

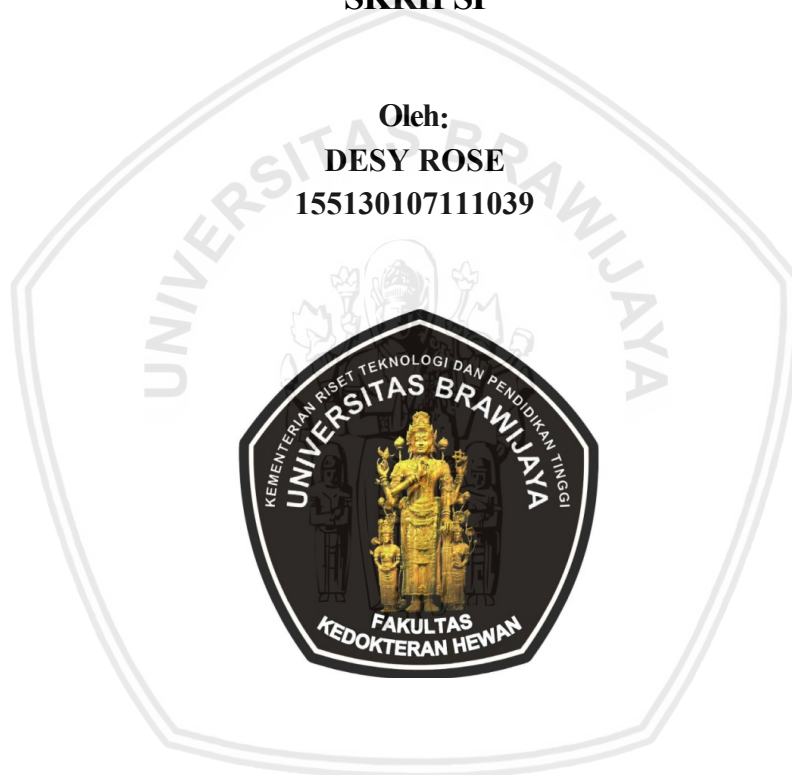
**PENGARUH PEMBERIAN INFUSA DAUN BELUNTAS
(*Pluchea indica L.*) TERHADAP EKSPRESI TNF-ALFA
DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI DUODENUM
PADA MENCIT BALB-C MODEL DIARE
HASIL INDUKSI *CASTOR OIL***

SKRIPSI

Oleh:

DESY ROSE

155130107111039



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

Pengaruh Pemberian Infusa Daun Beluntas (*Pluchea indica L.*) terhadap Ekspresi TNF-alfa dan Gambaran Histopatologi Duodenum pada Mencit Balb-C Model Diare Hasil Induksi *Castor Oil*

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

DESY ROSE

155130107111039



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

PENGARUH PEMBERIAN INFUSA DAUN BELUNTAS (*Pluchea indica L.*) TERHADAP EKSPRESI TNF-ALFA DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI DUODENUM PADA MENCIT BALB-C MODEL DIARE HASIL INDUKSI *CASTOR OIL*

Oleh:

DESY ROSE

155130107111039

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
Pada tanggal 19 Juli 2019
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

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

drh. Herlina Pratiwi, M.Si
NIP. 19870518 201012 2 010

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

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

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Desy Rose

NIM : 155130107111039

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulis Skripsi berjudul:

Pengaruh Pemberian Infusa Daun Beluntas (*Pluchea indica L.*) terhadap Ekspresi TNF-alfa dan Gambaran Histopatologi Duodenum pada Mencit Balb-C Model Diare Hasil Induksi *Castor Oil*

Dengan ini menyatakan bahwa:

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

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang,
Yang menyatakan,

Desy Rose
NIM. 155130107111039

PENGARUH PEMBERIAN INFUSA DAUN BELUNTAS (*Pluchea indica* L.) TERHADAP EKSPRESI TNF-ALFA DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI DUODENUM PADA MENCIT BALB-C MODEL DIARE HASIL INDUKSI *CASTOR OIL*

ABSTRAK

Diare merupakan penyakit yang ditandai dengan frekuensi buang air besar meningkat disertai perubahan bentuk dan konsistensi feses. Diare dapat disebabkan oleh gangguan osmotik, gangguan sekresi, dan gangguan motilitas usus. Paparan *castor oil* terhadap hewan coba dapat menyebabkan diare karena *castor oil* ini mengandung senyawa asam risinoleat yang berperan sebagai efek pencahar pada hewan yang mengonsumsinya. Penyakit diare diyakini dapat diobati dengan tumbuhan daun beluntas karena mengandung flavonoid dan tannin, zat-zat ini berperan dalam mengobati penyakit diare. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek kuratif infusa daun beluntas sebagai antidiare pada mencit balb-c model diare hasil induksi *castor oil*. Penelitian ini menggunakan enam kelompok perlakuan dengan 4 kali pengulangan yaitu kontrol negatif (tanpa perlakuan), kontrol positif (diinduksi *castor oil* 0,5 mL), kelompok pembanding (diinduksi *castor oil* 0,5 mL dan terapi norit® 0,8 mL), kelompok perlakuan 1 (diinduksi *castor oil* 0,5 mL dan terapi infusa daun beluntas 5% sebanyak 0,75 mL), kelompok perlakuan 2 (diinduksi *castor oil* 0,5 mL dan terapi infusa daun beluntas 10% sebanyak 0,75 mL), kelompok perlakuan 3 (diinduksi *castor oil* 0,75 mL dan terapi infusa daun beluntas 20% sebanyak 0,75 mL). Terapi dilakukan selama 1 hari. Parameter penelitian ini adalah gambaran histopatologi kerusakan villi dan sel epitel duodenum. Hasil penelitian terapi infusa daun beluntas 5%, 10%, dan 20% menunjukkan perubahan pada mukosa duodenum dengan berkurangnya erosi epitel, ruptur villi, dan penurunan ekspresi TNF- α , konsentrasi 20% tidak berbeda nyata ($p>0,05$) dengan kelompok sehat/kontrol negatif. Penelitian ini menyimpulkan bahwa infusa daun beluntas konsentrasi 20% adalah konsentrasi terbaik yang efektif dalam mengatasi diare, ditandai dengan menurunnya ekspresi TNF- α dan mengurangi kerusakan yang lebih parah dari gambaran histopatologi pada duodenum mencit.

Kata kunci : *Castor Oil*, Diare, Duodenum, Infusa Daun Beluntas, TNF- α

**EXPRESSION OF TUMOR NECROSIS FACTORS- α (TNF- α) AND
DUODENUM HISTOPATHOLOGY IN BALB C MICE DIARRHEA
MODEL RESULT OF CASTOR OIL INDUCTION WITH INFUSION
OF BELUNTAS LEAVES (*Pluchea indica L.*)**

ABSTRACT

Diarrhea is a disease that characterized by increasing frequency of bowel movements accompanied by changes in the shape and consistency of feces in patients. Diarrhea can be caused by osmotic disorders, impaired secretions, and intestinal abnormalities. Exposure of castor oil to experimental animals can cause diarrhea because castor oil contains risinoleic acid compounds which act as a laxative effect on animals. Diarrhea are believed to be treated with beluntas leaves because it contains flavonoids and tannins, these substances play a role in treating diarrheal diseases. This study aims to determine the curative effect of beluntas leaf infusion as an antidiarrheal in diarrhea balb-c mice induced by castor oil. This study used six treatment groups with 4 repetitions namely negative controls (without treatment), positive controls (induced castor oil 0.5 mL), comparison group (induced castor oil 0.5 mL and norit® therapy 0.8 mL), group treatment 1 (castor oil 0.5 mL induced and 5% beluntas leaf infusion therapy as much as 0.75 mL), treatment group 2 (induced castor oil 0.5 mL and infusion of beluntas leaves 10%), group treatment 3 (induced 0.75 mL castor oil and infusion therapy of 0.75 mL beluntas leaves 20%). Therapy was carried out for 1 day. The parameters of this study were histopathological features of villi damage and duodenal epithelial cells. The results showed that beluntas leaf infusion therapy of 5%, 10%, and 20% showed changes in the duodenal mucosa with reduced epithelial erosion, villi rupture, and decreased levels of TNF- α , 20% concentration was not significantly different ($p > 0.05$) with healthy groups / negative controls. This study concluded that the infusion of beluntas leaves with a concentration of 20% was the best concentration that was effective in treating diarrhea, marked by a decrease in TNF- α expression and reduced more severe damage from histopathological features in the duodenum of mice.

Keywords: Castor Oil, Diarrhea, Duodenum, Infusion of Beluntas Leaves, TNF- α

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas berkat dan anugerah-Nya, penulis dapat menyusun Skripsi yang berjudul “Pengaruh Pemberian Infusa Daun Beluntas (*Pluchea indica* L.) terhadap Ekspresi TNF- α dan Gambaran Histopatologi Duodenum pada Mencit Balb-C Model Diare Hasil Induksi *Castor Oil*.”

Penulis menyampaikan terima kasih sebesar-besarnya kepada seluruh pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan Skripsi ini, secara khusus penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya (FKH UB) atas kepemimpinan dan dukungan demi kemajuan FKH UB.
2. Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc selaku dosen pembimbing 1 yang telah menyisihkan waktu untuk membimbing penulis saat kegiatan serta penulisan Skripsi ini.
3. drh. Herlina Pratiwi, M.Si selaku dosen pembimbing 2 yang telah menyisihkan waktu untuk membimbing penulis saat kegiatan serta penulisan Skripsi ini.
4. drh. Aldila Noviatry, M. Biomed selaku dosen penguji 1 yang telah menyisihkan waktu untuk membimbing penulis saat penulisan Skripsi ini.
5. drh. Dodik Prasetyo, M.Vet selaku dosen penguji 2 yang telah menyisihkan waktu untuk membimbing penulis saat penulisan Skripsi ini.
6. Kedua orangtua, Bapak Iyustoda dan Ibu Emilia Liberty atas doa dan kerja keras

- untuk penulis serta perhatian akan kebutuhan penulis.
7. Mikhael Mario Brand, Barbara, Clara, Momo, dan Rubi sebagai *support system* yang selalu menghibur, menyemangati, dan membantu penulis.
 8. Erina Bidari Utomo, Catur Kesuma Ningtyas, dan Rowena Yutifri yang selalu menyemangati dan memberi dukungan dan doa serta selalu menemani hari-hari penulis.
 9. Teman *Cockroach Talks Group* (Olea Rody S., Silvira Tri Purnama, Dian Agatha N., Hardyanti T., Aditya F.) yang selalu membantu dan memberi masukan serta saran untuk penulis.
 10. Kiki Febriana., Hardyanti Tampubolon dan Annisa selaku team penelitian skripsi yang selalu membantu dan memberi masukan serta saran untuk penulis.
 12. Decode dan DNA, yaitu teman sekelas dan seangkatan penulis yang telah memberi dukungan serta doa untuk penulis.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kata sempurna. Oleh karena itu, kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan. Penulis berharap skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi penulis maupun bagi pembaca. Akhir kata, penulis mengucapkan banyak terima kasih dan mohon maaf apabila terdapat kekurangan dalam penulisan skripsi ini.

Malang,

Desy Rose

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
LEMBAR PERNYATAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
ISTILAH DAN LAMBANG	xiv

BAB 1 PENDAHULUAN.....1

1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Batasan Masalah	4
1.4 Tujuan Penelitian.....	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	5

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....7

2.1 Diare	7
2.2 <i>Castor Oil</i>	8
2.3 Tanaman Beluntas (<i>Pluchea indica L.</i>)	11
2.4 Mencit (<i>Mus musculus</i>)	13
2.4.1 Duodenum.....	14
2.6 Ekspresi TNF- α	16

BAB 3 KERANGKA KONSEP.....18

3.1 Kerangka Konseptual	18
3.2 Hipotesa Penelitian.....	22

BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN.....23

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	23
4.2 Alat dan Bahan	23
4.3 Tahapan Penelitian	23

4.4 Rancangan Penelitian	24
4.5 Variabel Penelitian	26
4.6 Prosedur Kerja	27
4.6.1 Persiapan Hewan Coba	27
4.6.2 Pembuatan Infusa Dari Daun Beluntas (<i>Pluchea indica L.</i>).....	27
4.6.3 Induksi Diare Dengan <i>Castor Oil</i> atau <i>Oleum Ricini</i>	28
4.6.4 Induksi Terapi Infusa Daun Beluntas dan Obat Pembanding (Norit®).....	29
4.6.5 Isolasi Organ Duodenum	29
4.6.6 Pembuatan Preparat Histopatologi Duodenum	30
4.6.7 Pengamatan Preparat Histopatologi	33
4.6.8 Metode Imunohistokimia (IHK)	33
4.6.9 Analisis Data	35
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN	36
5.1 Pengaruh Pemberian Infusa Daun Beluntas Terhadap Ekspresi TNF- α di Duodenum pada Model Diare Mencit.....	36
5.2 Pengaruh Pemberian Infusa Daun Beluntas pada Mencit Model Diare yang Diinduksi <i>Castor Oil</i>	43
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	52
6.1 Kesimpulan	52
6.2 Saran.....	52
DAFTAR PUSTAKA	53

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Tanaman Beluntas (<i>Pluchea indica</i> L.)	11
2.2 Mencit (<i>Mus musculus</i>)	13
2.3 Gambaran Histopatologi Duodenum Dengan Pewarnaan HE	15
2.4 Gambaran IHK TNF- α Normal di Duodenum Mencit.....	17
3.1 Kerangka Konsep Penelitian	18
5.1 Ekspresi TNF- α Jaringan Duodenum Mencit (<i>Mus musculus</i>) dengan Metode Immunohistokimia.....	36
5.2 Ekspresi TNF- α Jaringan Duodenum Mencit (<i>Mus musculus</i>) dengan Metode Immunohistokimia.....	37
5.3 Gambaran histopatologi mukosa duodenum mencit dengan pewarnaan HE kelompok kontrol negatif.....	45
5.4 Gambaran histopatologi mukosa duodenum mencit dengan pewarnaan HE kelompok kontrol positif.....	46
5.5 Gambaran histopatologi mukosa duodenum mencit dengan pewarnaan HE kelompok terapi obat norit®	47
5.6 Gambaran histopatologi mukosa duodenum mencit dengan pewarnaan HE kelompok P2.....	48
5.7 Gambaran histopatologi mukosa duodenum mencit dengan pewarnaan HE kelompok P1.....	49
5.8 Gambaran histopatologi mukosa duodenum mencit dengan pewarnaan HE kelompok P3.....	49

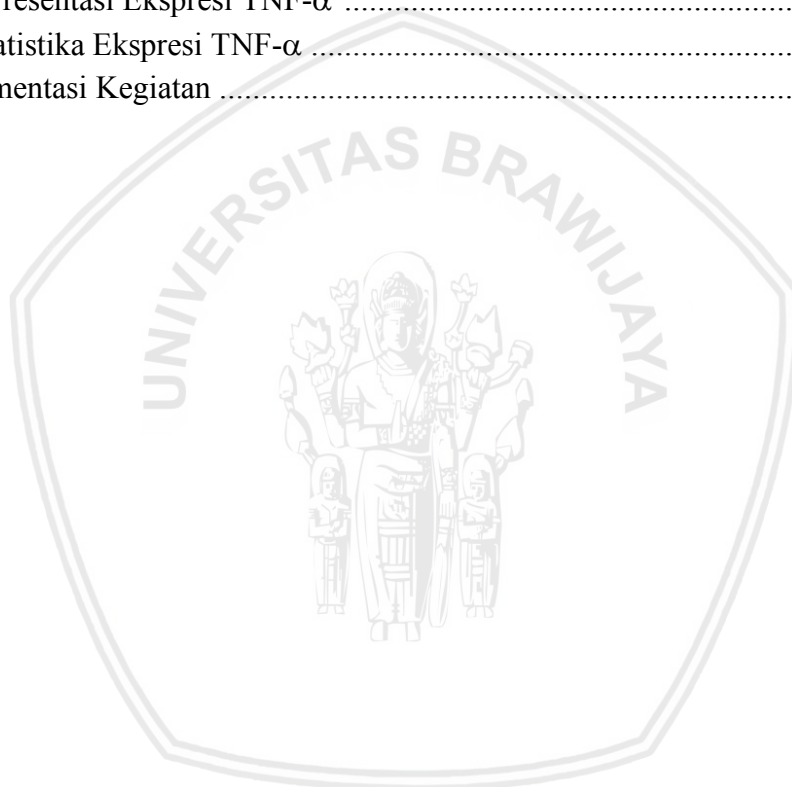
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Rancangan Kelompok Penelitian	25
5.1 Ekspresi TNF- α Duodenum Mencit (<i>Mus musculus</i>) Induksi <i>Castor Oil</i> dan Terapi Infusa Daun Beluntas	38



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Penelitian	58
2. KEP UB No. 935	59
3. Perhitungan Daun Beluntas	60
4. Perhitungan Dosis Norit®.....	61
5. Pembuatan Preparat Histopatologi Duodenum	62
6. Skema Metode Pembuatan IHK	63
7. Data Presentasi Ekspresi TNF- α	64
8. Uji Statistika Ekspresi TNF- α	66
9. Dokumentasi Kegiatan	68



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

Singkatan/Lambang	Keterangan
°C	: derajat celcius
%	: Persen
Ab	: Antibodi
Ach-M3	: <i>Muscarinic Acetylcholine Receptor M3</i>
ANOVA	: <i>Analysis Of Variance</i>
BNJ	: Beda Nyata Jujur
BSA	: <i>Bovine Serum Albumin</i>
COX-2	: <i>Siklooksigenase-2</i>
DAB	: <i>Diamino Benzidin</i>
dkk	: dan kawan-kawan
<i>et all</i>	: <i>et Alii</i>
g	: Gram
H ₂ O ₂	: Hidrogen Peroksida
HE	: Hematoxylin Eosin
IHK	: Imunohistokimia
K+	: Kelompok Kontrol Positif
K-	: Kelompok Kontrol Negatif
IL-1 β	: <i>Interleukin-1Beta</i>
IL-6	: <i>Interleukin-6</i>
L.	: Less

ml	:	Mili liter
Na ⁺ K ⁺ ATPase	:	Sodium Potassium Adenosine Triphosphatase
NaCl	:	Natrium Klorida
NFK β	:	<i>Nuclear Factor Kappa-B</i>
NSH	:	<i>Normal Horse Serum</i>
P1	:	Perlakuan 1
P2	:	Perlakuan 2
PBS	:	<i>Phosphat Buffered Saline</i>
RAL	:	Rancangan Acak Lengkap
SA-HRP	:	<i>Strep-Avidine Horse Radish Peroxidase</i>
TBS	:	<i>Tris Buffered Saline</i>
Th-2	:	<i>T-Helper Cell</i>
TNF- α	:	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
WHO	:	<i>World Health Organization</i>

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diare adalah suatu kondisi abnormal dalam sistem pencernaan yang terlihat pada saat hewan buang air besar (defekasi) dengan feses berbentuk cair atau setengah cair (setengah padat), kandungan air feses lebih banyak dari biasanya lebih dari 200 g atau 200 mL/24jam. Sedangkan apabila dilihat dari kriteria frekuensinya, defekasi encer lebih dari 3 kali/hari. Defekasi dengan konsistensi encer tersebut dapat/tanpa disertai lendir dan darah (Ciesla *et al.*, 2003).

