIA**  
**(*SENYAWA BIOAKTIF*)**



**LABORATORIUM BIOKIMIA**  
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**  
**UNIVERSITAS HASANUDDIN**

Kampus UNHAS Tamalanrea, Jl. Perintis Kemerdekaan KM. 10, Makassar, 90245  
Telp. 0411-586498, 0411-586200 Ext. 1092

**HASIL ANALISIS**

Nama/NIM : Jafriati / C013171008  
Asal Institusi : Universitas Hasanuddin  
Jenis Sampel : Ekstrak Lamun *Thalassia hemprichii*  
Jumlah : 1 (Satu)  
Analisis : Pengujian Fitokimia

| No. | Uji Fitokimia    | Hasil Uji |
|-----|------------------|-----------|
| 1   | Alkaloid         | -         |
|     | a. Mayer         | -         |
|     | b. Dragendorff   | -         |
| 2   | Flavonoid        | +         |
|     | a. Timbal asetat | +         |
|     | b. Asam sulfat   | -         |
| 3   | Terpenoid        | -         |
| 4   | Steroid          | -         |
| 5   | Saponin          | +         |
| 6   | Tanin            | +         |

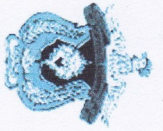
Makassar, 01 September 2019

PLP Lab. Biokimia

Mahdalia, S.Si., M.Si.

19750826 199601 2 001

**LAMPIRAN 3:**  
**HASIL PEMERIKSAAN POLIFENOL**  
***(TANIN)***



**LABORATORIUM BIOKIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN**

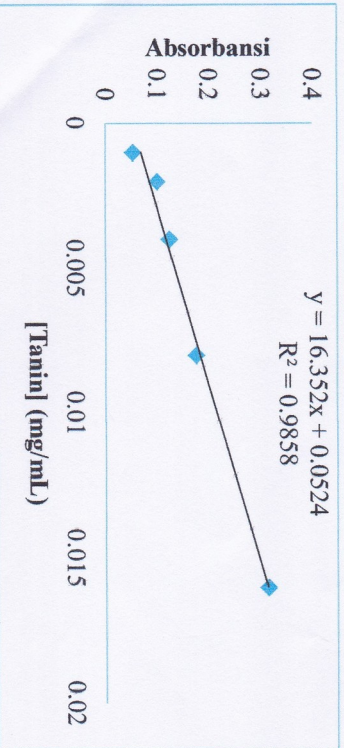
Kampus UNHAS Tamalanrea, Jl. Perintis Kemerdekaan KM. 10, Makassar, 90245  
Telp. 0411-586498, 0411-586200 Ext. 1092

**HASIL ANALISIS**

Nama/NIM : Jafriati / C013171008  
Asal Institusi : Universitas Hasanuddin  
Jenis Sampel : Ekstrak Lamun *Thalassia hemprichii*  
Jumlah : 1 (Satu) Duplo  
Analisis : Penentuan Kadar Polifenol (Tanin)

**STANDAR TANIN**

| [Tanin] (mg/mL) | Absorbansi |
|-----------------|------------|
| 0.001           | 0.053      |
| 0.002           | 0.1        |
| 0.004           | 0.125      |
| 0.008           | 0.176      |
| 0.016           | 0.315      |



Nama/NIM : Jafriati / C013171008  
Asal Institusi : Universitas Hasanuddin  
Jenis Sampel : Ekstrak Lamun *Thalassia hemprichii*  
Jumlah : 1 (Satu) Duplo

**SIMPLO**

| Kode sampel   | Absorbansi | FP | Tanin terukur (mg/mL) | Massa Sampel (g) | Volume pelarut air panas (mL) | Tanin terukur (%) |
|---------------|------------|----|-----------------------|------------------|-------------------------------|-------------------|
| Ekstrak Lamun | 0.89       | 10 | 0.51254               | 0.05             | 10                            | 10.25             |

**DUPLO**

| Kode sampel   | Absorbansi | FP | Tanin terukur (mg/mL) | Massa Sampel (g) | Volume pelarut air panas (mL) | Tanin terukur (%) |
|---------------|------------|----|-----------------------|------------------|-------------------------------|-------------------|
| Ekstrak Lamun | 0.895      | 10 | 0.51560               | 0.05             | 10                            | 10.31             |

Makassar, 01 September 2019

PLP Lab. ~~Biokimia~~



Mahdalia, S.Si., M.Si.  
19750826 199601 2 001

**LAMPIRAN 4:**  
**HASIL PEMERIKSAAN AKTIFITAS ANTIOKSIDAN**  
***(DPPH)***



**LABORATORIUM BIOKIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN**

Kampus UNHAS Tamalanrea, Jl. Perintis Kemerdekaan KM. 10, Makassar, 90245  
Telp. 0411-586498, 0411-586200 Ext. 1092

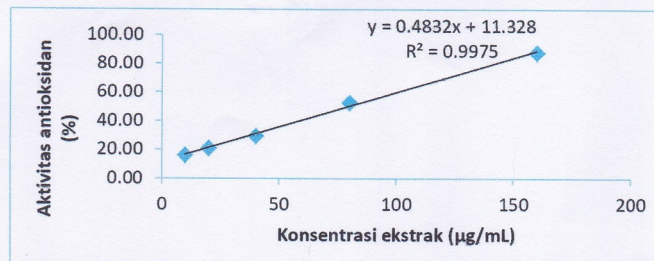
**HASIL ANALISIS**

Nama/NIM : Jafriati / C013171008  
Asal Institusi : Universitas Hasanuddin (Prodi S3 Ilmu Kedokteran)  
Jenis Sampel : Ekstrak Lamun *Thalassia hemprichii*  
Jumlah : 1 (Satu) Triplo  
Analisis : Antioksidan (IC-50)

**1. SIMPLO**

| No | Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ ) | Absorbansi (A) $\lambda = 515 \text{ nm}$ | Aktivitas Antioksidan (%) |
|----|----------------------------------|---|---------------------------|
| 1  | 10                               | 0.355                                     | 16.08                     |
| 2  | 20                               | 0.335                                     | 20.80                     |
| 3  | 40                               | 0.299                                     | 29.31                     |
| 4  | 80                               | 0.201                                     | 52.48                     |
| 5  | 160                              | 0.085                                     | 87.75                     |
| 6  | kontrol                          | 0.387                                     |                           |

| No | Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ ) | Aktivitas Antioksidan (%) | Nilai IC-50 ( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|----|----------------------------------|---------------------------|----------------------------------|
| 1  | 10                               | 16.08                     | 80.0331                          |
| 2  | 20                               | 20.80                     |                                  |
| 3  | 40                               | 29.31                     |                                  |
| 4  | 80                               | 52.48                     |                                  |
| 5  | 160                              | 87.75                     |                                  |

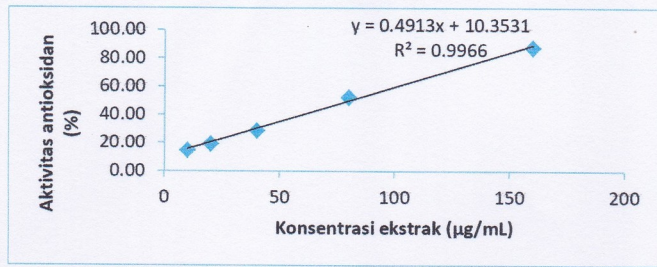


**2. DUPLO**

| No | Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ ) | Absorbansi (A) $\lambda = 515 \text{ nm}$ | Aktivitas Antioksidan (%) |
|----|----------------------------------|---|---------------------------|
| 1  | 10                               | 0.360                                     | 14.89                     |
| 2  | 20                               | 0.340                                     | 19.62                     |
| 3  | 40                               | 0.300                                     | 29.08                     |
| 4  | 80                               | 0.200                                     | 52.72                     |
| 5  | 160                              | 0.085                                     | 87.75                     |
| 6  | kontrol                          | 0.387                                     |                           |

| No | Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ ) | Aktivitas Antioksidan (%) | Nilai IC-50 ( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|----|----------------------------------|---------------------------|----------------------------------|
| 1  | 10                               | 14.89                     | 80.6979                          |
| 2  | 20                               | 19.62                     |                                  |
| 3  | 40                               | 29.08                     |                                  |
| 4  | 80                               | 52.72                     |                                  |
| 5  | 160                              | 87.75                     |                                  |

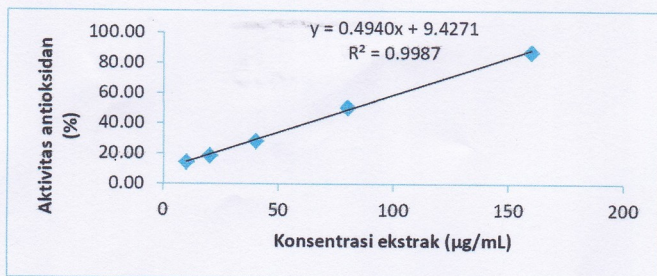




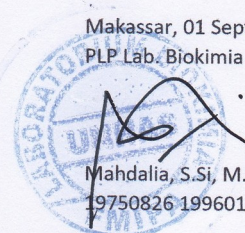
### 3. TRIPLLO

| No | Konsentrasi (µg/mL) | Absorbansi (A) λ = 515 nm | Aktivitas Antioksidan (%) |
|----|---------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1  | 10                  | 0.362                     | 14.42                     |
| 2  | 20                  | 0.344                     | 18.68                     |
| 3  | 40                  | 0.302                     | 28.61                     |
| 4  | 80                  | 0.208                     | 50.83                     |
| 5  | 160                 | 0.085                     | 87.75                     |
| 6  | kontrol             | 0.387                     |                           |

| No | Konsentrasi (µg/mL) | Aktivitas Antioksidan (%) | Nilai IC-50 (µg/mL) |
|----|---------------------|---------------------------|---------------------|
| 1  | 10                  | 14.42                     | 82.1314             |
| 2  | 20                  | 18.68                     |                     |
| 3  | 40                  | 28.61                     |                     |
| 4  | 80                  | 50.83                     |                     |
| 5  | 160                 | 87.75                     |                     |



Makassar, 01 September 2019  
PLP Lab. Biokimia



Mahdalia, S.Si, M.Si  
19750826 199601 2 001

**LAMPIRAN 5:**  
**HASIL PEMERIKSAAN KANDUNGAN GIZI**  
***(ANALISIS PROKSIMAT)***

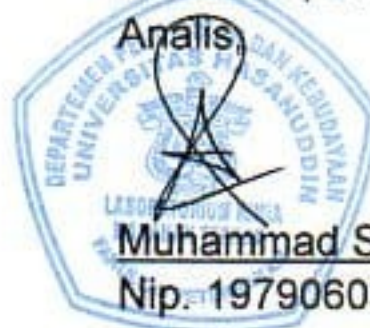


LABORATORIUM KIMIA MAKANAN TERNAK  
JURUSAN NUTRISI DAN MAKANAN TERNAK  
FAKULTAS PETERNAKAN  
UNIVERSITAS HASANUDDIN

HASIL ANALISIS BAHAN

| No | Parameter     | Satuan | Kode Sampel |           |
|----|---------------|--------|-------------|-----------|
|    |               |        | Ekstrak 1   | Ekstrak 2 |
| 1  | Air           | (%)    | 10,91       | 11,09     |
| 2  | Abu           | (%)    | 2,07        | 2,07      |
| 3  | Protein Kasar | (%)    | 22,16       | 23,96     |
| 4  | Lemak Kasar   | (%)    | 57,64       | 56,47     |
| 5  | Karbohidrat   | (%)    | 7,22        | 6,41      |
| 6  | Flavonoid     | ppm    | 0,16        | 0,14      |
| 7  | Anti Oksidan  | ppm    | 268,05      | 269,82    |
| 8  | Vitamin C     | %      | 4,26        | 3,38      |
| 9  | Beta Caroten  | %      | 0,16        | 0,18      |
| 10 | Polifenol     | %      | 0,94        | 0,99      |
| 11 | Calcium       | %      | 0,36        | 0,42      |
| 12 | Magnesium     | %      | 0,37        | 0,32      |
| 13 | Zink          | ppm    | 108,82      | 108,57    |

Makassar, 31 Juli 2019



Muhammad Syahrul

Nip. 19790603 2001 12 1 001

**LAMPIRAN 6:**  
**JUMLAH KOLONI BAKTERI**  
**(KULTUR)**

- PREVENTIF

| NO | KLP       | KODE MENCIT | HASIL KULTUR         |                  |                       |              |
|----|-----------|-------------|----------------------|------------------|-----------------------|--------------|
|    |           |             | 3 HR SETELAH INFEKSI |                  | 10 HR SETELAH INFEKSI |              |
|    |           |             | JUMLAH               | MEAN             | JUMLAH                | MEAN         |
| 1  | PREVENTIF | Kepala      | 21                   | 20,50<br>(17-24) | 7                     | 3,6<br>(2-7) |
| 2  |           | Punggung    | 20                   |                  | 4                     |              |
| 3  |           | Ekor        | 19                   |                  | 2                     |              |
| 4  |           | K. Depan KA | 22                   |                  | 3                     |              |
| 5  |           | K. Depan KI | 24                   |                  | 2                     |              |
| 6  |           | K. Belakang | 17                   |                  | -                     |              |

- KURATIF

| NO | KLP  | KODE MENCIT | HASIL KULTUR         |                  |                       |                  |
|----|--|-------------|----------------------|------------------|-----------------------|------------------|
|    |  |             | 3 HR SETELAH INFEKSI |                  | 10 HR SETELAH INFEKSI |                  |
|    |  |             | JUMLAH               | MEAN             | JUMLAH                | MEAN             |
| 7  | II. Herbal<br>500mg/kg<br>BB                   | Kepala      | 25                   | 27,67<br>(17-24) | 7                     | 5,67<br>(3-8)    |
| 8  |  | Punggung    | 29                   |                  | 4                     |                  |
| 9  |  | Ekor        | 28                   |                  | 8                     |                  |
| 10 |  | K. Depan KA | 25                   |                  | 5                     |                  |
| 11 |  | K. Depan KI | 26                   |                  | 7                     |                  |
| 12 |  | K. Belakang | 33                   |                  | 3                     |                  |
| 13 | III. 98mg<br>Levofloxacin<br>/ Kg BB<br>Mencit | Kepala      | 24                   | 28,00<br>(24-37) | 1                     | 1,67<br>(0-5)    |
| 14 |  | Punggung    | 24                   |                  | 5                     |                  |
| 15 |  | Ekor        | 37                   |                  | 1                     |                  |
| 16 |  | K. Depan KA | 32                   |                  | 0                     |                  |
| 17 |  | K. Depan KI | 26                   |                  | 1                     |                  |
| 18 |  | K. Belakang | 25                   |                  | 2                     |                  |
| 19 | IV. Aquadest                                   | Kepala      | 29                   | 26,17<br>(24-31) | 25                    | 26,17<br>(24-31) |
| 20 |  | Punggung    | 22                   |                  | 24                    |                  |
| 21 |  | Ekor        | 32                   |                  | 27                    |                  |
| 22 |  | K. Depan KA | 28                   |                  | 27                    |                  |
| 23 |  | K. Depan KI | 30                   |                  | 31                    |                  |
| 24 |  | K. Belakang | 26                   |                  | 23                    |                  |

**LAMPIRAN 7:**  
**LIST BERAT BADAN DAN DOSIS PENGOBATAN**  
**MENCIT BALB/C**

# List Berat Badan dan Dosis Pengobatan

Preventif

| NO | KLP       | Kode Mencit | BB Awal | Berat Badan dan Dosis Pengobatan |       |        |       |        |       |        |       |        |       |        |       |        |       |        |       |        |       |         |       |
|----|-----------|-------------|---------|----------------------------------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|---------|-------|
|    |           |             |         | Hari 1                           |       | Hari 2 |       | Hari 3 |       | Hari 4 |       | Hari 5 |       | Hari 6 |       | Hari 7 |       | Hari 8 |       | Hari 9 |       | Hari 10 |       |
|    |           |             |         | BB                               | Dosis | BB     | Dosis | BB     | Dosis | BB     | Dosis | BB     | Dosis | BB     | Dosis | BB     | Dosis | BB     | Dosis | BB     | Dosis | BB      | Dosis |
| 1  |           | Kepala      | 38,6    | 39,5                             | 20,1  | 39,6   | 20,2  | 38,6   | 19,7  | 40,0   | 20,4  | 39,8   | 20,3  | 39,5   | 20,1  | 39,4   | 20,1  | 40,2   | 20,5  | 40,7   | 20,8  | 40,3    | 20,6  |
| 2  |           | Punggung    | 34,1    | 36,7                             | 18,7  | 35,7   | 18,2  | 35,9   | 18,3  | 36,2   | 18,5  | 36,5   | 18,6  | 36,8   | 18,8  | 37,9   | 19,3  | 38,2   | 19,5  | 37,6   | 19,2  | 37,5    | 19,1  |
| 3  | 1         | Ekor        | 32,1    | 35,4                             | 18,1  | 34,5   | 17,6  | 34,8   | 17,7  | 35,3   | 18,0  | 35,8   | 18,3  | 34,7   | 17,7  | 33,5   | 17,1  | 34,5   | 17,6  | 34     | 17,3  | 35,1    | 17,9  |
| 4  | preventif | K. Depan KA | 30,2    | 31,8                             | 16,2  | 30,4   | 15,5  | 32,4   | 16,5  | 31,7   | 16,2  | 32,3   | 16,5  | 31,8   | 16,2  | 31,3   | 16,0  | 32,7   | 16,7  | 33,5   | 17,1  | 32,3    | 16,5  |
| 5  |           | K. Depan KI | 33,3    | 34,0                             | 17,3  | 33,9   | 17,3  | 34,3   | 17,5  | 34,2   | 17,4  | 35,7   | 18,2  | 34,9   | 17,8  | 34,1   | 17,4  | 35,8   | 18,3  | 36,8   | 18,8  | 35,4    | 18,1  |
| 6  |           | K. Belakang | 31,7    | 32,8                             | 16,7  | 31,9   | 16,3  | 32,3   | 16,5  | 32,5   | 16,6  | 31,8   | 16,2  | 32,6   | 16,6  | 33,8   | 17,2  | 34,1   | 17,4  | 32,8   | 16,7  | 33,2    | 16,9  |

Kuratif

| NO          | KLP                                  | Kode Mencit | BB Awal | Berat Badan dan Dosis Pengobatan |       |        |       |        |       |        |       |        |       |        |       |        |       |
|-------------|--------------------------------------|-------------|---------|----------------------------------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|
|             |                                      |             |         | Hari 1                           |       | Hari 2 |       | Hari 3 |       | Hari 4 |       | Hari 5 |       | Hari 6 |       | Hari 7 |       |
|             |                                      |             |         | BB                               | Dosis | BB     | Dosis | BB     | Dosis | BB     | Dosis | BB     | Dosis | BB     | Dosis | BB     | Dosis |
| 7           | II<br>510mg/<br>kg BB                | Kepala      | 31,8    | 30,5                             | 15,6  | 29,9   | 15,2  | 29,5   | 15,0  | 30,9   | 15,8  | 29,7   | 15,1  | 30,1   | 15,4  | 30,3   | 15,5  |
| Punggung    |                                      | 34,7        | 31,2    | 15,9                             | 32,6  | 16,6   | 33,0  | 16,8   | 32,7  | 16,7   | 33,2  | 16,9   | 33,5  | 17,1   | 33,2  | 16,9   |       |
| Ekor        |                                      | 34,3        | 32,3    | 16,5                             | 32,0  | 16,3   | 32,7  | 16,7   | 32,8  | 16,7   | 32,7  | 16,7   | 32,7  | 16,7   | 32,8  | 16,7   | 32,6  |
| 9           | II<br>510mg/<br>kg BB                | K. Depan KA | 34,2    | 30,6                             | 15,6  | 32,1   | 16,4  | 32,3   | 16,5  | 32,5   | 16,6  | 33,3   | 17,0  | 33,6   | 17,1  | 34,8   | 17,7  |
| K. Depan KI |                                      | 37,9        | 35,7    | 18,2                             | 34,0  | 17,3   | 35,0  | 17,9   | 34,2  | 17,4   | 34,8  | 17,7   | 34,2  | 17,4   | 33,8  | 17,2   |       |
| K. Belakang |                                      | 37,2        | 34,9    | 17,8                             | 35,3  | 18,0   | 35,7  | 18,2   | 35,6  | 18,2   | 36,3  | 18,5   | 36,8  | 18,8   | 37,1  | 18,9   |       |
| 11          | II<br>510mg/<br>kg BB                | K. Belakang | 37,2    | 34,9                             | 17,8  | 35,3   | 18,0  | 35,7   | 18,2  | 35,6   | 18,2  | 36,3   | 18,5  | 36,8   | 18,8  | 37,1   | 18,9  |
| K. Depan KI |                                      | 37,9        | 35,7    | 18,2                             | 34,0  | 17,3   | 35,0  | 17,9   | 34,2  | 17,4   | 34,8  | 17,7   | 34,2  | 17,4   | 33,8  | 17,2   |       |
| Kepala      |                                      | 32,8        | 30,0    | 2,9                              | 30,4  | 3,0    | 30,8  | 3,0    | 31,4  | 3,1    | 32,7  | 3,2    | 32,1  | 3,1    | 32,4  | 3,2    |       |
| 13          | III<br>98 mg<br>Levofloxacin / Kg BB | Kepala      | 32,8    | 30,0                             | 2,9   | 30,4   | 3,0   | 30,8   | 3,0   | 31,4   | 3,1   | 32,7   | 3,2   | 32,1   | 3,1   | 32,4   | 3,2   |
| Punggung    |                                      | 36,2        | 34,3    | 3,4                              | 33,8  | 3,3    | 34,1  | 3,3    | 33,4  | 3,3    | 33,2  | 3,3    | 33,5  | 3,3    | 32,9  | 3,2    |       |
| Ekor        |                                      | 35,8        | 34,1    | 3,3                              | 33,5  | 3,3    | 33,8  | 3,3    | 33,7  | 3,3    | 33,5  | 3,3    | 34,0  | 3,3    | 33,0  | 3,2    |       |
| 14          | III<br>98 mg<br>Levofloxacin / Kg BB | K. Depan KA | 30,7    | 29,8                             | 2,9   | 30,3   | 3,0   | 31,0   | 3,0   | 30,2   | 3,0   | 30,4   | 3,0   | 31,2   | 3,1   | 30,7   | 3,0   |
| K. Depan KI |                                      | 35,4        | 32,3    | 3,2                              | 31,2  | 3,1    | 31,5  | 3,1    | 31,7  | 3,1    | 32,0  | 3,1    | 32,5  | 3,2    | 32,3  | 3,2    |       |
| K. Belakang |                                      | 32,7        | 30,3    | 3,0                              | 30,8  | 3,0    | 31,2  | 3,1    | 31,8  | 3,1    | 33,3  | 3,3    | 34,1  | 3,3    | 33,0  | 3,2    |       |
| 15          | III<br>98 mg<br>Levofloxacin / Kg BB | K. Belakang | 32,7    | 30,3                             | 3,0   | 30,8   | 3,0   | 31,2   | 3,1   | 31,8   | 3,1   | 33,3   | 3,3   | 34,1   | 3,3   | 33,0   | 3,2   |
| Kepala      |                                      | 33,5        | 31,2    | 0,31                             | 31,8  | 0,32   | 32,3  | 0,32   | 31,6  | 0,32   | 31,4  | 0,31   | 31,5  | 0,32   | 31,0  | 0,31   |       |
| Punggung    |                                      | 37,3        | 35,3    | 0,35                             | 36,6  | 0,37   | 35,8  | 0,36   | 36,0  | 0,36   | 34,5  | 0,35   | 35,0  | 0,35   | 35,7  | 0,36   |       |
| 16          | IV<br>Aquadest                       | Ekor        | 36,2    | 35,0                             | 0,35  | 33,4   | 0,33  | 34,0   | 0,34  | 33,0   | 0,33  | 32,4   | 0,32  | 33,0   | 0,33  | 32,8   | 0,33  |
| K. Depan KA |                                      | 36,7        | 34,3    | 0,34                             | 35,8  | 0,36   | 35,5  | 0,36   | 35,3  | 0,35   | 36,1  | 0,36   | 36,0  | 0,36   | 36,3  | 0,36   |       |
| K. Depan KI |                                      | 33,9        | 31,2    | 0,31                             | 32,9  | 0,33   | 33,1  | 0,33   | 31,9  | 0,32   | 30,5  | 0,31   | 31,3  | 0,31   | 31,5  | 0,32   |       |
| 17          | IV<br>Aquadest                       | K. Depan KI | 33,9    | 31,2                             | 0,31  | 32,9   | 0,33  | 33,1   | 0,33  | 31,9   | 0,32  | 30,5   | 0,31  | 31,3   | 0,31  | 31,5   | 0,32  |
| K. Belakang |                                      | 31,8        | 30,5    | 0,31                             | 29,3  | 0,29   | 30,2  | 0,30   | 29,2  | 0,29   | 30,2  | 0,30   | 30,5  | 0,31   | 30,0  | 0,30   |       |
| K. Belakang |                                      | 31,8        | 30,5    | 0,31                             | 29,3  | 0,29   | 30,2  | 0,30   | 29,2  | 0,29   | 30,2  | 0,30   | 30,5  | 0,31   | 30,0  | 0,30   |       |
| 18          | IV<br>Aquadest                       | K. Belakang | 31,8    | 30,5                             | 0,31  | 29,3   | 0,29  | 30,2   | 0,30  | 29,2   | 0,29  | 30,2   | 0,30  | 30,5   | 0,31  | 30,0   | 0,30  |
| Kepala      |                                      | 33,5        | 31,2    | 0,31                             | 31,8  | 0,32   | 32,3  | 0,32   | 31,6  | 0,32   | 31,4  | 0,31   | 31,5  | 0,32   | 31,0  | 0,31   |       |
| Punggung    |                                      | 37,3        | 35,3    | 0,35                             | 36,6  | 0,37   | 35,8  | 0,36   | 36,0  | 0,36   | 34,5  | 0,35   | 35,0  | 0,35   | 35,7  | 0,36   |       |
| 19          | IV<br>Aquadest                       | Punggung    | 37,3    | 35,3                             | 0,35  | 36,6   | 0,37  | 35,8   | 0,36  | 36,0   | 0,36  | 34,5   | 0,35  | 35,0   | 0,35  | 35,7   | 0,36  |
| Ekor        |                                      | 36,2        | 35,0    | 0,35                             | 33,4  | 0,33   | 34,0  | 0,34   | 33,0  | 0,33   | 32,4  | 0,32   | 33,0  | 0,33   | 32,8  | 0,33   |       |
| K. Depan KA |                                      | 36,7        | 34,3    | 0,34                             | 35,8  | 0,36   | 35,5  | 0,36   | 35,3  | 0,35   | 36,1  | 0,36   | 36,0  | 0,36   | 36,3  | 0,36   |       |
| 20          | IV<br>Aquadest                       | K. Depan KA | 36,7    | 34,3                             | 0,34  | 35,8   | 0,36  | 35,5   | 0,36  | 35,3   | 0,35  | 36,1   | 0,36  | 36,0   | 0,36  | 36,3   | 0,36  |
| K. Depan KI |                                      | 33,9        | 31,2    | 0,31                             | 32,9  | 0,33   | 33,1  | 0,33   | 31,9  | 0,32   | 30,5  | 0,31   | 31,3  | 0,31   | 31,5  | 0,32   |       |
| K. Belakang |                                      | 31,8        | 30,5    | 0,31                             | 29,3  | 0,29   | 30,2  | 0,30   | 29,2  | 0,29   | 30,2  | 0,30   | 30,5  | 0,31   | 30,0  | 0,30   |       |
| 21          | IV<br>Aquadest                       | K. Belakang | 31,8    | 30,5                             | 0,31  | 29,3   | 0,29  | 30,2   | 0,30  | 29,2   | 0,29  | 30,2   | 0,30  | 30,5   | 0,31  | 30,0   | 0,30  |
| Kepala      |                                      | 33,5        | 31,2    | 0,31                             | 31,8  | 0,32   | 32,3  | 0,32   | 31,6  | 0,32   | 31,4  | 0,31   | 31,5  | 0,32   | 31,0  | 0,31   |       |
| Punggung    |                                      | 37,3        | 35,3    | 0,35                             | 36,6  | 0,37   | 35,8  | 0,36   | 36,0  | 0,36   | 34,5  | 0,35   | 35,0  | 0,35   | 35,7  | 0,36   |       |
| 22          | IV<br>Aquadest                       | Punggung    | 37,3    | 35,3                             | 0,35  | 36,6   | 0,37  | 35,8   | 0,36  | 36,0   | 0,36  | 34,5   | 0,35  | 35,0   | 0,35  | 35,7   | 0,36  |
| Ekor        |                                      | 36,2        | 35,0    | 0,35                             | 33,4  | 0,33   | 34,0  | 0,34   | 33,0  | 0,33   | 32,4  | 0,32   | 33,0  | 0,33   | 32,8  | 0,33   |       |
| K. Depan KA |                                      | 36,7        | 34,3    | 0,34                             | 35,8  | 0,36   | 35,5  | 0,36   | 35,3  | 0,35   | 36,1  | 0,36   | 36,0  | 0,36   | 36,3  | 0,36   |       |
| 23          | IV<br>Aquadest                       | K. Depan KA | 36,7    | 34,3                             | 0,34  | 35,8   | 0,36  | 35,5   | 0,36  | 35,3   | 0,35  | 36,1   | 0,36  | 36,0   | 0,36  | 36,3   | 0,36  |
| K. Depan KI |                                      | 33,9        | 31,2    | 0,31                             | 32,9  | 0,33   | 33,1  | 0,33   | 31,9  | 0,32   | 30,5  | 0,31   | 31,3  | 0,31   | 31,5  | 0,32   |       |
| K. Belakang |                                      | 31,8        | 30,5    | 0,31                             | 29,3  | 0,29   | 30,2  | 0,30   | 29,2  | 0,29   | 30,2  | 0,30   | 30,5  | 0,31   | 30,0  | 0,30   |       |
| 24          | IV<br>Aquadest                       | K. Belakang | 31,8    | 30,5                             | 0,31  | 29,3   | 0,29  | 30,2   | 0,30  | 29,2   | 0,29  | 30,2   | 0,30  | 30,5   | 0,31  | 30,0   | 0,30  |
| Kepala      |                                      | 33,5        | 31,2    | 0,31                             | 31,8  | 0,32   | 32,3  | 0,32   | 31,6  | 0,32   | 31,4  | 0,31   | 31,5  | 0,32   | 31,0  | 0,31   |       |
| Punggung    |                                      | 37,3        | 35,3    | 0,35                             | 36,6  | 0,37   | 35,8  | 0,36   | 36,0  | 0,36   | 34,5  | 0,35   | 35,0  | 0,35   | 35,7  | 0,36   |       |



**LAMPIRAN 8:**  
**HASIL ANALISIS STATISTIK**

Kelompok 1  
 ONEWAY Ekspresi BY Preventif  
 /STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY  
 /MISSING ANALYSIS  
 /POSTHOC=BONFERRONI ALPHA(0.01) .

## Oneway

### Descriptives

Ekspresi

|                                     | N  | Mean    | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean |             | Minimum | Maximum |
|-------------------------------------|----|---------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
|                                     |    |         |                |            | Lower Bound                      | Upper Bound |         |         |
| Sebelum Perlakuan                   | 5  | 5.90920 | .350395        | .156701    | 5.47413                          | 6.34427     | 5.436   | 6.279   |
| 10 hari setelah perlakuan Ekstra Th | 5  | 6.30800 | .522600        | .233714    | 5.65911                          | 6.95689     | 5.704   | 6.864   |
| hari ke-3 setelah diinfeksi ST      | 5  | 8.04340 | .304782        | .136302    | 7.66496                          | 8.42184     | 7.710   | 8.508   |
| hari ke -10 setelah diinfeksi ST    | 5  | 8.35200 | .236360        | .105703    | 8.05852                          | 8.64548     | 7.993   | 8.622   |
| Total                               | 20 | 7.15315 | 1.138696       | .254620    | 6.62022                          | 7.68608     | 5.436   | 8.622   |

### Test of Homogeneity of Variances

Ekspresi

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| 1.917            | 3   | 16  | .168 |

### ANOVA

Ekspresi

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F      | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Between Groups | 22.457         | 3  | 7.486       | 54.977 | .000 |
| Within Groups  | 2.179          | 16 | .136        |        |      |
| Total          | 24.636         | 19 |             |        |      |

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: Ekspresi  
Bonferroni

| (I) Preventif                       | (J) Preventif                       | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig.  | 99% Confidence Interval |             |
|-------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------|------------|-------|-------------------------|-------------|
|                                     |                                     |                       |            |       | Lower Bound             | Upper Bound |
| Sebelum Perlakuan Ekstra Th         | 10 hari setelah perlakuan Ekstra Th | -.398800              | .233376    | .641  | -1.27921                | .48161      |
|                                     | hari ke-3 setelah diinfeksi ST      | -2.134200*            | .233376    | .000  | -3.01461                | -1.25379    |
|                                     | hari ke -10 setelah diinfeksi ST    | -2.442800*            | .233376    | .000  | -3.32321                | -1.56239    |
| 10 hari setelah perlakuan Ekstra Th | Sebelum Perlakuan                   | .398800               | .233376    | .641  | -.48161                 | 1.27921     |
|                                     | hari ke-3 setelah diinfeksi ST      | -1.735400*            | .233376    | .000  | -2.61581                | -.85499     |
|                                     | hari ke -10 setelah diinfeksi ST    | -2.044000*            | .233376    | .000  | -2.92441                | -1.16359    |
| hari ke-3 setelah diinfeksi ST      | Sebelum Perlakuan                   | 2.134200*             | .233376    | .000  | 1.25379                 | 3.01461     |
|                                     | 10 hari setelah perlakuan Ekstra Th | 1.735400*             | .233376    | .000  | .85499                  | 2.61581     |
|                                     | hari ke -10 setelah diinfeksi ST    | -.308600              | .233376    | 1.000 | -1.18901                | .57181      |
| hari ke -10 setelah diinfeksi ST    | Sebelum Perlakuan                   | 2.442800*             | .233376    | .000  | 1.56239                 | 3.32321     |
|                                     | 10 hari setelah perlakuan Ekstra Th | 2.044000*             | .233376    | .000  | 1.16359                 | 2.92441     |
|                                     | hari ke-3 setelah diinfeksi ST      | .308600               | .233376    | 1.000 | -.57181                 | 1.18901     |

\*. The mean difference is significant at the 0.01 level.

## Kelompok 2

ONEWAY Ekspresigen BY Kuratif\_1  
 /STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY  
 /MISSING ANALYSIS  
 /POSTHOC=BONFERRONI ALPHA(0.01).

## Oneway

### Descriptives

Ekspresi Gen

|  | N  | Mean     | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean |             | Minimum | Maximum |
|--|----|----------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
|  |    |          |                |            | Lower Bound                      | Upper Bound |         |         |
| Sebelum perlakuan                      | 5  | 5.99620  | .340644        | .152341    | 5.57323                          | 6.41917     | 5.566   | 6.384   |
| 3 hari setelah diinfeksi St            | 5  | 10.83300 | .489016        | .218695    | 10.22581                         | 11.44019    | 10.217  | 11.474  |
| 7 hari setelah perlakuan ekstraksi Th  | 5  | 6.82320  | .369027        | .165034    | 6.36499                          | 7.28141     | 6.440   | 7.287   |
| 14 hari setelah perlakuan ekstraksi Th | 5  | 6.49500  | .317027        | .141779    | 6.10136                          | 6.88864     | 6.179   | 6.881   |
| Total                                  | 20 | 7.53685  | 2.006991       | .448777    | 6.59755                          | 8.47615     | 5.566   | 11.474  |

### Test of Homogeneity of Variances

Ekspresi Gen

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| .475             | 3   | 16  | .704 |

### ANOVA

Ekspresi Gen

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F       | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|------|
| Between Groups | 74.165         | 3  | 24.722      | 167.077 | .000 |
| Within Groups  | 2.367          | 16 | .148        |         |      |
| Total          | 76.532         | 19 |             |         |      |

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: Ekspresi Gen  
Bonferroni

| (I) Kuratif_1                          | (J) Kuratif_1                          | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig.  | 99% Confidence Interval |             |
|--|--|-----------------------|------------|-------|-------------------------|-------------|
|  |  |                       |            |       | Lower Bound             | Upper Bound |
| Sebelum perlakuan                      | 3 hari setelah diinfeksi St            | -4.836800*            | .243282    | .000  | -5.75458                | -3.91902    |
|  | 7 hari setelah perlakuan ekstraksi Th  | -.827000              | .243282    | .022  | -1.74478                | .09078      |
|  | 14 hari setelah perlakuan ekstraksi Th | -.498800              | .243282    | .343  | -1.41658                | .41898      |
| 3 hari setelah diinfeksi St            | Sebelum perlakuan                      | 4.836800*             | .243282    | .000  | 3.91902                 | 5.75458     |
|  | 7 hari setelah perlakuan ekstraksi Th  | 4.009800*             | .243282    | .000  | 3.09202                 | 4.92758     |
|  | 14 hari setelah perlakuan ekstraksi Th | 4.338000*             | .243282    | .000  | 3.42022                 | 5.25578     |
| 7 hari setelah perlakuan ekstraksi Th  | Sebelum perlakuan                      | .827000               | .243282    | .022  | -.09078                 | 1.74478     |
|  | 3 hari setelah diinfeksi St            | -4.009800*            | .243282    | .000  | -4.92758                | -3.09202    |
|  | 14 hari setelah perlakuan ekstraksi Th | .328200               | .243282    | 1.000 | -.58958                 | 1.24598     |
| 14 hari setelah perlakuan ekstraksi Th | Sebelum perlakuan                      | .498800               | .243282    | .343  | -.41898                 | 1.41658     |
|  | 3 hari setelah diinfeksi St            | -4.338000*            | .243282    | .000  | -5.25578                | -3.42022    |
|  | 7 hari setelah perlakuan ekstraksi Th  | -.328200              | .243282    | 1.000 | -1.24598                | .58958      |

\*. The mean difference is significant at the 0.01 level.

## Kelompok 3 Obat

ONEWAY ekspGEN BY Obat  
 /STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY  
 /MISSING ANALYSIS  
 /POSTHOC=BONFERRONI ALPHA(0.01) .

## Oneway

### Descriptives

eksGEN

|   | N  | Mean     | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean |             | Minimum | Maximum |
|---|----|----------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
|   |    |          |                |            | Lower Bound                      | Upper Bound |         |         |
| sebelum perlakuan                           | 5  | 6.06960  | .515729        | .230641    | 5.42924                          | 6.70996     | 5.511   | 6.779   |
| 3 hari sesudah diinjeksi ST                 | 5  | 10.63500 | .437957        | .195860    | 10.09120                         | 11.17880    | 10.034  | 11.157  |
| 7 hari sesudah pemberian Obat Levofloxacin  | 5  | 6.61860  | .335078        | .149851    | 6.20255                          | 7.03465     | 6.149   | 7.020   |
| 14 hari sesudah pemberian obat Levofloxacin | 5  | 6.00640  | .419695        | .187693    | 5.48528                          | 6.52752     | 5.572   | 6.575   |
| Total                                       | 20 | 7.33240  | 2.010929       | .449657    | 6.39126                          | 8.27354     | 5.511   | 11.157  |

### Test of Homogeneity of Variances

eksGEN

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| .355             | 3   | 16  | .786 |

### ANOVA

eksGEN

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F       | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|------|
| Between Groups | 73.848         | 3  | 24.616      | 131.953 | .000 |
| Within Groups  | 2.985          | 16 | .187        |         |      |
| Total          | 76.833         | 19 |             |         |      |

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: eksGEN

## Bonferroni

| (I) Obat                                    | (J) Obat                                    | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig.  | 99% Confidence Interval |             |
|---|---|-----------------------|------------|-------|-------------------------|-------------|
|   |   |                       |            |       | Lower Bound             | Upper Bound |
| sebelum perlakuan                           | 3 hari sesudah diinjeksi ST                 | 4.565400 <sup>*</sup> | .273167    | .000  | -5.59593                | -3.53487    |
|   | 7 hari sesudah pemberian Obat Levofloxacin  | -.549000              | .273167    | .370  | -1.57953                | .48153      |
|   | 14 hari sesudah pemberian obat Levofloxacin | .063200               | .273167    | 1.000 | -.96733                 | 1.09373     |
| 3 hari sesudah diinjeksi ST                 | sebelum perlakuan                           | 4.565400 <sup>*</sup> | .273167    | .000  | 3.53487                 | 5.59593     |
|   | 7 hari sesudah pemberian Obat Levofloxacin  | 4.016400 <sup>*</sup> | .273167    | .000  | 2.98587                 | 5.04693     |
|   | 14 hari sesudah pemberian obat Levofloxacin | 4.628600 <sup>*</sup> | .273167    | .000  | 3.59807                 | 5.65913     |
| 7 hari sesudah pemberian Obat Levofloxacin  | sebelum perlakuan                           | .549000               | .273167    | .370  | -.48153                 | 1.57953     |
|   | 3 hari sesudah diinjeksi ST                 | 4.016400 <sup>*</sup> | .273167    | .000  | -5.04693                | -2.98587    |
|   | 14 hari sesudah pemberian obat Levofloxacin | .612200               | .273167    | .237  | -.41833                 | 1.64273     |
| 14 hari sesudah pemberian obat Levofloxacin | sebelum perlakuan                           | -.063200              | .273167    | 1.000 | -1.09373                | .96733      |
|   | 3 hari sesudah diinjeksi ST                 | 4.628600 <sup>*</sup> | .273167    | .000  | -5.65913                | -3.59807    |
|   | 7 hari sesudah pemberian Obat Levofloxacin  | -.612200              | .273167    | .237  | -1.64273                | .41833      |

\*. The mean difference is significant at the 0.01 level.

## Kelompok 4 aquadest

ONEWAY EKSPgEn BY Aquadest  
 /STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY  
 /MISSING ANALYSIS  
 /POSTHOC=BONFERRONI ALPHA(0.01) .

### Oneway

#### Descriptives

EKSPgEn

|                                 | N  | Mean     | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean |             | Minimum | Maximum |
|---------------------------------|----|----------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
|                                 |    |          |                |            | Lower Bound                      | Upper Bound |         |         |
| sebelum perlakuan               | 5  | 5.96140  | .484837        | .216826    | 5.35940                          | 6.56340     | 5.408   | 6.614   |
| 3 hari sesudah diinjeksi ST     | 5  | 10.69780 | .411470        | .184015    | 10.18689                         | 11.20871    | 10.132  | 11.202  |
| 7 hari sesudah diberi aquadest  | 5  | 12.70720 | .425926        | .190480    | 12.17834                         | 13.23606    | 12.157  | 13.210  |
| 14 hari sesudah diberi aquadest | 5  | 13.53420 | .302667        | .135357    | 13.15839                         | 13.91001    | 13.090  | 13.894  |
| Total                           | 20 | 10.72515 | 3.037280       | .679156    | 9.30366                          | 12.14664    | 5.408   | 13.894  |

#### Test of Homogeneity of Variances

EKSPgEn

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| .606             | 3   | 16  | .621 |

#### ANOVA

EKSPgEn

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F       | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|------|
| Between Groups | 172.567        | 3  | 57.522      | 339.668 | .000 |
| Within Groups  | 2.710          | 16 | .169        |         |      |
| Total          | 175.276        | 19 |             |         |      |



## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: EKSPgEn  
Bonferroni

|                                 |                                 | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 99% Confidence Interval |             |
|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
| (I) Aquadest                    | (J) Aquadest                    |                       |            |      | Lower Bound             | Upper Bound |
| sebelum perlakuan               | 3 hari sesudah diinjeksi ST     | -4.736400*            | .260268    | .000 | -5.71826                | -3.75454    |
|                                 | 7 hari sesudah diberi aquadest  | -6.745800*            | .260268    | .000 | -7.72766                | -5.76394    |
|                                 | 14 hari sesudah diberi aquadest | -7.572800*            | .260268    | .000 | -8.55466                | -6.59094    |
| 3 hari sesudah diinjeksi ST     | sebelum perlakuan               | 4.736400*             | .260268    | .000 | 3.75454                 | 5.71826     |
|                                 | 7 hari sesudah diberi aquadest  | -2.009400*            | .260268    | .000 | -2.99126                | -1.02754    |
|                                 | 14 hari sesudah diberi aquadest | -2.836400*            | .260268    | .000 | -3.81826                | -1.85454    |
| 7 hari sesudah diberi aquadest  | sebelum perlakuan               | 6.745800*             | .260268    | .000 | 5.76394                 | 7.72766     |
|                                 | 3 hari sesudah diinjeksi ST     | 2.009400*             | .260268    | .000 | 1.02754                 | 2.99126     |
|                                 | 14 hari sesudah diberi aquadest | -.827000              | .260268    | .035 | -1.80886                | .15486      |
| 14 hari sesudah diberi aquadest | sebelum perlakuan               | 7.572800*             | .260268    | .000 | 6.59094                 | 8.55466     |
|                                 | 3 hari sesudah diinjeksi ST     | 2.836400*             | .260268    | .000 | 1.85454                 | 3.81826     |
|                                 | 7 hari sesudah diberi aquadest  | .827000               | .260268    | .035 | -.15486                 | 1.80886     |

\*. The mean difference is significant at the 0.01 level.

## K1 dan K2

```

ONEWAY eks.gen BY Kuratif_4
  /STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY
  /MISSING ANALYSIS
  /POSTHOC=BONFERRONI ALPHA(0.01) .
  
```

## Oneway

### Descriptives

Ekspresi Gen

|  | N  | Mean    | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean |             | Minimum | Maximum |
|--|----|---------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
|  |    |         |                |            | Lower Bound                      | Upper Bound |         |         |
| perlakuan Ekstra Th sebelum Injeksi St   | 20 | 7.15315 | 1.138696       | .254620    | 6.62022                          | 7.68608     | 5.436   | 8.622   |
| perlakuan ekstra Th setelah diinjeksi St | 20 | 7.53685 | 2.006991       | .448777    | 6.59755                          | 8.47615     | 5.566   | 11.474  |
| Total                                    | 40 | 7.34500 | 1.622284       | .256506    | 6.82617                          | 7.86383     | 5.436   | 11.474  |

### Test of Homogeneity of Variances

Ekspresi Gen

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| 5.531            | 1   | 38  | .024 |

### ANOVA

Ekspresi Gen

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F    | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|------|------|
| Between Groups | 1.472          | 1  | 1.472       | .553 | .462 |
| Within Groups  | 101.168        | 38 | 2.662       |      |      |
| Total          | 102.640        | 39 |             |      |      |

K1,K2,K3,K4

ONEWAY eksp\_gen BY PERLAKUAN  
 /STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY  
 /MISSING ANALYSIS  
 /POSTHOC=BONFERRONI ALPHA(0.01) .

## Oneway

### Descriptives

eksp\_gen

|  | N  | Mean     | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean |             | Minimum | Maximum |
|--|----|----------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
|  |    |          |                |            | Lower Bound                      | Upper Bound |         |         |
| pemberian ekstra Th sebelum injeksi St           | 20 | 7.15315  | 1.138696       | .254620    | 6.62022                          | 7.68608     | 5.436   | 8.622   |
| pemberian perlakuan ekstra Th sesudah injeksi St | 20 | 7.53685  | 2.006991       | .448777    | 6.59755                          | 8.47615     | 5.566   | 11.474  |
| Pengobatan Levofloxacin seelah injeksi St        | 20 | 7.33240  | 2.010929       | .449657    | 6.39126                          | 8.27354     | 5.511   | 11.157  |
| pemberian aquadest setelah injeksi St            | 20 | 10.72515 | 3.037280       | .679156    | 9.30366                          | 12.14664    | 5.408   | 13.894  |
| Total  | 80 | 8.18689  | 2.581725       | .288646    | 7.61235                          | 8.76142     | 5.408   | 13.894  |

### Test of Homogeneity of Variances

eksp\_gen

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| 5.147            | 3   | 76  | .003 |

### ANOVA

eksp\_gen

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F      | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Between Groups | 173.282        | 3  | 57.761      | 12.426 | .000 |
| Within Groups  | 353.277        | 76 | 4.648       |        |      |
| Total          | 526.559        | 79 |             |        |      |

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: eksp\_gen  
Bonferroni

| (I) PERLAKUAN                                    | (J) PERLAKUAN                                    | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig.  | 99% Confidence Interval |             |
|--|--|-----------------------|------------|-------|-------------------------|-------------|
|  |  |                       |            |       | Lower Bound             | Upper Bound |
| pemberian ekstra Th sebelum injeksi St           | pemberian perlakuan ekstra Th sesudah injeksi St | -.383700              | .681791    | 1.000 | -2.60656                | 1.83916     |
|  | Pengobatan Levofloxacin seelah injeksi St        | -.179250              | .681791    | 1.000 | -2.40211                | 2.04361     |
|  | pemberian aquadest setelah injeksi St            | -3.572000*            | .681791    | .000  | -5.79486                | -1.34914    |
| pemberian perlakuan ekstra Th sesudah injeksi St | pemberian ekstra Th sebelum injeksi St           | .383700               | .681791    | 1.000 | -1.83916                | 2.60656     |
|  | Pengobatan Levofloxacin seelah injeksi St        | .204450               | .681791    | 1.000 | -2.01841                | 2.42731     |
|  | pemberian aquadest setelah injeksi St            | -3.188300*            | .681791    | .000  | -5.41116                | -.96544     |
| Pengobatan Levofloxacin seelah injeksi St        | pemberian ekstra Th sebelum injeksi St           | .179250               | .681791    | 1.000 | -2.04361                | 2.40211     |
|  | pemberian perlakuan ekstra Th sesudah injeksi St | -.204450              | .681791    | 1.000 | -2.42731                | 2.01841     |
|  | pemberian aquadest setelah injeksi St            | -3.392750*            | .681791    | .000  | -5.61561                | -1.16989    |
| pemberian aquadest setelah injeksi St            | pemberian ekstra Th sebelum injeksi St           | 3.572000*             | .681791    | .000  | 1.34914                 | 5.79486     |
|  | pemberian perlakuan ekstra Th sesudah injeksi St | 3.188300*             | .681791    | .000  | .96544                  | 5.41116     |
|  | Pengobatan Levofloxacin seelah injeksi St        | 3.392750*             | .681791    | .000  | 1.16989                 | 5.61561     |

\*. The mean difference is significant at the 0.01 level.

**LAMPIRAN 9:**  
**HASIL PEMERIKSAAN EKSPRESI *mRNA***  
***GEN TLR4 (RT-PCR)***

|    | A | B    | C     | D       | E       | F        | G     | H       | I           | J                      | K                     | L        | M           |
|----|---|------|-------|---------|---------|----------|-------|---------|-------------|------------------------|-----------------------|----------|-------------|
| 1  |   | Well | Fluor | Target  | Content | Sample   | Cq    | Cq Mean | Cq Std. Dev | Starting Quantity (SQ) | Log Starting Quantity | SQ Mean  | SQ Std. Dev |
| 2  |   | A01  | SYBR  | β-Actin | Std-01  | Standard | 22.26 | 22.33   | 0.087       | 2.07E+01               | 1.317                 | 2.07E+01 | 0.0873689   |
| 3  |   | A02  | SYBR  | β-Actin | Std-01  | Standard | 22.43 | 22.33   | 0.087       | 2.06E+01               | 1.313                 | 2.07E+01 | 0.0873689   |
| 4  |   | A03  | SYBR  | β-Actin | Std-01  | Standard | 22.31 | 22.33   | 0.087       | 2.07E+01               | 1.316                 | 2.07E+01 | 0.0873689   |
| 5  |   | A04  | SYBR  | TLR4    | Unkn-01 | A01      | 31.89 | 31.83   | 0.053       | 1.11E+01               | 1.046                 | 1.12E+01 | 0.052915    |
| 6  |   | A05  | SYBR  | TLR4    | Unkn-01 | A01      | 31.81 | 31.83   | 0.053       | 1.12E+01               | 1.049                 | 1.12E+01 | 0.052915    |
| 7  |   | A06  | SYBR  | TLR4    | Unkn-01 | A01      | 31.79 | 31.83   | 0.053       | 1.12E+01               | 1.050                 | 1.12E+01 | 0.052915    |
| 8  |   | A07  | SYBR  | TLR4    | Unkn-02 | A02      | 31.28 | 31.16   | 0.125       | 1.17E+01               | 1.069                 | 1.18E+01 | 0.1252996   |
| 9  |   | A08  | SYBR  | TLR4    | Unkn-02 | A02      | 31.17 | 31.16   | 0.125       | 1.18E+01               | 1.073                 | 1.18E+01 | 0.1252996   |
| 10 |   | A09  | SYBR  | TLR4    | Unkn-02 | A02      | 31.03 | 31.16   | 0.125       | 1.20E+01               | 1.078                 | 1.18E+01 | 0.1252996   |
| 11 |   | A10  | SYBR  | TLR4    | Unkn-03 | A03      | 30.98 | 30.99   | 0.075       | 1.20E+01               | 1.080                 | 1.20E+01 | 0.0754983   |
| 12 |   | A11  | SYBR  | TLR4    | Unkn-03 | A03      | 30.92 | 30.99   | 0.075       | 1.21E+01               | 1.082                 | 1.20E+01 | 0.0754983   |
| 13 |   | A12  | SYBR  | TLR4    | Unkn-03 | A03      | 31.07 | 30.99   | 0.075       | 1.19E+01               | 1.077                 | 1.20E+01 | 0.0754983   |
| 14 |   | B01  | SYBR  | β-Actin | Std-02  | Standard | 24.08 | 24.26   | 0.186       | 1.89E+01               | 1.277                 | 1.87E+01 | 0.1855622   |
| 15 |   | B02  | SYBR  | β-Actin | Std-02  | Standard | 24.45 | 24.26   | 0.186       | 1.86E+01               | 1.268                 | 1.87E+01 | 0.1855622   |
| 16 |   | B03  | SYBR  | β-Actin | Std-02  | Standard | 24.24 | 24.26   | 0.186       | 1.88E+01               | 1.273                 | 1.87E+01 | 0.1855622   |
| 17 |   | B04  | SYBR  | TLR4    | Unkn-04 | A04      | 31.52 | 31.62   | 0.119       | 1.15E+01               | 1.060                 | 1.14E+01 | 0.1193035   |
| 18 |   | B05  | SYBR  | TLR4    | Unkn-04 | A04      | 31.75 | 31.62   | 0.119       | 1.13E+01               | 1.051                 | 1.14E+01 | 0.1193035   |
| 19 |   | B06  | SYBR  | TLR4    | Unkn-04 | A04      | 31.58 | 31.62   | 0.119       | 1.14E+01               | 1.058                 | 1.14E+01 | 0.1193035   |
| 20 |   | B07  | SYBR  | TLR4    | Unkn-05 | A05      | 31.17 | 31.20   | 0.153       | 1.18E+01               | 1.073                 | 1.18E+01 | 0.1527525   |
| 21 |   | B08  | SYBR  | TLR4    | Unkn-05 | A05      | 31.07 | 31.20   | 0.153       | 1.19E+01               | 1.077                 | 1.18E+01 | 0.1527525   |
| 22 |   | B09  | SYBR  | TLR4    | Unkn-05 | A05      | 31.37 | 31.20   | 0.153       | 1.16E+01               | 1.066                 | 1.18E+01 | 0.1527525   |
| 23 |   | B10  | SYBR  | TLR4    | Unkn-06 | B01      | 31.60 | 31.41   | 0.195       | 1.14E+01               | 1.057                 | 1.16E+01 | 0.1950214   |
| 24 |   | B11  | SYBR  | TLR4    | Unkn-06 | B01      | 31.21 | 31.41   | 0.195       | 1.18E+01               | 1.072                 | 1.16E+01 | 0.1950214   |
| 25 |   | B12  | SYBR  | TLR4    | Unkn-06 | B01      | 31.41 | 31.41   | 0.195       | 1.16E+01               | 1.064                 | 1.16E+01 | 0.1950214   |
| 26 |   | C01  | SYBR  | β-Actin | Std-03  | Standard | 26.48 | 26.46   | 0.186       | 1.65E+01               | 1.218                 | 1.65E+01 | 0.1855622   |
| 27 |   | C02  | SYBR  | β-Actin | Std-03  | Standard | 26.64 | 26.46   | 0.186       | 1.64E+01               | 1.214                 | 1.65E+01 | 0.1855622   |
| 28 |   | C03  | SYBR  | β-Actin | Std-03  | Standard | 26.27 | 26.46   | 0.186       | 1.67E+01               | 1.223                 | 1.65E+01 | 0.1855622   |
| 29 |   | C04  | SYBR  | TLR4    | Unkn-07 | B02      | 30.76 | 30.40   | 0.337       | 1.22E+01               | 1.088                 | 1.26E+01 | 0.3370954   |
| 30 |   | C05  | SYBR  | TLR4    | Unkn-07 | B02      | 30.36 | 30.40   | 0.337       | 1.26E+01               | 1.102                 | 1.26E+01 | 0.3370954   |
| 31 |   | C06  | SYBR  | TLR4    | Unkn-07 | B02      | 30.09 | 30.40   | 0.337       | 1.29E+01               | 1.111                 | 1.26E+01 | 0.3370954   |
| 32 |   | C07  | SYBR  | TLR4    | Unkn-08 | B03      | 31.14 | 30.94   | 0.200       | 1.19E+01               | 1.074                 | 1.21E+01 | 0.2         |
| 33 |   | C08  | SYBR  | TLR4    | Unkn-08 | B03      | 30.94 | 30.94   | 0.200       | 1.21E+01               | 1.081                 | 1.21E+01 | 0.2         |
| 34 |   | C09  | SYBR  | TLR4    | Unkn-08 | B03      | 30.74 | 30.94   | 0.200       | 1.23E+01               | 1.088                 | 1.21E+01 | 0.2         |
| 35 |   | C10  | SYBR  | TLR4    | Unkn-09 | B04      | 31.53 | 31.56   | 0.061       | 1.15E+01               | 1.060                 | 1.14E+01 | 0.0608276   |
| 36 |   | C11  | SYBR  | TLR4    | Unkn-09 | B04      | 31.63 | 31.56   | 0.061       | 1.14E+01               | 1.056                 | 1.14E+01 | 0.0608276   |
| 37 |   | C12  | SYBR  | TLR4    | Unkn-09 | B04      | 31.52 | 31.56   | 0.061       | 1.15E+01               | 1.060                 | 1.14E+01 | 0.0608276   |
| 38 |   | D01  | SYBR  | β-Actin | Std-04  | Standard | 28.92 | 28.92   | 0.065       | 1.41E+01               | 1.149                 | 1.41E+01 | 0.0650641   |
| 39 |   | D02  | SYBR  | β-Actin | Std-04  | Standard | 28.98 | 28.92   | 0.065       | 1.40E+01               | 1.147                 | 1.41E+01 | 0.0650641   |
| 40 |   | D03  | SYBR  | β-Actin | Std-04  | Standard | 28.85 | 28.92   | 0.065       | 1.42E+01               | 1.151                 | 1.41E+01 | 0.0650641   |
| 41 |   | D04  | SYBR  | TLR4    | Unkn-10 | B05      | 30.38 | 30.49   | 0.121       | 1.26E+01               | 1.101                 | 1.25E+01 | 0.1212436   |
| 42 |   | D05  | SYBR  | TLR4    | Unkn-10 | B05      | 30.47 | 30.49   | 0.121       | 1.25E+01               | 1.098                 | 1.25E+01 | 0.1212436   |

|    | N          |
|----|------------|
| 1  | Slope (dR) |
| 2  | -3.371     |
| 3  | -3.371     |
| 4  | -3.371     |
| 5  | -3.371     |
| 6  | -3.371     |
| 7  | -3.371     |
| 8  | -3.371     |
| 9  | -3.371     |
| 10 | -3.371     |
| 11 | -3.371     |
| 12 | -3.371     |
| 13 | -3.371     |
| 14 | -3.371     |
| 15 | -3.371     |
| 16 | -3.371     |
| 17 | -3.371     |
| 18 | -3.371     |
| 19 | -3.371     |
| 20 | -3.371     |
| 21 | -3.371     |
| 22 | -3.371     |
| 23 | -3.371     |
| 24 | -3.371     |
| 25 | -3.371     |
| 26 | -3.371     |
| 27 | -3.371     |
| 28 | -3.371     |
| 29 | -3.371     |
| 30 | -3.371     |
| 31 | -3.371     |
| 32 | -3.371     |
| 33 | -3.371     |
| 34 | -3.371     |
| 35 | -3.371     |
| 36 | -3.371     |
| 37 | -3.371     |
| 38 | -3.371     |
| 39 | -3.371     |
| 40 | -3.371     |
| 41 | -3.371     |
| 42 | -3.371     |