Menurut Wudu *et al*, 2008 prevalensi terjangkit dan kematian sapi yang disebabkan oleh penyakit diare ini masing – masing mencapai 62% dan 22%, dan angka tertinggi yang tercatat mencapai 33%. Sedangkan angka kematian pada babi yang disebabkan oleh penyakit diare mencapai 13,4% - 43,7% (Supar, 2001).

Diare dapat bersifat akut dan kronis. Diare akut adalah diare yang onset gejalanya tiba-tiba dan berlangsung kurang dari 14 hari, sedang diare kronik yaitu diare yang berlangsung lebih dari 14 hari (Lung, 2003). Kondisi duodenum yang mengalami diare tampak adanya kerusakan berupa inflamasi, erosi vili, pengelupasan epitel. Kerusakan tersebut berkaitan dengan tingginya ekspresi TNF- α didalam tubuh yang dapat menyebabkan terbentuknya reaksi peradangan. Sitokin TNF- α yang diproduksi oleh makrofag ini distimulasi dan rusak oleh kondisi diare dapat berkontribusi pada pathogenesis lesi dan efek lainnya (Soeroso, 2007).

Diare dapat disebabkan infeksi maupun non infeksi. Diare biasanya disebabkan oleh infeksi, toksin dan obat - obatan. Diare yang hebat dapat

menyebabkan dehidrasi karena tubuh kekurangan cairan, kekurangan kalium, elektrolit dalam jumlah yang banyak dan dehidrasi berat yang akan menimbulkan kelemahan bahkan jika tidak segera ditangani akan menyebabkan kematian. Diare merupakan penyakit yang masih dipandang remeh oleh masyarakat namun faktanya diare merupakan penyakit yang dapat merugikan masyarakat karna menyebabkan kematian pada hewan (Lung, 2003).

Pada beberapa penelitian diare dapat diciptakan dengan induksi *castor oil*. Bahan aktif *castor oil* yaitu asam risinoleat dapat menyebabkan iritasi dan inflamasi pada dinding usus. Induksi *castor oil* intra oral pada mencit menyebabkan gangguan intestinal, hal ini dikarenakan bahan aktif pada *castor oil* yaitu asam risinoleat menghasilkan perubahan signifikan pada mukosa usus kecil proksimal. Hal tersebut menyebabkan erosi vili di seluruh duodenum dan pengelupasan besar-besaran sel epitel kolumnar dan goblet (Mortensen *et al.*, 2017). Induksi *castor oil* melalui oral akan mengakibatkan asam risinoleat yang terkandung dalam *castor oil* menstimulus kerja duodenum sehingga menyebabkan pergerakan atau motilitas pada duodenum meningkat. Senyawa asam risinoleat merupakan iritan lokal mempercepat kerja dan akan berlangsung terus – menerus hingga senyawa ini diekskresikan melalui kolon (Katzung, 2001). Selain itu bahan aktif *castor oil* yaitu asam risinoleat dapat menyebabkan iritasi dan inflamasi pada dinding usus, dan kemudian sitokin proinflamasi akan memicu migrasi sel radang ke jaringan. Sitokin TNF- α yang diproduksi oleh makrofag ini distimulasi oleh induksi *castor oil* dapat berkontribusi pada pathogenesis lesi dan efek lainnya. Pada kondisi normal TNF- α berfungsi sebagai respon sistem imunitas tubuh dan merupakan mediator utama pada respon

dalam saluran pencernaan terhadap berbagai mikroorganisme penyebab infeksi (Soeroso, 2007).

Beberapa obat yang seringkali digunakan oleh masyarakat seperti: norit®, loperamide, dan lain – lain. Obat tersebut memiliki efek samping seperti: mual, nyeri perut, pusing-pusing, mulut kering, dan kelainan kulit mendadak (eksantema). Namun efek jarang terjadi pada dosis biasa. Sedangkan untuk manfaat nya sama – sama berfungsi sebagai antidiare yang bekerja dengan memulihkan sel-sel yang berada dalam keadaan hipersekresi ke keadaan resorpsi normal kembali (Tjay dan Rahardja, 2002). Masyarakat Indonesia meyakini bahwa diare yang seringkali terjadi tersebut dapat juga ditangani secara alami dengan obat herbal, yaitu dengan memanfaatkan daun dari tanaman beluntas. Tanaman beluntas (*Pluchea indica* L.) adalah salah satu tanaman asli Indonesia yang berpotensi untuk dikembangkan karena mengandung alkaloid (0,316%), flavonoid (4,18%), tannin (2,351%), minyak atsiri (4,47%), asam klorogenik, natrium, kalium, magnesium, dan fosfor yang dapat dimanfaatkan sebagai obat tradisional (Rukmiasih, 2011). Kelebihan daun beluntas (*Pluchea indica* L.) sebagai obat antidiare selain karena menggunakan bahan – bahan alami, pembuatan infusa daun beluntas (*Pluchea indica* L.) sangat sederhana dan mudah dilakukan, dan zat aktif yang terkandung dalam daun beluntas sudah terbukti dapat mengatasi diare . Pada penelitian sebelumnya infusa daun beluntas (*Pluchea indica* L.) dengan konsentrasi 5%, 10%, 20% memiliki aktivitas sebagai antidiare dengan menurunkan frekuensi diare, memperkecil bobot feses, dan memperbaiki konsentrasi feses (Setiawati, 2015).

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh daun beluntas yang memiliki kemampuan sebagai antidiare untuk dijadikan terapi dalam kondisi diare hasil induksi *castor oil* berdasarkan ekspresi TNF- α dan histopatologi duodenum. Tingginya ekspresi TNF- α didalam tubuh dapat menyebabkan terbentuknya reaksi peradangan, selain itu akibat induksi *castor oil* dapat menyebabkan iritasi dan inflamasi pada mukosa duodenum. Oleh karena itu penelitian ini menggunakan parameter ekspresi TNF-alfa dan gambaran histopatologi duodenum pada mencit (*Mus musculus*) sebagai indikator efek daun beluntas sebagai antidiare.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Apakah infusa dari daun beluntas (*Pluchea indica L.*) dapat menurunkan ekspresi TNF- α pada duodenum mencit diare yang diinduksi *castor oil*?
2. Apakah infusa dari daun beluntas (*Pluchea indica L.*) memiliki potensi sebagai obat antidiare berdasarkan histopatologi duodenum mencit diare yang diinduksi *castor oil*?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang maka penelitian ini dibatasi pada :

1. Hewan coba yang digunakan adalah Mencit (*Mus musculus*) jantan, umur 40 – 60 hari dengan berat badan mencit 20 - 25 gram. Penggunaan hewan coba telah lolos sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya (KEP-UB) No. 935.

2. Pembuatan model hewan diare dilakukan dengan induksi *castor oil* dengan volume 0,5 mL yang diberikan satu kali secara peroral dengan menggunakan sonde (Anas dkk, 2016).
3. Infusa daun beluntas (*Pluchea indica L.*) yang digunakan dalam penelitian ini diambil langsung dari Materia Medica Kota Batu, Jawa Timur.
4. Terapi kuratif infusa daun beluntas dengan volume 0,75 mL pada kelompok 5%, 10%, dan 20% secara sonde (Setiawati, 2015).
5. Variabel yang diamati pada penelitian ini adalah Ekspresi TNF- α (*Tumor Necrosis Factor-Alpha*) dengan metode IHK dan perubahan histopatologi duodenum pewarnaan HE.

1.4 Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui pengaruh infusa daun beluntas (*Pluchea indica L.*) dalam menurunkan ekspresi TNF- α pada duodenum mencit diare yang diinduksi *castor oil*.
2. Mengetahui pengaruh infusa daun beluntas (*Pluchea Indica L.*) untuk dimanfaatkan sebagai obat antidiare berdasarkan histopatologi duodenum mencit diare yang diinduksi *castor oil*.

1.5 Manfaat

Manfaat penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mendapatkan informasi bahwa infusa daun beluntas (*Pluchea indica L.*)

dapat dimanfaatkan untuk menangani penyakit diare sehingga tanaman beluntas dapat dengan mudah digunakan masyarakat.

2. Mengurangi pengeluaran biaya pengobatan diare dengan memanfaatkan potensi daun beluntas (*Pluchea Indica L.*) sebagai obat antidiare.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Diare

Menurut *World Health Organization* (WHO), penyakit diare adalah suatu penyakit yang ditandai dengan perubahan bentuk dan konsistensi feces yang lembek sampai mencair dan bertambahnya frekuensi buang air besar yang lebih dari biasa, yaitu tiga kali atau lebih dalam sehari yang mungkin dapat disertai dengan muntah atau feses yang berdarah (Simatupang, 2004).

Terjadinya suatu kasus diare tidak selalu dikarenakan infeksi, namun dapat bermacam macam penyebab seperti faktor malabsorpsi seperti malabsorpsi karbohidrat, disakarida (intoleransi laktosa, maltosa, dan sukrosa) monosakarida (intoleransi glukosa, fruktosa, dan galaktosa), Karena faktor makanan basi, beracun, alergi karena makanan, dan diare karena faktor psikologis, rasa takut dan cemas (Guerrant *et al.*, 2001).

Beberapa mekanisme dasar penyebab terjadinya diare, yaitu gangguan osmotik, gangguan sekresi, dan gangguan motilitas usus (Ciesla *et al.*, 2003).

Gangguan osmotik, yaitu adanya suatu zat atau makanan yang tidak dapat diserap yang menyebabkan meningkatnya tekanan osmotik dalam rongga usus, sehingga terjadi pergeseran air dan elektrolit ke dalam rongga usus, hal ini akan merangsang usus untuk mengeluarkan isi rongga yang berlebih tersebut hingga timbul diare (Guerrant *et al.*, 2001).

Gangguan sekresi, yaitu akibat rangsangan tertentu (misalnya toksin) pada dinding usus akan terjadi peningkatan air dan elektrolit ke dalam rongga usus dan

selanjutnya diare timbul karena terdapat peningkatan isi rongga usus (Ciesla *et al.*, 2003).

Gangguan motilitas usus, keadaan dimana berkurangnya kesempatan usus untuk menyerap makanan karena terjadinya hiperperistaltik sehingga timbul diare, sebaliknya kondisi peristaltik usus yang menurun akan mengakibatkan bakteri timbul berlebihan dan kemudian juga dapat menimbulkan diare (Ciesla *et al.*, 2003).

Selain itu diare juga dapat terjadi, akibat masuknya mikroorganisme hidup ke dalam usus setelah berhasil melewati asam lambung, mikroorganisme tersebut berkembangbiak, kemudian mengeluarkan toksin dan akibat toksin tersebut terjadi hipersekresi yang selanjutnya akan menimbulkan diare (Ciesla *et al.*, 2003).

2.2 *Castor Oil*

Castor oil atau minyak jarak atau yang juga dikenal *ricinus oil*, *oil of Palma Christi*, tangan- tangan oil, and neoloid merupakan trigliserida dari berbagai asam lemak yang terdiri atas: 87% risinoleat, 7% oleat, 3% linoleat, 2% palmitat, 1% stearat, dan sejumlah kecil dihidroksistearat. *Castor oil* merupakan minyak yang didapatkan dari biji pohon jarak *Ricinus communis L.*, yang termasuk famili Euphorbiaceae. Pohon jarak terdapat hampir di semua negara tropis dan sub tropis. Pohon jarak bervariasi dalam ukuran, bentuk dan warna, begitu pula dengan bijinya (James, 1985).

Castor oil (minyak jarak) merupakan suatu senyawa trigliserida yang dapat dibedakan dengan gliserida lainya dari komposisi asam lemaknya, viskositas,

bilangan asetil dan kelarutanya dalam alkohol yang sangat tinggi. Kandungan utama *castor oil* yaitu trigliserida dari asam lemak risinoleat mengalami hidrolisis dalam usus halus oleh enzim lipase pancreas menjadi gliserol dan asam risinoleat. Zat ini bekerja mengurangi absorpsi cairan, elektrolit dan menstimulasi peristaltik usus serta mengakibatkan pengeluaran isi usus dengan cepat, berupa pengeluaran buang air besar berbentuk encer (Adrianto dkk, 2017).

Castor oil bersifat toksik yang ditunjukkan oleh aktivitas pencahar yang ditimbulkannya bila dikonsumsi. Selain itu mengandung asam lemak esensialnya sangat rendah. Hal ini menyebabkan *castor oil* tidak dapat digunakan sebagai minyak makan dan bahan pangan (Ketaren, 2008). Efek toksik dapat memberi gejala dan tanda klinis baik secara *in vivo* pada hewan percobaan maupun pada manusia. Gejala klinis yang paling sering ditemui adalah gejala iritasi saluran pencernaan seperti nyeri perut akut, mual, muntah, diare dengan feses berdarah dan sensasi terbakar pada dada. Selain itu, dapat pula ditemukan depresi sistem saraf pusat dan kardiovaskular. Pada hewan percobaan, ditemukan perubahan patologi pada usus halus, hepar, jantung, ginjal dan paru. Perubahan terjadi bergantung pada kadar yang dikonsumsi. Perubahan patologi yang paling terlihat adalah enteritis, erosi mukosa usus halus, kongesti dan perdarahan pada usus halus, jantung, paru serta perlemakan hepar dan ginjal (Hasanuddin, 2016).

Proses terjadinya diare oleh *castor oil* dijelaskan bahwa *castor oil* di usus akan dipecah oleh *pancreatic juice* (cairan pankreas) ke dalam gliserol dan ricinoleic acid (asam risinoleat) yang berperan sebagai pencahar. Senyawa tersebut dapat menghambat aktivitas enzim $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ sehingga mengurangi absorpsi

cairan pada usus, menstimulasi pembentukan prostaglandin (Meite *et al.*, 2009). Hal ini terjadi akibat iritasi dan inflamasi pada mukosa usus (Maiti *et al.*, 2007).

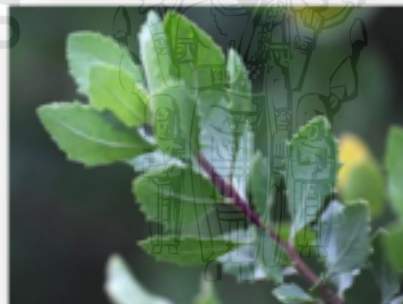
Agen penyebab diare bertindak dengan berbagai mekanisme yaitu sekresi atau absorpsi elektrolit abnormal, perubahan morfologi mukosa dan permeabilitas, dan gangguan aktivitas motorik. Pada hewan percobaan, *castor oil* menginduksi diare karena metabolit aktifnya yaitu asam risinoleat yang menyebabkan stimulasi gerakan peristaltik usus halus dan pengurangan / penghambatan aktivitas $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$. Hal ini berakibat pada perubahan permeabilitas elektrolit dari mukosa usus, sekresi berlebihan dari isi usus, dan perlambatan waktu transportasi di usus. Selanjutnya, asam risinoleat berfungsi sebagai agen diare yang bekerja pada jalur oksida nitrat / prostaglandin. Nitric oxide memunculkan diare dengan meningkatkan sekresi neto dari elektrolit usus, dimana prostaglandin menstimulasi sekresi cairan dan menghambat penyerapan natrium (Sahoo *et al.*, 2016). Senyawa tersebut juga mengaktifkan peristaltik usus halus dan mengubah permeabilitas elektrolit pada mukosa usus (Maiti *et al.*, 2007) dan *castor oil* ini juga dapat mencegah reabsorpsi air yang menyebabkan peningkatan volume cairan usus (Maiti *et al.*, 2007).

Kerusakan yang terjadi pada lambung dan usus dipicu oleh asam risinoleat yang terdapat pada *castor oil*. Asam risinoleat dapat menyebabkan iritasi dan inflamasi pada dinding usus (Maiti *et al.*, 2007). Erosi vili di seluruh duodenum dan pengelupasan besar-besaran sel epitel kolumnar dan goblet (Mortensen *et al.*, 2017).

2.3 Tanaman Beluntas (*Pluchea indica* L.)

Klasifikasi taksonomi tanaman beluntas (*Pluchea indica* L.) menurut Sulistiyaningsih (2009) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Asterales
Famili	: Asteraceae
Genus	: Pluchea
Spesies	: <i>Pluchea indica</i> Less



Gambar 2.1 Daun Tanaman Beluntas (*Pluchea indica* L.) (Dalimartha, 2008)

Beluntas (*Pluchea indica* L.) yang terlihat pada **Gambar 2.1** umumnya tumbuh liar di daerah kering dan memerlukan sinar matahari untuk pertumbuhannya. Masyarakat seringkali menjadikan tanaman ini sebagai tanaman pagar. Pertumbuhan tanaman ini cukup baik dengan tinggi dapat mencapai 2 meter atau bahkan lebih dari itu. Memiliki ciri umum yang khas yaitu: bercabang – cabang, memiliki rusuk halus, serta berbulu halus. Tanaman ini berdaun tunggal, memiliki bentuk bundar telur sungsang, bertangkai pendek, letaknya berseling,

ujung bundar melancip, bergerigi, berwarna hijau terang, dan apabila diremas akan memberikan aroma yang harum (Utami, 2008).

Beluntas (*Pluchea indica* L.) mengandung alkaloid, flavonoid, tanin, minyak atsiri, asam klorogenik, natrium, kalium, magnesium, dan fosfor yang dapat dimanfaatkan sebagai obat tradisional (Widyawati dkk, 2010). Senyawa tanin dapat digunakan sebagai anti diare. Senyawa flavonoid (kuersetin) dalam menghentikan diare dengan menghambat motilitas usus, tetapi tidak mengubah transport cairan di dalam mukosa usus sehingga mengurangi sekresi cairan dan elektrolit. Aktivitas flavonoid yang lain adalah dengan menghambat pelepasan asetilkolin di saluran cerna (Puspitaningrum dkk, 2014). Penghambatan pelepasan asetilkolin akan menyebabkan berkurangnya aktivasi reseptor asetilkolin nikotik yang memperantarai terjadinya kontraksi otot polos dan teraktivasinya reseptor asetilkolin muskarinik (khususnya Ach-M3) yang mengatur motilitas gastrointestinal dan kontraksi otot polos (Ikawati, 2008). Senyawa alkaloid sebagai anti peristaltik yang dapat mengurangi gerakan peristaltik dari usus (Sulaksana dan Jayusman, 2004). Senyawa aktif yaitu senyawa tanin dalam daun beluntas memiliki aktivitas anti diare. Senyawa ini diduga dapat menurunkan pergerakan usus, sehingga usus halus memiliki waktu yang lebih lama menyerap lebih banyak air. Hal ini dapat menurunkan diare, karena semakin sedikit frekuensi defekasi, semakin panjang durasi absorpsi. Tanin merusak protein menjadi protein tanat. Protein ini membuat mukosa usus menjadi lebih resisten terhadap rangsangan senyawa kimia dan zat toksik yang mengakibatkan diare. Hal ini mengurangi ekskresi air ke lumen usus. Akibatnya reabsorpsi NaCl dan air menjadi lebih banyak

dan frekuensi durasi diare dapat berkurang. Senyawa tanin ini dapat berfungsi sebagai adstringensia yang memperkecil permukaan usus (Haryanto, 2010). Senyawa tanin bersifat *adstringent* yang diperlukan untuk mengatasi disentri dan diare, sifat *adstringent* ini memperkecil permukaan usus sehingga mengurangi pengeluaran cairan diare dan disentri serta menghambat sekresi elektrolit (Tjay dan Rahardja, 2007).

2.4 Mencit (*Mus musculus*)



Gambar 2.2 Mencit (*Mus musculus*) (Kurniawan dkk, 2018)

Mencit (*Mus musculus*) merupakan hewan kelompok mamalia yang termasuk dalam ordo rodentia. Hewan ini memiliki kebiasaan hidup berkelompok. Hewan nocturnal ini seperti pada **Gambar 2.3** memiliki bentuk tubuh yang ramping dan panjang, serta ekor runcing yang diselubungi rambut dan sisik. Mencit (*Mus musculus*) memiliki berat lahir pada mencit berkisar 0.5-1.0 g. Mencit dapat bertahan hidup sekitar 1-3 tahun, bahkan dapat mencapai 3 tahun. Dewasa kelamin mencit pada umur 35 hari. Saat mencapai dewasa, berat tubuh mencit jantan dapat mencapai 20-40 g, sedangkan pada betina hanya 18-35 g. Hewan ini memiliki indera penciuman yang sangat peka, berfungsi untuk mendeteksi pakan, predator, dan signal (feromon). Mencit tidak mempunyai penglihatan yang baik, hal ini

dikarenakan sedikit nya sel conus sehingga tidak dapat membedakan warna (Kurniawan dkk, 2018).

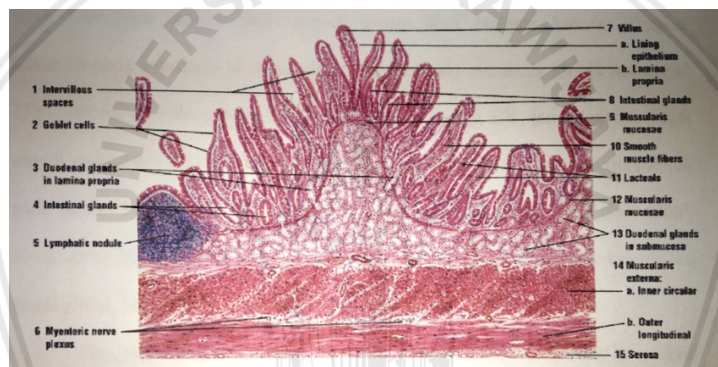
Menurut Priyambodo (2003), klasifikasi hewan mencit (*Mus musculus*) adalah sebagai berikut:

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

2.4.1 Duodenum

Duodenum merupakan bagian dari usus halus (intestinum tenue) yang memiliki mempunyai bentuk seperti huruf C yang melengkung mengelilingi kaput pankreas dan panjang sekitar 25–30 cm terletak retroperitoneal (kecuali 3 cm bagian yang pertama). Duodenum terbagi menjadi empat segmen, yaitu pars superior, pars descending, pars horizontal, dan pars ascending. Pars superior duodenum yaitu sekitar 2–5 cm bagian pertama tertutupi oleh peritoneum. Pada bagian bawah pars superior duodenum menjadi tempat melekatnya omentum minus sedangkan pada bagian atasnya terdapat omentum majus. Bagian pertama pars superior duodenum terletak pada intraperitoneal, hal ini dikarenakan adanya ligamentum

hipoduodenale. Sedangkan pada bagian yang lain terletak retroperitoneal sekunder (Widiastuti dan Made, 2013). Duodenum berfungsi dalam proses pencernaan dan absorpsi nutrisi. Dengan bantuan enzim – enzim dari pankreas, proses pencernaan karbohidrat, lemak, dan protein dirubah menjadi zat yang lebih sederhana oleh duodenum sehingga dapat diserap oleh sirkulasi tubuh guna menunjang kehidupan organisme. Sedangkan pada proses penyerapan nutrisi, duodenum dapat menyerap gula, asam amino, lemak, vitamin larut lemak (A, D, E, K), zat besi, dan kalsium (Sridianti, 2014).



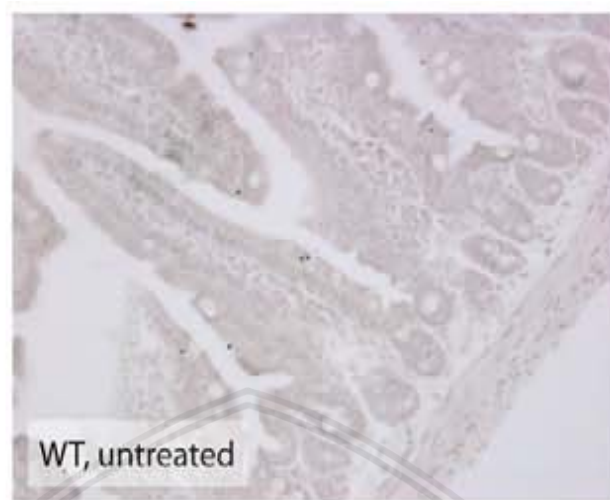
Gambar 2.3 Gambaran Histologi Duodenum Mencit dengan Pewarnaan HE Perbesaran 10x Keterangan (1) tunika mukosa, (2) tunika submukosa, (3) tunika muskularis, (4) tunika serosa, (5) vili, (6) kript pada mukosa, (7) kelenjar Brunner pada submukosa (Gunin, 2000).

Melalui pewarnaan HE pada **Gambar 2.4** terlihat beberapa lapisan yang menyusun duodenum usus halus, meliputi lapisan mukosa, muskularis mukosa, submukosa, muskularis sirkular, muskularis longitudinal dan serosa. Lapisan duodenum paling dalam adalah tunika mukosa, pada lapisan ini terdapat sel epitel kolumnar simplex yang melapisi vili – vili usus dan diantara sel epitelia duodenum terdapat sel goblet. Pada lapisan kedua yaitu tunika submukosa terdapat kelenjar

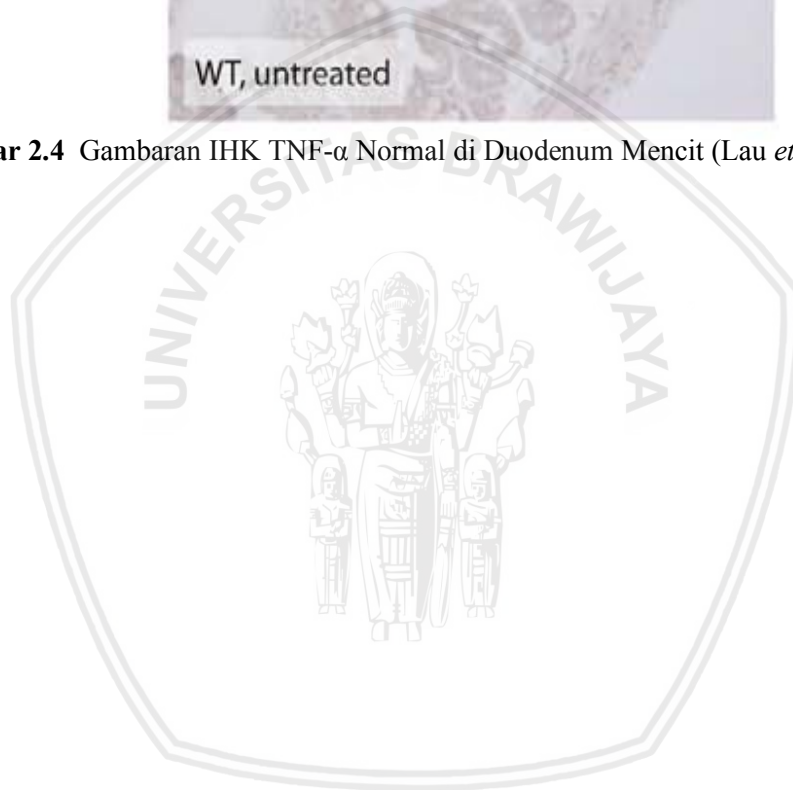
brunner yang berfungsi sebagai proteksi mukosa duodenum terhadap asam lambung dan sebagai penetral pH usus (Elziyad *et al.*, 2013).

2.5 Ekspresi TNF- α

Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) merupakan sitokin utama pada respon inflamasi akut terhadap bakteri Gram negatif dan mikroba lainnya. TNF- α biasanya tidak terdeteksi pada individu sehat tapi sering ditemukan dalam kondisi inflamasi dan infeksi dalam serum. Produksi TNF dalam jumlah yang besar yang menimbulkan reaksi sistemik dapat dipicu oleh kondisi infeksi yang berat (Baratawidjaya dan Rengganis, 2009). Sitokin TNF- α diproduksi oleh makrofag dan diaktifkan oleh sel T limfosit, antigen, sel NK, dan sel mast. Sitokin TNF- α berperan dalam mengatur aktivitas makrofag dan respon imun dalam jaringan dengan merangsang factor pertumbuhan dan sitokin lain, serta berperan dalam respon imun terhadap bakteri, virus, jamur, invasi parasit (Yani dkk, 2011). Sitokin TNF- α bekerja terhadap leukosit dan endotel, menginduksi inflamasi akut pada saat terekspresi rendah karena TNF- α merupakan pirogen yang kuat. Sitokin TNF- α berperan pada inflamasi sistemik pada terekspresi sedang. Sitokin TNF- α menimbulkan kelainan patologis syok septik pada ekspresi yang tinggi, sebab TNF- α bersifat sitotoksik. Sistem imun berpengaruh terhadap tinggi dan rendahnya ekspresi TNF- α , kemampuan imunitas tubuh yang lemah untuk melawan infeksi menyebabkan TNF- α diproduksi secara berlebihan dan ekspresi TNF- α meningkat (Fatmah, 2006). Gambaran IHK TNF- α normal di duodenum mencit dapat dilihat pada **Gambar 2.4**.

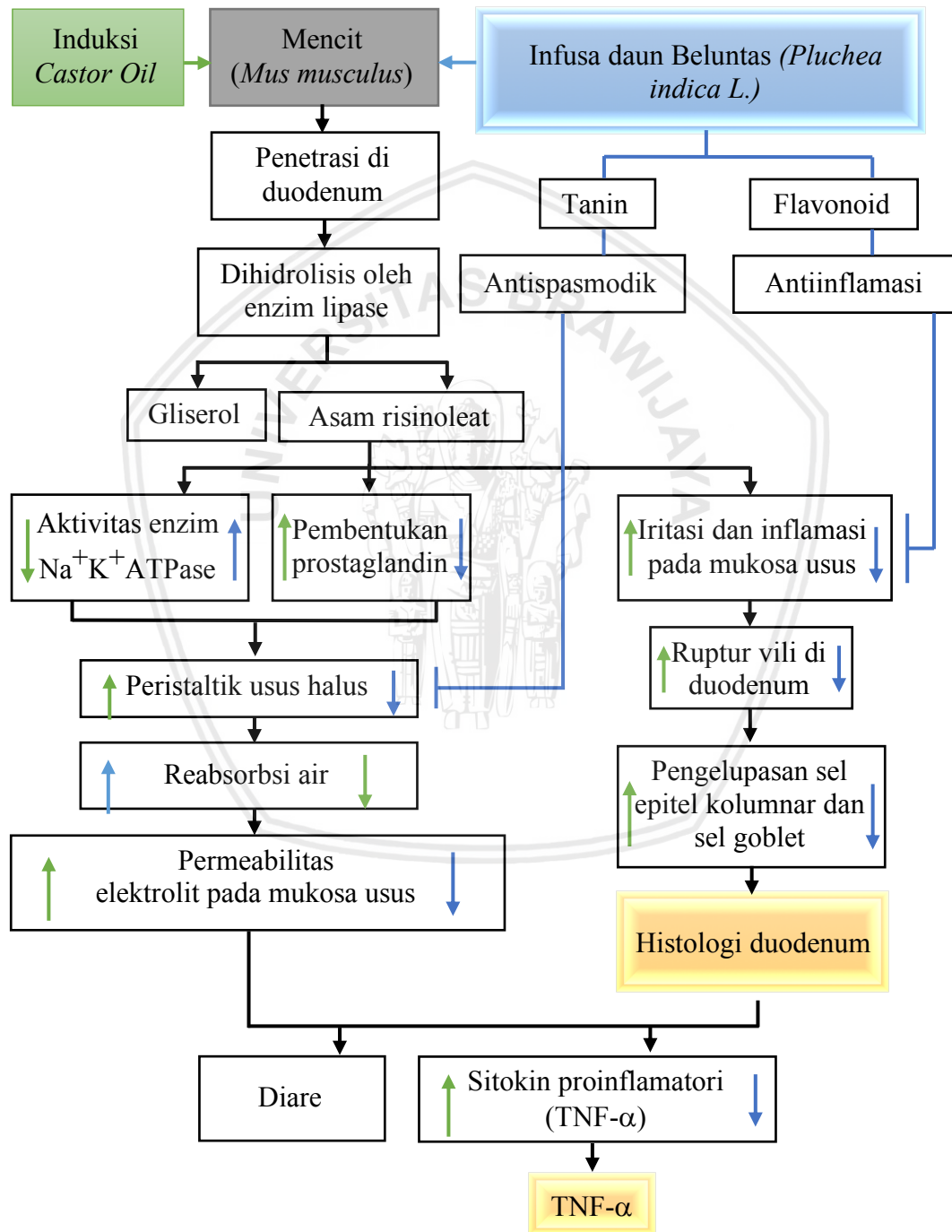


Gambar 2.4 Gambaran IHK TNF- α Normal di Duodenum Mencit (Lau *et al.*, 2012)



BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan :

 : Patomekanisme	 : Hewan coba
 : Terapi	 : Induksi
 : Paparan	 : Variabel bebas
 : Variabel terikat	 : Efek asam risinoleat
 : Menurun	 : Pengaruh induksi infusa daun beluntas

Induksi *castor oil* pada mencit dilakukan dengan cara disonde, yang kemudian ketika mencapai usus halus akan dipecah oleh *pancreatic juice* (cairan pankreas) menjadi gliserol dan ricinoleic acid (asam risinoleat) yang berperan sebagai pencakar. Senyawa tersebut dapat menghambat aktivitas enzim $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ sehingga mengurangi absorpsi cairan pada usus, menstimulasi pembentukan prostaglandin.