|    | A | B   | C    | D              | E       | F        | G     | H     | I     | J        | K     | L        | M         |
|----|---|-----|------|----------------|---------|----------|-------|-------|-------|----------|-------|----------|-----------|
| 43 |   | D06 | SYBR | TLR4           | Unkn-10 | B05      | 30.62 | 30.49 | 0.121 | 1.24E+01 | 1.093 | 1.25E+01 | 0.1212436 |
| 44 |   | D07 | SYBR | TLR4           | Unkn-11 | C01      | 29.61 | 29.43 | 0.204 | 1.34E+01 | 1.127 | 1.36E+01 | 0.2040425 |
| 45 |   | D08 | SYBR | TLR4           | Unkn-11 | C01      | 29.21 | 29.43 | 0.204 | 1.38E+01 | 1.140 | 1.36E+01 | 0.2040425 |
| 46 |   | D09 | SYBR | TLR4           | Unkn-11 | C01      | 29.48 | 29.43 | 0.204 | 1.35E+01 | 1.131 | 1.36E+01 | 0.2040425 |
| 47 |   | D10 | SYBR | TLR4           | Unkn-12 | C02      | 29.34 | 29.22 | 0.110 | 1.37E+01 | 1.135 | 1.38E+01 | 0.1096966 |
| 48 |   | D11 | SYBR | TLR4           | Unkn-12 | C02      | 29.18 | 29.22 | 0.110 | 1.38E+01 | 1.141 | 1.38E+01 | 0.1096966 |
| 49 |   | D12 | SYBR | TLR4           | Unkn-12 | C02      | 29.13 | 29.22 | 0.110 | 1.39E+01 | 1.142 | 1.38E+01 | 0.1096966 |
| 50 |   | E01 | SYBR | $\beta$ -Actin | Std-05  | Standard | 30.98 | 30.76 | 0.285 | 1.20E+01 | 1.080 | 1.22E+01 | 0.2853653 |
| 51 |   | E02 | SYBR | $\beta$ -Actin | Std-05  | Standard | 30.44 | 30.76 | 0.285 | 1.26E+01 | 1.099 | 1.22E+01 | 0.2853653 |
| 52 |   | E03 | SYBR | $\beta$ -Actin | Std-05  | Standard | 30.87 | 30.76 | 0.285 | 1.21E+01 | 1.084 | 1.22E+01 | 0.2853653 |
| 53 |   | E04 | SYBR | TLR4           | Unkn-13 | C03      | 28.96 | 28.76 | 0.174 | 1.40E+01 | 1.147 | 1.42E+01 | 0.174356  |
| 54 |   | E05 | SYBR | TLR4           | Unkn-13 | C03      | 28.64 | 28.76 | 0.174 | 1.44E+01 | 1.157 | 1.42E+01 | 0.174356  |
| 55 |   | E06 | SYBR | TLR4           | Unkn-13 | C03      | 28.68 | 28.76 | 0.174 | 1.43E+01 | 1.156 | 1.42E+01 | 0.174356  |
| 56 |   | E07 | SYBR | TLR4           | Unkn-14 | C04      | 29.12 | 29.17 | 0.110 | 1.39E+01 | 1.142 | 1.38E+01 | 0.1101514 |
| 57 |   | E08 | SYBR | TLR4           | Unkn-14 | C04      | 29.30 | 29.17 | 0.110 | 1.37E+01 | 1.137 | 1.38E+01 | 0.1101514 |
| 58 |   | E09 | SYBR | TLR4           | Unkn-14 | C04      | 29.10 | 29.17 | 0.110 | 1.39E+01 | 1.143 | 1.38E+01 | 0.1101514 |
| 59 |   | E10 | SYBR | TLR4           | Unkn-15 | C05      | 29.68 | 29.56 | 0.131 | 1.33E+01 | 1.125 | 1.34E+01 | 0.1311488 |
| 60 |   | E11 | SYBR | TLR4           | Unkn-15 | C05      | 29.42 | 29.56 | 0.131 | 1.36E+01 | 1.133 | 1.34E+01 | 0.1311488 |
| 61 |   | E12 | SYBR | TLR4           | Unkn-15 | C05      | 29.58 | 29.56 | 0.131 | 1.34E+01 | 1.128 | 1.34E+01 | 0.1311488 |
| 62 |   | F01 | SYBR | $\beta$ -Actin | Std-06  | Standard | 32.79 | 32.79 | 0.006 | 1.02E+01 | 1.009 | 1.02E+01 | 0.0057735 |
| 63 |   | F02 | SYBR | $\beta$ -Actin | Std-06  | Standard | 32.79 | 32.79 | 0.006 | 1.02E+01 | 1.009 | 1.02E+01 | 0.0057735 |
| 64 |   | F03 | SYBR | $\beta$ -Actin | Std-06  | Standard | 32.80 | 32.79 | 0.006 | 1.02E+01 | 1.009 | 1.02E+01 | 0.0057735 |
| 65 |   | F04 | SYBR | TLR4           | Unkn-16 | D01      | 29.50 | 29.28 | 0.195 | 1.35E+01 | 1.130 | 1.37E+01 | 0.1950214 |
| 66 |   | F05 | SYBR | TLR4           | Unkn-16 | D01      | 29.14 | 29.28 | 0.195 | 1.39E+01 | 1.142 | 1.37E+01 | 0.1950214 |
| 67 |   | F06 | SYBR | TLR4           | Unkn-16 | D01      | 29.19 | 29.28 | 0.195 | 1.38E+01 | 1.140 | 1.37E+01 | 0.1950214 |
| 68 |   | F07 | SYBR | TLR4           | Unkn-17 | D02      | 29.07 | 28.96 | 0.287 | 1.39E+01 | 1.144 | 1.40E+01 | 0.2872862 |
| 69 |   | F08 | SYBR | TLR4           | Unkn-17 | D02      | 28.63 | 28.96 | 0.287 | 1.44E+01 | 1.157 | 1.40E+01 | 0.2872862 |
| 70 |   | F09 | SYBR | TLR4           | Unkn-17 | D02      | 29.17 | 28.96 | 0.287 | 1.38E+01 | 1.141 | 1.40E+01 | 0.2872862 |
| 71 |   | F10 | SYBR | TLR4           | Unkn-18 | D03      | 28.56 | 28.65 | 0.081 | 1.44E+01 | 1.160 | 1.44E+01 | 0.080829  |
| 72 |   | F11 | SYBR | TLR4           | Unkn-18 | D03      | 28.72 | 28.65 | 0.081 | 1.43E+01 | 1.155 | 1.44E+01 | 0.080829  |
| 73 |   | F12 | SYBR | TLR4           | Unkn-18 | D03      | 28.66 | 28.65 | 0.081 | 1.43E+01 | 1.157 | 1.44E+01 | 0.080829  |
| 74 |   | G01 | SYBR | $\beta$ -Actin | NTC     | Neg      | N/A   | N/A   | N/A   | N/A      | N/A   | N/A      | N/A       |
| 75 |   | G02 | SYBR | $\beta$ -Actin | NTC     | Neg      | N/A   | N/A   | N/A   | N/A      | N/A   | N/A      | N/A       |
| 76 |   | G03 | SYBR | $\beta$ -Actin | NTC     | Neg      | N/A   | N/A   | N/A   | N/A      | N/A   | N/A      | N/A       |
| 77 |   | G04 | SYBR | TLR4           | Unkn-19 | D04      | 28.73 | 28.93 | 0.190 | 1.43E+01 | 1.154 | 1.41E+01 | 0.1903506 |
| 78 |   | G05 | SYBR | TLR4           | Unkn-19 | D04      | 28.94 | 28.93 | 0.190 | 1.41E+01 | 1.148 | 1.41E+01 | 0.1903506 |
| 79 |   | G06 | SYBR | TLR4           | Unkn-19 | D04      | 29.11 | 28.93 | 0.190 | 1.39E+01 | 1.143 | 1.41E+01 | 0.1903506 |
| 80 |   | G07 | SYBR | TLR4           | Unkn-20 | D05      | 28.72 | 28.77 | 0.167 | 1.43E+01 | 1.155 | 1.42E+01 | 0.1665333 |
| 81 |   | G08 | SYBR | TLR4           | Unkn-20 | D05      | 28.96 | 28.77 | 0.167 | 1.40E+01 | 1.147 | 1.42E+01 | 0.1665333 |
| 82 |   | G09 | SYBR | TLR4           | Unkn-20 | D05      | 28.64 | 28.77 | 0.167 | 1.44E+01 | 1.157 | 1.42E+01 | 0.1665333 |

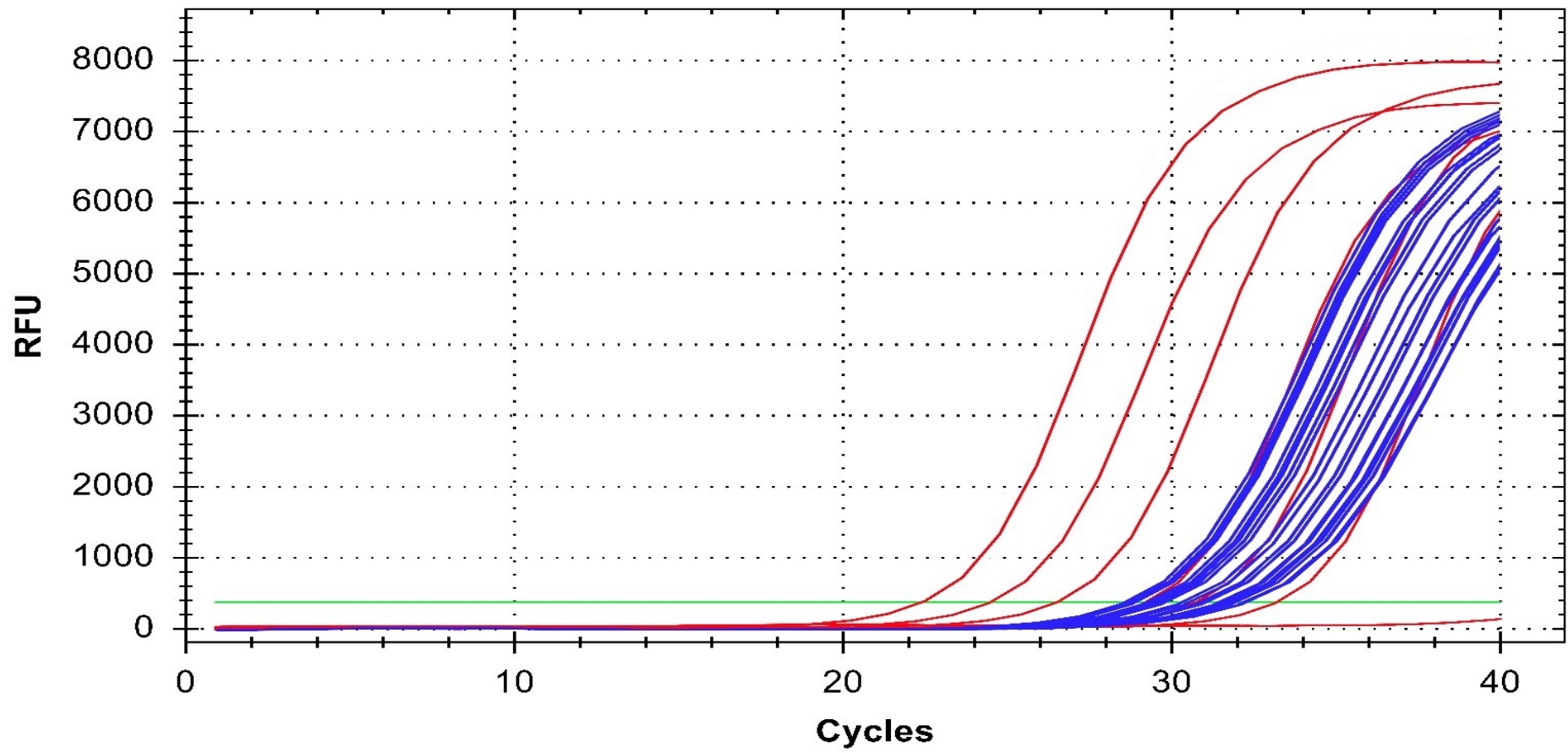


|    | N      |
|----|--------|
| 43 | -3.371 |
| 44 | -3.371 |
| 45 | -3.371 |
| 46 | -3.371 |
| 47 | -3.371 |
| 48 | -3.371 |
| 49 | -3.371 |
| 50 | -3.371 |
| 51 | -3.371 |
| 52 | -3.371 |
| 53 | -3.371 |
| 54 | -3.371 |
| 55 | -3.371 |
| 56 | -3.371 |
| 57 | -3.371 |
| 58 | -3.371 |
| 59 | -3.371 |
| 60 | -3.371 |
| 61 | -3.371 |
| 62 | -3.371 |
| 63 | -3.371 |
| 64 | -3.371 |
| 65 | -3.371 |
| 66 | -3.371 |
| 67 | -3.371 |
| 68 | -3.371 |
| 69 | -3.371 |
| 70 | -3.371 |
| 71 | -3.371 |
| 72 | -3.371 |
| 73 | -3.371 |
| 74 | N/A    |
| 75 | N/A    |
| 76 | N/A    |
| 77 | -3.371 |
| 78 | -3.371 |
| 79 | -3.371 |
| 80 | -3.371 |
| 81 | -3.371 |
| 82 | -3.371 |



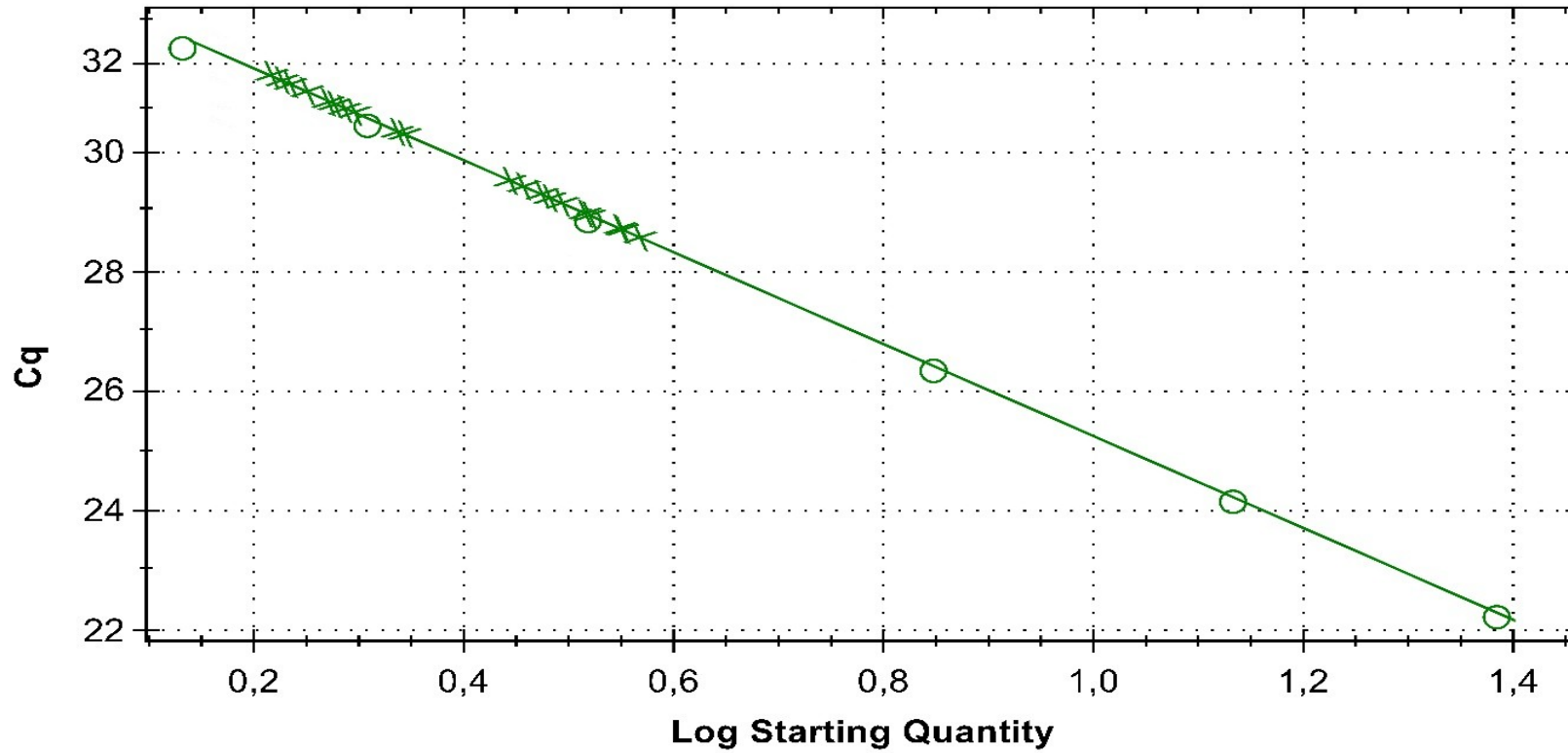
| 11    | 12    |
|-------|-------|
| Unk3  | Unk3  |
| Unk6  | Unk6  |
| Unk9  | Unk9  |
| Unk12 | Unk12 |
| Unk15 | Unk15 |
| Unk18 | Unk18 |
|       |       |
|       |       |

# Amplification





Standard Curve



○ Standard  
× Unknown  
— SYBR E= 99,2% R<sup>2</sup>=0,991 Slope= -3,371 y-int= 29,563

|    | A                          | B                       |
|----|----------------------------|-------------------------|
| 1  | File Name                  | Jafri_TLR4_Plate1.pcrd  |
| 2  | Created By User            | Romi                    |
| 3  | Notes                      |                         |
| 4  | ID                         |                         |
| 5  | Run Started                | 05/20/2019 15:23:17 UTC |
| 6  | Run Ended                  | 05/20/2019 16:28:33 UTC |
| 7  | Sample Vol                 | 25                      |
| 8  | Lid Temp                   | 105                     |
| 9  | Protocol File Name         | Jafri_TLR4_Plate1.prcl  |
| 10 | Plate Setup File Name      | Jafri_TLR4_Plate1.pltd  |
| 11 | Base Serial Number         | BR004129                |
| 12 | Optical Head Serial Number | 788BR04138              |
| 13 | CFX Manager Version        | 3.1.1517.0823.          |

|    | A | B    | C     | D       | E       | F        | G     | H       | I           | J                      | K                     | L        | M           |
|----|---|------|-------|---------|---------|----------|-------|---------|-------------|------------------------|-----------------------|----------|-------------|
| 1  |   | Well | Fluor | Target  | Content | Sample   | Cq    | Cq Mean | Cq Std. Dev | Starting Quantity (SQ) | Log Starting Quantity | SQ Mean  | SQ Std. Dev |
| 2  |   | A01  | SYBR  | β-Actin | Std-01  | Standard | 23.03 | 23.16   | 0.126       | 2.00E+01               | 1.300                 | 1.98E+01 | 0.1258306   |
| 3  |   | A02  | SYBR  | β-Actin | Std-01  | Standard | 23.18 | 23.16   | 0.126       | 1.98E+01               | 1.297                 | 1.98E+01 | 0.1258306   |
| 4  |   | A03  | SYBR  | β-Actin | Std-01  | Standard | 23.28 | 23.16   | 0.126       | 1.97E+01               | 1.295                 | 1.98E+01 | 0.1258306   |
| 5  |   | A04  | SYBR  | TLR4    | Unkn-01 | A06      | 31.14 | 31.02   | 0.104       | 1.19E+01               | 1.074                 | 1.20E+01 | 0.1040833   |
| 6  |   | A05  | SYBR  | TLR4    | Unkn-01 | A06      | 30.94 | 31.02   | 0.104       | 1.21E+01               | 1.081                 | 1.20E+01 | 0.1040833   |
| 7  |   | A06  | SYBR  | TLR4    | Unkn-01 | A06      | 30.99 | 31.02   | 0.104       | 1.20E+01               | 1.080                 | 1.20E+01 | 0.1040833   |
| 8  |   | A07  | SYBR  | TLR4    | Unkn-02 | A07      | 31.09 | 30.89   | 0.250       | 1.19E+01               | 1.076                 | 1.21E+01 | 0.2497999   |
| 9  |   | A08  | SYBR  | TLR4    | Unkn-02 | A07      | 30.61 | 30.89   | 0.250       | 1.24E+01               | 1.093                 | 1.21E+01 | 0.2497999   |
| 10 |   | A09  | SYBR  | TLR4    | Unkn-02 | A07      | 30.97 | 30.89   | 0.250       | 1.20E+01               | 1.080                 | 1.21E+01 | 0.2497999   |
| 11 |   | A10  | SYBR  | TLR4    | Unkn-03 | A08      | 31.25 | 31.25   | 0.085       | 1.18E+01               | 1.070                 | 1.18E+01 | 0.085049    |
| 12 |   | A11  | SYBR  | TLR4    | Unkn-03 | A08      | 31.16 | 31.25   | 0.085       | 1.18E+01               | 1.073                 | 1.18E+01 | 0.085049    |
| 13 |   | A12  | SYBR  | TLR4    | Unkn-03 | A08      | 31.33 | 31.25   | 0.085       | 1.17E+01               | 1.067                 | 1.18E+01 | 0.085049    |
| 14 |   | B01  | SYBR  | β-Actin | Std-02  | Standard | 25.42 | 25.29   | 0.117       | 1.76E+01               | 1.245                 | 1.77E+01 | 0.1171893   |
| 15 |   | B02  | SYBR  | β-Actin | Std-02  | Standard | 25.24 | 25.29   | 0.117       | 1.78E+01               | 1.249                 | 1.77E+01 | 0.1171893   |
| 16 |   | B03  | SYBR  | β-Actin | Std-02  | Standard | 25.20 | 25.29   | 0.117       | 1.78E+01               | 1.250                 | 1.77E+01 | 0.1171893   |
| 17 |   | B04  | SYBR  | TLR4    | Unkn-04 | A09      | 31.60 | 31.71   | 0.142       | 1.14E+01               | 1.057                 | 1.13E+01 | 0.1417745   |
| 18 |   | B05  | SYBR  | TLR4    | Unkn-04 | A09      | 31.87 | 31.71   | 0.142       | 1.11E+01               | 1.046                 | 1.13E+01 | 0.1417745   |
| 19 |   | B06  | SYBR  | TLR4    | Unkn-04 | A09      | 31.66 | 31.71   | 0.142       | 1.13E+01               | 1.055                 | 1.13E+01 | 0.1417745   |
| 20 |   | B07  | SYBR  | TLR4    | Unkn-05 | A10      | 31.58 | 31.53   | 0.151       | 1.14E+01               | 1.058                 | 1.15E+01 | 0.1513275   |
| 21 |   | B08  | SYBR  | TLR4    | Unkn-05 | A10      | 31.36 | 31.53   | 0.151       | 1.16E+01               | 1.066                 | 1.15E+01 | 0.1513275   |
| 22 |   | B09  | SYBR  | TLR4    | Unkn-05 | A10      | 31.65 | 31.53   | 0.151       | 1.14E+01               | 1.055                 | 1.15E+01 | 0.1513275   |
| 23 |   | B10  | SYBR  | TLR4    | Unkn-06 | B06      | 26.11 | 26.14   | 0.052       | 1.69E+01               | 1.228                 | 1.69E+01 | 0.0519615   |
| 24 |   | B11  | SYBR  | TLR4    | Unkn-06 | B06      | 26.20 | 26.14   | 0.052       | 1.68E+01               | 1.225                 | 1.69E+01 | 0.0519615   |
| 25 |   | B12  | SYBR  | TLR4    | Unkn-06 | B06      | 26.11 | 26.14   | 0.052       | 1.69E+01               | 1.228                 | 1.69E+01 | 0.0519615   |
| 26 |   | C01  | SYBR  | β-Actin | Std-03  | Standard | 27.03 | 27.03   | 0.045       | 1.60E+01               | 1.203                 | 1.60E+01 | 0.0450925   |
| 27 |   | C02  | SYBR  | β-Actin | Std-03  | Standard | 27.07 | 27.03   | 0.045       | 1.59E+01               | 1.202                 | 1.60E+01 | 0.0450925   |
| 28 |   | C03  | SYBR  | β-Actin | Std-03  | Standard | 26.98 | 27.03   | 0.045       | 1.60E+01               | 1.205                 | 1.60E+01 | 0.0450925   |
| 29 |   | C04  | SYBR  | TLR4    | Unkn-07 | B07      | 26.93 | 27.06   | 0.125       | 1.61E+01               | 1.206                 | 1.59E+01 | 0.1252996   |
| 30 |   | C05  | SYBR  | TLR4    | Unkn-07 | B07      | 27.18 | 27.06   | 0.125       | 1.58E+01               | 1.199                 | 1.59E+01 | 0.1252996   |
| 31 |   | C06  | SYBR  | TLR4    | Unkn-07 | B07      | 27.07 | 27.06   | 0.125       | 1.59E+01               | 1.202                 | 1.59E+01 | 0.1252996   |
| 32 |   | C07  | SYBR  | TLR4    | Unkn-08 | B08      | 26.30 | 26.50   | 0.176       | 1.67E+01               | 1.223                 | 1.65E+01 | 0.175784    |
| 33 |   | C08  | SYBR  | TLR4    | Unkn-08 | B08      | 26.63 | 26.50   | 0.176       | 1.64E+01               | 1.214                 | 1.65E+01 | 0.175784    |
| 34 |   | C09  | SYBR  | TLR4    | Unkn-08 | B08      | 26.57 | 26.50   | 0.176       | 1.64E+01               | 1.216                 | 1.65E+01 | 0.175784    |
| 35 |   | C10  | SYBR  | TLR4    | Unkn-09 | B09      | 26.40 | 26.71   | 0.274       | 1.66E+01               | 1.220                 | 1.63E+01 | 0.2740438   |
| 36 |   | C11  | SYBR  | TLR4    | Unkn-09 | B09      | 26.81 | 26.71   | 0.274       | 1.62E+01               | 1.209                 | 1.63E+01 | 0.2740438   |
| 37 |   | C12  | SYBR  | TLR4    | Unkn-09 | B09      | 26.92 | 26.71   | 0.274       | 1.61E+01               | 1.206                 | 1.63E+01 | 0.2740438   |
| 38 |   | D01  | SYBR  | β-Actin | Std-04  | Standard | 29.26 | 29.24   | 0.040       | 1.37E+01               | 1.138                 | 1.38E+01 | 0.0404145   |
| 39 |   | D02  | SYBR  | β-Actin | Std-04  | Standard | 29.26 | 29.24   | 0.040       | 1.37E+01               | 1.138                 | 1.38E+01 | 0.0404145   |
| 40 |   | D03  | SYBR  | β-Actin | Std-04  | Standard | 29.19 | 29.24   | 0.040       | 1.38E+01               | 1.140                 | 1.38E+01 | 0.0404145   |
| 41 |   | D04  | SYBR  | TLR4    | Unkn-10 | B10      | 25.86 | 25.80   | 0.060       | 1.71E+01               | 1.234                 | 1.72E+01 | 0.06        |
| 42 |   | D05  | SYBR  | TLR4    | Unkn-10 | B10      | 25.80 | 25.80   | 0.060       | 1.72E+01               | 1.236                 | 1.72E+01 | 0.06        |



|    | N          |
|----|------------|
| 1  | Slope (dR) |
| 2  | -3.368     |
| 3  | -3.368     |
| 4  | -3.368     |
| 5  | -3.368     |
| 6  | -3.368     |
| 7  | -3.368     |
| 8  | -3.368     |
| 9  | -3.368     |
| 10 | -3.368     |
| 11 | -3.368     |
| 12 | -3.368     |
| 13 | -3.368     |
| 14 | -3.368     |
| 15 | -3.368     |
| 16 | -3.368     |
| 17 | -3.368     |
| 18 | -3.368     |
| 19 | -3.368     |
| 20 | -3.368     |
| 21 | -3.368     |
| 22 | -3.368     |
| 23 | -3.368     |
| 24 | -3.368     |
| 25 | -3.368     |
| 26 | -3.368     |
| 27 | -3.368     |
| 28 | -3.368     |
| 29 | -3.368     |
| 30 | -3.368     |
| 31 | -3.368     |
| 32 | -3.368     |
| 33 | -3.368     |
| 34 | -3.368     |
| 35 | -3.368     |
| 36 | -3.368     |
| 37 | -3.368     |
| 38 | -3.368     |
| 39 | -3.368     |
| 40 | -3.368     |
| 41 | -3.368     |
| 42 | -3.368     |