Prostaglandin juga terlibat dalam patofisiologi terjadinya diare. Prostaglandin merupakan molekul pembawa pesan pada proses inflamasi dan juga diketahui bahwa sintesis prostaglandin berperan sebagai mediator utama inflamasi. Iritasi dan inflamasi pada dinding mukosa usus yang muncul karena induksi *castor oil* dapat menstimulasi pelepasan autacoids dan prostaglandin. Keadaan tersebut dapat mengakibatkan membrane permeabilitas elektrolit pada mukosa usus berubah sehingga terjadi hipersekresi cairan dan elektrolit, peningkatan aktivitas peristaltic usus, motilitas usus meningkat dapat menyebabkan berkurangnya waktu transit makanan yang dicerna (chymus), penumpukan cairan dalam usus akibat hipersekresi disertai berkurangnya resorpsi cairan dan elektrolit dapat menyebabkan diare.

Kerusakan yang terjadi pada usus dipicu oleh asam risinoleat yang terdapat pada *castor oil*. Asam risinoleat dapat menyebabkan iritasi dan inflamasi pada dinding usus. Induksi *castor oil* secara oral pada mencit menyebabkan gangguan intestinal, hal ini dikarenakan bahan aktif pada *castor oil* yaitu asam risinoleat menghasilkan perubahan signifikan pada mukosa usus kecil proksimal. Villi duodenum secara nyata diperpendek dengan pengelupasan secara masif sel kolumnar dan sel goblet. Erosi vili di seluruh duodenum dan pengelupasan besar-besaran sel epitel kolumnar dan goblet.

Kerusakan jaringan duodenum menyebabkan terjadinya reaksi inflamasi dan kerusakan sel. Reaksi inflamasi akan mengaktifkan makrofag yang nantinya dapat memproduksi sitokin *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α). Sitokin proinflamasi akan memicu migrasi sel radang ke jaringan. Sitokin TNF- α yang diproduksi oleh makrofag ini seperti *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α). Sitokin proinflamasi akan memicu migrasi sel radang ke jaringan. Sitokin TNF- α yang diproduksi oleh makrofag ini distimulasi oleh induksi *castor oil* dapat berkontribusi pada pathogenesis lesi dan efek lainnya. Pada kondisi normal TNF- α berfungsi sebagai respon sistem imunitas tubuh dan merupakan mediator utama pada respon dalam saluran pencernaan terhadap berbagai mikroorganisme penyebab infeksi (Soeroso, 2007). Tingginya ekspresi TNF- α didalam tubuh dapat menyebabkan terbentuknya reaksi peradangan. Sitokin TNF- α dapat digunakan sebagai indikator stres oksidatif, apoptosis, dan nekrosis.

Kemampuan dari infusa daun beluntas sebagai terapi dapat menghambat terjadinya diare akibat paparan *castor oil*. Beluntas (*Pluchea indica L.*) mengandung alkaloid, flavonoid, tanin, minyak atsiri, asam klorogenik, natrium, kalium, magnesium, dan fosfor. Senyawa flavonoid (kuersetin) dalam menghentikan diare dengan menghambat motilitas usus, tetapi tidak mengubah transport cairan di dalam mukosa usus sehingga mengurangi sekresi cairan dan elektrolit. Aktivitas flavonoid yang lain adalah dengan menghambat pelepasan asetilkolin di saluran cerna. Penghambatan pelepasan asetilkolin akan menyebabkan berkurangnya aktivitas reseptor asetilkolin nikotik yang memperantarai terjadinya kontraksi otot polos dan teraktivasinya reseptor asetilkolin muskarinik (khususnya Ach-M3) yang mengatur motilitas gastrointestinal dan kontraksi otot polos.

Senyawa aktif yaitu senyawa tanin dalam daun beluntas memiliki aktivitas anti diare. Senyawa ini diduga dapat menurunkan pergerakan usus, sehingga usus halus memiliki waktu yang lebih lama menyerap lebih banyak air. Hal ini dapat menurunkan durasi diare karena semakin sedikit frekuensi diare, semakin pendek durasi diarenya. Tanin merusak protein menjadi protein tanat. Protein ini membuat mukosa usus menjadi lebih resisten terhadap rangsangan senyawa kimia yang mengakibatkan diare dan toksin dari *castor oil*. Hal ini mengurangi ekskresi air ke lumen usus. Akibatnya reabsorpsi NaCl dan air menjadi lebih banyak dan frekuensi durasi diare dapat berkurang. Senyawa tanin juga mempunyai sifat *adstringent* yang diperlukan untuk mengatasi disentri dan diare, sifat *adstringent* ini mengerutkan permukaan usus sehingga mengurangi pengeluaran cairan diare dan disentri serta

menghambat sekresi elektrolit. Senyawa flavonoid bekerja dengan cara sebagai agen antiinflamasi dengan menekan ekspresi sitokin proinflamasi. Flavonoid dapat menghambat beberapa sitokin proinflamasi diantaranya TNF- α , IL-1 β dan IL-6. Flavonoid dapat menghambat aktivasi dari NFK β yang akan melemahkan respon autoimun dan respon inflamasi, sehingga penurunan ekspresi TNF- α akan memacu perubahan pada mukosa duodenum untuk kembali normal. Perubahan pada mukosa duodenum tersebut terjadi karena aktivitas flavonoid yang berperan mengurangi kerusakan membran dengan menghambat pelepasan mediator – mediator inflamasi. Aktivitas tersebut kemudian mampu memperbaiki kontinuitas sel epitel, mengurangi infiltrasi sel radang dan memulihkan permeabilitas permukaan mukosa usus ke arah normal.

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan kerangka konsep yang telah ada, maka hipotesis yang dapat diajukan adalah sebagai berikut :

Infusa daun beluntas (*Pluchea indica* L.) dapat memperbaiki kerusakan gambaran histopatologi duodenum dan dapat menghentikan peningkatan ekspresi TNF- α duodenum

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada tanggal 5 Juni 2018 sampai bulan Mei 2019. Kegiatan dilakukan di Institut Biosains Universitas Brawijaya dan Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.2 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut, hewan coba: mencit (*mus musculus*); perlakuan: daun beluntas, aquadest, norit®, formalin, pakan mencit, air minum, spuit sonde, alat bedah (nekropsi) / *dissecting set*, wadah botol film, botol obat, panicle tim, timbangan, kertas saring, thermometer raksa, gelas ukur, spuit 1 mL, kawat, underpad, kendang, tempat minum; Imunohistokimia: PBS, H₂O₂, BSA, Ab TNF- α , incubator, *object glass*, refrigerator, SA-HRP, Kromogen DAB, mayer haematoxylin, entellan, mikroskop cahaya ; HE: pewarnaan HE (*Hematoxylin Eosin*), paraffin, xylol, PBS, paraffin cair, *object glass*, *cover glass*, rak kaca objek, *waterbath*, mikroskop.

4.3 Tahapan Penelitian

1. Rancangan penelitian dan persiapan hewan coba
2. Perlakuan induksi *castor oil* 0,5 mL secara sonde
3. Perlakuan infusa daun beluntas 0,75 mL dengan cara disonde.
4. Perlakuan pemberian norit® dengan volume 0,8 mL

5. Ekspresi TNF- α
6. Pengambilan dan pembuatan preparat histologi duodenum
7. Pengamatan preparat histopatologi duodenum dengan pewarnaan HE (*Hematoxylin Eosin*) dan IHK (Imunohistokimia)
8. Pengamatan hasil
9. Analisis hasil

4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Berdasarkan desain kelompok penelitian yang menggunakan 6 kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol negatif (-), kontrol positif (+), kelompok terapi norit®, kelompok terapi infusa daun beluntas 5%, kelompok terapi infusa daun beluntas 10%, dan kelompok terapi infusa daun beluntas 20%. Maka jumlah ulangan untuk masing – masing kelompok perlakuan adalah sebagai berikut, menurut Kusriningrum (2008) :

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

$$6 (n-1) \geq 15$$

$$6n - 6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3,5$$

$$n = 4$$

Keterangan :

P : jumlah kelompok hewan coba

n : jumlah ulangan yang diperlukan

(Kusriningrum, 2008)

Berdasarkan perhitungan di atas, maka diperoleh 6 perlakuan kelompok dengan 4 kali ulangan dalam setiap kelompok. Total tikus yang dibutuhkan adalah 48 ekor.

Tabel 4.1. Rancangan Kelompok Penelitian

Variabel yang Diamati	Ulangan			
	1	2	3	4
Ekspresi TNF-α dan Gambaran Histopatologi Duodenum				
Kelompok Kontrol Negatif				
Kelompok Kontrol Positif (Induksi <i>castor oil</i>)				
Kelompok Norit® (Induksi <i>castor oil</i> dan Terapi obat norit®)				
Kelompok Perlakuan 1 (Induksi <i>castor oil</i> dan Terapi Infusa Daun Beluntas 5%)				
Kelompok Perlakuan 2 (Induksi <i>castor oil</i> dan Terapi Infusa Daun Beluntas 10%)				
Kelompok Perlakuan 3 (Induksi <i>castor oil</i> dan Terapi Infusa Daun Beluntas 20%)				

Hewan coba dalam penelitian ini dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan yaitu :

1. Kelompok 1 (kontrol negatif) adalah mencit sehat yang tidak diinduksi *castor oil* dan tidak diberikan infusa daun beluntas dan tanpa obat Norit®.
2. Kelompok 2 (kontrol positif) adalah mencit sehat yang diinduksi *castor oil* 0,5 mL, tanpa pemberian infusa daun beluntas.

3. Kelompok 3 (norit®) adalah mencit sehat yang sudah diinduksi *castor oil* 0,5 mL kemudian diterapi dengan menggunakan Norit® dengan volume 0,75 mL.
4. Kelompok 4 (infusa daun beluntas 5%) adalah mencit sehat yang sudah diinduksi *castor oil* 0,5 mL kemudian diterapi dengan menggunakan infusa daun beluntas 5%.
5. Kelompok 5 (infusa daun beluntas 10%) adalah mencit sehat yang sudah diinduksi *castor oil* 0,5 mL kemudian diterapi dengan menggunakan infusa daun beluntas 10%.
6. Kelompok 6 (infusa daun beluntas 20%) adalah mencit sehat yang sudah diinduksi *castor oil* 0,5 mL kemudian diterapi dengan menggunakan infusa daun beluntas 20%.

4.5 Variabel Penelitian

Adapun variable yang diamati dalam penelitian ini adalah :

- Variabel bebas : Induksi *castor oil*, terapi infusa daun beluntas, dan norit®
- Variabel terikat : Ekspresi TNF- α (*Tumor Necrosis Factor-Alpha*) dan perubahan histopatologi duodenum
- Variabel kontrol : Mencit (*Mus musculus*), strain Balb-C, jantan, usia 40 – 60 hari, berat badan 20 – 25 gram, ukuran kandang 17,5 cm x 23,75 cm x 17,5 cm, suhu optimum ruangan kandang 22 – 24°C, kelembaban udara ruangan 50 – 60%, pakan pelet, dan minuman air.

4.6 Prosedur Kerja

4.6.1 Persiapan Hewan Coba

Penyiapan hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*mus musculus*) jantan sebanyak 4 ekor dengan berat badan 20-25g dengan usia 40-60 hari di kandang dengan ukuran kandang 17,5 cm x 23,75 cm x 17,5 cm, suhu optimum ruangan kandang 22 – 24°C, kelembaban udara ruangan 50 – 60%, pakan pelet, dan minuman air. Kemudian tikus dipuasakan 1 x 18 jam namun tetap diberikan minum sebelum dilakukan percobaan (Umam dkk, 2015).

4.6.2 Pembuatan infusa dari Daun Beluntas (*Pluchea Indica L*)

Pembuatan infusa daun beluntas 5%, dimulai dengan menyiapkan simplisia daun beluntas 10gram dan 200cc aquadest. Direbus kedua bahan tersebut dengan suhu 90°C selama 15 menit. Kemudian disaring dengan kertas saring dan ditampung sebanyak 200cc, apabila tidak mencapai 200cc (volume berkurang karena proses penguapan) ditambahkan aquadest sebanyak volume yang terbuang karena proses penguapan saat direbus. Disimpan pada wadah botol yang gelap agar terhindar dari sinar matahari, infusa ini hanya bisa digunakan dengan masa kadaluarsa 1x24jam.

Pembuatan infusa daun beluntas 10%, dimulai dengan menyiapkan simplisia daun beluntas 10gram dan 100cc aquadest. Direbus kedua bahan tersebut dengan suhu 90°C selama 15 menit. Kemudian disaring dengan kertas saring dan ditampung sebanyak 100cc, apabila tidak mencapai 100cc (volume berkurang karena

proses penguapan) ditambahkan aquadest sebanyak volume yang terbuang karena proses penguapan saat direbus. Disimpan pada wadah botol yang gelap agar terhindar dari sinar matahari, infusa ini hanya bisa digunakan dengan masa kadaluarsa 1x24jam.

Pembuatan infusa daun beluntas 20%, dimulai dengan menyiapkan simplisia daun beluntas 10gram dan 50cc aquadest. Direbus kedua bahan tersebut dengan suhu 90°C selama 15 menit. Kemudian disaring dengan kertas saring dan ditampung sebanyak 50cc, apabila tidak mencapai 50cc (volume berkurang karena proses penguapan) ditambahkan aquadest sebanyak volume yang terbuang karena proses penguapan saat direbus. Disimpan pada wadah botol yang gelap agar terhindar dari sinar matahari, infusa ini hanya bisa digunakan dengan masa kadaluarsa 1x24jam.

4.6.3 Induksi Diare dengan *Castor Oil*

Hewan coba mencit (*Mus musculus*) dikelompokkan menjadi 6 kelompok perlakuan dengan masing-masing kelompok berjumlah 4 ekor. *Castor oil* diinduksikan secara per oral menggunakan sonde sebanyak 0,5 mL/20 gram bobot badan mencit diberikan pada setiap ekor mencit (Anas dkk, 2016). Selanjutnya diamati gejala klinis selama 4 jam kemudian dilanjutkan perlakuan selanjutnya. Hasil induksi menyebabkan iritasi dan inflamasi pada dinding usus yang kemudian menimbulkan efek diare dengan gejala konsistensi feses menjadi lebih cair, frekuensi defekasi yang lebih meningkat, dan lain – lain (Maiti *et al.*, 2007).

4.6.4 Induksi Terapi Infusa Daun Beluntas dan Obat Pembanding (Norit®)

Setelah 4 jam diinduksi *castor oil*, kemudian diberi terapi infusa daun beluntas pada setiap kelompok dan diberi terapi norit® sebagai obat pembanding. Pada kelompok norit® diberikan norit® yang dilarutkan menggunakan aquades dengan volume pemberian 0,8 mL. Perhitungan dosis norit® dan aquadest yang diberikan per oral dapat dilihat pada **Lampiran 4**.