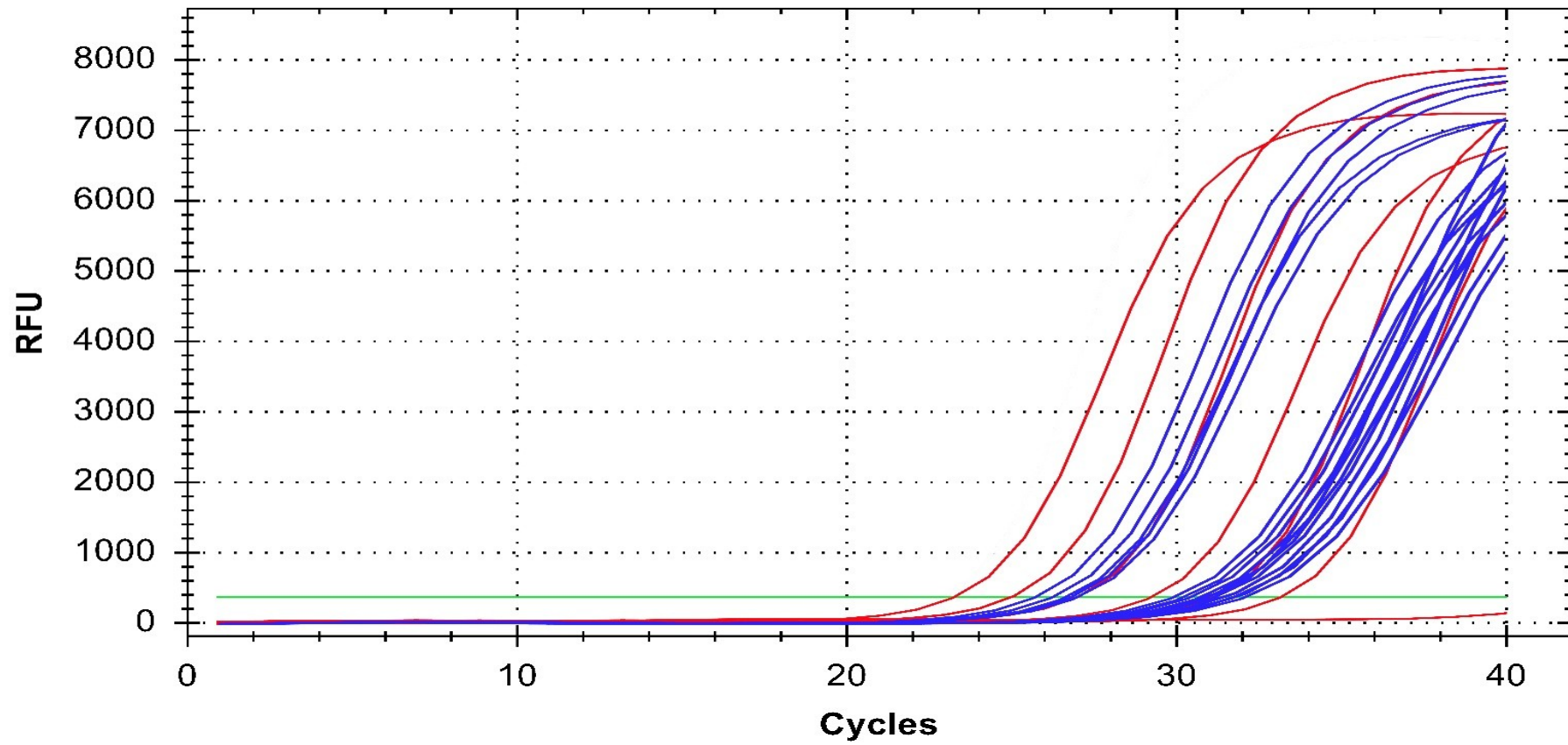
|    | A | B   | C    | D              | E       | F        | G     | H     | I     | J        | K     | L        | M         |
|----|---|-----|------|----------------|---------|----------|-------|-------|-------|----------|-------|----------|-----------|
| 43 |   | D06 | SYBR | TLR4           | Unkn-10 | B10      | 25.74 | 25.80 | 0.060 | 1.73E+01 | 1.237 | 1.72E+01 | 0.06      |
| 44 |   | D07 | SYBR | TLR4           | Unkn-11 | C06      | 30.23 | 30.14 | 0.086 | 1.28E+01 | 1.106 | 1.29E+01 | 0.0862168 |
| 45 |   | D08 | SYBR | TLR4           | Unkn-11 | C06      | 30.06 | 30.14 | 0.086 | 1.29E+01 | 1.112 | 1.29E+01 | 0.0862168 |
| 46 |   | D09 | SYBR | TLR4           | Unkn-11 | C06      | 30.12 | 30.14 | 0.086 | 1.29E+01 | 1.110 | 1.29E+01 | 0.0862168 |
| 47 |   | D10 | SYBR | TLR4           | Unkn-12 | C07      | 30.71 | 30.69 | 0.086 | 1.23E+01 | 1.090 | 1.23E+01 | 0.0862168 |
| 48 |   | D11 | SYBR | TLR4           | Unkn-12 | C07      | 30.77 | 30.69 | 0.086 | 1.22E+01 | 1.087 | 1.23E+01 | 0.0862168 |
| 49 |   | D12 | SYBR | TLR4           | Unkn-12 | C07      | 30.60 | 30.69 | 0.086 | 1.24E+01 | 1.093 | 1.23E+01 | 0.0862168 |
| 50 |   | E01 | SYBR | $\beta$ -Actin | Std-05  | Standard | 31.32 | 31.30 | 0.049 | 1.17E+01 | 1.067 | 1.17E+01 | 0.0493288 |
| 51 |   | E02 | SYBR | $\beta$ -Actin | Std-05  | Standard | 31.33 | 31.30 | 0.049 | 1.17E+01 | 1.067 | 1.17E+01 | 0.0493288 |
| 52 |   | E03 | SYBR | $\beta$ -Actin | Std-05  | Standard | 31.24 | 31.30 | 0.049 | 1.18E+01 | 1.070 | 1.17E+01 | 0.0493288 |
| 53 |   | E04 | SYBR | TLR4           | Unkn-13 | C08      | 30.82 | 30.84 | 0.067 | 1.22E+01 | 1.086 | 1.22E+01 | 0.0665833 |
| 54 |   | E05 | SYBR | TLR4           | Unkn-13 | C08      | 30.78 | 30.84 | 0.067 | 1.22E+01 | 1.087 | 1.22E+01 | 0.0665833 |
| 55 |   | E06 | SYBR | TLR4           | Unkn-13 | C08      | 30.91 | 30.84 | 0.067 | 1.21E+01 | 1.082 | 1.22E+01 | 0.0665833 |
| 56 |   | E07 | SYBR | TLR4           | Unkn-14 | C09      | 30.05 | 29.99 | 0.183 | 1.30E+01 | 1.112 | 1.30E+01 | 0.1833939 |
| 57 |   | E08 | SYBR | TLR4           | Unkn-14 | C09      | 30.13 | 29.99 | 0.183 | 1.29E+01 | 1.110 | 1.30E+01 | 0.1833939 |
| 58 |   | E09 | SYBR | TLR4           | Unkn-14 | C09      | 29.78 | 29.99 | 0.183 | 1.32E+01 | 1.121 | 1.30E+01 | 0.1833939 |
| 59 |   | E10 | SYBR | TLR4           | Unkn-15 | C10      | 30.46 | 30.61 | 0.162 | 1.25E+01 | 1.098 | 1.24E+01 | 0.1616581 |
| 60 |   | E11 | SYBR | TLR4           | Unkn-15 | C10      | 30.78 | 30.61 | 0.162 | 1.22E+01 | 1.087 | 1.24E+01 | 0.1616581 |
| 61 |   | E12 | SYBR | TLR4           | Unkn-15 | C10      | 30.58 | 30.61 | 0.162 | 1.24E+01 | 1.094 | 1.24E+01 | 0.1616581 |
| 62 |   | F01 | SYBR | $\beta$ -Actin | Std-06  | Standard | 33.03 | 33.28 | 0.261 | 9.97E+00 | 0.999 | 9.72E+00 | 0.2610236 |
| 63 |   | F02 | SYBR | $\beta$ -Actin | Std-06  | Standard | 33.55 | 33.28 | 0.261 | 9.45E+00 | 0.975 | 9.72E+00 | 0.2610236 |
| 64 |   | F03 | SYBR | $\beta$ -Actin | Std-06  | Standard | 33.25 | 33.28 | 0.261 | 9.75E+00 | 0.989 | 9.72E+00 | 0.2610236 |
| 65 |   | F04 | SYBR | TLR4           | Unkn-16 | D06      | 30.26 | 30.51 | 0.217 | 1.27E+01 | 1.105 | 1.25E+01 | 0.2165641 |
| 66 |   | F05 | SYBR | TLR4           | Unkn-16 | D06      | 30.63 | 30.51 | 0.217 | 1.24E+01 | 1.092 | 1.25E+01 | 0.2165641 |
| 67 |   | F06 | SYBR | TLR4           | Unkn-16 | D06      | 30.64 | 30.51 | 0.217 | 1.24E+01 | 1.092 | 1.25E+01 | 0.2165641 |
| 68 |   | F07 | SYBR | TLR4           | Unkn-17 | D07      | 30.93 | 30.84 | 0.085 | 1.21E+01 | 1.082 | 1.22E+01 | 0.085049  |
| 69 |   | F08 | SYBR | TLR4           | Unkn-17 | D07      | 30.76 | 30.84 | 0.085 | 1.22E+01 | 1.088 | 1.22E+01 | 0.085049  |
| 70 |   | F09 | SYBR | TLR4           | Unkn-17 | D07      | 30.84 | 30.84 | 0.085 | 1.22E+01 | 1.085 | 1.22E+01 | 0.085049  |
| 71 |   | F10 | SYBR | TLR4           | Unkn-18 | D08      | 31.09 | 31.10 | 0.050 | 1.19E+01 | 1.076 | 1.19E+01 | 0.0503322 |
| 72 |   | F11 | SYBR | TLR4           | Unkn-18 | D08      | 31.15 | 31.10 | 0.050 | 1.19E+01 | 1.074 | 1.19E+01 | 0.0503322 |
| 73 |   | F12 | SYBR | TLR4           | Unkn-18 | D08      | 31.05 | 31.10 | 0.050 | 1.20E+01 | 1.077 | 1.19E+01 | 0.0503322 |
| 74 |   | G01 | SYBR | $\beta$ -Actin | NTC     | Neg      | N/A   | N/A   | N/A   | N/A      | N/A   | N/A      | N/A       |
| 75 |   | G02 | SYBR | $\beta$ -Actin | NTC     | Neg      | N/A   | N/A   | N/A   | N/A      | N/A   | N/A      | N/A       |
| 76 |   | G03 | SYBR | $\beta$ -Actin | NTC     | Neg      | N/A   | N/A   | N/A   | N/A      | N/A   | N/A      | N/A       |
| 77 |   | G04 | SYBR | TLR4           | Unkn-19 | D09      | 30.45 | 30.39 | 0.230 | 1.26E+01 | 1.099 | 1.26E+01 | 0.2302897 |
| 78 |   | G05 | SYBR | TLR4           | Unkn-19 | D09      | 30.14 | 30.39 | 0.230 | 1.29E+01 | 1.109 | 1.26E+01 | 0.2302897 |
| 79 |   | G06 | SYBR | TLR4           | Unkn-19 | D09      | 30.59 | 30.39 | 0.230 | 1.24E+01 | 1.094 | 1.26E+01 | 0.2302897 |
| 80 |   | G07 | SYBR | TLR4           | Unkn-20 | D10      | 31.09 | 31.06 | 0.095 | 1.19E+01 | 1.076 | 1.19E+01 | 0.0945163 |
| 81 |   | G08 | SYBR | TLR4           | Unkn-20 | D10      | 31.13 | 31.06 | 0.095 | 1.19E+01 | 1.074 | 1.19E+01 | 0.0945163 |
| 82 |   | G09 | SYBR | TLR4           | Unkn-20 | D10      | 30.95 | 31.06 | 0.095 | 1.21E+01 | 1.081 | 1.19E+01 | 0.0945163 |

|    | N      |
|----|--------|
| 43 | -3.368 |
| 44 | -3.368 |
| 45 | -3.368 |
| 46 | -3.368 |
| 47 | -3.368 |
| 48 | -3.368 |
| 49 | -3.368 |
| 50 | -3.368 |
| 51 | -3.368 |
| 52 | -3.368 |
| 53 | -3.368 |
| 54 | -3.368 |
| 55 | -3.368 |
| 56 | -3.368 |
| 57 | -3.368 |
| 58 | -3.368 |
| 59 | -3.368 |
| 60 | -3.368 |
| 61 | -3.368 |
| 62 | -3.368 |
| 63 | -3.368 |
| 64 | -3.368 |
| 65 | -3.368 |
| 66 | -3.368 |
| 67 | -3.368 |
| 68 | -3.368 |
| 69 | -3.368 |
| 70 | -3.368 |
| 71 | -3.368 |
| 72 | -3.368 |
| 73 | -3.368 |
| 74 | N/A    |
| 75 | N/A    |
| 76 | N/A    |
| 77 | -3.368 |
| 78 | -3.368 |
| 79 | -3.368 |
| 80 | -3.368 |
| 81 | -3.368 |
| 82 | -3.368 |

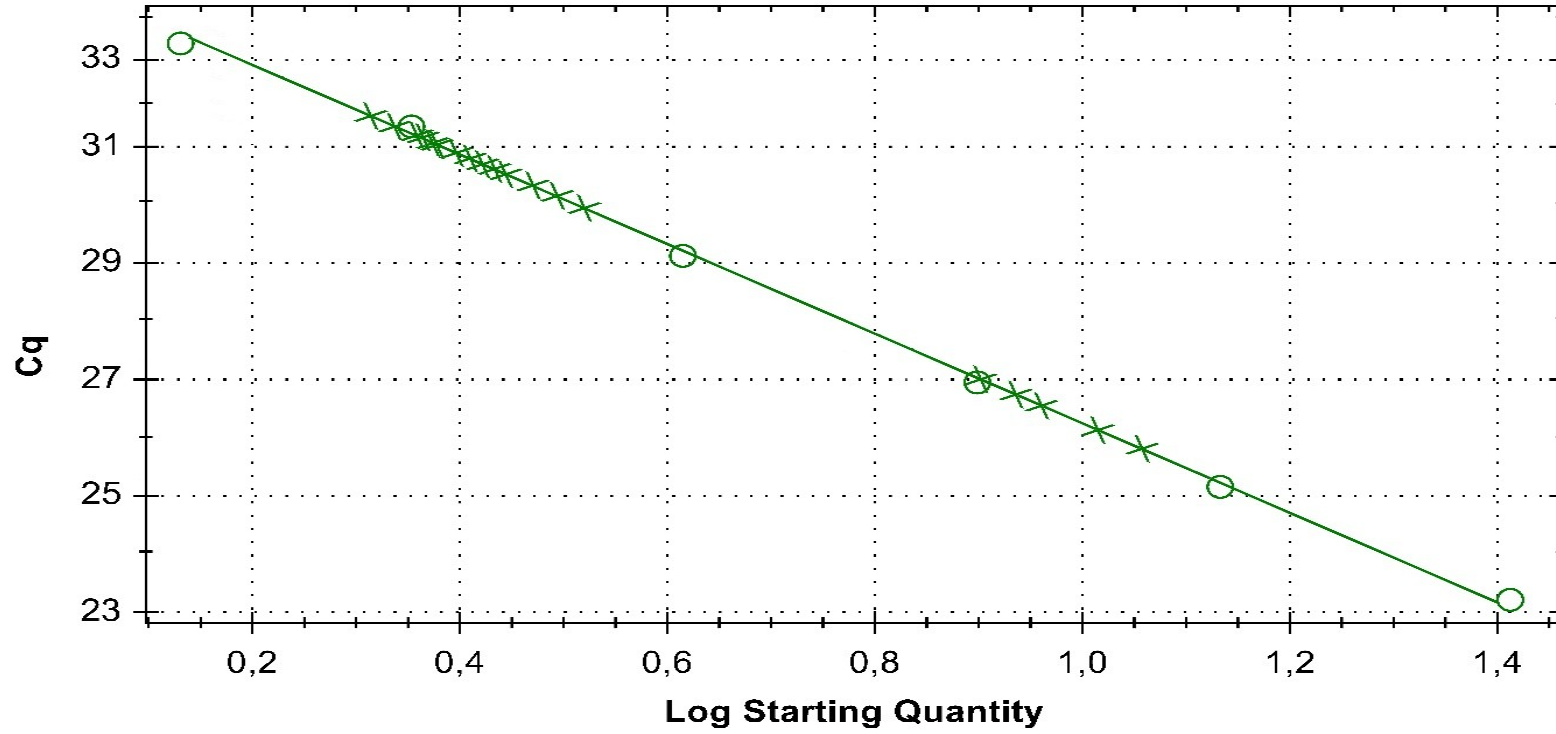


|  |       |
|--|-------|
|  | 12    |
|  | Unk3  |
|  | Unk6  |
|  | Unk9  |
|  | Unk12 |
|  | Unk15 |
|  | Unk18 |
|  |       |
|  |       |

# Amplification



Standard Curve



○ Standard  
× Unknown  
— SYBR E= 99,0% R^2=0,992 Slope= -3,368 y-int= 30.391

|    | A                          | B                       |
|----|----------------------------|-------------------------|
| 1  | File Name                  | Jafri_TLR4_Plate2.pcrd  |
| 2  | Created By User            | Romi                    |
| 3  | Notes                      |                         |
| 4  | ID                         |                         |
| 5  | Run Started                | 05/21/2019 15:33:06 UTC |
| 6  | Run Ended                  | 05/21/2019 16:39:02 UTC |
| 7  | Sample Vol                 | 25                      |
| 8  | Lid Temp                   | 105                     |
| 9  | Protocol File Name         | Jafri_TLR4_Plate1.prcl  |
| 10 | Plate Setup File Name      | Jafri_TLR4_Plate2.pltd  |
| 11 | Base Serial Number         | BR004129                |
| 12 | Optical Head Serial Number | 788BR04138              |
| 13 | CFX Manager Version        | 3.1.1517.0823.          |



|    | A | B    | C     | D       | E       | F        | G     | H       | I           | J                      | K                     | L        | M           |
|----|---|------|-------|---------|---------|----------|-------|---------|-------------|------------------------|-----------------------|----------|-------------|
| 1  |   | Well | Fluor | Target  | Content | Sample   | Cq    | Cq Mean | Cq Std. Dev | Starting Quantity (SQ) | Log Starting Quantity | SQ Mean  | SQ Std. Dev |
| 2  |   | A01  | SYBR  | β-Actin | Std-01  | Standard | 23.34 | 23.38   | 0.061       | 1.97E+01               | 1.294                 | 1.96E+01 | 0.0608276   |
| 3  |   | A02  | SYBR  | β-Actin | Std-01  | Standard | 23.45 | 23.38   | 0.061       | 1.96E+01               | 1.291                 | 1.96E+01 | 0.0608276   |
| 4  |   | A03  | SYBR  | β-Actin | Std-01  | Standard | 23.35 | 23.38   | 0.061       | 1.97E+01               | 1.293                 | 1.96E+01 | 0.0608276   |
| 5  |   | A04  | SYBR  | TLR4    | Unkn-01 | A11      | 31.45 | 31.61   | 0.146       | 1.16E+01               | 1.063                 | 1.14E+01 | 0.1457166   |
| 6  |   | A05  | SYBR  | TLR4    | Unkn-01 | A11      | 31.66 | 31.61   | 0.146       | 1.13E+01               | 1.055                 | 1.14E+01 | 0.1457166   |
| 7  |   | A06  | SYBR  | TLR4    | Unkn-01 | A11      | 31.73 | 31.61   | 0.146       | 1.13E+01               | 1.052                 | 1.14E+01 | 0.1457166   |
| 8  |   | A07  | SYBR  | TLR4    | Unkn-02 | A12      | 30.18 | 30.49   | 0.280       | 1.28E+01               | 1.108                 | 1.25E+01 | 0.2804164   |
| 9  |   | A08  | SYBR  | TLR4    | Unkn-02 | A12      | 30.55 | 30.49   | 0.280       | 1.25E+01               | 1.095                 | 1.25E+01 | 0.2804164   |
| 10 |   | A09  | SYBR  | TLR4    | Unkn-02 | A12      | 30.73 | 30.49   | 0.280       | 1.23E+01               | 1.089                 | 1.25E+01 | 0.2804164   |
| 11 |   | A10  | SYBR  | TLR4    | Unkn-03 | A13      | 30.99 | 30.92   | 0.062       | 1.20E+01               | 1.080                 | 1.21E+01 | 0.06245     |
| 12 |   | A11  | SYBR  | TLR4    | Unkn-03 | A13      | 30.87 | 30.92   | 0.062       | 1.21E+01               | 1.084                 | 1.21E+01 | 0.06245     |
| 13 |   | A12  | SYBR  | TLR4    | Unkn-03 | A13      | 30.90 | 30.92   | 0.062       | 1.21E+01               | 1.083                 | 1.21E+01 | 0.06245     |
| 14 |   | B01  | SYBR  | β-Actin | Std-02  | Standard | 25.95 | 25.48   | 0.407       | 1.71E+01               | 1.232                 | 1.75E+01 | 0.4073082   |
| 15 |   | B02  | SYBR  | β-Actin | Std-02  | Standard | 25.26 | 25.48   | 0.407       | 1.77E+01               | 1.249                 | 1.75E+01 | 0.4073082   |
| 16 |   | B03  | SYBR  | β-Actin | Std-02  | Standard | 25.23 | 25.48   | 0.407       | 1.78E+01               | 1.250                 | 1.75E+01 | 0.4073082   |
| 17 |   | B04  | SYBR  | TLR4    | Unkn-04 | A14      | 31.16 | 31.20   | 0.078       | 1.18E+01               | 1.073                 | 1.18E+01 | 0.0781025   |
| 18 |   | B05  | SYBR  | TLR4    | Unkn-04 | A14      | 31.29 | 31.20   | 0.078       | 1.17E+01               | 1.069                 | 1.18E+01 | 0.0781025   |
| 19 |   | B06  | SYBR  | TLR4    | Unkn-04 | A14      | 31.15 | 31.20   | 0.078       | 1.19E+01               | 1.074                 | 1.18E+01 | 0.0781025   |
| 20 |   | B07  | SYBR  | TLR4    | Unkn-05 | A15      | 31.83 | 31.75   | 0.080       | 1.12E+01               | 1.048                 | 1.12E+01 | 0.0802081   |
| 21 |   | B08  | SYBR  | TLR4    | Unkn-05 | A15      | 31.76 | 31.75   | 0.080       | 1.12E+01               | 1.051                 | 1.12E+01 | 0.0802081   |
| 22 |   | B09  | SYBR  | TLR4    | Unkn-05 | A15      | 31.67 | 31.75   | 0.080       | 1.13E+01               | 1.054                 | 1.12E+01 | 0.0802081   |
| 23 |   | B10  | SYBR  | TLR4    | Unkn-06 | B11      | 27.08 | 27.23   | 0.346       | 1.59E+01               | 1.202                 | 1.58E+01 | 0.3464583   |
| 24 |   | B11  | SYBR  | TLR4    | Unkn-06 | B11      | 27.63 | 27.23   | 0.346       | 1.54E+01               | 1.187                 | 1.58E+01 | 0.3464583   |
| 25 |   | B12  | SYBR  | TLR4    | Unkn-06 | B11      | 26.99 | 27.23   | 0.346       | 1.60E+01               | 1.204                 | 1.58E+01 | 0.3464583   |
| 26 |   | C01  | SYBR  | β-Actin | Std-03  | Standard | 27.22 | 27.17   | 0.090       | 1.58E+01               | 1.198                 | 1.58E+01 | 0.0896289   |
| 27 |   | C02  | SYBR  | β-Actin | Std-03  | Standard | 27.07 | 27.17   | 0.090       | 1.59E+01               | 1.202                 | 1.58E+01 | 0.0896289   |
| 28 |   | C03  | SYBR  | β-Actin | Std-03  | Standard | 27.23 | 27.17   | 0.090       | 1.58E+01               | 1.198                 | 1.58E+01 | 0.0896289   |
| 29 |   | C04  | SYBR  | TLR4    | Unkn-07 | B12      | 26.85 | 26.36   | 0.431       | 1.62E+01               | 1.208                 | 1.66E+01 | 0.4309679   |
| 30 |   | C05  | SYBR  | TLR4    | Unkn-07 | B12      | 26.03 | 26.36   | 0.431       | 1.70E+01               | 1.230                 | 1.66E+01 | 0.4309679   |
| 31 |   | C06  | SYBR  | TLR4    | Unkn-07 | B12      | 26.21 | 26.36   | 0.431       | 1.68E+01               | 1.225                 | 1.66E+01 | 0.4309679   |
| 32 |   | C07  | SYBR  | TLR4    | Unkn-08 | B13      | 25.97 | 26.11   | 0.121       | 1.70E+01               | 1.231                 | 1.69E+01 | 0.1212436   |
| 33 |   | C08  | SYBR  | TLR4    | Unkn-08 | B13      | 26.18 | 26.11   | 0.121       | 1.68E+01               | 1.226                 | 1.69E+01 | 0.1212436   |
| 34 |   | C09  | SYBR  | TLR4    | Unkn-08 | B13      | 26.18 | 26.11   | 0.121       | 1.68E+01               | 1.226                 | 1.69E+01 | 0.1212436   |
| 35 |   | C10  | SYBR  | TLR4    | Unkn-09 | B14      | 26.52 | 26.57   | 0.076       | 1.65E+01               | 1.217                 | 1.64E+01 | 0.0757188   |
| 36 |   | C11  | SYBR  | TLR4    | Unkn-09 | B14      | 26.54 | 26.57   | 0.076       | 1.65E+01               | 1.216                 | 1.64E+01 | 0.0757188   |
| 37 |   | C12  | SYBR  | TLR4    | Unkn-09 | B14      | 26.66 | 26.57   | 0.076       | 1.63E+01               | 1.213                 | 1.64E+01 | 0.0757188   |
| 38 |   | D01  | SYBR  | β-Actin | Std-04  | Standard | 29.16 | 29.07   | 0.078       | 1.38E+01               | 1.141                 | 1.39E+01 | 0.0776745   |
| 39 |   | D02  | SYBR  | β-Actin | Std-04  | Standard | 29.01 | 29.07   | 0.078       | 1.40E+01               | 1.146                 | 1.39E+01 | 0.0776745   |
| 40 |   | D03  | SYBR  | β-Actin | Std-04  | Standard | 29.05 | 29.07   | 0.078       | 1.40E+01               | 1.145                 | 1.39E+01 | 0.0776745   |
| 41 |   | D04  | SYBR  | TLR4    | Unkn-10 | B15      | 26.91 | 26.87   | 0.125       | 1.61E+01               | 1.207                 | 1.61E+01 | 0.1249      |
| 42 |   | D05  | SYBR  | TLR4    | Unkn-10 | B15      | 26.73 | 26.87   | 0.125       | 1.63E+01               | 1.211                 | 1.61E+01 | 0.1249      |

|    | N          |
|----|------------|
| 1  | Slope (dR) |
| 2  | -3.373     |
| 3  | -3.373     |
| 4  | -3.373     |
| 5  | -3.373     |
| 6  | -3.373     |
| 7  | -3.373     |
| 8  | -3.373     |
| 9  | -3.373     |
| 10 | -3.373     |
| 11 | -3.373     |
| 12 | -3.373     |
| 13 | -3.373     |
| 14 | -3.373     |
| 15 | -3.373     |
| 16 | -3.373     |
| 17 | -3.373     |
| 18 | -3.373     |
| 19 | -3.373     |
| 20 | -3.373     |
| 21 | -3.373     |
| 22 | -3.373     |
| 23 | -3.373     |
| 24 | -3.373     |
| 25 | -3.373     |
| 26 | -3.373     |
| 27 | -3.373     |
| 28 | -3.373     |
| 29 | -3.373     |
| 30 | -3.373     |
| 31 | -3.373     |
| 32 | -3.373     |
| 33 | -3.373     |
| 34 | -3.373     |
| 35 | -3.373     |
| 36 | -3.373     |
| 37 | -3.373     |
| 38 | -3.373     |
| 39 | -3.373     |
| 40 | -3.373     |
| 41 | -3.373     |
| 42 | -3.373     |

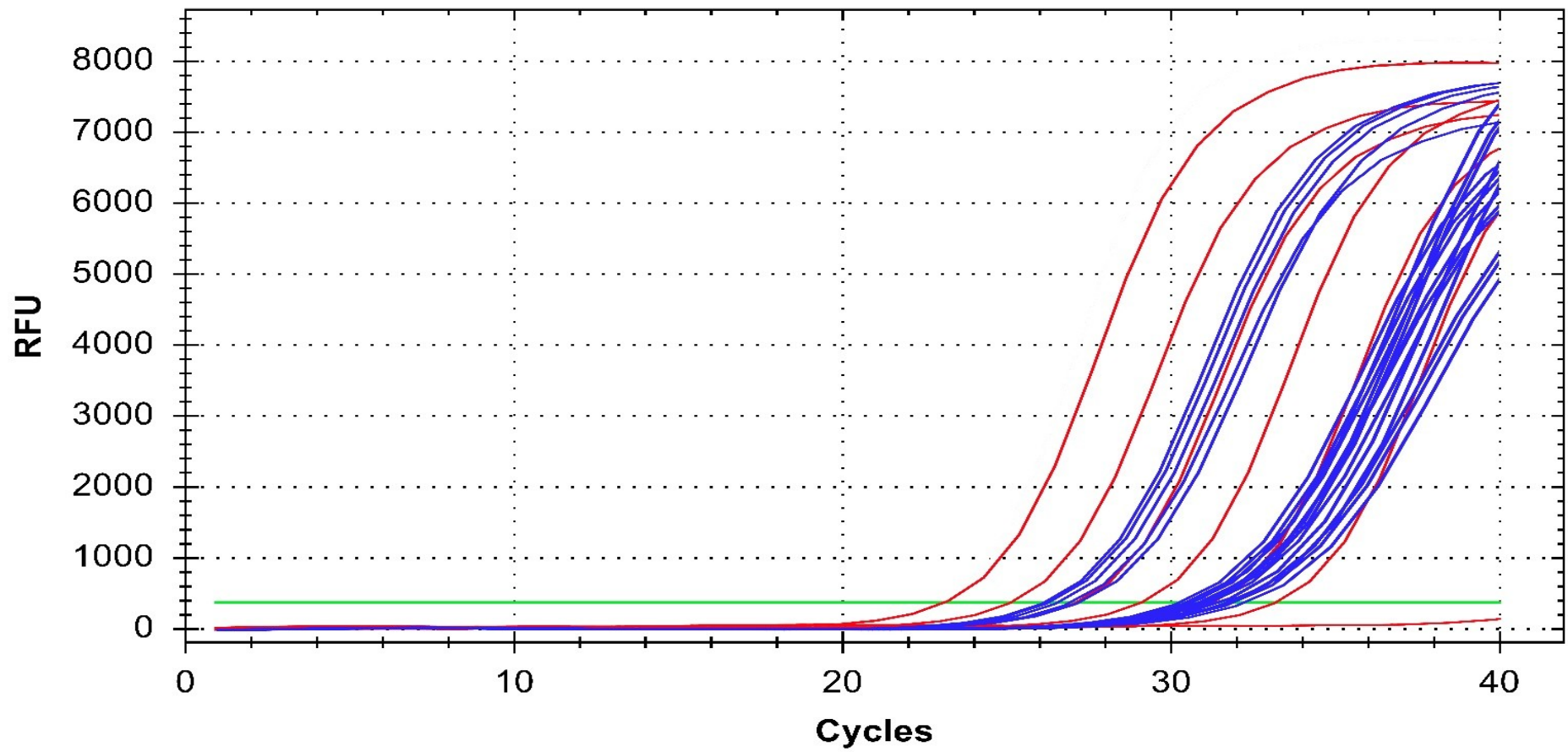
|    | A | B   | C    | D              | E       | F        | G     | H     | I     | J        | K     | L        | M         |
|----|---|-----|------|----------------|---------|----------|-------|-------|-------|----------|-------|----------|-----------|
| 43 |   | D06 | SYBR | TLR4           | Unkn-10 | B15      | 26.97 | 26.87 | 0.125 | 1.60E+01 | 1.205 | 1.61E+01 | 0.1249    |
| 44 |   | D07 | SYBR | TLR4           | Unkn-11 | C11      | 31.12 | 31.11 | 0.091 | 1.19E+01 | 1.075 | 1.19E+01 | 0.0907377 |
| 45 |   | D08 | SYBR | TLR4           | Unkn-11 | C11      | 31.01 | 31.11 | 0.091 | 1.20E+01 | 1.079 | 1.19E+01 | 0.0907377 |
| 46 |   | D09 | SYBR | TLR4           | Unkn-11 | C11      | 31.19 | 31.11 | 0.091 | 1.18E+01 | 1.072 | 1.19E+01 | 0.0907377 |
| 47 |   | D10 | SYBR | TLR4           | Unkn-12 | C12      | 30.15 | 30.25 | 0.095 | 1.29E+01 | 1.109 | 1.28E+01 | 0.0950438 |
| 48 |   | D11 | SYBR | TLR4           | Unkn-12 | C12      | 30.34 | 30.25 | 0.095 | 1.27E+01 | 1.102 | 1.28E+01 | 0.0950438 |
| 49 |   | D12 | SYBR | TLR4           | Unkn-12 | C12      | 30.25 | 30.25 | 0.095 | 1.28E+01 | 1.106 | 1.28E+01 | 0.0950438 |
| 50 |   | E01 | SYBR | $\beta$ -Actin | Std-05  | Standard | 30.97 | 30.73 | 0.276 | 1.20E+01 | 1.080 | 1.23E+01 | 0.2761038 |
| 51 |   | E02 | SYBR | $\beta$ -Actin | Std-05  | Standard | 30.43 | 30.73 | 0.276 | 1.26E+01 | 1.099 | 1.23E+01 | 0.2761038 |
| 52 |   | E03 | SYBR | $\beta$ -Actin | Std-05  | Standard | 30.80 | 30.73 | 0.276 | 1.22E+01 | 1.086 | 1.23E+01 | 0.2761038 |
| 53 |   | E04 | SYBR | TLR4           | Unkn-13 | C13      | 30.49 | 30.44 | 0.050 | 1.25E+01 | 1.097 | 1.26E+01 | 0.0503322 |
| 54 |   | E05 | SYBR | TLR4           | Unkn-13 | C13      | 30.45 | 30.44 | 0.050 | 1.26E+01 | 1.099 | 1.26E+01 | 0.0503322 |
| 55 |   | E06 | SYBR | TLR4           | Unkn-13 | C13      | 30.39 | 30.44 | 0.050 | 1.26E+01 | 1.101 | 1.26E+01 | 0.0503322 |
| 56 |   | E07 | SYBR | TLR4           | Unkn-14 | C14      | 30.67 | 30.63 | 0.081 | 1.23E+01 | 1.091 | 1.24E+01 | 0.0814453 |
| 57 |   | E08 | SYBR | TLR4           | Unkn-14 | C14      | 30.69 | 30.63 | 0.081 | 1.23E+01 | 1.090 | 1.24E+01 | 0.0814453 |
| 58 |   | E09 | SYBR | TLR4           | Unkn-14 | C14      | 30.54 | 30.63 | 0.081 | 1.25E+01 | 1.096 | 1.24E+01 | 0.0814453 |
| 59 |   | E10 | SYBR | TLR4           | Unkn-15 | C15      | 30.79 | 30.80 | 0.066 | 1.22E+01 | 1.087 | 1.22E+01 | 0.0655744 |
| 60 |   | E11 | SYBR | TLR4           | Unkn-15 | C15      | 30.87 | 30.80 | 0.066 | 1.21E+01 | 1.084 | 1.22E+01 | 0.0655744 |
| 61 |   | E12 | SYBR | TLR4           | Unkn-15 | C15      | 30.74 | 30.80 | 0.066 | 1.23E+01 | 1.088 | 1.22E+01 | 0.0655744 |
| 62 |   | F01 | SYBR | $\beta$ -Actin | Std-06  | Standard | 33.24 | 33.34 | 0.162 | 9.76E+00 | 0.989 | 9.66E+00 | 0.1619671 |
| 63 |   | F02 | SYBR | $\beta$ -Actin | Std-06  | Standard | 33.53 | 33.34 | 0.162 | 9.47E+00 | 0.976 | 9.66E+00 | 0.1619671 |
| 64 |   | F03 | SYBR | $\beta$ -Actin | Std-06  | Standard | 33.26 | 33.34 | 0.162 | 9.74E+00 | 0.989 | 9.66E+00 | 0.1619671 |
| 65 |   | F04 | SYBR | TLR4           | Unkn-16 | D11      | 31.62 | 31.69 | 0.087 | 1.14E+01 | 1.056 | 1.13E+01 | 0.0873689 |
| 66 |   | F05 | SYBR | TLR4           | Unkn-16 | D11      | 31.79 | 31.69 | 0.087 | 1.12E+01 | 1.050 | 1.13E+01 | 0.0873689 |
| 67 |   | F06 | SYBR | TLR4           | Unkn-16 | D11      | 31.67 | 31.69 | 0.087 | 1.13E+01 | 1.054 | 1.13E+01 | 0.0873689 |
| 68 |   | F07 | SYBR | TLR4           | Unkn-17 | D12      | 31.12 | 31.13 | 0.170 | 1.19E+01 | 1.075 | 1.19E+01 | 0.170098  |
| 69 |   | F08 | SYBR | TLR4           | Unkn-17 | D12      | 31.30 | 31.13 | 0.170 | 1.17E+01 | 1.068 | 1.19E+01 | 0.170098  |
| 70 |   | F09 | SYBR | TLR4           | Unkn-17 | D12      | 30.96 | 31.13 | 0.170 | 1.20E+01 | 1.081 | 1.19E+01 | 0.170098  |
| 71 |   | F10 | SYBR | TLR4           | Unkn-18 | D13      | 30.56 | 30.69 | 0.113 | 1.24E+01 | 1.095 | 1.23E+01 | 0.1126943 |
| 72 |   | F11 | SYBR | TLR4           | Unkn-18 | D13      | 30.76 | 30.69 | 0.113 | 1.22E+01 | 1.088 | 1.23E+01 | 0.1126943 |
| 73 |   | F12 | SYBR | TLR4           | Unkn-18 | D13      | 30.75 | 30.69 | 0.113 | 1.23E+01 | 1.088 | 1.23E+01 | 0.1126943 |
| 74 |   | G01 | SYBR | $\beta$ -Actin | NTC     | Neg      | N/A   | N/A   | N/A   | N/A      | N/A   | N/A      | N/A       |
| 75 |   | G02 | SYBR | $\beta$ -Actin | NTC     | Neg      | N/A   | N/A   | N/A   | N/A      | N/A   | N/A      | N/A       |
| 76 |   | G03 | SYBR | $\beta$ -Actin | NTC     | Neg      | N/A   | N/A   | N/A   | N/A      | N/A   | N/A      | N/A       |
| 77 |   | G04 | SYBR | TLR4           | Unkn-19 | D14      | 31.05 | 31.13 | 0.114 | 1.20E+01 | 1.077 | 1.19E+01 | 0.1135782 |
| 78 |   | G05 | SYBR | TLR4           | Unkn-19 | D14      | 31.26 | 31.13 | 0.114 | 1.17E+01 | 1.070 | 1.19E+01 | 0.1135782 |
| 79 |   | G06 | SYBR | TLR4           | Unkn-19 | D14      | 31.08 | 31.13 | 0.114 | 1.19E+01 | 1.076 | 1.19E+01 | 0.1135782 |
| 80 |   | G07 | SYBR | TLR4           | Unkn-20 | D15      | 31.66 | 31.66 | 0.125 | 1.13E+01 | 1.055 | 1.13E+01 | 0.1250333 |
| 81 |   | G08 | SYBR | TLR4           | Unkn-20 | D15      | 31.78 | 31.66 | 0.125 | 1.12E+01 | 1.050 | 1.13E+01 | 0.1250333 |
| 82 |   | G09 | SYBR | TLR4           | Unkn-20 | D15      | 31.53 | 31.66 | 0.125 | 1.15E+01 | 1.060 | 1.13E+01 | 0.1250333 |

|    | N      |
|----|--------|
| 43 | -3.373 |
| 44 | -3.373 |
| 45 | -3.373 |
| 46 | -3.373 |
| 47 | -3.373 |
| 48 | -3.373 |
| 49 | -3.373 |
| 50 | -3.373 |
| 51 | -3.373 |
| 52 | -3.373 |
| 53 | -3.373 |
| 54 | -3.373 |
| 55 | -3.373 |
| 56 | -3.373 |
| 57 | -3.373 |
| 58 | -3.373 |
| 59 | -3.373 |
| 60 | -3.373 |
| 61 | -3.373 |
| 62 | -3.373 |
| 63 | -3.373 |
| 64 | -3.373 |
| 65 | -3.373 |
| 66 | -3.373 |
| 67 | -3.373 |
| 68 | -3.373 |
| 69 | -3.373 |
| 70 | -3.373 |
| 71 | -3.373 |
| 72 | -3.373 |
| 73 | -3.373 |
| 74 | N/A    |
| 75 | N/A    |
| 76 | N/A    |
| 77 | -3.373 |
| 78 | -3.373 |
| 79 | -3.373 |
| 80 | -3.373 |
| 81 | -3.373 |
| 82 | -3.373 |



| 11    | 12    |
|-------|-------|
| Unk3  | Unk3  |
| Unk6  | Unk6  |
| Unk9  | Unk9  |
| Unk12 | Unk12 |
| Unk15 | Unk15 |
| Unk18 | Unk18 |
|       |       |
|       |       |

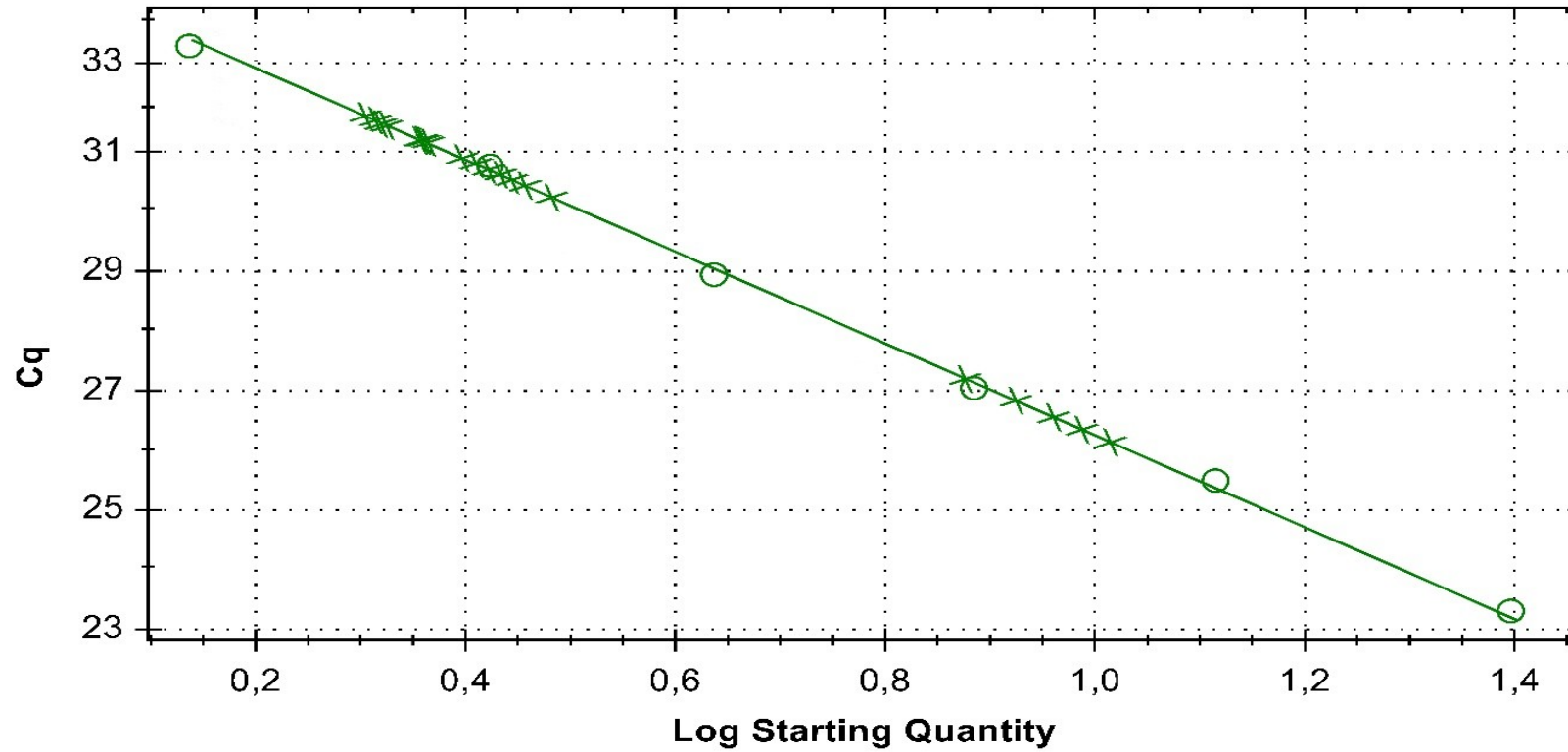
# Amplification







Standard Curve



○ Standard  
× Unknown  
— SYBR E= 98,7% R<sup>2</sup>=0,989 Slope= -3,373 y-int= 30.632

|    | A                          | B                       |
|----|----------------------------|-------------------------|
| 1  | File Name                  | Jafri_TLR4_Plate3.pcrd  |
| 2  | Created By User            | Romi                    |
| 3  | Notes                      |                         |
| 4  | ID                         |                         |
| 5  | Run Started                | 05/22/2019 16:08:17 UTC |
| 6  | Run Ended                  | 05/22/2019 17:14:03 UTC |
| 7  | Sample Vol                 | 25                      |
| 8  | Lid Temp                   | 105                     |
| 9  | Protocol File Name         | Jafri_TLR4_Plate1.prcl  |
| 10 | Plate Setup File Name      | Jafri_TLR4_Plate3.pltd  |
| 11 | Base Serial Number         | BR004129                |
| 12 | Optical Head Serial Number | 788BR04138              |
| 13 | CFX Manager Version        | 3.1.1517.0823.          |

|    | A | B    | C     | D       | E       | F        | G     | H       | I           | J                      | K                     | L        | M           |
|----|---|------|-------|---------|---------|----------|-------|---------|-------------|------------------------|-----------------------|----------|-------------|
| 1  |   | Well | Fluor | Target  | Content | Sample   | Cq    | Cq Mean | Cq Std. Dev | Starting Quantity (SQ) | Log Starting Quantity | SQ Mean  | SQ Std. Dev |
| 2  |   | A01  | SYBR  | β Actin | Std-01  | Standard | 23.02 | 23.12   | 0.089       | 2.00E+01               | 1.301                 | 1.99E+01 | 0.0888819   |
| 3  |   | A02  | SYBR  | β Actin | Std-01  | Standard | 23.15 | 23.12   | 0.089       | 1.99E+01               | 1.298                 | 1.99E+01 | 0.0888819   |
| 4  |   | A03  | SYBR  | β Actin | Std-01  | Standard | 23.19 | 23.12   | 0.089       | 1.98E+01               | 1.297                 | 1.99E+01 | 0.0888819   |
| 5  |   | A04  | SYBR  | TLR4    | Unkn-01 | A16      | 30.67 | 30.67   | 0.055       | 1.23E+01               | 1.091                 | 1.23E+01 | 0.0550757   |
| 6  |   | A05  | SYBR  | TLR4    | Unkn-01 | A16      | 30.61 | 30.67   | 0.055       | 1.24E+01               | 1.093                 | 1.23E+01 | 0.0550757   |
| 7  |   | A06  | SYBR  | TLR4    | Unkn-01 | A16      | 30.72 | 30.67   | 0.055       | 1.23E+01               | 1.089                 | 1.23E+01 | 0.0550757   |
| 8  |   | A07  | SYBR  | TLR4    | Unkn-02 | A17      | 31.52 | 31.61   | 0.086       | 1.15E+01               | 1.060                 | 1.14E+01 | 0.0862168   |
| 9  |   | A08  | SYBR  | TLR4    | Unkn-02 | A17      | 31.63 | 31.61   | 0.086       | 1.14E+01               | 1.056                 | 1.14E+01 | 0.0862168   |
| 10 |   | A09  | SYBR  | TLR4    | Unkn-02 | A17      | 31.69 | 31.61   | 0.086       | 1.13E+01               | 1.053                 | 1.14E+01 | 0.0862168   |
| 11 |   | A10  | SYBR  | TLR4    | Unkn-03 | A18      | 30.90 | 30.99   | 0.107       | 1.21E+01               | 1.083                 | 1.20E+01 | 0.1069268   |
| 12 |   | A11  | SYBR  | TLR4    | Unkn-03 | A18      | 30.97 | 30.99   | 0.107       | 1.20E+01               | 1.080                 | 1.20E+01 | 0.1069268   |
| 13 |   | A12  | SYBR  | TLR4    | Unkn-03 | A18      | 31.11 | 30.99   | 0.107       | 1.19E+01               | 1.075                 | 1.20E+01 | 0.1069268   |
| 14 |   | B01  | SYBR  | β Actin | Std-02  | Standard | 24.69 | 24.79   | 0.118       | 1.83E+01               | 1.263                 | 1.82E+01 | 0.1178983   |
| 15 |   | B02  | SYBR  | β Actin | Std-02  | Standard | 24.76 | 24.79   | 0.118       | 1.82E+01               | 1.261                 | 1.82E+01 | 0.1178983   |
| 16 |   | B03  | SYBR  | β Actin | Std-02  | Standard | 24.92 | 24.79   | 0.118       | 1.81E+01               | 1.257                 | 1.82E+01 | 0.1178983   |
| 17 |   | B04  | SYBR  | TLR4    | Unkn-04 | A19      | 32.03 | 31.87   | 0.227       | 1.10E+01               | 1.040                 | 1.11E+01 | 0.2271563   |
| 18 |   | B05  | SYBR  | TLR4    | Unkn-04 | A19      | 31.97 | 31.87   | 0.227       | 1.10E+01               | 1.043                 | 1.11E+01 | 0.2271563   |
| 19 |   | B06  | SYBR  | TLR4    | Unkn-04 | A19      | 31.61 | 31.87   | 0.227       | 1.14E+01               | 1.057                 | 1.11E+01 | 0.2271563   |
| 20 |   | B07  | SYBR  | TLR4    | Unkn-05 | A20      | 31.24 | 31.45   | 0.220       | 1.18E+01               | 1.070                 | 1.15E+01 | 0.2203028   |
| 21 |   | B08  | SYBR  | TLR4    | Unkn-05 | A20      | 31.44 | 31.45   | 0.220       | 1.16E+01               | 1.063                 | 1.15E+01 | 0.2203028   |
| 22 |   | B09  | SYBR  | TLR4    | Unkn-05 | A20      | 31.68 | 31.45   | 0.220       | 1.13E+01               | 1.054                 | 1.15E+01 | 0.2203028   |
| 23 |   | B10  | SYBR  | TLR4    | Unkn-06 | B16      | 27.28 | 27.15   | 0.146       | 1.57E+01               | 1.196                 | 1.59E+01 | 0.1464013   |
| 24 |   | B11  | SYBR  | TLR4    | Unkn-06 | B16      | 26.99 | 27.15   | 0.146       | 1.60E+01               | 1.204                 | 1.59E+01 | 0.1464013   |
| 25 |   | B12  | SYBR  | TLR4    | Unkn-06 | B16      | 27.17 | 27.15   | 0.146       | 1.58E+01               | 1.199                 | 1.59E+01 | 0.1464013   |
| 26 |   | C01  | SYBR  | β Actin | Std-03  | Standard | 27.10 | 27.31   | 0.347       | 1.59E+01               | 1.201                 | 1.57E+01 | 0.3465545   |
| 27 |   | C02  | SYBR  | β Actin | Std-03  | Standard | 27.71 | 27.31   | 0.347       | 1.53E+01               | 1.184                 | 1.57E+01 | 0.3465545   |
| 28 |   | C03  | SYBR  | β Actin | Std-03  | Standard | 27.12 | 27.31   | 0.347       | 1.59E+01               | 1.201                 | 1.57E+01 | 0.3465545   |
| 29 |   | C04  | SYBR  | TLR4    | Unkn-07 | B17      | 26.09 | 26.08   | 0.125       | 1.69E+01               | 1.228                 | 1.69E+01 | 0.1252996   |
| 30 |   | C05  | SYBR  | TLR4    | Unkn-07 | B17      | 25.95 | 26.08   | 0.125       | 1.71E+01               | 1.232                 | 1.69E+01 | 0.1252996   |
| 31 |   | C06  | SYBR  | TLR4    | Unkn-07 | B17      | 26.20 | 26.08   | 0.125       | 1.68E+01               | 1.225                 | 1.69E+01 | 0.1252996   |
| 32 |   | C07  | SYBR  | TLR4    | Unkn-08 | B18      | 26.58 | 26.75   | 0.231       | 1.64E+01               | 1.215                 | 1.63E+01 | 0.2307235   |
| 33 |   | C08  | SYBR  | TLR4    | Unkn-08 | B18      | 27.01 | 26.75   | 0.231       | 1.60E+01               | 1.204                 | 1.63E+01 | 0.2307235   |
| 34 |   | C09  | SYBR  | TLR4    | Unkn-08 | B18      | 26.65 | 26.75   | 0.231       | 1.64E+01               | 1.214                 | 1.63E+01 | 0.2307235   |
| 35 |   | C10  | SYBR  | TLR4    | Unkn-09 | B19      | 26.47 | 26.32   | 0.146       | 1.65E+01               | 1.218                 | 1.67E+01 | 0.1457166   |
| 36 |   | C11  | SYBR  | TLR4    | Unkn-09 | B19      | 26.18 | 26.32   | 0.146       | 1.68E+01               | 1.226                 | 1.67E+01 | 0.1457166   |
| 37 |   | C12  | SYBR  | TLR4    | Unkn-09 | B19      | 26.30 | 26.32   | 0.146       | 1.67E+01               | 1.223                 | 1.67E+01 | 0.1457166   |
| 38 |   | D01  | SYBR  | β Actin | Std-04  | Standard | 29.93 | 29.88   | 0.045       | 1.31E+01               | 1.116                 | 1.31E+01 | 0.0450925   |
| 39 |   | D02  | SYBR  | β Actin | Std-04  | Standard | 29.88 | 29.88   | 0.045       | 1.31E+01               | 1.118                 | 1.31E+01 | 0.0450925   |
| 40 |   | D03  | SYBR  | β Actin | Std-04  | Standard | 29.84 | 29.88   | 0.045       | 1.32E+01               | 1.119                 | 1.31E+01 | 0.0450925   |
| 41 |   | D04  | SYBR  | TLR4    | Unkn-10 | B20      | 26.45 | 26.63   | 0.157       | 1.66E+01               | 1.219                 | 1.64E+01 | 0.1571623   |
| 42 |   | D05  | SYBR  | TLR4    | Unkn-10 | B20      | 26.70 | 26.63   | 0.157       | 1.63E+01               | 1.212                 | 1.64E+01 | 0.1571623   |

|    | N          |
|----|------------|
| 1  | Slope (dR) |
| 2  | -3.364     |
| 3  | -3.364     |
| 4  | -3.364     |
| 5  | -3.364     |
| 6  | -3.364     |
| 7  | -3.364     |
| 8  | -3.364     |
| 9  | -3.364     |
| 10 | -3.364     |
| 11 | -3.364     |
| 12 | -3.364     |
| 13 | -3.364     |
| 14 | -3.364     |
| 15 | -3.364     |
| 16 | -3.364     |
| 17 | -3.364     |
| 18 | -3.364     |
| 19 | -3.364     |
| 20 | -3.364     |
| 21 | -3.364     |
| 22 | -3.364     |
| 23 | -3.364     |
| 24 | -3.364     |
| 25 | -3.364     |
| 26 | -3.364     |
| 27 | -3.364     |
| 28 | -3.364     |
| 29 | -3.364     |
| 30 | -3.364     |
| 31 | -3.364     |
| 32 | -3.364     |
| 33 | -3.364     |
| 34 | -3.364     |
| 35 | -3.364     |
| 36 | -3.364     |
| 37 | -3.364     |
| 38 | -3.364     |
| 39 | -3.364     |
| 40 | -3.364     |
| 41 | -3.364     |
| 42 | -3.364     |

|    | A | B   | C    | D       | E       | F        | G     | H     | I     | J        | K     | L        | M         |
|----|---|-----|------|---------|---------|----------|-------|-------|-------|----------|-------|----------|-----------|
| 43 |   | D06 | SYBR | TLR4    | Unkn-10 | B20      | 26.74 | 26.63 | 0.157 | 1.63E+01 | 1.211 | 1.64E+01 | 0.1571623 |
| 44 |   | D07 | SYBR | TLR4    | Unkn-11 | C16      | 25.27 | 25.12 | 0.187 | 1.77E+01 | 1.249 | 1.79E+01 | 0.1873499 |
| 45 |   | D08 | SYBR | TLR4    | Unkn-11 | C16      | 25.18 | 25.12 | 0.187 | 1.78E+01 | 1.251 | 1.79E+01 | 0.1873499 |
| 46 |   | D09 | SYBR | TLR4    | Unkn-11 | C16      | 24.91 | 25.12 | 0.187 | 1.81E+01 | 1.257 | 1.79E+01 | 0.1873499 |
| 47 |   | D10 | SYBR | TLR4    | Unkn-12 | C17      | 24.21 | 24.28 | 0.113 | 1.88E+01 | 1.274 | 1.87E+01 | 0.1126943 |
| 48 |   | D11 | SYBR | TLR4    | Unkn-12 | C17      | 24.22 | 24.28 | 0.113 | 1.88E+01 | 1.274 | 1.87E+01 | 0.1126943 |
| 49 |   | D12 | SYBR | TLR4    | Unkn-12 | C17      | 24.41 | 24.28 | 0.113 | 1.86E+01 | 1.269 | 1.87E+01 | 0.1126943 |
| 50 |   | E01 | SYBR | β Actin | Std-05  | Standard | 31.00 | 31.12 | 0.276 | 1.20E+01 | 1.079 | 1.19E+01 | 0.2764658 |
| 51 |   | E02 | SYBR | β Actin | Std-05  | Standard | 31.44 | 31.12 | 0.276 | 1.16E+01 | 1.063 | 1.19E+01 | 0.2764658 |
| 52 |   | E03 | SYBR | β Actin | Std-05  | Standard | 30.93 | 31.12 | 0.276 | 1.21E+01 | 1.082 | 1.19E+01 | 0.2764658 |
| 53 |   | E04 | SYBR | TLR4    | Unkn-13 | C18      | 24.24 | 24.53 | 0.337 | 1.88E+01 | 1.273 | 1.85E+01 | 0.3371943 |
| 54 |   | E05 | SYBR | TLR4    | Unkn-13 | C18      | 24.90 | 24.53 | 0.337 | 1.81E+01 | 1.258 | 1.85E+01 | 0.3371943 |
| 55 |   | E06 | SYBR | TLR4    | Unkn-13 | C18      | 24.45 | 24.53 | 0.337 | 1.86E+01 | 1.268 | 1.85E+01 | 0.3371943 |
| 56 |   | E07 | SYBR | TLR4    | Unkn-14 | C19      | 25.04 | 24.86 | 0.216 | 1.80E+01 | 1.254 | 1.81E+01 | 0.2163331 |
| 57 |   | E08 | SYBR | TLR4    | Unkn-14 | C19      | 24.62 | 24.86 | 0.216 | 1.84E+01 | 1.264 | 1.81E+01 | 0.2163331 |
| 58 |   | E09 | SYBR | TLR4    | Unkn-14 | C19      | 24.92 | 24.86 | 0.216 | 1.81E+01 | 1.257 | 1.81E+01 | 0.2163331 |
| 59 |   | E10 | SYBR | TLR4    | Unkn-15 | C20      | 24.15 | 24.07 | 0.100 | 1.89E+01 | 1.275 | 1.89E+01 | 0.1001665 |
| 60 |   | E11 | SYBR | TLR4    | Unkn-15 | C20      | 23.96 | 24.07 | 0.100 | 1.90E+01 | 1.280 | 1.89E+01 | 0.1001665 |
| 61 |   | E12 | SYBR | TLR4    | Unkn-15 | C20      | 24.11 | 24.07 | 0.100 | 1.89E+01 | 1.276 | 1.89E+01 | 0.1001665 |
| 62 |   | F01 | SYBR | β Actin | Std-06  | Standard | 33.21 | 33.32 | 0.168 | 9.79E+00 | 0.991 | 9.68E+00 | 0.1677299 |
| 63 |   | F02 | SYBR | β Actin | Std-06  | Standard | 33.51 | 33.32 | 0.168 | 9.49E+00 | 0.977 | 9.68E+00 | 0.1677299 |
| 64 |   | F03 | SYBR | β Actin | Std-06  | Standard | 33.23 | 33.32 | 0.168 | 9.77E+00 | 0.990 | 9.68E+00 | 0.1677299 |
| 65 |   | F04 | SYBR | TLR4    | Unkn-16 | D16      | 24.25 | 24.20 | 0.050 | 1.88E+01 | 1.273 | 1.88E+01 | 0.0503322 |
| 66 |   | F05 | SYBR | TLR4    | Unkn-16 | D16      | 24.19 | 24.20 | 0.050 | 1.88E+01 | 1.274 | 1.88E+01 | 0.0503322 |
| 67 |   | F06 | SYBR | TLR4    | Unkn-16 | D16      | 24.15 | 24.20 | 0.050 | 1.89E+01 | 1.275 | 1.88E+01 | 0.0503322 |
| 68 |   | F07 | SYBR | TLR4    | Unkn-17 | D17      | 23.69 | 23.86 | 0.147 | 1.93E+01 | 1.286 | 1.91E+01 | 0.1474223 |
| 69 |   | F08 | SYBR | TLR4    | Unkn-17 | D17      | 23.97 | 23.86 | 0.147 | 1.90E+01 | 1.279 | 1.91E+01 | 0.1474223 |
| 70 |   | F09 | SYBR | TLR4    | Unkn-17 | D17      | 23.91 | 23.86 | 0.147 | 1.91E+01 | 1.281 | 1.91E+01 | 0.1474223 |
| 71 |   | F10 | SYBR | TLR4    | Unkn-18 | D18      | 23.75 | 23.59 | 0.160 | 1.93E+01 | 1.284 | 1.94E+01 | 0.1601041 |
| 72 |   | F11 | SYBR | TLR4    | Unkn-18 | D18      | 23.58 | 23.59 | 0.160 | 1.94E+01 | 1.288 | 1.94E+01 | 0.1601041 |
| 73 |   | F12 | SYBR | TLR4    | Unkn-18 | D18      | 23.43 | 23.59 | 0.160 | 1.96E+01 | 1.292 | 1.94E+01 | 0.1601041 |
| 74 |   | G01 | SYBR | β Actin | NTC     | Neg      | N/A   | N/A   | N/A   | N/A      | N/A   | N/A      | N/A       |
| 75 |   | G02 | SYBR | β Actin | NTC     | Neg      | N/A   | N/A   | N/A   | N/A      | N/A   | N/A      | N/A       |
| 76 |   | G03 | SYBR | β Actin | NTC     | Neg      | N/A   | N/A   | N/A   | N/A      | N/A   | N/A      | N/A       |
| 77 |   | G04 | SYBR | TLR4    | Unkn-19 | D19      | 23.57 | 23.39 | 0.190 | 1.94E+01 | 1.288 | 1.96E+01 | 0.1903506 |
| 78 |   | G05 | SYBR | TLR4    | Unkn-19 | D19      | 23.19 | 23.39 | 0.190 | 1.98E+01 | 1.297 | 1.96E+01 | 0.1903506 |
| 79 |   | G06 | SYBR | TLR4    | Unkn-19 | D19      | 23.40 | 23.39 | 0.190 | 1.96E+01 | 1.292 | 1.96E+01 | 0.1903506 |
| 80 |   | G07 | SYBR | TLR4    | Unkn-20 | D20      | 23.62 | 23.71 | 0.095 | 1.94E+01 | 1.287 | 1.93E+01 | 0.0950438 |
| 81 |   | G08 | SYBR | TLR4    | Unkn-20 | D20      | 23.81 | 23.71 | 0.095 | 1.92E+01 | 1.283 | 1.93E+01 | 0.0950438 |
| 82 |   | G09 | SYBR | TLR4    | Unkn-20 | D20      | 23.71 | 23.71 | 0.095 | 1.93E+01 | 1.285 | 1.93E+01 | 0.0950438 |