Dan terapi infusa daun beluntas diberikan pada 3 kelompok (5%, 10%, 20%), diberikan 1 kali terapi sebanyak 0,75 mL dengan cara di sonde (Setiawati, 2015). Kemudian diamati perubahan nya selama 6 jam. Lalu dilanjutkan perlakuan nekropsi untuk mengoleksi organ.

4.6.5 Isolasi Organ Duodenum

Hewan coba yang sudah diberi perlakuan kemudian di euthanasia dan dinekropsi, hal ini bertujuan untuk mengoleksi organ agar dapat melihat efek dari setiap perlakuan yang dihasilkan. Metode euthanasia yang digunakan yaitu teknik dislokasi os. Occipitale. Setelah itu, hewan coba di dinekropsi dengan di lentangkan posisi rebah dorsal pada papan lilin. Kemudian dilakukan insisi pada area abdomen linea alba (cauda midline) sehingga cavum abdomen terbuka, setelah itu dikoleksi organ duodenum menggunakan pinset dan dikoleksi dicuci dengan NaCl fisiologis kemudian dimasukkan ke dalam pot organ yang berisi formalin 10%.

4.6.6 Pembuatan Preparat Histopatologi Duodenum

Organ duodenum yang telah difiksasi dalam larutan formalin 10%, kemudian dibuat preparat histopatologi. Proses pembuatan preparat histopatologi terdiri dari fiksasi, dehidrasi, penjernihan (*clearing*), *embedding*, *blocking*, pemotongan (*mounting*), dan penempelan di *object glass* serta pewarnaan.

1. Fiksasi

Fiksasi dilakukan untuk mencegah kerusakan pada jaringan, menghentikan proses metabolisme, mengawetkan komponen sitologis dan histologis, serta mengeraskan materi yang lunak agar jaringan dapat diwarnai. Fiksasi dilakukan dengan cara dimasukkan kedalam larutan formalin 40%.

2. Dehidrasi

Dehidrasi merupakan langkah kedua dalam pemrosesan jaringan. Proses ini bertujuan untuk mengeluarkan seluruh cairan yang terdapat dalam jaringan yang telah di fiksasi, sehingga jaringan nanti dapat diisi dengan parafin atau zat lain yang digunakan untuk membuat blok preparat. Dehidrasi dilakukan menggunakan larutan etanol secara bertingkat dari konsentrasi 70% selama 24 jam, etanol 80% selama 2 jam serta etanol 90%, dan absolut selama 20 menit. Proses dehidrasi berjalan dalam kondisi teragitasi dan pada suhu 4°C.

3. Penjernihan (*clearing*)

Untuk melakukan penjernihan, jaringan dipindahkan dari alcohol absolut ke larutan penjernihan, yaitu xylol I selama 20 menit dan xylol II selama 30 menit.

4. *Embedding*

Embedding adalah proses untuk mengeluarkan cairan penjernih (*clearing agent*) dari jaringan dan diganti dengan paraffin. Pada tahap ini jaringan harus benar-benar bebas dari cairan penjernih karena sisa cairan penjernih dapat mengkristal dan ketika dipotong dengan mikrotom akan menyebabkan jaringan menjadi mudah robek. *Embedding* dilakukan dalam parafin cair yang ditempatkan dalam inkubator bersuhu 58-60°C. Jaringan dimasukkan dalam parafin cair sampai memadat.

5. *Blocking*

Pengecoran (*Blocking*) merupakan suatu proses pembuatan blok preparat agar dapat dipotong dengan mikrotom. Proses ini menggunakan cetakan dari plastik (*histoplate*) dan piringan logam. *Histoplate* diletakkan di atas piringan logam dan sedikit cairan parafin dituang ke dalam cetakan tersebut. Jaringan dimasukkan dengan cepat menggunakan pinset yang telah dipanaskan dan posisi jaringan diatur di dalam cetakan. Parafin cair kemudian dituang kembali hingga menutupi seluruh cetakan tersebut.

6. Pemotongan (*Mounting*) dan Penempelan pada *Object Glass*

Setelah membeku, cetakan diletakkan dalam penjepit mikrotom dan dipotong dengan ketebalan $\pm 5 \mu\text{m}$. Jaringan dipotong untuk merapikan bagian yang tidak terpotong secara sempurna pada awal pemotongan. Untuk menempelkan jaringan pada *object glass*, *object glass* yang telah di-coated dengan cara dimasukkan kedalam *waterbath* dan digerakkan ke arah object yang juga dimasukkan pada *waterbath*. Sediaan disimpan dalam inkubator dengan suhu $38-40^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam lalu siap diwarnai dengan HE.

7. Pewarnaan HE

Pewarnaan HE dilakukan dengan menggunakan zat pewarna hematoksin untuk memberi warna pada inti sel dan memberikan warna biru (basofilik), serta eosin yang merupakan *counterstaining* hematoksin, digunakan untuk memulas sitoplasma sel dan jaringan penyambung, sehingga memberikan warna merah muda. Langkah pewarnaan HE meliputi:

- a. Proses deparafinasi dengan menggunakan xylol I dan II selama 5 menit.
Proses rehidrasi dengan menggunakan alkohol 95%, 90%, 80%, dan 70% secara berurutan masing-masing selama 5 menit.
- b. Pencucian sediaan dengan air mengalir selama 15 menit dan dilanjutkan dengan aquades selama 5 menit.
- c. Pewarnaan dengan pewarna *hematoxylin* selama 10 menit kemudian dicuci dengan air selama 30 menit dan akuades selama 5 menit.

- d. Pewarnaan dengan pewarna eosin selama 5 menit dan dicuci kembali dengan air mengalir selama 10 menit.
- e. Dehidrasi dengan etanol 80%, 90%, dan 95% selama 5 menit.
- f. Pengeringan sediaan dan pelapisan (*mounting*) dengan menggunakan *entellan*.
- g. Pengamatan histopatologi duodenum.

4.6.7 Pengamatan Preparat Histopatologi

Pengamatan preparat histopatologi duodenum menggunakan mikroskop cahaya (Olympus BX-51) dengan perbesaran 400x. Hasil berupa data kuantitatif yang diperoleh dari perhitungan rata – rata persentase 5 lapang pandang yang diamati dari mikroskop cahaya yang dianalisa menggunakan immunoratio software.

4.6.8 Metode Imunohistokimia (IHK)

Prosedur pewarnaan Imunohistokimia dimulai dengan melakukan deparafinisasi slide memakai 3 larutan Xylol 1, 2, dan 3 masing - masing selama 5 menit lalu dilanjutkan dengan proses rehidrasi untuk menghilangkan sisa xylol dengan menggunakan larutan alkohol absolut, alkohol 96%, alkohol 80%, dan alkohol 70% masing - masing selama 4 menit, setelah itu dicuci dibawah air mengalir selama 5 menit. Kemudian masukkan slide ke dalam mesin pengering, kemudian diatur set up Preheat 65°C, running time 98°C selama 15 menit, tunggu sampai ± 1 jam, setelah slide kering, dengan menggunakan spidol pap pen, preparat yang ada di slide dilingkari agar ketika dilakukan peneteskan antibodi atau cairan lain tidak keluar melewati batas lingkaran pap pen yang sudah digunakan diawal.

Selama 5 menit slide dimasukkan kedalam larutan Tris Buffered Saline (TBS) pH 7,4, dilanjutkan dengan proses blocking dengan peroxidase, selama 5-10 menit, kemudian kembali dicuci dalam larutan Tris Buffered Saline (TBS) pH 7,4 selama 5 menit blocking kembali dengan Normal horse serum (NSH) 3%, selama 15 menit, cuci dalam larutan Tris Buffered Saline (TBS) pH 7,4 selama 5 menit. Setelah itu barulah diinkubasi dengan antibodi TNF- α NBP1-67821) pAb, dengan besar unit 0.05 mg, masing-masing selama 1 jam. Cuci kembali kedalam larutan Tris Buffered Saline (TBS) pH 7,4 atau Tween 20 selama 5 menit, kemudian simpan kedalam rak slide selama 30 menit. Setelah itu slide kembali dicuci dalam larutan Tris Buffered Saline (TBS) pH 7,4 atau Tween 20 selama 5-10 menit.

Kemudian slide ditetesi dengan kromogen Diamino Benzidin (DAB) + Substrat Chromogen solution dengan pengenceran 20 μ L DAB:1000 μ L substrat (dapat bertahan 5 hari di suhu 2-8°C setelah di-mix) selama 5 menit, lalu di cuci kembali dengan air mengalir dan dilakukan pewarnaan dengan Hematoxylin masing-masing selama 10 menit. Sediaan tersebut kembali dicuci dibawah air mengalir selama 5 menit, celupkan slide preparat kedalam lithium carbonat (5% dalam aqua) selama 2 menit, cuci dengan air mengalir dan kembali dilakukan proses pengeringan cairan sebelumnya dengan proses dehidrasi menggunakan alkohol 80%, alkohol 96%, alkohol Absolut masing-masing selama 5 menit, kemudian clearing dengan larutan Xylol 1, Xylol 2, Xylol 3 masing-masing selama 5 menit, kemudian mounting dan tutup slide preparat dengan *cover glass*, dan preparat siap dilihat atau dinilai. Pengamatan TNF- α dalam jaringan akan tampak dengan warna

coklat yang menunjukkan ada ikatan kompleks antigen-antibodi. Keberadaan TNF- α pada duodenum dianalisis secara semi kuantitatif dengan cara membandingkan distribusi TNF- α pada kontrol dengan perlakuan pada perbesaran rendah yaitu 400x menggunakan *software Immunoratio*.

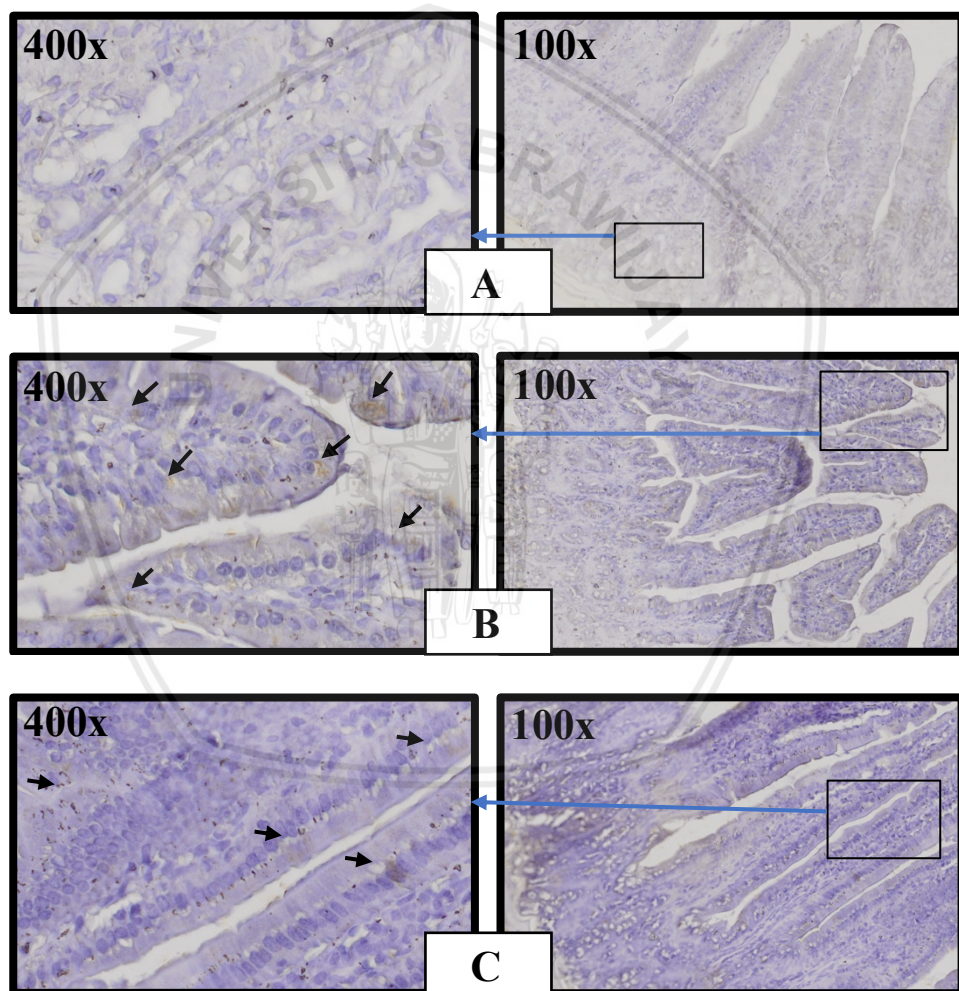
4.7 Analisa Data

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Mencit diberi 6 perlakuan dengan 4 kali pengulangan. Analisa data Ekspresi TNF- α menggunakan ANOVA (*Analysis Of Variance*) dan uji lanjutan beda nyata jujur (BNJ) $\alpha = 0,05$ untuk melihat dan menganalisa perbedaan antar kelompok perlakuan. Pada perubahan histopatologi duodenum mencit (*Mus musculus*) pengolahan data dilakukan secara deskriptif dengan membandingkan histopatologi duodenum dari masing – masing kelompok perlakuan.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Pemberian Infusa Daun Beluntas Terhadap Ekspresi TNF- α di Duodenum pada Model Diare Mencit

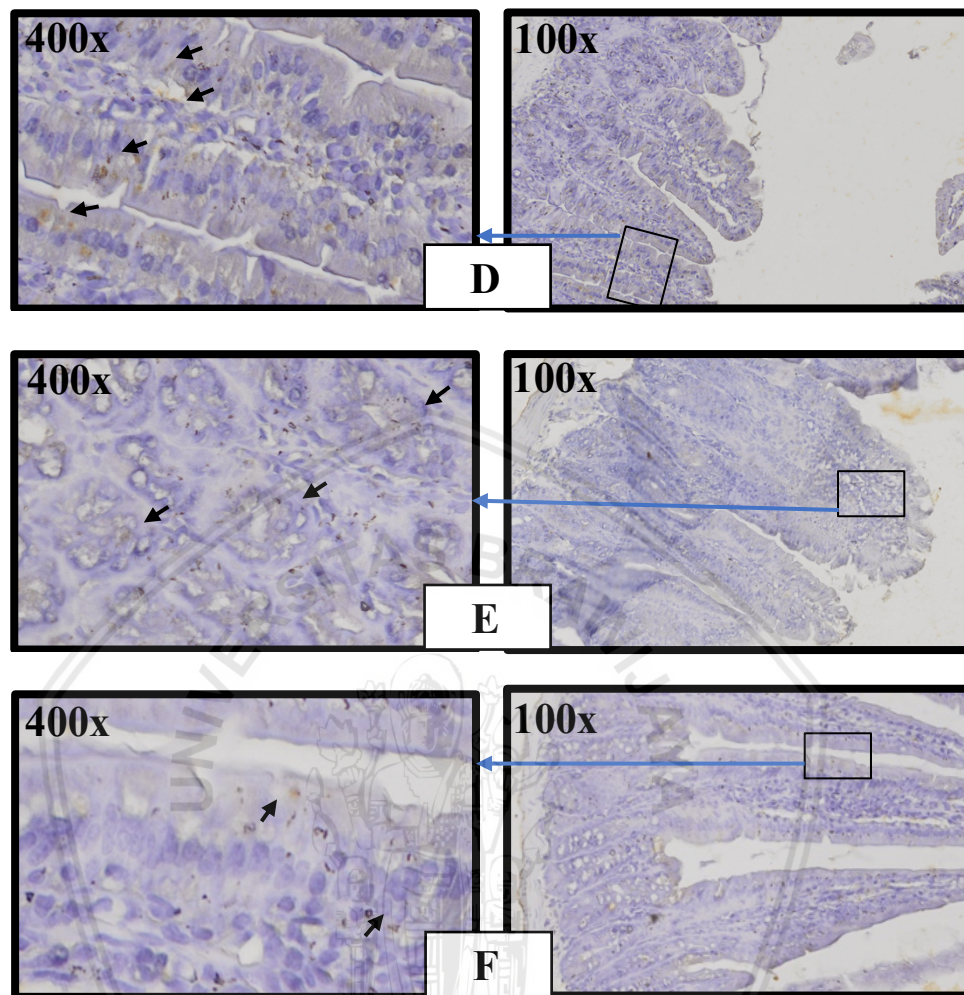
Penggunaan infusa daun beluntas terhadap ekspresi TNF- α pada diare mencit (*Mus musculus*) diamati dengan menggunakan metode immunohistokimia (IHK).



Gambar 5.1 Ekspresi TNF- α Jaringan Duodenum Mencit (*Mus musculus*) dengan Metode Immunohistokimia Perbesaran 400x dan 100x

Keterangan :

(A) Mencit kontrol negatif, (B) Mencit kontrol positif, (C) Mencit terapi obat norit®.



Gambar 5.1 Ekspresi TNF- α Jaringan Duodenum Mencit (Mus musculus) dengan Metode Immunohistokimia Perbesaran 400x dan 100x

Keterangan :

(D) Mencit terapi kuratif infusa daun beluntas konsentrasi 5%, (E) Mencit terapi kuratif infusa daun beluntas konsentrasi 10%, (F) Mencit terapi kuratif infusa daun beluntas d 20%, (panah hitam) ekspresi TNF- α .

Pengamatan dilakukan dengan 5 lapang pandang menggunakan perbesaran 400x kemudian dianalisa menggunakan *software web Immunoratio*. Produksi TNF- α ditandai dengan adanya warna coklat pada jaringan akibat adanya ikatan antigen dan antibodi pada jaringan yaitu antibodi primer *anti-Rat* TNF- α dan antibodi sekunder *goat antirat labelled biotin* sehingga terbentuk ikatan kompleks antigen-

antibodi yang dikenali SA-HRP yang akan terwarnai dengan substrat kromagen DAB sehingga tervisualisasi warna kecoklatan pada preparat.

Tabel 5.1 Ekspresi TNF- α Duodenum Mencit (*Mus musculus*) Induksi *Castor Oil* dan Terapi Infusa Daun Beluntas.

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Ekspresi TNF- α (%) $\pm$ Standard Deviasi	(%) ekspresi TNF- α	
		Peningkatan terhadap Kontrol Negatif	Penurunan terhadap Kontrol Positif
Kontrol Negatif	1,46 $\pm$ 0,33 ^a	-	-
Kontrol Positif	8,90 $\pm$ 0,59 ^d	509,58%	
Pembanding Norit®	1,56 $\pm$ 0,13 ^a	-	82,47%
Perlakuan 1	4,85 $\pm$ 0,68 ^c	-	45,50%
Perlakuan 2	3,01 $\pm$ 0,22 ^b	-	66,17%
Perlakuan 3	2,01 $\pm$ 0,21 ^a	-	77,41%

Keterangan : Perbedaan notasi (a, b, c, dan d) menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antar perlakuan terhadap ekspresi TNF- α ($p < 0,05$).

Hasil positif ekspresi TNF- α metode IHK adalah sinyal coklat gelap di inti dan sitoplasma, kelompok kontrol negatif menunjukkan hasil positif karena menunjukkan sinyal coklat gelap pada inti dan sitoplasma jaringan duodenum (Hidayati dkk, 2017). Ekspresi TNF- α pada kelompok kontrol negatif (**Gambar 5.1 A**) terlihat dalam jumlah sedikit (**Tabel 5.1**) apabila dibandingkan dengan kelompok lainnya. Hal tersebut menandakan bahwa dalam keadaan normal sitokin didalam tubuh akan tetap ada walaupun dalam jumlah yang sedikit. Mencit kontrol negatif pada gambar immunohistokimia duodenum terdapat sedikit sel yang

mengekspresikan kan TNF- α dan memiliki rata-rata yaitu sebanyak $1,46 \pm 0,335$. Pada kondisi normal, TNF- α diekspresikan dalam jumlah kecil (O'keeffe *et al*, 2001). Sel-sel mononuklear seperti limfosit, sel plasma, dan makrofag berperan dalam menghasilkan TNF- α . Sel-sel tersebut memenuhi bagian lamina propia duodenum berperan khusus dalam mekanisme pertahanan imunologis epitelium duodenum yang mudah sekali terkena toksin atau bakteri patogen (Fawcett, 2002).

Berdasarkan hasil uji tukey didapatkan bahwa kelompok mencit diare pada kelompok kontrol positif (K+) berbeda signifikan ($p < 0,05$) terhadap kelompok kontrol negatif (K-) yang ditandai dengan berbeda notasi. Pada kontrol positif diinduksi dengan *castor oil* terjadi peningkatan, hal tersebut ditandai dengan adanya banyak warna coklat pada inti sel dan sitoplasma jaringan duodenum (**Gambar 5.1 B**). Jumlah sel yang mengekspresikan TNF- α pada duodenum kontrol positif memiliki rata-rata yaitu sebanyak $8,90 \pm 0,593$ dengan persentase peningkatan 509,58 %. Peningkatan jumlah sel yang mengekspresikan TNF- α tersebut mengindikasikan terjadinya inflamasi pada duodenum mencit kontrol positif hasil induksi *castor oil*. Menurut Baratawidjaja dan Rengganis (2009), TNF- α pada saat terjadinya inflamasi akan mengarahkan neutrofil dan monosit ke tempat inflamasi. Peningkatan produksi TNF- α pada sel akan menyebabkan adanya aktivasi migrasi (perpindahan) neutrofil ke jaringan. Migrasi neutrofil yang tidak terkendali menyebabkan kerusakan yang berlebih pada tempat terjadinya inflamasi sehingga pada kasus ini sel-sel duodenum mencit akan mengalami kerusakan. Hal ini menyebabkan peningkatan ekspresi TNF- α pada duodenum mencit.

Kelompok terapi obat norit® menunjukkan hasil positif yang terlihat pada inti sel dan sitoplasma jaringan duodenum terwarnai coklat (**Gambar 5.1 C**) tidak berbeda signifikan ($p>0,05$) karena memiliki notasi yang sama dengan kelompok kontrol negatif (K-) namun berbeda signifikan ($p<0,05$) terhadap kelompok kontrol positif (K+) yang ditandai dengan perbedaan notasi. Jumlah sel yang mengekspresikan TNF- α pada duodenum kelompok terapi obat norit® memiliki rata-rata yaitu sebanyak $1,56\pm0,135$ dengan persentase penurunan 82,47%.

Penurunan presentase ekspresi TNF- α tersebut disebabkan oleh kandungan karbon aktif dari norit® yang berperan dalam memberikan efek antidiare dengan menyerap zat toksik *castor oil* kemudian dibuang bersama dengan feses, sehingga dapat mengurangi keparahan kerusakan duodenum. *Castor oil* yang terus-menerus berada di dalam duodenum akan memicu zat toksik dari *castor oil* tersebut untuk terus merusak mukosa usus tanpa memberikan kesempatan mukosa usus kembali ke morfologi normalnya. Norit® bekerja dengan mengikat zat toksik tersebut dan mengeluarkan nya bersama dengan feses, sehingga menghentikan paparan zat toksik yang terus-menerus merusak mukosa duodenum (Tjay dan Rahardja, 2002). Pada akhirnya tingkat keparahan kelompok terapi norit® tidak separah kontrol positif (K+) karena iritasi dan inflamasi dari efek *castor oil* dapat dihambat oleh norit®, sedangkan kontrol positif tetap terjadi iritasi dan inflamasi yang semakin parah.

Ekspresi TNF- α pada mencit (*Mus musculus*) sebagai antidiare induksi *castor oil* dengan terapi kuratif infusa daun beluntas menunjukkan terjadinya

penurunan. Pada kelompok terapi kuratif dengan konsentrasi 5% (**Gambar 5.1 D**), kelompok terapi kuratif dengan konsentrasi 10% **Gambar 5.1 E**, dan terapi kuratif dengan konsentrasi 20% (**Gambar 5.1 F**), masing-masing menunjukkan area berwarna coklat lebih sedikit pada inti sel dan sitoplasma jaringan duodenum dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (**Gambar 5.1 B**). Pada perlakuan 1 yaitu terapi kuratif infusa daun beluntas dengan konsentrasi 5% terjadi penurunan ekspresi TNF- α sebesar 45,50% (**Tabel 5.1**). Penurunan tersebut menandakan bahwa kelompok perlakuan dengan terapi infusa daun beluntas konsentrasi 5% (kelompok P1) berbeda signifikan ($p < 0,05$) terhadap kelompok kontrol negatif (K-) dan berbeda signifikan ($p < 0,05$) dengan kelompok kontrol positif (K+) karena saling berbeda notasi.

Pada perlakuan 2 yaitu terapi kuratif dengan konsentrasi 10% terjadi penurunan ekspresi TNF- α sebesar 66,17%. Penurunan tersebut menunjukkan bahwa terapi infusa daun beluntas konsentrasi 10% (kelompok P2) berbeda signifikan ($p < 0,05$) terhadap kelompok kontrol negatif (K-) dan berbeda signifikan ($p < 0,05$) dengan kelompok kontrol positif (K+) karena saling berbeda notasi.

Sedangkan kelompok perlakuan 3 yaitu mencit diare dengan terapi infusa daun beluntas konsentrasi 20% terjadi penurunan ekspresi TNF- α sebesar 77,41%. Penurunan tersebut menunjukkan bahwa pada terapi kuratif dengan konsentrasi 20% tidak berbeda signifikan ($p > 0,05$) karena memiliki notasi yang sama dengan kelompok kontrol negatif (K-) namun berbeda signifikan ($p < 0,05$) terhadap kelompok kontrol positif (K+) yang ditandai dengan perbedaan notasi.

Penurunan persentase ekspresi TNF- α tersebut disebabkan oleh kandungan

aktif daun tanaman daun beluntas seperti tanin yang berfungsi sebagai adstringent yang dapat memperkecil permukaan usus (Haryanto, 2010), tannin merusak protein menjadi protein tanat. Protein ini membuat mukosa usus menjadi lebih resisten terhadap rangsangan senyawa kimia yang mengakibatkan diare dan toksin dari *castor oil*. Senyawa aktif lain yaitu flavonoid, bekerja dengan cara sebagai agen antiinflamasi dengan menekan ekspresi sitokin proinflamasi. Flavonoid dapat menghambat beberapa sitokin proinflamasi diantaranya $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ dan IL-6 . Flavonoid akan menekan aktivasi dari NFKB yang memicu produksi sitokin, sehingga aktivasi sel radang berkurang (Janeway *et al.*, 2001). Mekanisme flavonoid sebagai antiinflamasi juga dengan cara menghambat aktivitas enzim siklooksigenase-2 (COX-2), dimana COX-2 berperan dalam mediator inflamasi dengan terlibat dalam pelepasan asam arakidonat yang berperan dalam tahap awal respon inflamasi. Asam arakidonat ini berperan dalam pembentukan senyawa kemotaksis oleh neutrofil (Nijveltd *et al.*, 2001). Mekanisme yang diperankan oleh flavonoid dan tanin dapat menyebabkan tingkat keparahan nya tidak separah kontrol positif (K^+) karena iritasi dan inflamasi dari efek *castor oil* dihambat oleh infusa daun beluntas, sedangkan kontrol positif (K^+) tetap terjadi iritasi dan inflamasi yang semakin parah. Pada akhirnya hal tersebut dapat menekan produksi dari sitokin proinflamasi $\text{TNF-}\alpha$ akibat pemberian terapi kuratif infusa daun beluntas.

Berdasarkan hasil uji ANOVA yang dilanjutkan dengan uji Tukey menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antar kelompok perlakuan terapi kuratif konsentrasi 5%, terapi kuratif konsentrasi 10%, terapi kuratif konsentrasi 20% yang

ditandai dengan perbedaan notasi. Mencit yang diberikan terapi infusa daun beluntas konsentrasi 20% memiliki penurunan ekspresi TNF- α yang paling tinggi apabila dibandingkan dengan kelompok terapi konsentrasi 5% dan 10% yaitu mencapai 77,41%. Penurunan tersebut mendekati angka penurunan ekspresi TNF- α pada kelompok kontrol negatif yaitu kondisi normal dan terapi obat norit® yang memang terbukti sebagai obat antidiare. Hal ini menunjukkan bahwa terapi infusa daun beluntas konsentrasi 20% merupakan konsentrasi terbaik yang efektif untuk menurunkan ekspresi TNF- α pada mencit diare, dikarenakan nilai rata-rata mendekati kondisi normal dengan hasil nilai notasi kontrol (a) tidak berbeda nyata dengan konsentrasi terapi 20%. Adanya penurunan ekspresi TNF- α ini membuktikan bahwa terapi kuratif infusa daun beluntas berpengaruh terhadap pengurangan kerusakan yang lebih parah pada gambaran histopatologi duodenum pada mencit (*Mus musculus*) yang mengandung tanin dan flavonoid mampu menurunkan terjadinya inflamasi pada mencit diare induksi *castor oil*.

5.2 Pengaruh Pemberian Infusa Daun Beluntas Pada Mencit Model Diare Yang di Induksi *Castor Oil*

Pengamatan dilakukan dengan melihat fase penyembuhan mukosa duodenum mencit yang ditandai berkurangnya erosi sel epitel dan ruptur villi. Pengamatan erosi sel epitel dan ruptur villi dapat dilakukan dengan melihat gambaran histopatologi menggunakan pewarnaan *Hematoxyline Eosin* (HE) dengan perbesaran 400x. Pengamatan histopatologi ini bertujuan untuk melihat kerusakan yang disebabkan *castor oil* dapat berkurang atau tidak apabila diberikan terapi

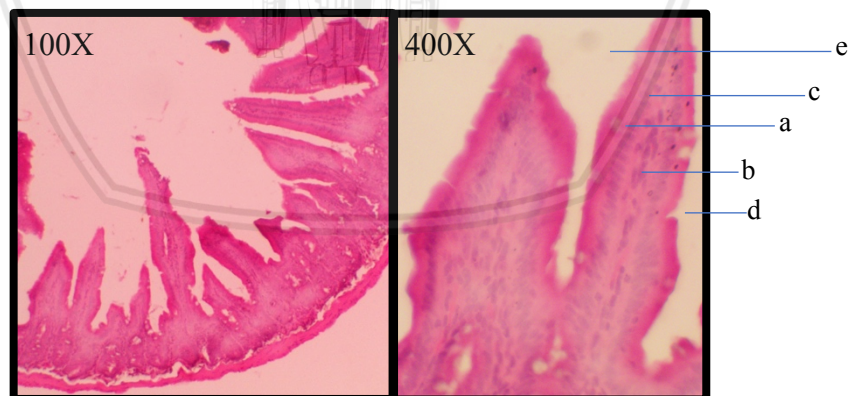
infusa daun beluntas yang diharapkan dapat berpengaruh dalam proses penyembuhan mencit yang mengalami diare.

Gambaran histopatologi pada kelompok kontrol negatif (K-) menunjukkan keadaan duodenum yang normal, hal ini disebabkan oleh mencit pada kelompok K- tidak diberikan perlakuan apapun (**Gambar 5.2**). Gambaran histopatologi kelompok kontrol positif (K+) yang merupakan kelompok perlakuan mencit yang diinduksi *castor oil* dan tanpa diberikan terapi pengobatan infusa daun beluntas menunjukkan kerusakan berupa erosi sel epitel dan ruptur villi (**Gambar 5.3**). Gambaran histopatologi kelompok pembanding obat norit® merupakan kelompok perlakuan mencit yang diinduksi *castor oil* kemudian diberikan terapi berupa obat anti diare yaitu norit®, pada **Gambar 5.4** menunjukkan kondisi duodenum mencit kelompok norit® mengalami beberapa perubahan yang lebih baik sel epitel dan villi apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (K+).

Gambaran histopatologi kelompok perlakuan 1 (P1) merupakan kelompok mencit yang diinduksi *castor oil* dan kemudian diberikan terapi infusa daun beluntas 5% yang menunjukkan perubahan yang cukup berarti apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (K+) yaitu erosi sel epitel dan ruptur villi yang sedikit berkurang (**Gambar 5.5**). Gambaran histopatologi kelompok perlakuan 2 (P2) merupakan kelompok mencit yang diinduksi *castor oil* dan kemudian diberikan terapi infusa daun beluntas 10% yang menunjukkan perubahan yang kurang lebih sama dengan kelompok perlakuan 2 (P2) dan apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (K+) erosi sel epitel dan ruptur villi pada mukosa duodenum sedikit berkurang, kemudian juga terlihat adanya sel goblet

yang lebih banyak (**Gambar 5.6**). Gambaran histopatologi kelompok perlakuan 3 merupakan kelompok mencit yang diinduksi *castor oil* dan kemudian diberikan terapi infusa daun beluntas 20% yang menunjukkan perubahan yang sangat berarti apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (K+), kelompok perlakuan 1 (P1) dan kelompok perlakuan 2 (P2) yaitu erosi sel epitel dan ruptur villi pada mukosa duodenum yang mulai tidak tampak atau mengalami perubahan menuju normal (**Gambar 5.7**).

Pada kelompok mencit kontrol negatif atau kelompok mencit sehat (**Gambar 5.2**) yang tanpa diberi perlakuan induksi *castor oil* dan terapi apapun menunjukkan tidak ada kerusakan pada struktur villi, sel epitel, dan sel goblet. Gambaran histologi normal duodenum terdiri dari empat lapisan, yaitu tunika mukosa, tunika submukosa, muskularis eksterna, dan tunika serosa. Pada lapisan tunika mukosa terdapat villi, sel epitel, dan sel goblet (Eroschenko, 2008).