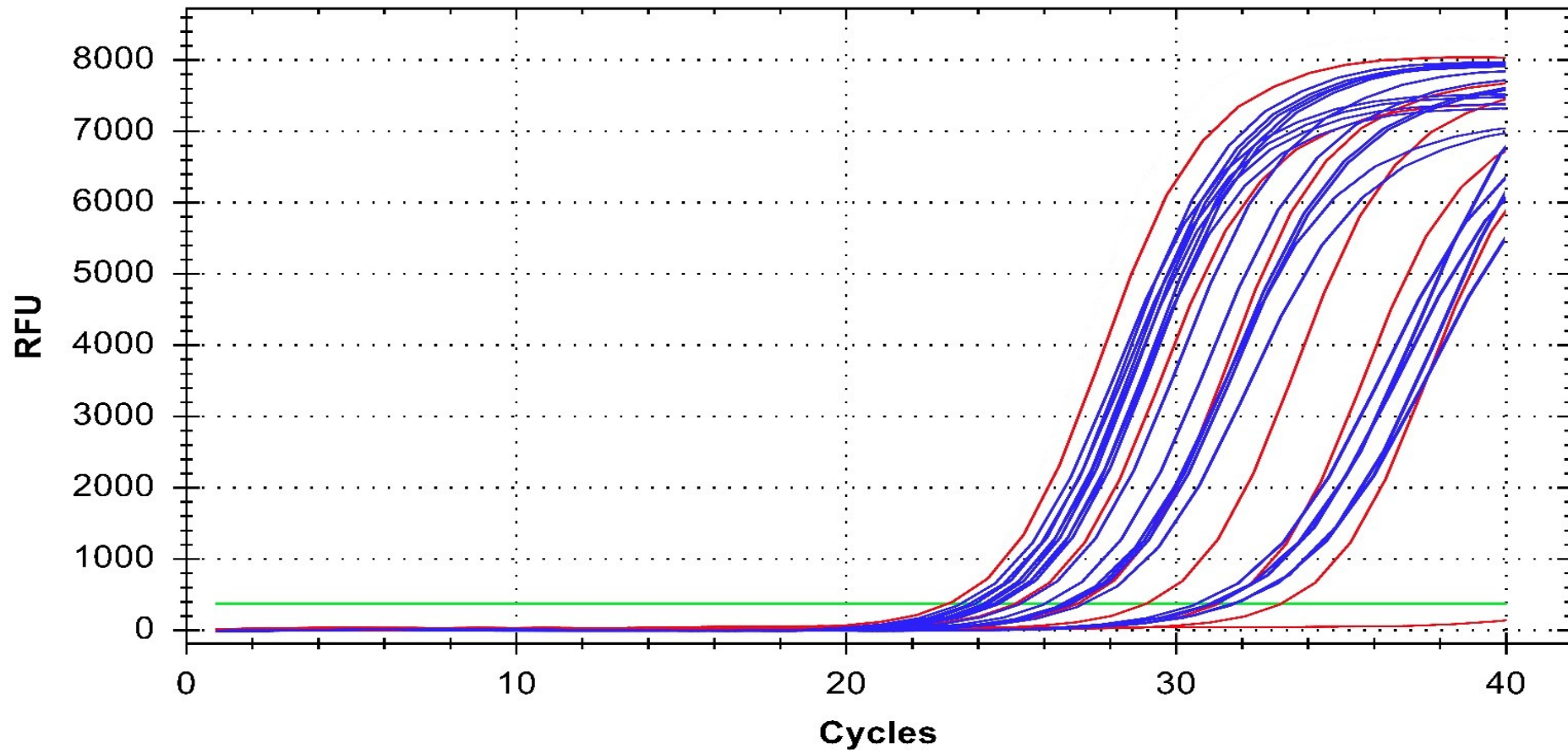
|    | N      |
|----|--------|
| 43 | -3.364 |
| 44 | -3.364 |
| 45 | -3.364 |
| 46 | -3.364 |
| 47 | -3.364 |
| 48 | -3.364 |
| 49 | -3.364 |
| 50 | -3.364 |
| 51 | -3.364 |
| 52 | -3.364 |
| 53 | -3.364 |
| 54 | -3.364 |
| 55 | -3.364 |
| 56 | -3.364 |
| 57 | -3.364 |
| 58 | -3.364 |
| 59 | -3.364 |
| 60 | -3.364 |
| 61 | -3.364 |
| 62 | -3.364 |
| 63 | -3.364 |
| 64 | -3.364 |
| 65 | -3.364 |
| 66 | -3.364 |
| 67 | -3.364 |
| 68 | -3.364 |
| 69 | -3.364 |
| 70 | -3.364 |
| 71 | -3.364 |
| 72 | -3.364 |
| 73 | -3.364 |
| 74 | N/A    |
| 75 | N/A    |
| 76 | N/A    |
| 77 | -3.364 |
| 78 | -3.364 |
| 79 | -3.364 |
| 80 | -3.364 |
| 81 | -3.364 |
| 82 | -3.364 |



| 11    | 12    |
|-------|-------|
| Unk3  | Unk3  |
| Unk6  | Unk6  |
| Unk9  | Unk9  |
| Unk12 | Unk12 |
| Unk15 | Unk15 |
| Unk18 | Unk18 |
|       |       |
|       |       |

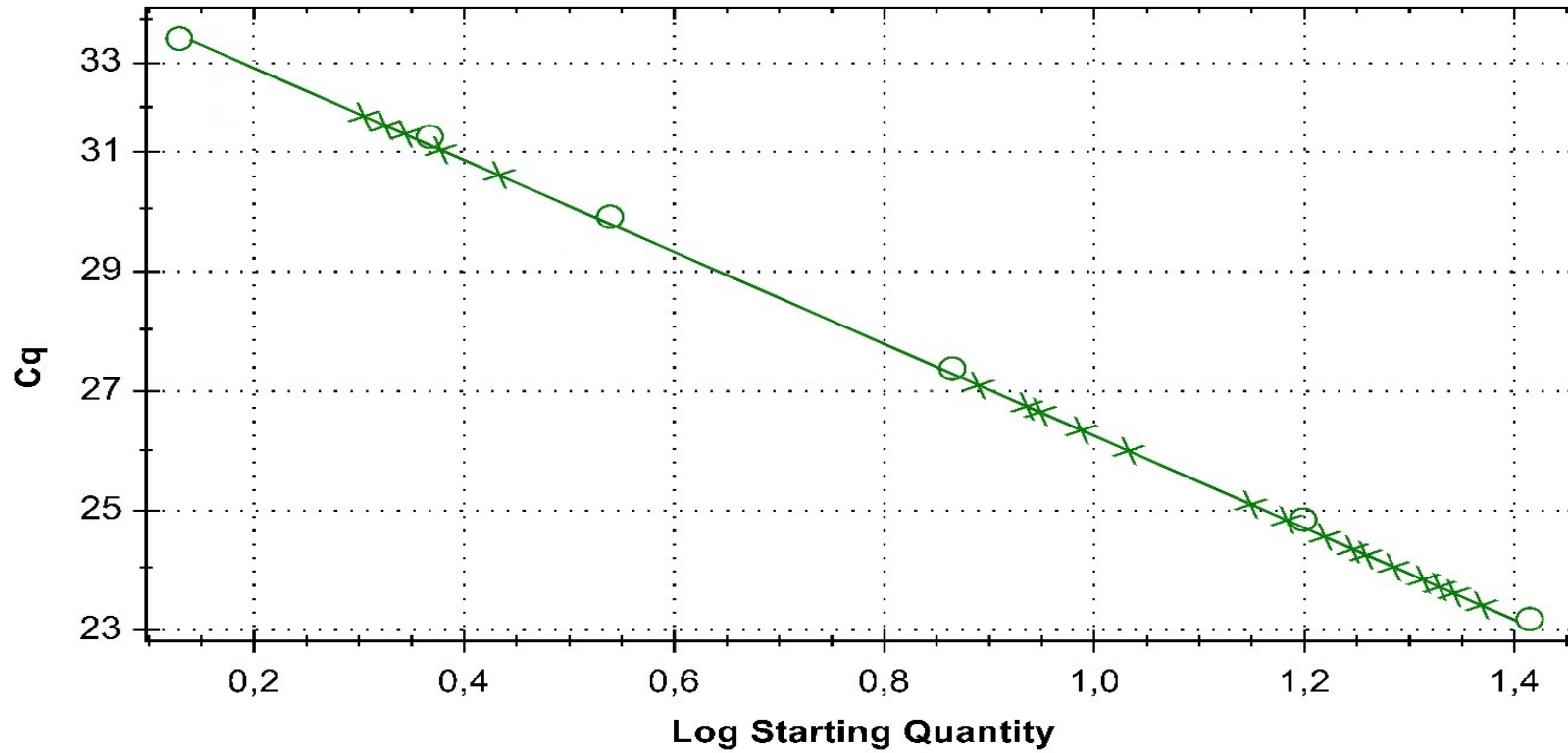


# Amplification





Standard Curve



○ Standard  
× Unknown  
— SYBR E= 99,1% R<sup>2</sup>=0,994 Slope= -3,364 y-int= 25,128

|    | A                          | B                       |
|----|----------------------------|-------------------------|
| 1  | File Name                  | Jafri_TLR4_Plate4.pcrd  |
| 2  | Created By User            | Romi                    |
| 3  | Notes                      |                         |
| 4  | ID                         |                         |
| 5  | Run Started                | 05/23/2019 14:58:36 UTC |
| 6  | Run Ended                  | 05/23/2019 16:03:21 UTC |
| 7  | Sample Vol                 | 25                      |
| 8  | Lid Temp                   | 105                     |
| 9  | Protocol File Name         | Jafri_TLR4_Plate1.prcl  |
| 10 | Plate Setup File Name      | Jafri_TLR4_Plate4.pltd  |
| 11 | Base Serial Number         | BR004129                |
| 12 | Optical Head Serial Number | 788BR04138              |
| 13 | CFX Manager Version        | 3.1.1517.0823.          |

| Sample   | Starting Quantity (SQ) | Slope (dR) | Template | Log Template | Exp. mRNA | ER Mean  | ER Std. Dev |
|----------|------------------------|------------|----------|--------------|-----------|----------|-------------|
| Standard | 2.07E+01               | -3.371     | 50.000   | 1.69897      | 15.01277  | 14.93944 | 0.08737     |
| Standard | 2.06E+01               | -3.371     | 50.000   | 1.69897      | 14.84277  | 14.93944 | 0.08737     |
| Standard | 2.07E+01               | -3.371     | 50.000   | 1.69897      | 14.96277  | 14.93944 | 0.08737     |
| A01      | 1.11E+01               | -3.371     | 50.235   | 1.70101      | 5.37591   | 5.43591  | 0.05292     |
| A01      | 1.12E+01               | -3.371     | 50.235   | 1.70101      | 5.45591   | 5.43591  | 0.05292     |
| A01      | 1.12E+01               | -3.371     | 50.235   | 1.70101      | 5.47591   | 5.43591  | 0.05292     |
| A02      | 1.17E+01               | -3.371     | 50.058   | 1.69947      | 5.99107   | 6.11107  | 0.12530     |
| A02      | 1.18E+01               | -3.371     | 50.058   | 1.69947      | 6.10107   | 6.11107  | 0.12530     |
| A02      | 1.20E+01               | -3.371     | 50.058   | 1.69947      | 6.24107   | 6.11107  | 0.12530     |
| A03      | 1.20E+01               | -3.371     | 50.134   | 1.70013      | 6.28885   | 6.27885  | 0.07550     |
| A03      | 1.21E+01               | -3.371     | 50.134   | 1.70013      | 6.34885   | 6.27885  | 0.07550     |
| A03      | 1.19E+01               | -3.371     | 50.134   | 1.70013      | 6.19885   | 6.27885  | 0.07550     |
| Standard | 1.89E+01               | -3.371     | 25.000   | 1.39794      | 14.20754  | 14.03088 | 0.18556     |
| Standard | 1.86E+01               | -3.371     | 25.000   | 1.39794      | 13.83754  | 14.03088 | 0.18556     |
| Standard | 1.88E+01               | -3.371     | 25.000   | 1.39794      | 14.04754  | 14.03088 | 0.18556     |
| A04      | 1.15E+01               | -3.371     | 50.087   | 1.69973      | 5.75023   | 5.65356  | 0.11930     |
| A04      | 1.13E+01               | -3.371     | 50.087   | 1.69973      | 5.52023   | 5.65356  | 0.11930     |
| A04      | 1.14E+01               | -3.371     | 50.087   | 1.69973      | 5.69023   | 5.65356  | 0.11930     |
| A05      | 1.18E+01               | -3.371     | 50.104   | 1.69987      | 6.09973   | 6.06640  | 0.15275     |
| A05      | 1.19E+01               | -3.371     | 50.104   | 1.69987      | 6.19973   | 6.06640  | 0.15275     |
| A05      | 1.16E+01               | -3.371     | 50.104   | 1.69987      | 5.89973   | 6.06640  | 0.15275     |
| B01      | 1.14E+01               | -3.371     | 50.035   | 1.69927      | 5.67175   | 5.86508  | 0.19502     |
| B01      | 1.18E+01               | -3.371     | 50.035   | 1.69927      | 6.06175   | 5.86508  | 0.19502     |
| B01      | 1.16E+01               | -3.371     | 50.035   | 1.69927      | 5.86175   | 5.86508  | 0.19502     |
| Standard | 1.65E+01               | -3.371     | 12.500   | 1.09691      | 12.82232  | 12.83898 | 0.18556     |
| Standard | 1.64E+01               | -3.371     | 12.500   | 1.09691      | 12.66232  | 12.83898 | 0.18556     |
| Standard | 1.67E+01               | -3.371     | 12.500   | 1.09691      | 13.03232  | 12.83898 | 0.18556     |
| B02      | 1.22E+01               | -3.371     | 50.184   | 1.70057      | 6.50739   | 6.86406  | 0.33710     |
| B02      | 1.26E+01               | -3.371     | 50.184   | 1.70057      | 6.90739   | 6.86406  | 0.33710     |
| B02      | 1.29E+01               | -3.371     | 50.184   | 1.70057      | 7.17739   | 6.86406  | 0.33710     |
| B03      | 1.19E+01               | -3.371     | 50.162   | 1.70037      | 6.12804   | 6.32804  | 0.20000     |
| B03      | 1.21E+01               | -3.371     | 50.162   | 1.70037      | 6.32804   | 6.32804  | 0.20000     |
| B03      | 1.23E+01               | -3.371     | 50.162   | 1.70037      | 6.52804   | 6.32804  | 0.20000     |
| B04      | 1.15E+01               | -3.371     | 50.288   | 1.70146      | 5.73436   | 5.70436  | 0.06083     |
| B04      | 1.14E+01               | -3.371     | 50.288   | 1.70146      | 5.63436   | 5.70436  | 0.06083     |

**RUMUS EKSPRESI :**  
**SLOPE \* LOG TEMPLATE +**  
**STARTING QUANTITY**

**SATUAN EKSPRESI :**  
**FOLD CHANGE**

|          |          |        |        |         |          |          |         |
|----------|----------|--------|--------|---------|----------|----------|---------|
| B04      | 1.15E+01 | -3.371 | 50.288 | 1.70146 | 5.74436  | 5.70436  | 0.06083 |
| Standard | 1.41E+01 | -3.371 | 6.250  | 0.79588 | 11.39709 | 11.40042 | 0.06506 |
| Standard | 1.40E+01 | -3.371 | 6.250  | 0.79588 | 11.33709 | 11.40042 | 0.06506 |
| Standard | 1.42E+01 | -3.371 | 6.250  | 0.79588 | 11.46709 | 11.40042 | 0.06506 |
| B05      | 1.26E+01 | -3.371 | 50.136 | 1.70015 | 6.88880  | 6.77880  | 0.12124 |
| B05      | 1.25E+01 | -3.371 | 50.136 | 1.70015 | 6.79880  | 6.77880  | 0.12124 |
| B05      | 1.24E+01 | -3.371 | 50.136 | 1.70015 | 6.64880  | 6.77880  | 0.12124 |
| C01      | 1.34E+01 | -3.371 | 49.953 | 1.69856 | 7.66415  | 7.84082  | 0.20404 |
| C01      | 1.38E+01 | -3.371 | 49.953 | 1.69856 | 8.06415  | 7.84082  | 0.20404 |
| C01      | 1.35E+01 | -3.371 | 49.953 | 1.69856 | 7.79415  | 7.84082  | 0.20404 |
| C02      | 1.37E+01 | -3.371 | 50.013 | 1.69908 | 7.93239  | 8.05572  | 0.10970 |
| C02      | 1.38E+01 | -3.371 | 50.013 | 1.69908 | 8.09239  | 8.05572  | 0.10970 |
| C02      | 1.39E+01 | -3.371 | 50.013 | 1.69908 | 8.14239  | 8.05572  | 0.10970 |
| Standard | 1.20E+01 | -3.371 | 3.125  | 0.49485 | 10.35186 | 10.56853 | 0.28537 |
| Standard | 1.26E+01 | -3.371 | 3.125  | 0.49485 | 10.89186 | 10.56853 | 0.28537 |
| Standard | 1.21E+01 | -3.371 | 3.125  | 0.49485 | 10.46186 | 10.56853 | 0.28537 |
| C03      | 1.40E+01 | -3.371 | 50.173 | 1.70047 | 8.30772  | 8.50772  | 0.17436 |
| C03      | 1.44E+01 | -3.371 | 50.173 | 1.70047 | 8.62772  | 8.50772  | 0.17436 |
| C03      | 1.43E+01 | -3.371 | 50.173 | 1.70047 | 8.58772  | 8.50772  | 0.17436 |
| C04      | 1.39E+01 | -3.371 | 49.927 | 1.69834 | 8.15491  | 8.10158  | 0.11015 |
| C04      | 1.37E+01 | -3.371 | 49.927 | 1.69834 | 7.97491  | 8.10158  | 0.11015 |
| C04      | 1.39E+01 | -3.371 | 49.927 | 1.69834 | 8.17491  | 8.10158  | 0.11015 |
| C05      | 1.33E+01 | -3.371 | 50.086 | 1.69972 | 7.59026  | 7.71026  | 0.13115 |
| C05      | 1.36E+01 | -3.371 | 50.086 | 1.69972 | 7.85026  | 7.71026  | 0.13115 |
| C05      | 1.34E+01 | -3.371 | 50.086 | 1.69972 | 7.69026  | 7.71026  | 0.13115 |
| Standard | 1.02E+01 | -3.371 | 1.562  | 0.19368 | 9.55710  | 9.55377  | 0.00577 |
| Standard | 1.02E+01 | -3.371 | 1.562  | 0.19368 | 9.55710  | 9.55377  | 0.00577 |
| Standard | 1.02E+01 | -3.371 | 1.562  | 0.19368 | 9.54710  | 9.55377  | 0.00577 |
| D01      | 1.35E+01 | -3.371 | 50.096 | 1.69980 | 7.76996  | 7.99330  | 0.19502 |
| D01      | 1.39E+01 | -3.371 | 50.096 | 1.69980 | 8.12996  | 7.99330  | 0.19502 |
| D01      | 1.38E+01 | -3.371 | 50.096 | 1.69980 | 8.07996  | 7.99330  | 0.19502 |
| D02      | 13.93000 | -3.371 | 50.158 | 1.70034 | 8.19815  | 8.31149  | 0.28729 |
| D02      | 14.37000 | -3.371 | 50.158 | 1.70034 | 8.63815  | 8.31149  | 0.28729 |
| D02      | 13.83000 | -3.371 | 50.158 | 1.70034 | 8.09815  | 8.31149  | 0.28729 |
| D03      | 14.44000 | -3.371 | 50.146 | 1.70024 | 8.70850  | 8.62184  | 0.08083 |
| D03      | 14.28000 | -3.371 | 50.146 | 1.70024 | 8.54850  | 8.62184  | 0.08083 |
| D03      | 14.34000 | -3.371 | 50.146 | 1.70024 | 8.60850  | 8.62184  | 0.08083 |

|     |          |        |        |         |         |         |         |
|-----|----------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|
| Neg | N/A      | N/A    | N/A    | #VALUE! | #VALUE! | #VALUE! | #VALUE! |
| Neg | N/A      | N/A    | N/A    | #VALUE! | #VALUE! | #VALUE! | #VALUE! |
| Neg | N/A      | N/A    | N/A    | #VALUE! | #VALUE! | #VALUE! | #VALUE! |
| D04 | 14.27000 | -3.371 | 50.181 | 1.70054 | 8.53748 | 8.34082 | 0.19035 |
| D04 | 14.06000 | -3.371 | 50.181 | 1.70054 | 8.32748 | 8.34082 | 0.19035 |
| D04 | 13.89000 | -3.371 | 50.181 | 1.70054 | 8.15748 | 8.34082 | 0.19035 |
| D05 | 14.28000 | -3.371 | 50.205 | 1.70075 | 8.54678 | 8.49345 | 0.16653 |
| D05 | 14.04000 | -3.371 | 50.205 | 1.70075 | 8.30678 | 8.49345 | 0.16653 |
| D05 | 14.36000 | -3.371 | 50.205 | 1.70075 | 8.62678 | 8.49345 | 0.16653 |

Plate 1

| NO | Sampel | Ekspresi (Fold change) |
|----|--------|------------------------|
| 1  | A01    | 5.436                  |
| 2  | A02    | 6.111                  |
| 3  | A03    | 6.279                  |
| 4  | A04    | 5.654                  |
| 5  | A05    | 6.066                  |
| 6  | B01    | 5.865                  |
| 7  | B02    | 6.864                  |
| 8  | B03    | 6.328                  |
| 9  | B04    | 5.704                  |
| 10 | B05    | 6.779                  |
| 11 | C01    | 7.841                  |
| 12 | C02    | 8.056                  |
| 13 | C03    | 8.508                  |
| 14 | C04    | 8.102                  |
| 15 | C05    | 7.710                  |
| 16 | D01    | 7.993                  |
| 17 | D02    | 8.311                  |
| 18 | D03    | 8.622                  |
| 19 | D04    | 8.341                  |
| 20 | D05    | 8.493                  |



| Sample   | Starting Quantity (SQ) | Slope (dR) | Template | Log Template | Exp. mRNA | ER Mean  | ER Std. Dev |
|----------|------------------------|------------|----------|--------------|-----------|----------|-------------|
| Standard | 2.00E+01               | -3.368     | 50.000   | 1.69897      | 14.24787  | 14.11454 | 0.12583     |
| Standard | 1.98E+01               | -3.368     | 50.000   | 1.69897      | 14.09787  | 14.11454 | 0.12583     |
| Standard | 1.97E+01               | -3.368     | 50.000   | 1.69897      | 13.99787  | 14.11454 | 0.12583     |
| A06      | 1.19E+01               | -3.368     | 50.067   | 1.69955      | 6.13591   | 6.25258  | 0.10408     |
| A06      | 1.21E+01               | -3.368     | 50.067   | 1.69955      | 6.33591   | 6.25258  | 0.10408     |
| A06      | 1.20E+01               | -3.368     | 50.067   | 1.69955      | 6.28591   | 6.25258  | 0.10408     |
| A07      | 1.19E+01               | -3.368     | 50.128   | 1.70008      | 6.18413   | 6.38413  | 0.24980     |
| A07      | 1.24E+01               | -3.368     | 50.128   | 1.70008      | 6.66413   | 6.38413  | 0.24980     |
| A07      | 1.20E+01               | -3.368     | 50.128   | 1.70008      | 6.30413   | 6.38413  | 0.24980     |
| A08      | 1.18E+01               | -3.368     | 50.042   | 1.69933      | 6.02664   | 6.02997  | 0.08505     |
| A08      | 1.18E+01               | -3.368     | 50.042   | 1.69933      | 6.11664   | 6.02997  | 0.08505     |
| A08      | 1.17E+01               | -3.368     | 50.042   | 1.69933      | 5.94664   | 6.02997  | 0.08505     |
| Standard | 1.76E+01               | -3.368     | 25.000   | 1.39794      | 12.87174  | 13.00507 | 0.11719     |
| Standard | 1.78E+01               | -3.368     | 25.000   | 1.39794      | 13.05174  | 13.00507 | 0.11719     |
| Standard | 1.78E+01               | -3.368     | 25.000   | 1.39794      | 13.09174  | 13.00507 | 0.11719     |
| A09      | 1.14E+01               | -3.368     | 50.081   | 1.69967      | 5.67550   | 5.56550  | 0.14177     |
| A09      | 1.11E+01               | -3.368     | 50.081   | 1.69967      | 5.40550   | 5.56550  | 0.14177     |
| A09      | 1.13E+01               | -3.368     | 50.081   | 1.69967      | 5.61550   | 5.56550  | 0.14177     |
| A10      | 1.14E+01               | -3.368     | 49.986   | 1.69885      | 5.69828   | 5.74828  | 0.15133     |
| A10      | 1.16E+01               | -3.368     | 49.986   | 1.69885      | 5.91828   | 5.74828  | 0.15133     |
| A10      | 1.14E+01               | -3.368     | 49.986   | 1.69885      | 5.62828   | 5.74828  | 0.15133     |
| B06      | 1.69E+01               | -3.368     | 50.122   | 1.70003      | 11.16430  | 11.13430 | 0.05196     |
| B06      | 1.68E+01               | -3.368     | 50.122   | 1.70003      | 11.07430  | 11.13430 | 0.05196     |
| B06      | 1.69E+01               | -3.368     | 50.122   | 1.70003      | 11.16430  | 11.13430 | 0.05196     |
| Standard | 1.60E+01               | -3.368     | 12.500   | 1.09691      | 12.27561  | 12.27894 | 0.04509     |
| Standard | 1.59E+01               | -3.368     | 12.500   | 1.09691      | 12.23561  | 12.27894 | 0.04509     |
| Standard | 1.60E+01               | -3.368     | 12.500   | 1.09691      | 12.32561  | 12.27894 | 0.04509     |
| B07      | 1.61E+01               | -3.368     | 50.038   | 1.69930      | 10.34676  | 10.21676 | 0.12530     |
| B07      | 1.58E+01               | -3.368     | 50.038   | 1.69930      | 10.09676  | 10.21676 | 0.12530     |
| B07      | 1.59E+01               | -3.368     | 50.038   | 1.69930      | 10.20676  | 10.21676 | 0.12530     |
| B08      | 1.67E+01               | -3.368     | 50.073   | 1.69960      | 10.97574  | 10.77574 | 0.17578     |
| B08      | 1.64E+01               | -3.368     | 50.073   | 1.69960      | 10.64574  | 10.77574 | 0.17578     |
| B08      | 1.64E+01               | -3.368     | 50.073   | 1.69960      | 10.70574  | 10.77574 | 0.17578     |
| B09      | 1.66E+01               | -3.368     | 50.144   | 1.70022      | 10.87366  | 10.56366 | 0.27404     |

**RUMUS EKSPRESI :**  
**SLOPE \* LOG TEMPLATE +**  
**STARTING QUANTITY**

**SATUAN EKSPRESI :**  
**FOLD CHANGE**

|          |          |        |        |         |          |          |         |
|----------|----------|--------|--------|---------|----------|----------|---------|
| B09      | 1.62E+01 | -3.368 | 50.144 | 1.70022 | 10.46366 | 10.56366 | 0.27404 |
| B09      | 1.61E+01 | -3.368 | 50.144 | 1.70022 | 10.35366 | 10.56366 | 0.27404 |
| Standard | 1.37E+01 | -3.368 | 6.250  | 0.79588 | 11.05948 | 11.08281 | 0.04041 |
| Standard | 1.37E+01 | -3.368 | 6.250  | 0.79588 | 11.05948 | 11.08281 | 0.04041 |
| Standard | 1.38E+01 | -3.368 | 6.250  | 0.79588 | 11.12948 | 11.08281 | 0.04041 |
| B10      | 1.71E+01 | -3.368 | 50.138 | 1.70017 | 11.41384 | 11.47384 | 0.06000 |
| B10      | 1.72E+01 | -3.368 | 50.138 | 1.70017 | 11.47384 | 11.47384 | 0.06000 |
| B10      | 1.73E+01 | -3.368 | 50.138 | 1.70017 | 11.53384 | 11.47384 | 0.06000 |
| C06      | 1.28E+01 | -3.368 | 50.005 | 1.69901 | 7.04772  | 7.13967  | 0.08509 |
| C06      | 1.29E+01 | -3.368 | 50.076 | 1.69963 | 7.21565  | 7.13967  | 0.08509 |
| C06      | 1.29E+01 | -3.368 | 50.076 | 1.69963 | 7.15565  | 7.13967  | 0.08509 |
| C07      | 1.23E+01 | -3.368 | 50.062 | 1.69951 | 6.56606  | 6.58272  | 0.08622 |
| C07      | 1.22E+01 | -3.368 | 50.062 | 1.69951 | 6.50606  | 6.58272  | 0.08622 |
| C07      | 1.24E+01 | -3.368 | 50.062 | 1.69951 | 6.67606  | 6.58272  | 0.08622 |
| Standard | 1.17E+01 | -3.368 | 3.125  | 0.49485 | 10.01335 | 10.03668 | 0.04933 |
| Standard | 1.17E+01 | -3.368 | 3.125  | 0.49485 | 10.00335 | 10.03668 | 0.04933 |
| Standard | 1.18E+01 | -3.368 | 3.125  | 0.49485 | 10.09335 | 10.03668 | 0.04933 |
| C08      | 1.22E+01 | -3.368 | 50.033 | 1.69926 | 6.45690  | 6.44024  | 0.06658 |
| C08      | 1.22E+01 | -3.368 | 50.033 | 1.69926 | 6.49690  | 6.44024  | 0.06658 |
| C08      | 1.21E+01 | -3.368 | 50.033 | 1.69926 | 6.36690  | 6.44024  | 0.06658 |
| C09      | 1.30E+01 | -3.368 | 50.141 | 1.70019 | 7.22375  | 7.28708  | 0.18339 |
| C09      | 1.29E+01 | -3.368 | 50.141 | 1.70019 | 7.14375  | 7.28708  | 0.18339 |
| C09      | 1.32E+01 | -3.368 | 50.141 | 1.70019 | 7.49375  | 7.28708  | 0.18339 |
| C10      | 1.25E+01 | -3.368 | 50.162 | 1.70037 | 6.81314  | 6.66647  | 0.16166 |
| C10      | 1.22E+01 | -3.368 | 50.162 | 1.70037 | 6.49314  | 6.66647  | 0.16166 |
| C10      | 1.24E+01 | -3.368 | 50.162 | 1.70037 | 6.69314  | 6.66647  | 0.16166 |
| Standard | 9.97E+00 | -3.368 | 1.562  | 0.19368 | 9.31768  | 9.07102  | 0.26102 |
| Standard | 9.45E+00 | -3.368 | 1.562  | 0.19368 | 8.79768  | 9.07102  | 0.26102 |
| Standard | 9.75E+00 | -3.368 | 1.562  | 0.19368 | 9.09768  | 9.07102  | 0.26102 |
| D06      | 1.27E+01 | -3.368 | 50.084 | 1.69970 | 7.01541  | 6.76541  | 0.21656 |
| D06      | 1.24E+01 | -3.368 | 50.084 | 1.69970 | 6.64541  | 6.76541  | 0.21656 |
| D06      | 1.24E+01 | -3.368 | 50.084 | 1.69970 | 6.63541  | 6.76541  | 0.21656 |
| D07      | 12.07000 | -3.368 | 50.113 | 1.69995 | 6.34457  | 6.43123  | 0.08505 |
| D07      | 12.24000 | -3.368 | 50.113 | 1.69995 | 6.51457  | 6.43123  | 0.08505 |
| D07      | 12.16000 | -3.368 | 50.113 | 1.69995 | 6.43457  | 6.43123  | 0.08505 |
| D08      | 11.91000 | -3.368 | 50.073 | 1.69960 | 6.18574  | 6.17907  | 0.05033 |

|     |          |        |        |         |         |         |         |
|-----|----------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|
| D08 | 11.85000 | -3.368 | 50.073 | 1.69960 | 6.12574 | 6.17907 | 0.05033 |
| D08 | 11.95000 | -3.368 | 50.073 | 1.69960 | 6.22574 | 6.17907 | 0.05033 |
| Neg | N/A      | N/A    | N/A    | #VALUE! | #VALUE! | #VALUE! | #VALUE! |
| Neg | N/A      | N/A    | N/A    | #VALUE! | #VALUE! | #VALUE! | #VALUE! |
| Neg | N/A      | N/A    | N/A    | #VALUE! | #VALUE! | #VALUE! | #VALUE! |
| D09 | 12.55000 | -3.368 | 50.121 | 1.70002 | 6.82433 | 6.88100 | 0.23029 |
| D09 | 12.86000 | -3.368 | 50.121 | 1.70002 | 7.13433 | 6.88100 | 0.23029 |
| D09 | 12.41000 | -3.368 | 50.121 | 1.70002 | 6.68433 | 6.88100 | 0.23029 |
| D10 | 11.91000 | -3.368 | 50.086 | 1.69972 | 6.18536 | 6.21869 | 0.09452 |
| D10 | 11.87000 | -3.368 | 50.086 | 1.69972 | 6.14536 | 6.21869 | 0.09452 |
| D10 | 12.05000 | -3.368 | 50.086 | 1.69972 | 6.32536 | 6.21869 | 0.09452 |

Plate 2

| NO | Sampel | Ekspresi (Fold change) |
|----|--------|------------------------|
| 1  | A06    | 6.253                  |
| 2  | A07    | 6.384                  |
| 3  | A08    | 6.030                  |
| 4  | A09    | 5.566                  |
| 5  | A10    | 5.748                  |
| 6  | B06    | 11.134                 |
| 7  | B07    | 10.217                 |
| 8  | B08    | 10.776                 |
| 9  | B09    | 10.564                 |
| 10 | B10    | 11.474                 |
| 11 | C06    | 7.140                  |
| 12 | C07    | 6.583                  |
| 13 | C08    | 6.440                  |
| 14 | C09    | 7.287                  |
| 15 | C10    | 6.666                  |
| 16 | D06    | 6.765                  |
| 17 | D07    | 6.431                  |
| 18 | D08    | 6.179                  |
| 19 | D09    | 6.881                  |
| 20 | D10    | 6.219                  |

| Sample   | Starting Quantity (SQ) | Slope (dR) | Template | Log Template | Exp. mRNA | ER Mean  | ER Std. Dev |
|----------|------------------------|------------|----------|--------------|-----------|----------|-------------|
| Standard | 1.97E+01               | -3.373     | 50.000   | 1.69897      | 13.92937  | 13.88937 | 0.06083     |
| Standard | 1.96E+01               | -3.373     | 50.000   | 1.69897      | 13.81937  | 13.88937 | 0.06083     |
| Standard | 1.97E+01               | -3.373     | 50.000   | 1.69897      | 13.91937  | 13.88937 | 0.06083     |
| A11      | 1.16E+01               | -3.373     | 50.125   | 1.70005      | 5.81572   | 5.65238  | 0.14572     |
| A11      | 1.13E+01               | -3.373     | 50.125   | 1.70005      | 5.60572   | 5.65238  | 0.14572     |
| A11      | 1.13E+01               | -3.373     | 50.125   | 1.70005      | 5.53572   | 5.65238  | 0.14572     |
| A12      | 1.28E+01               | -3.373     | 50.134   | 1.70013      | 7.08545   | 6.77879  | 0.28042     |
| A12      | 1.25E+01               | -3.373     | 50.134   | 1.70013      | 6.71545   | 6.77879  | 0.28042     |
| A12      | 1.23E+01               | -3.373     | 50.134   | 1.70013      | 6.53545   | 6.77879  | 0.28042     |
| A13      | 1.20E+01               | -3.373     | 50.247   | 1.70111      | 6.27216   | 6.34216  | 0.06245     |
| A13      | 1.21E+01               | -3.373     | 50.247   | 1.70111      | 6.39216   | 6.34216  | 0.06245     |
| A13      | 1.21E+01               | -3.373     | 50.247   | 1.70111      | 6.36216   | 6.34216  | 0.06245     |
| Standard | 1.71E+01               | -3.373     | 25.000   | 1.39794      | 12.33475  | 12.80475 | 0.40731     |
| Standard | 1.77E+01               | -3.373     | 25.000   | 1.39794      | 13.02475  | 12.80475 | 0.40731     |
| Standard | 1.78E+01               | -3.373     | 25.000   | 1.39794      | 13.05475  | 12.80475 | 0.40731     |
| A14      | 1.18E+01               | -3.373     | 50.195   | 1.70066      | 6.10367   | 6.06367  | 0.07810     |
| A14      | 1.17E+01               | -3.373     | 50.195   | 1.70066      | 5.97367   | 6.06367  | 0.07810     |
| A14      | 1.19E+01               | -3.373     | 50.195   | 1.70066      | 6.11367   | 6.06367  | 0.07810     |
| A15      | 1.12E+01               | -3.373     | 50.168   | 1.70043      | 5.43446   | 5.51113  | 0.08021     |
| A15      | 1.12E+01               | -3.373     | 50.168   | 1.70043      | 5.50446   | 5.51113  | 0.08021     |
| A15      | 1.13E+01               | -3.373     | 50.168   | 1.70043      | 5.59446   | 5.51113  | 0.08021     |
| B11      | 1.59E+01               | -3.373     | 50.056   | 1.69946      | 10.18773  | 10.03440 | 0.34646     |
| B11      | 1.54E+01               | -3.373     | 50.056   | 1.69946      | 9.63773   | 10.03440 | 0.34646     |
| B11      | 1.60E+01               | -3.373     | 50.056   | 1.69946      | 10.27773  | 10.03440 | 0.34646     |
| Standard | 1.58E+01               | -3.373     | 12.500   | 1.09691      | 12.08012  | 12.12679 | 0.08963     |
| Standard | 1.59E+01               | -3.373     | 12.500   | 1.09691      | 12.23012  | 12.12679 | 0.08963     |
| Standard | 1.58E+01               | -3.373     | 12.500   | 1.09691      | 12.07012  | 12.12679 | 0.08963     |
| B12      | 1.62E+01               | -3.373     | 50.180   | 1.70053      | 10.41411  | 10.90078 | 0.43097     |
| B12      | 1.70E+01               | -3.373     | 50.180   | 1.70053      | 11.23411  | 10.90078 | 0.43097     |
| B12      | 1.68E+01               | -3.373     | 50.180   | 1.70053      | 11.05411  | 10.90078 | 0.43097     |
| B13      | 1.70E+01               | -3.373     | 50.093   | 1.69978      | 11.29665  | 11.15665 | 0.12124     |
| B13      | 1.68E+01               | -3.373     | 50.093   | 1.69978      | 11.08665  | 11.15665 | 0.12124     |
| B13      | 1.68E+01               | -3.373     | 50.093   | 1.69978      | 11.08665  | 11.15665 | 0.12124     |
| B14      | 1.65E+01               | -3.373     | 50.137   | 1.70016      | 10.74537  | 10.69203 | 0.07572     |

**RUMUS EKSPRESI :**  
**SLOPE \* LOG TEMPLATE +**  
**STARTING QUANTITY**

**SATUAN EKSPRESI :**  
**FOLD CHANGE**

|          |          |        |        |         |          |          |         |
|----------|----------|--------|--------|---------|----------|----------|---------|
| B14      | 1.65E+01 | -3.373 | 50.137 | 1.70016 | 10.72537 | 10.69203 | 0.07572 |
| B14      | 1.63E+01 | -3.373 | 50.137 | 1.70016 | 10.60537 | 10.69203 | 0.07572 |
| Standard | 1.38E+01 | -3.373 | 6.250  | 0.79588 | 11.15550 | 11.24216 | 0.07767 |
| Standard | 1.40E+01 | -3.373 | 6.250  | 0.79588 | 11.30550 | 11.24216 | 0.07767 |
| Standard | 1.40E+01 | -3.373 | 6.250  | 0.79588 | 11.26550 | 11.24216 | 0.07767 |
| B15      | 1.61E+01 | -3.373 | 50.290 | 1.70148 | 10.35090 | 10.39090 | 0.12490 |
| B15      | 1.63E+01 | -3.373 | 50.290 | 1.70148 | 10.53090 | 10.39090 | 0.12490 |
| B15      | 1.60E+01 | -3.373 | 50.290 | 1.70148 | 10.29090 | 10.39090 | 0.12490 |
| C11      | 1.19E+01 | -3.373 | 50.468 | 1.70302 | 6.13573  | 6.14906  | 0.09074 |
| C11      | 1.20E+01 | -3.373 | 50.468 | 1.70302 | 6.24573  | 6.14906  | 0.09074 |
| C11      | 1.18E+01 | -3.373 | 50.468 | 1.70302 | 6.06573  | 6.14906  | 0.09074 |
| C12      | 1.29E+01 | -3.373 | 50.094 | 1.69979 | 7.11662  | 7.01996  | 0.09504 |
| C12      | 1.27E+01 | -3.373 | 50.094 | 1.69979 | 6.92662  | 7.01996  | 0.09504 |
| C12      | 1.28E+01 | -3.373 | 50.094 | 1.69979 | 7.01662  | 7.01996  | 0.09504 |
| Standard | 1.20E+01 | -3.373 | 3.125  | 0.49485 | 10.36087 | 10.59754 | 0.27610 |
| Standard | 1.26E+01 | -3.373 | 3.125  | 0.49485 | 10.90087 | 10.59754 | 0.27610 |
| Standard | 1.22E+01 | -3.373 | 3.125  | 0.49485 | 10.53087 | 10.59754 | 0.27610 |
| C13      | 1.25E+01 | -3.373 | 50.051 | 1.69941 | 6.77788  | 6.82455  | 0.05033 |
| C13      | 1.26E+01 | -3.373 | 50.051 | 1.69941 | 6.81788  | 6.82455  | 0.05033 |
| C13      | 1.26E+01 | -3.373 | 50.051 | 1.69941 | 6.87788  | 6.82455  | 0.05033 |
| C14      | 1.23E+01 | -3.373 | 49.972 | 1.69873 | 6.60019  | 6.63686  | 0.08145 |
| C14      | 1.23E+01 | -3.373 | 49.972 | 1.69873 | 6.58019  | 6.63686  | 0.08145 |
| C14      | 1.25E+01 | -3.373 | 49.972 | 1.69873 | 6.73019  | 6.63686  | 0.08145 |
| C15      | 1.22E+01 | -3.373 | 50.255 | 1.70118 | 6.47192  | 6.46192  | 0.06557 |
| C15      | 1.21E+01 | -3.373 | 50.255 | 1.70118 | 6.39192  | 6.46192  | 0.06557 |
| C15      | 1.23E+01 | -3.373 | 50.255 | 1.70118 | 6.52192  | 6.46192  | 0.06557 |
| Standard | 9.76E+00 | -3.373 | 1.562  | 0.19368 | 9.10671  | 9.00338  | 0.16197 |
| Standard | 9.47E+00 | -3.373 | 1.562  | 0.19368 | 8.81671  | 9.00338  | 0.16197 |
| Standard | 9.74E+00 | -3.373 | 1.562  | 0.19368 | 9.08671  | 9.00338  | 0.16197 |
| D11      | 1.14E+01 | -3.373 | 50.128 | 1.70008 | 5.64563  | 5.57230  | 0.08737 |
| D11      | 1.12E+01 | -3.373 | 50.128 | 1.70008 | 5.47563  | 5.57230  | 0.08737 |
| D11      | 1.13E+01 | -3.373 | 50.128 | 1.70008 | 5.59563  | 5.57230  | 0.08737 |
| D12      | 11.88000 | -3.373 | 50.125 | 1.70005 | 6.14572  | 6.13905  | 0.17010 |
| D12      | 11.70000 | -3.373 | 50.125 | 1.70005 | 5.96572  | 6.13905  | 0.17010 |
| D12      | 12.04000 | -3.373 | 50.125 | 1.70005 | 6.30572  | 6.13905  | 0.17010 |
| D13      | 12.44000 | -3.373 | 50.163 | 1.70038 | 6.70461  | 6.57461  | 0.11269 |

|     |          |        |        |         |         |         |         |
|-----|----------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|
| D13 | 12.24000 | -3.373 | 50.163 | 1.70038 | 6.50461 | 6.57461 | 0.11269 |
| D13 | 12.25000 | -3.373 | 50.163 | 1.70038 | 6.51461 | 6.57461 | 0.11269 |
| Neg | N/A      | N/A    | N/A    | #VALUE! | #VALUE! | #VALUE! | #VALUE! |
| Neg | N/A      | N/A    | N/A    | #VALUE! | #VALUE! | #VALUE! | #VALUE! |
| Neg | N/A      | N/A    | N/A    | #VALUE! | #VALUE! | #VALUE! | #VALUE! |
| D14 | 11.95000 | -3.373 | 50.088 | 1.69973 | 6.21680 | 6.13680 | 0.11358 |
| D14 | 11.74000 | -3.373 | 50.088 | 1.69973 | 6.00680 | 6.13680 | 0.11358 |
| D14 | 11.92000 | -3.373 | 50.088 | 1.69973 | 6.18680 | 6.13680 | 0.11358 |
| D15 | 11.34000 | -3.373 | 50.131 | 1.70011 | 5.60554 | 5.60887 | 0.12503 |
| D15 | 11.22000 | -3.373 | 50.131 | 1.70011 | 5.48554 | 5.60887 | 0.12503 |
| D15 | 11.47000 | -3.373 | 50.131 | 1.70011 | 5.73554 | 5.60887 | 0.12503 |

Plate 3

| NO | Sampel | Ekspresi (Fold change) |
|----|--------|------------------------|
| 1  | A11    | 5.652                  |
| 2  | A12    | 6.779                  |
| 3  | A13    | 6.342                  |
| 4  | A14    | 6.064                  |
| 5  | A15    | 5.511                  |
| 6  | B11    | 10.034                 |
| 7  | B12    | 10.901                 |
| 8  | B13    | 11.157                 |
| 9  | B14    | 10.692                 |
| 10 | B15    | 10.391                 |
| 11 | C11    | 6.149                  |
| 12 | C12    | 7.020                  |
| 13 | C13    | 6.825                  |
| 14 | C14    | 6.637                  |
| 15 | C15    | 6.462                  |
| 16 | D11    | 5.572                  |
| 17 | D12    | 6.139                  |
| 18 | D13    | 6.575                  |
| 19 | D14    | 6.137                  |
| 20 | D15    | 5.609                  |



| Sample   | Starting Quantity (SQ) | Slope (dR) | Template | Log Template | Exp. mRNA | ER Mean  | ER Std. Dev |
|----------|------------------------|------------|----------|--------------|-----------|----------|-------------|
| Standard | 2.00E+01               | -3.364     | 50.000   | 1.69897      | 14.26466  | 14.16466 | 0.08888     |
| Standard | 1.99E+01               | -3.364     | 50.000   | 1.69897      | 14.13466  | 14.16466 | 0.08888     |
| Standard | 1.98E+01               | -3.364     | 50.000   | 1.69897      | 14.09466  | 14.16466 | 0.08888     |
| A16      | 1.23E+01               | -3.364     | 50.137   | 1.70016      | 6.61067   | 6.61400  | 0.05508     |
| A16      | 1.24E+01               | -3.364     | 50.137   | 1.70016      | 6.67067   | 6.61400  | 0.05508     |
| A16      | 1.23E+01               | -3.364     | 50.137   | 1.70016      | 6.56067   | 6.61400  | 0.05508     |
| A17      | 1.15E+01               | -3.364     | 50.082   | 1.69968      | 5.76227   | 5.66894  | 0.08622     |
| A17      | 1.14E+01               | -3.364     | 50.082   | 1.69968      | 5.65227   | 5.66894  | 0.08622     |
| A17      | 1.13E+01               | -3.364     | 50.082   | 1.69968      | 5.59227   | 5.66894  | 0.08622     |
| A18      | 1.21E+01               | -3.364     | 50.167   | 1.70042      | 6.37979   | 6.28646  | 0.10693     |
| A18      | 1.20E+01               | -3.364     | 50.167   | 1.70042      | 6.30979   | 6.28646  | 0.10693     |
| A18      | 1.19E+01               | -3.364     | 50.167   | 1.70042      | 6.16979   | 6.28646  | 0.10693     |
| Standard | 1.83E+01               | -3.364     | 25.000   | 1.39794      | 13.60733  | 13.50733 | 0.11790     |
| Standard | 1.82E+01               | -3.364     | 25.000   | 1.39794      | 13.53733  | 13.50733 | 0.11790     |
| Standard | 1.81E+01               | -3.364     | 25.000   | 1.39794      | 13.37733  | 13.50733 | 0.11790     |
| A19      | 1.10E+01               | -3.364     | 50.221   | 1.70089      | 5.24822   | 5.40822  | 0.22716     |
| A19      | 1.10E+01               | -3.364     | 50.221   | 1.70089      | 5.30822   | 5.40822  | 0.22716     |
| A19      | 1.14E+01               | -3.364     | 50.221   | 1.70089      | 5.66822   | 5.40822  | 0.22716     |
| A20      | 1.18E+01               | -3.364     | 50.039   | 1.69931      | 6.04353   | 5.83019  | 0.22030     |
| A20      | 1.16E+01               | -3.364     | 50.039   | 1.69931      | 5.84353   | 5.83019  | 0.22030     |
| A20      | 1.13E+01               | -3.364     | 50.039   | 1.69931      | 5.60353   | 5.83019  | 0.22030     |
| B16      | 1.57E+01               | -3.364     | 50.196   | 1.70067      | 9.99895   | 10.13228 | 0.14640     |
| B16      | 1.60E+01               | -3.364     | 50.196   | 1.70067      | 10.28895  | 10.13228 | 0.14640     |
| B16      | 1.58E+01               | -3.364     | 50.196   | 1.70067      | 10.10895  | 10.13228 | 0.14640     |
| Standard | 1.59E+01               | -3.364     | 12.500   | 1.09691      | 12.20999  | 11.99999 | 0.34655     |
| Standard | 1.53E+01               | -3.364     | 12.500   | 1.09691      | 11.59999  | 11.99999 | 0.34655     |
| Standard | 1.59E+01               | -3.364     | 12.500   | 1.09691      | 12.18999  | 11.99999 | 0.34655     |
| B17      | 1.69E+01               | -3.364     | 50.078   | 1.69965      | 11.19239  | 11.20239 | 0.12530     |
| B17      | 1.71E+01               | -3.364     | 50.078   | 1.69965      | 11.33239  | 11.20239 | 0.12530     |
| B17      | 1.68E+01               | -3.364     | 50.078   | 1.69965      | 11.08239  | 11.20239 | 0.12530     |
| B18      | 1.64E+01               | -3.364     | 50.114   | 1.69996      | 10.70134  | 10.53467 | 0.23072     |
| B18      | 1.60E+01               | -3.364     | 50.114   | 1.69996      | 10.27134  | 10.53467 | 0.23072     |
| B18      | 1.64E+01               | -3.364     | 50.114   | 1.69996      | 10.63134  | 10.53467 | 0.23072     |
| B19      | 1.65E+01               | -3.364     | 49.935   | 1.69841      | 10.81657  | 10.96990 | 0.14572     |

**RUMUS EKSPRESI :**  
**SLOPE \* LOG TEMPLATE +**  
**STARTING QUANTITY**

**SATUAN EKSPRESI :**  
**FOLD CHANGE**

|          |          |        |        |         |          |          |         |
|----------|----------|--------|--------|---------|----------|----------|---------|
| B19      | 1.68E+01 | -3.364 | 49.935 | 1.69841 | 11.10657 | 10.96990 | 0.14572 |
| B19      | 1.67E+01 | -3.364 | 49.935 | 1.69841 | 10.98657 | 10.96990 | 0.14572 |
| Standard | 1.31E+01 | -3.364 | 6.250  | 0.79588 | 10.39266 | 10.43933 | 0.04509 |
| Standard | 1.31E+01 | -3.364 | 6.250  | 0.79588 | 10.44266 | 10.43933 | 0.04509 |
| Standard | 1.32E+01 | -3.364 | 6.250  | 0.79588 | 10.48266 | 10.43933 | 0.04509 |
| B20      | 1.66E+01 | -3.364 | 50.173 | 1.70047 | 10.82962 | 10.64962 | 0.15716 |
| B20      | 1.63E+01 | -3.364 | 50.173 | 1.70047 | 10.57962 | 10.64962 | 0.15716 |
| B20      | 1.63E+01 | -3.364 | 50.173 | 1.70047 | 10.53962 | 10.64962 | 0.15716 |
| C16      | 1.77E+01 | -3.364 | 50.264 | 1.70126 | 12.00697 | 12.15697 | 0.18735 |
| C16      | 1.78E+01 | -3.364 | 50.264 | 1.70126 | 12.09697 | 12.15697 | 0.18735 |
| C16      | 1.81E+01 | -3.364 | 50.264 | 1.70126 | 12.36697 | 12.15697 | 0.18735 |
| C17      | 1.88E+01 | -3.364 | 50.192 | 1.70063 | 13.06907 | 12.99907 | 0.11269 |
| C17      | 1.88E+01 | -3.364 | 50.192 | 1.70063 | 13.05907 | 12.99907 | 0.11269 |
| C17      | 1.86E+01 | -3.364 | 50.192 | 1.70063 | 12.86907 | 12.99907 | 0.11269 |
| Standard | 1.20E+01 | -3.364 | 3.125  | 0.49485 | 10.33532 | 10.21199 | 0.27647 |
| Standard | 1.16E+01 | -3.364 | 3.125  | 0.49485 | 9.89532  | 10.21199 | 0.27647 |
| Standard | 1.21E+01 | -3.364 | 3.125  | 0.49485 | 10.40532 | 10.21199 | 0.27647 |
| C18      | 1.88E+01 | -3.364 | 50.137 | 1.70016 | 13.04067 | 12.75067 | 0.33719 |
| C18      | 1.81E+01 | -3.364 | 50.137 | 1.70016 | 12.38067 | 12.75067 | 0.33719 |
| C18      | 1.86E+01 | -3.364 | 50.137 | 1.70016 | 12.83067 | 12.75067 | 0.33719 |
| C19      | 1.80E+01 | -3.364 | 50.207 | 1.70076 | 12.23863 | 12.41863 | 0.21633 |
| C19      | 1.84E+01 | -3.364 | 50.207 | 1.70076 | 12.65863 | 12.41863 | 0.21633 |
| C19      | 1.81E+01 | -3.364 | 50.207 | 1.70076 | 12.35863 | 12.41863 | 0.21633 |
| C20      | 1.89E+01 | -3.364 | 50.058 | 1.69947 | 13.13297 | 13.20964 | 0.10017 |
| C20      | 1.90E+01 | -3.364 | 50.058 | 1.69947 | 13.32297 | 13.20964 | 0.10017 |
| C20      | 1.89E+01 | -3.364 | 50.058 | 1.69947 | 13.17297 | 13.20964 | 0.10017 |
| Standard | 9.79E+00 | -3.364 | 1.562  | 0.19368 | 9.13846  | 9.03179  | 0.16773 |
| Standard | 9.49E+00 | -3.364 | 1.562  | 0.19368 | 8.83846  | 9.03179  | 0.16773 |
| Standard | 9.77E+00 | -3.364 | 1.562  | 0.19368 | 9.11846  | 9.03179  | 0.16773 |
| D16      | 1.88E+01 | -3.364 | 49.936 | 1.69841 | 13.03654 | 13.08987 | 0.05033 |
| D16      | 1.88E+01 | -3.364 | 49.936 | 1.69841 | 13.09654 | 13.08987 | 0.05033 |
| D16      | 1.89E+01 | -3.364 | 49.936 | 1.69841 | 13.13654 | 13.08987 | 0.05033 |
| D17      | 19.31000 | -3.364 | 50.131 | 1.70011 | 13.59084 | 13.42418 | 0.14742 |
| D17      | 19.03000 | -3.364 | 50.131 | 1.70011 | 13.31084 | 13.42418 | 0.14742 |
| D17      | 19.09000 | -3.364 | 50.131 | 1.70011 | 13.37084 | 13.42418 | 0.14742 |
| D18      | 19.25000 | -3.364 | 50.049 | 1.69940 | 13.53323 | 13.69657 | 0.16010 |

|     |          |        |        |         |          |          |         |
|-----|----------|--------|--------|---------|----------|----------|---------|
| D18 | 19.42000 | -3.364 | 50.049 | 1.69940 | 13.70323 | 13.69657 | 0.16010 |
| D18 | 19.57000 | -3.364 | 50.049 | 1.69940 | 13.85323 | 13.69657 | 0.16010 |
| Neg | N/A      | N/A    | N/A    | #VALUE! | #VALUE!  | #VALUE!  | #VALUE! |
| Neg | N/A      | N/A    | N/A    | #VALUE! | #VALUE!  | #VALUE!  | #VALUE! |
| Neg | N/A      | N/A    | N/A    | #VALUE! | #VALUE!  | #VALUE!  | #VALUE! |
| D19 | 19.43000 | -3.364 | 50.147 | 1.70024 | 13.71038 | 13.89371 | 0.19035 |
| D19 | 19.81000 | -3.364 | 50.147 | 1.70024 | 14.09038 | 13.89371 | 0.19035 |
| D19 | 19.60000 | -3.364 | 50.147 | 1.70024 | 13.88038 | 13.89371 | 0.19035 |
| D20 | 19.38000 | -3.364 | 50.169 | 1.70044 | 13.65974 | 13.56640 | 0.09504 |
| D20 | 19.19000 | -3.364 | 50.169 | 1.70044 | 13.46974 | 13.56640 | 0.09504 |
| D20 | 19.29000 | -3.364 | 50.169 | 1.70044 | 13.56974 | 13.56640 | 0.09504 |