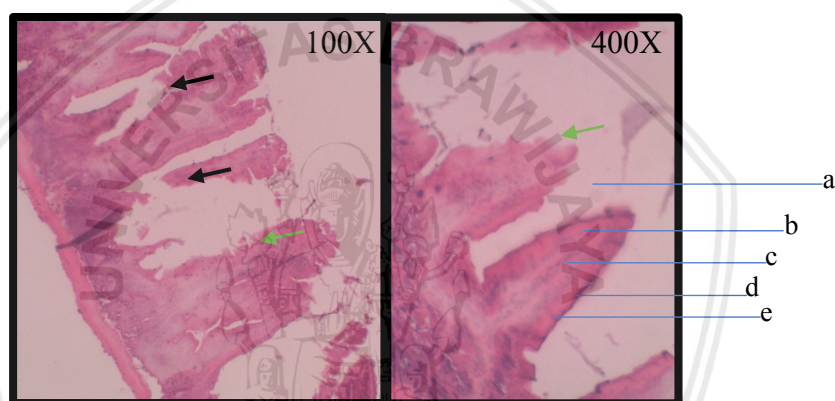
Gambar 5.2 Gambaran histopatologi mukosa duodenum mencit dengan pewarnaan HE perbesaran 100x dan 400x pada kelompok kontrol negatif (K-).

Keterangan :

Mukosa duodenum normal tidak menunjukkan adanya kerusakan seperti erosi epitel dan rupture villi. (a) sel goblet; (b) lamina propria; (c) sel epitel; (d) villi; (e) lumen.

Pada mencit kelompok kontrol positif yang diinduksi *castor oil* (**Gambar 5.3**) menunjukkan adanya kerusakan pada struktur jaringan duodenum dibanding

kan dengan kontrol negatif. Deretan sel epitel kolumnar pada bagian mukosa mengalami erosi dan sebagian ada yang menghilang, kondisi erosi sel epitel ini secara tidak langsung membuat sel goblet berkurang. Menurut Maiti *et al.*, (2007) asam risinoleat pada *castor oil* dapat menyebabkan iritasi dan inflamasi pada dinding usus yang apabila dilihat secara mikroskopis akan terdapat erosi villi di seluruh duodenum dan pengelupasan besar-besaran sel epitel kolumnar dan sel goblet (Mortensen *et al.*, 2017).

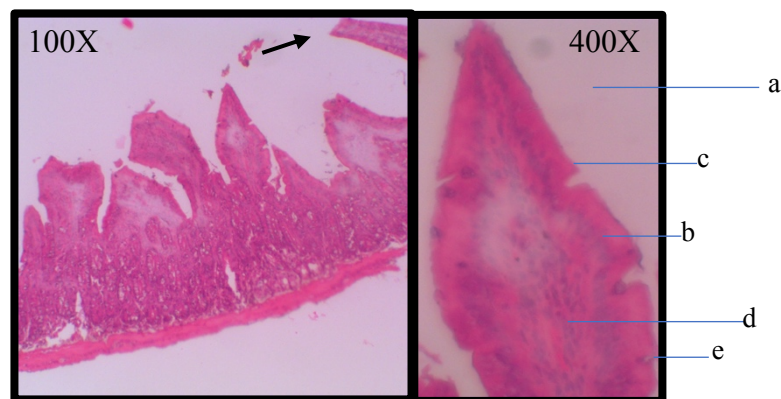


Gambar 5.3 Gambaran histopatologi mukosa duodenum mencit dengan pewarnaan HE perbesaran 100x (A) dan 400x (B) pada kelompok kontrol positif (K+).

Keterangan :

Mukosa duodenum menunjukkan kondisi tidak normal, terlihat jelas erosi sel epitel disertai menghilangnya sel goblet (panah hijau) dan ruptur villi (panah hitam). (a) lumen; (b) epitel; (c) lamina propria; (d) villi; (e) sel goblet.

Sel goblet yang hilang pada mencit kelompok kontrol positif ini disebabkan oleh adanya erosi epitel (**Gambar 5.3**). Kerusakan parah pada kelompok ini bila dibandingkan dengan kelompok terapi adalah disebabkan dari waktu paparan *castor oil* yang lebih lama dan tidak langsung diberikan terapi. Menurut Geboes (2003), inflamasi pada duodenum ditandai dengan kerusakan lapisan mukosa, yaitu pada bagian villi dan berkurangnya sel goblet.



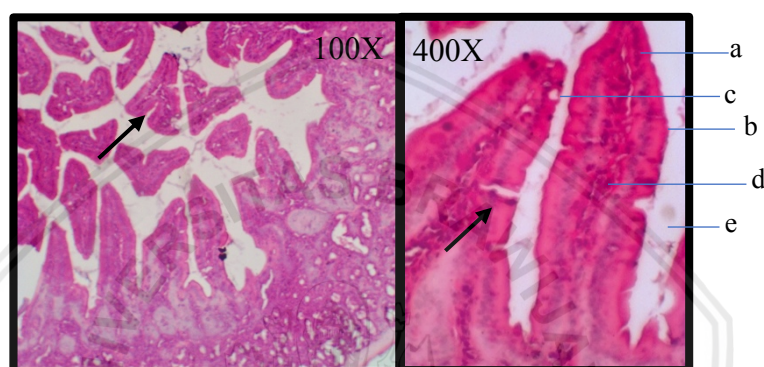
Gambar 5.4 Gambaran histopatologi mukosa duodenum mencit dengan pewarnaan HE perbesaran 100x (A) dan 400x (B) pada kelompok pembanding (norit®).

Keterangan :

Mukosa duodenum mengalami pengurangan dari kerusakan dengan terlihat erosi sel epitel mulai berkurang (panah hitam) dan villi baru mulai terbentuk. (a) Lumen; (b) sel epitel; (c) vili; (d) lamina propria; (e) sel goblet.

Pada mencit kelompok terapi obat norit® yaitu mencit yang diinduksi *castor oil* dan diberikan terapi obat antidiare norit® (**Gambar 5.4**) menunjukkan perubahan yang terlihat dengan tidak adanya kerusakan seperti erosi sel epitel dan ruptur villi. Perubahan yang ditunjukkan secara mikroskopis tersebut disebabkan oleh karbon aktif didalam norit® yang terlihat berupa pori-pori, dimana pori tersebut ikut berperan dalam fungsinya sebagai absorbent atau menangkap zat beracun. Cara kerja norit® dalam memberikan terapi terhadap induksi *castor oil* adalah dengan masuk kedalam saluran pencernaan dan kemudian menyerap zat toksik *castor oil*, setelah itu menyimpannya dalam permukaan pori sehingga nantinya keluar bersama feses. Zat toksik dari *castor oil* yang terus-menerus berada didalam duodenum, akan terus merusak mukosa usus tanpa memberikan kesempatan mukosa usus untuk kembali ke morfologi normalnya. Norit® bekerja dengan mengikat zat toksik tersebut dan mengeluarkan nya bersama dengan feses,

sehingga menghentikan paparan zat toksik yang terus-menerus merusak mukosa duodenum (Tjay dan Rahardja, 2002). Pada akhirnya tingkat keparahan kelompok terapi norit® tidak separah kontrol positif (K+) karena iritasi dan inflamasi dari efek *castor oil* dapat dihambat oleh norit®, sedangkan kontrol positif tetap terjadi iritasi dan inflamasi yang semakin parah.

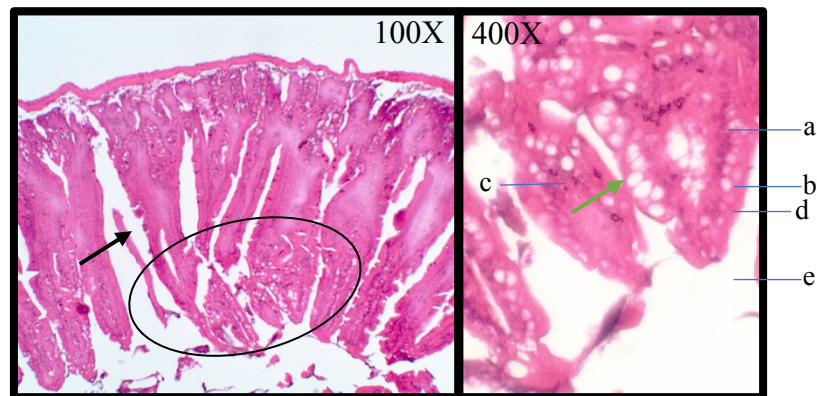


Gambar 5.5 Gambaran histopatologi mukosa duodenum mencit dengan pewarnaan HE perbesaran 100x (A) dan 400x (B) pada kelompok perlakuan 1 (P1).

Keterangan :

Mukosa duodenum mengalami perubahan dengan terlihat tidak ada erosi sel epitel, dan ruptur villi mulai berkurang (panah hitam). (a) sel epitel; (b) villi; (c) sel goblet; (d) lamina propria; (e) lumen.

Pada kelompok terapi kuratif infusa daun beluntas 5% (**Gambar 5.5**) menunjukkan masih banyaknya rupture villi pada duodenum mencit. Sedangkan pada mencit kelompok terapi kuratif infusa daun beluntas dengan 10% terlihat ada banyaknya sel goblet (**Gambar 5.6**). Sel goblet mensintesis dan mensekresikan mucus glikoprotein yang bertujuan untuk melindungi sel-sel epithelium intestinal dari zat toksik seperti *castor oil*. Aktivasi sitokin yang dilepaskan oleh sel Th-2 merangsang sel goblet. Pada duodenum yang mengalami kerusakan berat, dapat ditemukan jumlah sel goblet yang sangat banyak. Hal ini menunjukkan adanya gangguan zat toksik dari *castor oil* tersebut sehingga sel goblet akan bertambah banyak yang bertujuan mempertahankan sel dari infeksi (Balqis *et al.*, 2015).

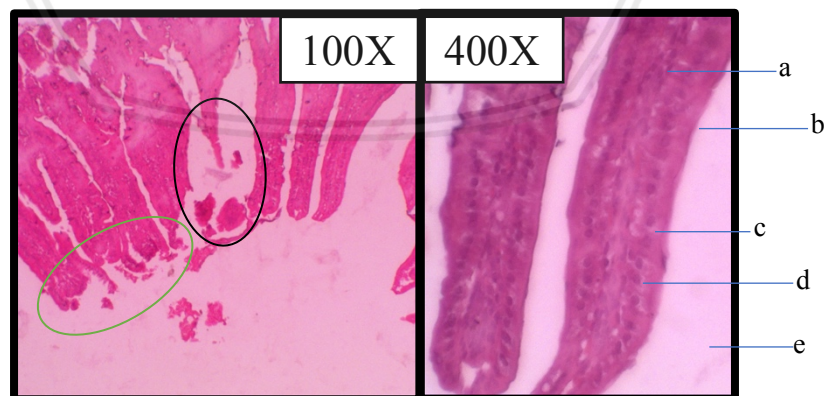


Gambar 5.6 Gambaran histopatologi mukosa duodenum mencit dengan pewarnaan HE perbesaran 100x (A) dan 400x (B) pada kelompok perlakuan 2 (P2).

Keterangan :

Mukosa duodenum mengalami perubahan dengan terlihat erosi sel epitel yang sedikit (panah hitam), sel goblet (panah hijau), namun masih terlihat adanya ruptur villi (lingkarang hitam). (a) sel epitel; (b) sel goblet; (c) lamina propria; (d) villi; (e) lumen.

Pada kelompok terapi kuratif infusa daun beluntas 20% (**Gambar 5.7**) sudah mengalami perubahan bila dibandingkan dengan kelompok terapi kuratif infusa daun beluntas konsentrasi 5% dan 10% ditandai dengan sel epitel dan villi duodenum sudah terlihat adanya perubahan struktur meskipun masih terdapat runtuh villi.



Gambar 5.7 Gambaran histopatologi mukosa duodenum mencit dengan pewarnaan HE perbesaran 100x (A) dan 400x (B) pada kelompok perlakuan 3 (P3).

Keterangan :

Mukosa duodenum mengalami perubahan dengan terlihat erosi sel epitel (lingkaran hijau) dan ruptur villi (lingkaran hitam) mulai berkurang. (a) lamina propria; (b) villi; (c) sel goblet; (d) sel epitel; (e) lumen.

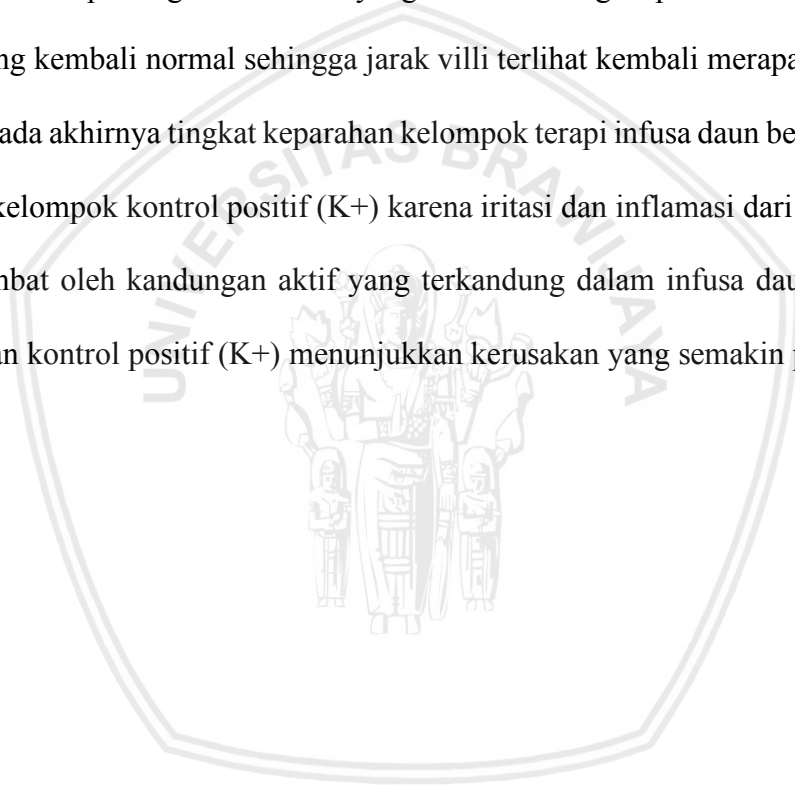
Menurut Samuelson (2007), pada bagian bawah villi terdapat kriptas dan kelenjar leberkuhn yang terdiri atas sel punca dan sel goblet. Sel kriptas epitel duodenum bermitosis setiap 10-14 jam pada mencit dan waktu transit sel dari kriptas ke ujung villi membutuhkan waktu selama 48 jam (Shackelford and Elwell, 1999). Akan tetapi terapi pada penelitian ini dilakukan dengan waktu yang kurang dari 48 jam, maka regenerasi sel belum sempat terjadi namun pada kelompok terapi infusa daun beluntas 20% (**Gambar 5.7**) sehingga masih tampak sedikit erosi sel epitel dan ruptur villi walaupun dominan jaringan sudah mengalami perubahan.

Perubahan yang terjadi pada kelompok mencit yang diberikan terapi infusa daun beluntas disebabkan oleh kandungan zat aktif yang bekerja dengan memberikan efek antidiare yaitu tanin dan flavonoid. Senyawa aktif yaitu senyawa tanin dalam daun beluntas memiliki aktivitas anti diare. Senyawa ini diduga dapat menurunkan pergerakan usus, sehingga usus halus memiliki waktu yang lebih lama menyerap lebih banyak air. Senyawa tanin juga mempunyai sifat *adstringent* yang diperlukan untuk mengatasi disentri dan diare, sifat *adstringent* ini memperkecil permukaan usus sehingga mengurangi pengeluaran cairan diare dan disentri serta menghambat sekresi elektrolit (Tjay dan Rahardja, 2007). Senyawa flavonoid (kuersetin) dalam menghentikan diare dengan menghambat motilitas usus, tetapi tidak mengubah transport cairan di dalam mukosa usus sehingga mengurangi sekresi cairan dan elektrolit. Aktivitas flavonoid yang lain adalah dengan menghambat pelepasan asetilkolin di saluran cerna (Puspitaningrum dkk, 2014). Aktivitas ini akan mengembalikan permeabilitas mukosa duodenum sehingga proses pencernaan bekerja normal kembali, kemudian kerusakan morfologi mukosa

duodenum yang terjadi akibat kondisi hipersekresi, peristaltik meningkat, dan absorpsi menurun akan mengalami penurunan tingkat keparahan.

Flavanoid yang terkandung dalam daun beluntas (*Pluchea indica L.*) juga berperan sebagai antiinflamasi. Menurut Zhang (2005), inaktifasi mediator-mediator inflamasi oleh zat aktif flavonoid menyebabkan terjadinya perubahan gambaran histopatologi duodenum yang ditandai dengan perubahan normal sel epitel yang kembali normal sehingga jarak villi terlihat kembali merapat.