Plate 4

| NO | Sampel | Ekspresi (Fold change) |
|----|--------|------------------------|
| 1  | A16    | 6.614                  |
| 2  | A17    | 5.669                  |
| 3  | A18    | 6.286                  |
| 4  | A19    | 5.408                  |
| 5  | A20    | 5.830                  |
| 6  | B16    | 10.132                 |
| 7  | B17    | 11.202                 |
| 8  | B18    | 10.535                 |
| 9  | B19    | 10.970                 |
| 10 | B20    | 10.650                 |
| 11 | C16    | 12.157                 |
| 12 | C17    | 12.999                 |
| 13 | C18    | 12.751                 |
| 14 | C19    | 12.419                 |
| 15 | C20    | 13.210                 |
| 16 | D16    | 13.090                 |
| 17 | D17    | 13.424                 |
| 18 | D18    | 13.697                 |
| 19 | D19    | 13.894                 |
| 20 | D20    | 13.566                 |

**LAMPIRAN 10:**  
**HASIL PEMERIKSAAN KADAR TLR4**  
**(*ELISA*)**

## Mouse TLR4 ELISA Kit Cat. No. LS-F21475

### Layout

| <> | 1          | 2          | 3         | 4         | 5         | 6         | 7         | 8         | 9         | 10        | 11        | 12        |
|----|------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| A  | Standard 1 | Standard 1 | Sample-1  | Sample-1  | Sample-2  | Sample-2  | Sample-3  | Sample-3  | Sample-4  | Sample-4  | Sample-5  | Sample-5  |
| B  | Standard 2 | Standard 2 | Sample-6  | Sample-6  | Sample-7  | Sample-7  | Sample-8  | Sample-8  | Sample-9  | Sample-9  | Sample-10 | Sample-10 |
| C  | Standard 3 | Standard 3 | Sample-11 | Sample-11 | Sample-12 | Sample-12 | Sample-13 | Sample-13 | Sample-14 | Sample-14 | Sample-15 | Sample-15 |
| D  | Standard 4 | Standard 4 | Sample-16 | Sample-16 | Sample-17 | Sample-17 | Sample-18 | Sample-18 | Sample-19 | Sample-19 | Sample-20 | Sample-20 |
| E  | Standard 5 | Standard 5 | Sample-21 | Sample-21 | Sample-22 | Sample-22 | Sample-23 | Sample-23 | Sample-24 | Sample-24 | Sample-25 | Sample-25 |
| F  | Standard 6 | Standard 6 | Sample-26 | Sample-26 | Sample-27 | Sample-27 | Sample-28 | Sample-28 | Sample-29 | Sample-29 | Sample-30 | Sample-30 |
| G  | Standard 7 | Standard 7 | Sample-31 | Sample-31 | Sample-32 | Sample-32 | Sample-33 | Sample-33 | Sample-34 | Sample-34 | Sample-35 | Sample-35 |
| H  | NEG        | NEG        | Sample-36 | Sample-36 | Sample-37 | Sample-37 | Sample-38 | Sample-38 | Sample-39 | Sample-39 | Sample-40 | Sample-40 |

### Sampel

| <> | 1      | 2     | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  | 11  | 12  |
|----|--------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| A  | TLR4#1 | 10    | A01 | A01 | A02 | A02 | A03 | A03 | A04 | A04 | A05 | A05 |
| B  | TLR4#2 | 5     | A06 | A06 | A07 | A07 | A08 | A08 | A09 | A09 | A10 | A10 |
| C  | TLR4#3 | 2.5   | B01 | B01 | B02 | B02 | B03 | B03 | B04 | B04 | B05 | B05 |
| D  | TLR4#4 | 1.25  | B06 | B06 | B07 | B07 | B08 | B08 | B09 | B09 | B10 | B10 |
| E  | TLR4#5 | 0.625 | C01 | C01 | C02 | C02 | C03 | C03 | C04 | C04 | C05 | C05 |
| F  | TLR4#6 | 0.313 | C06 | C06 | C07 | C07 | C08 | C08 | C09 | C09 | C10 | C10 |
| G  | TLR4#7 | 0.157 | D01 | D01 | D02 | D02 | D03 | D03 | D04 | D04 | D05 | D05 |
| H  | NEG    | 0     | D06 | D06 | D07 | D07 | D08 | D08 | D09 | D09 | D10 | D10 |

### Optic Density

| <> | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A  | 2.205 | 2.001 | 0.17  | 0.2   | 0.17  | 0.146 | 0.156 | 0.174 | 0.195 | 0.169 | 0.189 | 0.157 |
| B  | 1.271 | 1.439 | 0.171 | 0.153 | 0.206 | 0.172 | 0.177 | 0.161 | 0.188 | 0.166 | 0.151 | 0.183 |
| C  | 0.905 | 0.781 | 0.198 | 0.176 | 0.153 | 0.189 | 0.184 | 0.156 | 0.193 | 0.183 | 0.206 | 0.188 |
| D  | 0.450 | 0.372 | 0.304 | 0.374 | 0.35  | 0.292 | 0.339 | 0.273 | 0.336 | 0.292 | 0.315 | 0.379 |
| E  | 0.242 | 0.296 | 0.23  | 0.218 | 0.236 | 0.202 | 0.235 | 0.273 | 0.251 | 0.215 | 0.221 | 0.209 |
| F  | 0.159 | 0.125 | 0.217 | 0.187 | 0.211 | 0.243 | 0.235 | 0.209 | 0.18  | 0.208 | 0.226 | 0.186 |
| G  | 0.105 | 0.087 | 0.215 | 0.241 | 0.243 | 0.219 | 0.259 | 0.223 | 0.267 | 0.229 | 0.222 | 0.252 |
| H  | 0.049 | 0.047 | 0.218 | 0.180 | 0.208 | 0.234 | 0.229 | 0.197 | 0.201 | 0.165 | 0.203 | 0.193 |

## Mouse TLR4 ELISA Kit Cat. No. LS-F21475

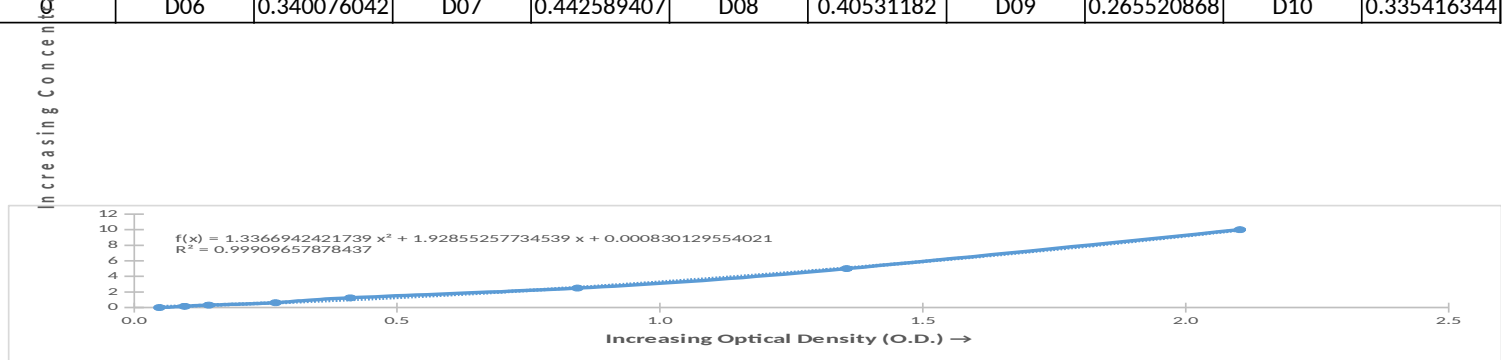
**Mean / STD DEV OD**

| <> | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A  | 2.103 | 0.144 | 0.185 | 0.021 | 0.158 | 0.017 | 0.165 | 0.013 | 0.182 | 0.018 | 0.173 | 0.023 |
| B  | 1.355 | 0.119 | 0.162 | 0.013 | 0.189 | 0.024 | 0.169 | 0.011 | 0.177 | 0.016 | 0.167 | 0.023 |
| C  | 0.843 | 0.088 | 0.187 | 0.016 | 0.171 | 0.025 | 0.170 | 0.020 | 0.188 | 0.007 | 0.197 | 0.013 |
| D  | 0.411 | 0.055 | 0.339 | 0.049 | 0.321 | 0.041 | 0.306 | 0.047 | 0.314 | 0.031 | 0.347 | 0.045 |
| E  | 0.269 | 0.038 | 0.224 | 0.008 | 0.219 | 0.024 | 0.254 | 0.027 | 0.233 | 0.025 | 0.215 | 0.008 |
| F  | 0.142 | 0.024 | 0.202 | 0.021 | 0.227 | 0.023 | 0.222 | 0.018 | 0.194 | 0.020 | 0.206 | 0.028 |
| G  | 0.096 | 0.013 | 0.228 | 0.018 | 0.231 | 0.017 | 0.241 | 0.025 | 0.248 | 0.027 | 0.237 | 0.021 |
| H  | 0.048 | 0.001 | 0.199 | 0.027 | 0.221 | 0.018 | 0.213 | 0.023 | 0.183 | 0.025 | 0.198 | 0.007 |

**Sampel / Concentration (ng/ml)**

|   | 1      | 2     | 3   | 4           | 5   | 6           | 7   | 8           | 9   | 10          | 11  | 12          |
|---|--------|-------|-----|-------------|-----|-------------|-----|-------------|-----|-------------|-----|-------------|
| A | TLR4#1 | 10    | A01 | 0.274840264 | A02 | 0.149028407 | A03 | 0.181646296 | A04 | 0.260861169 | A05 | 0.218923884 |
| B | TLR4#2 | 5     | A06 | 0.167667201 | A07 | 0.293479058 | A08 | 0.20028509  | A09 | 0.237562677 | A10 | 0.190965693 |
| C | TLR4#3 | 2.5   | B01 | 0.284159661 | B02 | 0.209604487 | B03 | 0.204944788 | B04 | 0.28881936  | B05 | 0.330756645 |
| D | TLR4#4 | 1.25  | B06 | 0.99243382  | B07 | 0.908559248 | B08 | 0.838663772 | B09 | 0.87594136  | B10 | 1.029711407 |
| E | TLR4#5 | 0.625 | C01 | 0.456568503 | C02 | 0.43327001  | C03 | 0.596359455 | C04 | 0.498505788 | C05 | 0.414631217 |
| F | TLR4#6 | 0.313 | C06 | 0.354055137 | C07 | 0.470547598 | C08 | 0.447249106 | C09 | 0.31677755  | C10 | 0.372693931 |
| G | TLR4#7 | 0.157 | D01 | 0.475207296 | D02 | 0.489186391 | D03 | 0.535783376 | D04 | 0.568401264 | D05 | 0.517144582 |
| H | NEG    | 0     | D06 | 0.340076042 | D07 | 0.442589407 | D08 | 0.40531182  | D09 | 0.265520868 | D10 | 0.335416344 |

| OD    | Conc  |
|-------|-------|
| 2.103 | 10    |
| 1.355 | 5     |
| 0.843 | 2.5   |
| 0.411 | 1.25  |
| 0.269 | 0.625 |
| 0.142 | 0.313 |
| 0.096 | 0.157 |
| 0.048 | 0     |







**HASIL ELISA**

| No | No Sampel | Konsentrasi (ng/ml) | Konsentrasi 10X |
|----|-----------|---------------------|-----------------|
| 1  | A01       | 0.275               | 2.748           |
| 2  | A02       | 0.149               | 1.490           |
| 3  | A03       | 0.182               | 1.816           |
| 4  | A04       | 0.261               | 2.609           |
| 5  | A05       | 0.219               | 2.189           |
| 6  | A06       | 0.168               | 1.677           |
| 7  | A07       | 0.293               | 2.935           |
| 8  | A08       | 0.200               | 2.003           |
| 9  | A09       | 0.238               | 2.376           |
| 10 | A10       | 0.191               | 1.910           |
| 11 | B01       | 0.284               | 2.842           |
| 12 | B02       | 0.210               | 2.096           |
| 13 | B03       | 0.205               | 2.049           |
| 14 | B04       | 0.289               | 2.888           |
| 15 | B05       | 0.331               | 3.308           |
| 16 | B06       | 0.992               | 9.924           |
| 17 | B07       | 0.909               | 9.086           |
| 18 | B08       | 0.839               | 8.387           |
| 19 | B09       | 0.876               | 8.759           |
| 20 | B10       | 1.030               | 10.297          |
| 21 | C01       | 0.457               | 4.566           |
| 22 | C02       | 0.433               | 4.333           |
| 23 | C03       | 0.596               | 5.964           |
| 24 | C04       | 0.499               | 4.985           |
| 25 | C05       | 0.415               | 4.146           |
| 26 | C06       | 0.354               | 3.541           |
| 27 | C07       | 0.471               | 4.705           |
| 28 | C08       | 0.447               | 4.472           |
| 29 | C09       | 0.317               | 3.168           |
| 30 | C10       | 0.373               | 3.727           |
| 31 | D01       | 0.475               | 4.752           |
| 32 | D02       | 0.489               | 4.892           |
| 33 | D03       | 0.536               | 5.358           |
| 34 | D04       | 0.568               | 5.684           |
| 35 | D05       | 0.517               | 5.171           |
| 36 | D06       | 0.340               | 3.401           |
| 37 | D07       | 0.443               | 4.426           |
| 38 | D08       | 0.405               | 4.053           |
| 39 | D09       | 0.266               | 2.655           |
| 40 | D10       | 0.335               | 3.354           |

## Mouse TLR4 ELISA Kit Cat. No. LS-F21475

### Layout

| <> | 1          | 2          | 3         | 4         | 5         | 6         | 7         | 8         | 9         | 10        | 11        | 12        |
|----|------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| A  | Standard 1 | Standard 1 | Sample-1  | Sample-1  | Sample-2  | Sample-2  | Sample-3  | Sample-3  | Sample-4  | Sample-4  | Sample-5  | Sample-5  |
| B  | Standard 2 | Standard 2 | Sample-6  | Sample-6  | Sample-7  | Sample-7  | Sample-8  | Sample-8  | Sample-9  | Sample-9  | Sample-10 | Sample-10 |
| C  | Standard 3 | Standard 3 | Sample-11 | Sample-11 | Sample-12 | Sample-12 | Sample-13 | Sample-13 | Sample-14 | Sample-14 | Sample-15 | Sample-15 |
| D  | Standard 4 | Standard 4 | Sample-16 | Sample-16 | Sample-17 | Sample-17 | Sample-18 | Sample-18 | Sample-19 | Sample-19 | Sample-20 | Sample-20 |
| E  | Standard 5 | Standard 5 | Sample-21 | Sample-21 | Sample-22 | Sample-22 | Sample-23 | Sample-23 | Sample-24 | Sample-24 | Sample-25 | Sample-25 |
| F  | Standard 6 | Standard 6 | Sample-26 | Sample-26 | Sample-27 | Sample-27 | Sample-28 | Sample-28 | Sample-29 | Sample-29 | Sample-30 | Sample-30 |
| G  | Standard 7 | Standard 7 | Sample-31 | Sample-31 | Sample-32 | Sample-32 | Sample-33 | Sample-33 | Sample-34 | Sample-34 | Sample-35 | Sample-35 |
| H  | NEG        | NEG        | Sample-36 | Sample-36 | Sample-37 | Sample-37 | Sample-38 | Sample-38 | Sample-39 | Sample-39 | Sample-40 | Sample-40 |

### Sampel

| <> | 1      | 2     | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  | 11  | 12  |
|----|--------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| A  | TLR4#1 | 10    | A11 | A11 | A12 | A12 | A13 | A13 | A14 | A14 | A15 | A15 |
| B  | TLR4#2 | 5     | A16 | A16 | A17 | A17 | A18 | A18 | A19 | A19 | A20 | A20 |
| C  | TLR4#3 | 2.5   | B11 | B11 | B12 | B12 | B13 | B13 | B14 | B14 | B15 | B15 |
| D  | TLR4#4 | 1.25  | B16 | B16 | B17 | B17 | B18 | B18 | B19 | B19 | B20 | B20 |
| E  | TLR4#5 | 0.625 | C11 | C11 | C12 | C12 | C13 | C13 | C14 | C14 | C15 | C15 |
| F  | TLR4#6 | 0.313 | C16 | C16 | C17 | C17 | C18 | C18 | C19 | C19 | C20 | C20 |
| G  | TLR4#7 | 0.157 | D11 | D11 | D12 | D12 | D13 | D13 | D14 | D14 | D15 | D15 |
| H  | NEG    | 0     | D16 | D16 | D17 | D17 | D18 | D18 | D19 | D19 | D20 | D20 |

### Optic Density

| <> | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A  | 2.022 | 2.232 | 0.173 | 0.201 | 0.176 | 0.152 | 0.167 | 0.183 | 0.167 | 0.151 | 0.209 | 0.179 |
| B  | 1.470 | 1.312 | 0.204 | 0.19  | 0.179 | 0.157 | 0.187 | 0.157 | 0.18  | 0.202 | 0.175 | 0.185 |
| C  | 0.795 | 0.909 | 0.317 | 0.375 | 0.333 | 0.291 | 0.285 | 0.323 | 0.343 | 0.305 | 0.313 | 0.363 |
| D  | 0.472 | 0.396 | 0.341 | 0.293 | 0.325 | 0.343 | 0.339 | 0.303 | 0.372 | 0.34  | 0.341 | 0.289 |
| E  | 0.295 | 0.261 | 0.216 | 0.192 | 0.223 | 0.209 | 0.212 | 0.192 | 0.233 | 0.217 | 0.235 | 0.205 |
| F  | 0.146 | 0.168 | 0.365 | 0.441 | 0.358 | 0.396 | 0.389 | 0.345 | 0.42  | 0.35  | 0.381 | 0.405 |
| G  | 0.116 | 0.090 | 0.199 | 0.187 | 0.18  | 0.162 | 0.15  | 0.174 | 0.189 | 0.179 | 0.217 | 0.197 |
| H  | 0.053 | 0.049 | 0.448 | 0.376 | 0.405 | 0.473 | 0.453 | 0.399 | 0.391 | 0.441 | 0.461 | 0.403 |

## Mouse TLR4 ELISA Kit Cat. No. LS-F21475

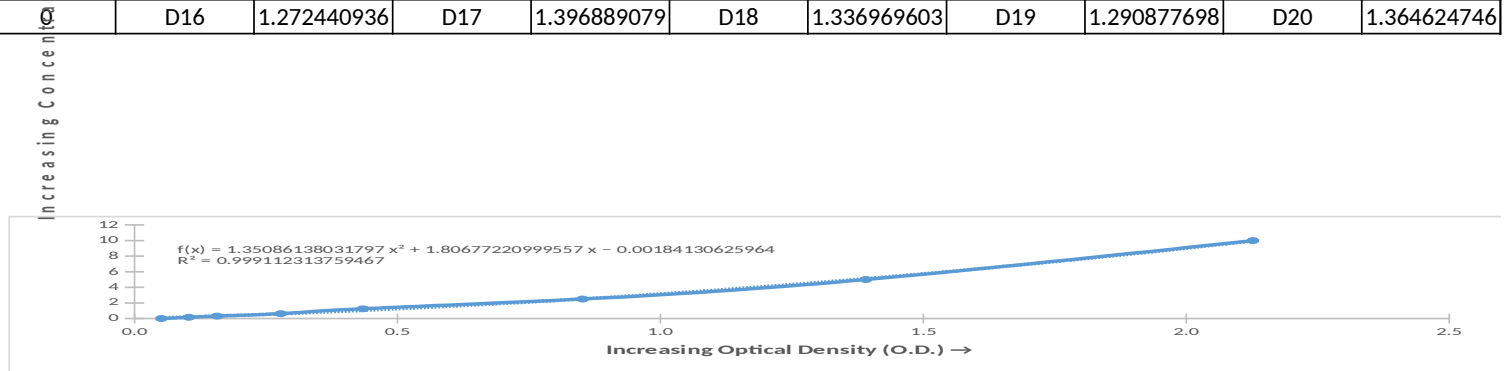
Mean / STD DEV OD

| <> | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A  | 2.127 | 0.148 | 0.187 | 0.020 | 0.164 | 0.017 | 0.175 | 0.011 | 0.159 | 0.011 | 0.194 | 0.021 |
| B  | 1.391 | 0.112 | 0.197 | 0.010 | 0.168 | 0.016 | 0.172 | 0.021 | 0.191 | 0.016 | 0.180 | 0.007 |
| C  | 0.852 | 0.081 | 0.346 | 0.041 | 0.312 | 0.030 | 0.304 | 0.027 | 0.324 | 0.027 | 0.338 | 0.035 |
| D  | 0.434 | 0.054 | 0.317 | 0.034 | 0.334 | 0.013 | 0.321 | 0.025 | 0.356 | 0.023 | 0.315 | 0.037 |
| E  | 0.278 | 0.024 | 0.204 | 0.017 | 0.216 | 0.010 | 0.202 | 0.014 | 0.225 | 0.011 | 0.220 | 0.021 |
| F  | 0.157 | 0.016 | 0.403 | 0.054 | 0.377 | 0.027 | 0.367 | 0.031 | 0.385 | 0.049 | 0.393 | 0.017 |
| G  | 0.103 | 0.018 | 0.193 | 0.008 | 0.171 | 0.013 | 0.162 | 0.017 | 0.184 | 0.007 | 0.207 | 0.014 |
| H  | 0.051 | 0.003 | 0.412 | 0.051 | 0.439 | 0.048 | 0.426 | 0.038 | 0.416 | 0.035 | 0.432 | 0.041 |

Sampel / Concentration (ng/ml)

|   | 1      | 2     | 3   | 4           | 5   | 6           | 7   | 8           | 9   | 10          | 11  | 12          |
|---|--------|-------|-----|-------------|-----|-------------|-----|-------------|-----|-------------|-----|-------------|
| A | TLR4#1 | 10    | A11 | 0.235373069 | A12 | 0.129361687 | A13 | 0.180062783 | A14 | 0.106315734 | A15 | 0.267637403 |
| B | TLR4#2 | 5     | A16 | 0.281464974 | A17 | 0.147798449 | A18 | 0.166235211 | A19 | 0.253809831 | A20 | 0.203108735 |
| C | TLR4#3 | 2.5   | B11 | 0.968234361 | B12 | 0.811521884 | B13 | 0.77464836  | B14 | 0.86683217  | B15 | 0.931360837 |
| D | TLR4#4 | 1.25  | B16 | 0.834567836 | B17 | 0.912924075 | B18 | 0.853004598 | B19 | 1.014326266 | B20 | 0.825349455 |
| E | TLR4#5 | 0.625 | C11 | 0.313729308 | C12 | 0.369039594 | C13 | 0.304510927 | C14 | 0.410522309 | C15 | 0.387476356 |
| F | TLR4#6 | 0.313 | C16 | 1.230958221 | C17 | 1.111119267 | C18 | 1.065027362 | C19 | 1.147992792 | C20 | 1.184866316 |
| G | TLR4#7 | 0.157 | D11 | 0.263028212 | D12 | 0.161626021 | D13 | 0.120143306 | D14 | 0.221545497 | D15 | 0.327556879 |
| H | NEG    | 0     | D16 | 1.272440936 | D17 | 1.396889079 | D18 | 1.336969603 | D19 | 1.290877698 | D20 | 1.364624746 |

| OD    | Conc  |
|-------|-------|
| 2.127 | 10    |
| 1.391 | 5     |
| 0.852 | 2.5   |
| 0.434 | 1.25  |
| 0.278 | 0.625 |
| 0.157 | 0.313 |
| 0.103 | 0.157 |
| 0.051 | 0     |





**HASIL ELISA**

| No | No Sampel | Konsentrasi (ng/ml) | Konsentrasi 10X |
|----|-----------|---------------------|-----------------|
| 1  | A11       | 0.235               | 2.354           |
| 2  | A12       | 0.129               | 1.294           |
| 3  | A13       | 0.180               | 1.801           |
| 4  | A14       | 0.106               | 1.063           |
| 5  | A15       | 0.268               | 2.676           |
| 6  | A16       | 0.281               | 2.815           |
| 7  | A17       | 0.148               | 1.478           |
| 8  | A18       | 0.166               | 1.662           |
| 9  | A19       | 0.254               | 2.538           |
| 10 | A20       | 0.203               | 2.031           |
| 11 | B11       | 0.968               | 9.682           |
| 12 | B12       | 0.812               | 8.115           |
| 13 | B13       | 0.775               | 7.746           |
| 14 | B14       | 0.867               | 8.668           |
| 15 | B15       | 0.931               | 9.314           |
| 16 | B16       | 0.835               | 8.346           |
| 17 | B17       | 0.913               | 9.129           |
| 18 | B18       | 0.853               | 8.530           |
| 19 | B19       | 1.014               | 10.143          |
| 20 | B20       | 0.825               | 8.253           |
| 21 | C11       | 0.314               | 3.137           |
| 22 | C12       | 0.369               | 3.690           |
| 23 | C13       | 0.305               | 3.045           |
| 24 | C14       | 0.411               | 4.105           |
| 25 | C15       | 0.387               | 3.875           |
| 26 | C16       | 1.231               | 12.310          |
| 27 | C17       | 1.111               | 11.111          |
| 28 | C18       | 1.065               | 10.650          |
| 29 | C19       | 1.148               | 11.480          |
| 30 | C20       | 1.185               | 11.849          |
| 31 | D11       | 0.263               | 2.630           |
| 32 | D12       | 0.162               | 1.616           |
| 33 | D13       | 0.120               | 1.201           |
| 34 | D14       | 0.222               | 2.215           |
| 35 | D15       | 0.328               | 3.276           |
| 36 | D16       | 1.272               | 12.724          |
| 37 | D17       | 1.397               | 13.969          |
| 38 | D18       | 1.337               | 13.370          |
| 39 | D19       | 1.291               | 12.909          |
| 40 | D20       | 1.365               | 13.646          |

**LAMPIRAN 11:**  
**PERSETUJUAN ETIK**

**LAMPIRAN 12:**  
**IZIN PENGGUNAAN LABORATORIUM**



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
RSPTN UNIVERSITAS HASANUDDIN  
RSUP Dr. WAHIDIN SUDIROHUSODO MAKASSAR  
KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN

Sekretariat : Lantai 3 Gedung Laboratorium Terpadu  
JL.PERINTIS KEMERDEKAAN KAMPUS TAMALANREA KM.10 MAKASSAR 90245.  
Contact Person: dr. Agussalim Bukhari, MMed, PhD, SpGK TELP. 081225704670 e-mail : agussalimbukhari@yahoo.com

**REKOMENDASI PERSETUJUAN ETIK**

Nomor : 740/UN4.6.4.5.31/ PP36/ 2019

Tanggal: 30 Agustus 2019

Dengan ini Menyatakan bahwa Protokol dan Dokumen yang Berhubungan Dengan Protokol berikut ini telah mendapatkan Persetujuan Etik :

|  |   |  |                           |
|--|---|--|---------------------------|
| No Protokol                                      | UH19010020  | No Sponsor Protokol  |                           |
| Peneliti Utama                                   | <b>Jafriati, S.Si,M.Si</b>  | Sponsor  |                           |
| Judul Peneliti                                   | Analisis Efek Senyawa Bioaktif Ekstrak Thalassia hemprichii Pada Mencit BALB/C Yang Terinfeksi Salmonella typhi : Kajian Patomekanisme Ekspresi mRNA Gen TLR4 |  |                           |
| No Versi Protokol                                | 1   | Tanggal Versi  | 11 Januari 2019           |
| No Versi PSP                                     |   | Tanggal Versi  |                           |
| Tempat Penelitian                                | Laboratorium Mikrobiologi dan Immunologi FKUH Makassar  |  |                           |
| Jenis Review                                     | <input type="checkbox"/> Exempted<br><input checked="" type="checkbox"/> Expedited<br><input type="checkbox"/> Fullboard Tanggal                              | Masa Berlaku<br>30 Agustus 2019<br>sampai<br>30 Agustus 2020 | Frekuensi review lanjutan |
| Ketua Komisi Etik Penelitian Kesehatan FKUH      | Nama<br><b>Prof.Dr.dr. Suryani As'ad, M.Sc.,Sp.GK (K)</b>   | Tanda tangan<br>   |                           |
| Sekretaris Komisi Etik Penelitian Kesehatan FKUH | Nama<br><b>dr. Agussalim Bukhari, M.Med.,Ph.D.,Sp.GK (K)</b>  | Tanda tangan<br>   |                           |

Kewajiban Peneliti Utama:

- Menyerahkan Amandemen Protokol untuk persetujuan sebelum di implementasikan
- Menyerahkan Laporan SAE ke Komisi Etik dalam 24 Jam dan dilengkapi dalam 7 hari dan Laporan SUSAR dalam 72 Jam setelah Peneliti Utama menerima laporan
- Menyerahkan Laporan Kemajuan (progress report) setiap 6 bulan untuk penelitian resiko tinggi dan setiap setahun untuk penelitian resiko rendah
- Menyerahkan laporan akhir setelah Penelitian berakhir
- Melaporkan penyimpangan dari protokol yang disetujui (protocol deviation / violation)
- Mematuhi semua peraturan yang ditentukan





KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
**PROGRAM STUDI S3 ILMU KEDOKTERAN**

Jl. Perintis Kemerdekaan Km. 10 Makassar 90245 Telp.(0411)586010,(0411)586297,  
s3kedokteranunhas@gmail.com

Nomor : 20462/UN4.6.1/PT.01.04/2019  
Perihal : Permohonan Izin Penggunaan Laboratorium

10 Oktober 2019

Yth.  
Dekan  
Fakultas MIPA  
Universitas Hasanuddin  
Makassar

Dengan hormat, bahwa mahasiswa Program Studi S3 Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin yang tersebut dibawah ini :

N a m a : **Jafriati**  
Nomor Pokok : C013171008  
Program Studi : Doktor Ilmu Kedokteran

Bermaksud melakukan penelitian dalam rangka persiapan penulisan disertasi dengan Judul :  
**Analisis Efek senyawa Bioaktif Ekstrak Thalossia hemprichii pada Mencit Balb/c yang terinfeksi Salmohella thypi: Kajian Patomekanisme Ekspresi mRNA Gen TLR4.**

Sehubungan dengan hal tersebut kami mohon kiranya berkenan memberikan izin kepada yang bersangkutan menggunakan Laboratorium pada Institusi Bapak.

an. Dekan  
Wakil Dekan Bidang Akademik, Riset  
dan Inovasi

Dr. dr. Irfan Idris, M.Kes  
NIP.19671103 199802 1 001

Tembusan Kepada Yth :

1. Ketua Prodi Doktor Ilmu Kedokteran FK Unhas
2. Kepala Lab. Penelitian dan Pengembangan Sains Terpadu Fak. MIPA Unhas
3. Arsip