Pada akhirnya tingkat keparahan kelompok terapi infusa daun beluntas tidak separah kelompok kontrol positif (K+) karena iritasi dan inflamasi dari efek *castor oil* dihambat oleh kandungan aktif yang terkandung dalam infusa daun beluntas, sedangkan kontrol positif (K+) menunjukkan kerusakan yang semakin parah.



BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat ditarik kesimpulan bahwa :

1. Pemberian terapi infusa daun beluntas (*Pluchea indica L.*) konsentrasi 20% merupakan konsentrasi terbaik yang dapat menurunkan ekspresi TNF- α pada kasus diare hasil induksi *castor oil*.
2. Pemberian terapi infusa daun beluntas (*Pluchea indica L.*) konsentrasi 20% merupakan konsentrasi terbaik yang dapat memperbaiki gambaran histopatologi duodenum pada kasus diare hasil induksi *castor oil*.

6.2 Saran

Beberapa saran yang dapat dilakukan adalah sebagai berikut :

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai dosis toksik infusa daun beluntas (*Pluchea indica L.*) pada kasus diare.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai senyawa aktif apa saja yang paling banyak terkandung di dalam infusa daun beluntas yang dapat berperan sebagai antidiare.
3. Perlu dilakukan penelitian yang sama namun dalam kurun waktu yang lebih lama untuk melihat proses regenerasi sel.

DAFTAR PUSTAKA

- Adrianto, A. Santoso, J. Suprasetya, E. 2017. Uji Efektivitas Antidiare Ekstrak Etanol Daun Bidara (*Ziziphus mauritiana* Lam.) Pada Mencit Jantan (*Mus musculus*) Dengan Induksi Oleum Ricini. *Yogyakarta: Politeknik Kesehatan Permata Indonesia*. Hal 59 – 74, Volume 8, Nomor 2, November 2017
- Anas, Y. Hidayati, D., N. Kurniasih, A. Sanjaya, L., K., D. 2016. Aktivitas Antidiare Ekstrak Etanol Daun Nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) dan Daun Angsana (*Pterocarpus indicus* Wild.) pada Mencit Jantan Galur Balb/C. *Fakultas Farmasi. Universitas Wahid Hasyim. Semarang*.
- Balqis, U., M. Hanafiah, J. Connie, M. Nur, A. Siti, dan F. Yudha. 2015. Jumlah Sel Goblet pada Usus Halus Ayam Kampung (*Gallus domesticus*) yang Terinfeksi *Ascaridia galli* secara Alami. *Jurnal Medika Veterinaria*, 9(1): 1-6.
- Baratawidjaja, K. G dan Rengganis, I. 2009. *Imunologi Dasar*. Balai Penerbit FKUI. Jakarta.
- Ciesla, W., P. Guerrant, R., L. 2003. *Infectious Diarrhea*. In: Wilson WR, Drew WL, Henry NK, et al editors. *Current Diagnosis and Treatment in Infectious Disease*. New York: Lange Medical Books, 225 - 68.
- Dalimartha, S. 2005. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia Jilid 1*. Trubus Agriwidya. Jakarta. PT. Pustaka Pembangunan Swadaya Nusantara.
- Elziyad, M. T., N. M. R. Widjaja, dan H. Plumeriastuti. 2013. Pengaruh Boraks terhadap Gambaran Histopatologi Duodenum Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). *Jurnal Veterinaria Medika*, 6(2): 133-138.
- Eroschenko, V.P. 2008. *Atlas of Histology with Functional Correlations*. Lippincott Williams & Wilkins The Point. USA.
- Fatmah. 2006. Respon Imunitas yang Rendah pada Tubuh Manusia Usia Lanjut. *Makara Kesehatan*. 2006; 10(1): 47-53.
- Fawcett. 2002. *Buku Ajar Histologi. Edisi 12*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 552-553.

- Geboes, K. 2003. Histopathology of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Journal of Pathology*, 11(18): 255-276.
- Guerrant, R., L. Gilder, T., V. Steiner, T., S. 2001. Practice Guidelines for the Management of Infectious Diarrhea. *Clinical Infectious Diseases*; 32: 331-51.
- Gunin A. 2000. Histology Images. [Terhubung Berkala] www.histol.chuvashia.com [3 Desember 2018].
- Haryanto, S. 2010. Ensiklopedia Tanaman Obat Indonesia. Yogyakarta: Palmall
- Hasanuddin, Nabilah A. 2016. Efek Pemberian Ekstrak Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L) terhadap Kadar Protein VEGF dan Gambaran Histologi Vena Sentralis Jaringan Hepar. Jakarta: Program Studi Kedokteran dan Profesi Dokter Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Syarif Hidayatullah.
- Hidayati, D.Y.N., Sujuti, H., Wulandari, L., Saputra, A.D. and Santoso, G.A. 2017. TNF- α (Tumor Necrosis Factor Alpha) and iNOS (Inducible Nitric Oxide Synthase) Expression in Rat Brain Infected by Mycobacterium tuberculosis Strain H37RV. *Journal of Tuberculosis Research*, 5, 58-68.
- Ikawati, Z., 2008. *Pengantar Farmakologi Molekuler*, 50, 78-81. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- James, A., D. 1985. *CRC Handbook of Medicinal Herbs*. CRC Press Inc., Florida, USA.
- Janeway, C., A., T. Paul, W. Mark. and J., S. Mark. 2001. *Immuno Biology 5th Edition*. Garland Publishing. New York.
- Katzung, B.G. 2001. *Farmakologi Dasar dan Klinik : Reseptor- reseptor Obat dan Farmakodinamik*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. pp. 23-4.
- Ketaren, S. 2008. *Minyak dan Lemak Pangan*. Cetakan Pertama. Jakarta : Universitas Indonesia Press.
- Kurniawan, S., N. Raisa, N. Margareta. 2018. *Penggunaan Hewan Coba pada Penelitian di Bidang Neurologi*. UB Press., Malang. 37, 48.

- Lau, K., S. Cortez, R., V. Philips, S., R. Pittet, M., J. Lauffenburger, D., A. Kevin, M., H. 2012. Multi-Scale In Vivo Systems Analysis Reveals the Influence of Immune Cells on TNF- α -Induced Apoptosis in the Intestinal Epithelium. *PLOS Biology Volume 10 (Issue 9): e1001393*.
- Lung, E. 2003. Acute Diarrheal Disease. In: *Friedman SL, McQuaid KR, Grendell JH, editors. Current Diagnosis and Treatment in Gastroenterology. 2nd edition. New York: Lange Medical Books, 131 - 50.*
- Maiti A, Saikat D, Subhash CM. 2007. In vivo evaluation of antidiarrhoeal activity of the seed of *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae). *Tropical journal of Pharmaceutical Research* 6(2): 711-716.
- Meite, S. Nguessan, J., D., N. Bahi, C. Yapi, H., F. Djaman, A., J. and Guina F., G. 2009. Antidiarrheal Activity of the Ethyl Acetate Extract of *Morinda Morindoides* in Rats. *Trop J Pharm Res* 8 (3): 201-207.
- Mortensen, A., Aguilar, F., Crebelli, R., Di Domenico, A., Dusemund, B., Frutos, M. J., and Lindtner, O. 2017. Re-evaluation of Polyglycerol Polyricinoleate (E 476) as a Food Additive. *EFSA Journal*, 15(3).
- Nijveldt, R. J., E. van Nood, D.E.C. van Hoorn, P.G. Boelens, K. van Norren, P.A.M. van Leeuwen. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical and Nutrition* 74:418-425.
- O'keeffe, J., S. Lynch, A. Whelan, J. Jackson, N., P. Kennedy, D., G. Weir, C. Feighery. 2001. Flow Cytometric Measurement of Intracellular Migration Inhibition Factor and Tumour Necrosis Factor Alpha in the Mucosa of Patients with Coeliac Disease. *Clin Exp Immunol*. 125: 376-382.
- Priyambodo, S. 2003. *Pengendalian Hama Tikus Terpadu*. Ed ke-3. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Puspitaningrum, Ika, Arsa Wahyu N. dan Suwarmi. 2014. Uji Anti Diare Infusa Daun Mimba (*Azadirachta Indica* Juss) terhadap Mencit Jantan Galur Swiss. Semarang: Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Yayasan Pharmasi.
- Rukmiasih. 2011. Penurunan Bau Amis (*Off-Odor*) Daging Itik Lokal Dengan Pemberian Daun Beluntas (*Pluchea indica* Less) Dalam Pakan dan

- Dampaknya Terhadap Performa [Disertasi] Bogor: Program Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Sahoo, H., B. Sagar, R. Kumar, A. Bhaiji, Amrita. Bhattamishra, S., K. 2016. Antidiarrhoeal investigation of *Apium leptophyllum* (Pers.) by modulation of Na+K+ATPase, nitrous oxide and intestinal transit in rats. *Biomedical journal* 39 (2016) 376 – 381.
- Samuelson, D.A. 2007. *Textbook of Veterinary Histology*. Saunders Elsevier. China
- Setiawati, H. 2015. Uji Aktivitas Antidiare Infusa Daun Beluntas (*Pluchea indica* L.) Pada Mencit Jantan Galur Swiss Webster Yang Diinduksi dengan *Oleum Ricini*. [Karya Tulis Ilmiah] Jurusan Farmasi. Politeknik Kesehatan Bandung. Bandung.
- Shackelford, C. C dan Elwell, M. R. 1999. *Small and Large Intestine, and Mesentary*. Di dalam: RR Maronpot, GA Boorman, BW Gaul, Editor. Pathology of the Mouse Reference and Atlas. Vienna: *Cache River Press*; 81-115.
- Simatupang M., 2004. Analisis Faktor-Faktor yang Berhubungan dengan Kejadian Universitas Sumatera Utara Diare Pada Balita di Kota Sibolga pada Tahun 2003. Medan: Program Pascasarjana Universitas Sumatera Utara.
- Soeroso, A. 2007. Sitokin. *Jurnal Oftalmologi Indonesia*. 2007;5:171-80.
- Sridianti. 2014. Duodenum Struktur Fungsi Lokasi. <http://www.sridianti.com/duodenum-struktur-fungsi-lokasi.html>. [3 Desember 2018].
- Sulaksana, J., dan Jayusman, D.I., 2004, *Meniran Budi Daya dan Pemanfaatan untuk Obat*, Jakarta: Penebar Swadaya
- Sulistiyaningsih. 2009. Potensi Daun Beluntas (*Pluchea indica* L.) sebagai Inhibitor terhadap *Pseudomonas aeruginosa* Multi Resistant dan Methicillin Resistant *Stapylococcus aureus*. Fakultas Farmasi. *Universitas Padjajaran. Bandung*.
- Supar. 2001. Pemberdayaan Plasma Nutfah Mikroba Veteriner dalam Pengembangan Peternakan: Harapan Vaksin *Escherichia coli*

Enterotoxigenic, Enteropatogenik dan Verotoksigenik untuk Pengendalian Kolibasilosis Neonatal pada Anak Babi dan Sapi. Wartazoa. Vol 11. Hal 33-43.

Tjay, H.T dan Rahardja, K. 2002. Obat-obat Penting: Khasiat, Penggunaan dan Efek-efek Sampingnya. Edisi 5. Cetakan pertama. Gramedia. Jakarta

Umam. K. A. A, Surjowardojo. P, dan Susilorini.E. T. 2015. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Beluntas (*Pluchea Indica L.*) Dengan Pelarut Aquades . *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Universitas Brawijaya*. Widiastuti, I. D. A., dan D. I Made. 2013. *Diagnosis dan Tatalaksana Atresia Duodenum*. Fakultas Kedokteran. Universitas Udayana. Denpasar.

Utami, Prapti, 2008. *Buku Pintar Tanaman Obat*. Jakarta: AgroMedia Pustaka

Widiastuti, I., D., A. dan D., I., Made. 2013. Diagnosa dan Tatalaksana Atresia Duodenum. Fakultas Kedokteran. Universitas Udayana. Denpasar

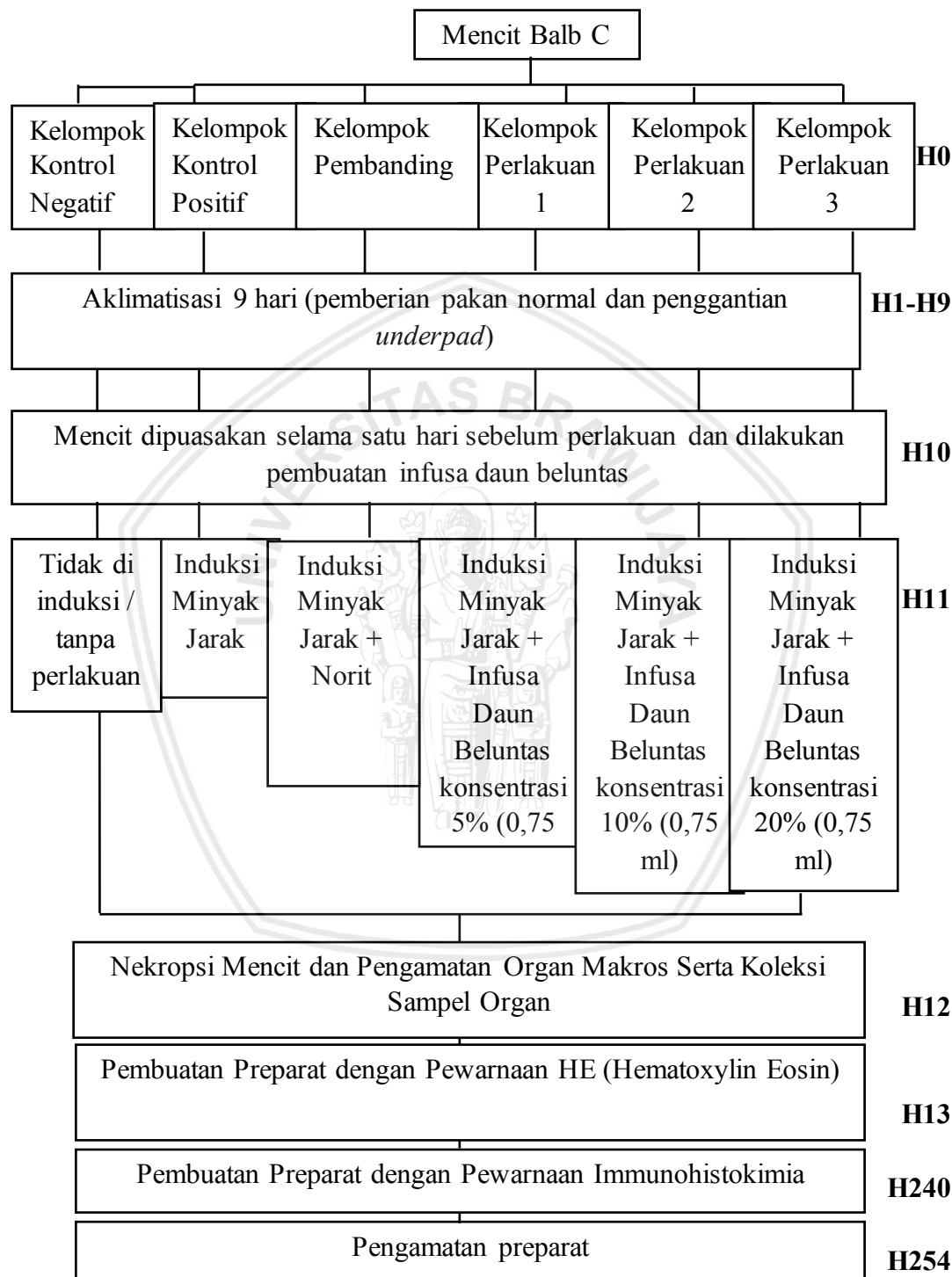
Widyawati, P. S., C.H. Wijaya., P.S. Harjosworo., dan D. Sajuthi. 2010. Pengaruh Ekstraksi dan Fraksinasi terhadap Kemampuan Menangkap Radikal Bebas DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) Ekstrak dan Fraksi Daun Beluntas (*Pluchea indica Less*). *Jurnal Rekayasa Kimia dan Proses*. ISSN : 1441-4216.

Wudu T, Kelay B, Mekonnen HM and TesfuK (2008). Calf morbidity and mortality in smallholder dairy farms in Ada'a Liben district of Oromia, Ethiopia. *Tropical Animal Health Production* 40: 369–376.

Yani L, Ilhamjaya P, Gatot SL, Wijaya A, Suryani A. 2011. Korelasi antara adiponektin dengan Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-a) pada pria Indonesia obes non-diabetes. *MKI*. 2011;6;1.

Zhang, H., Y. 2005. *Structure Activity Relationships and Rational Design Strategies for Radical Scavenging Antioxidants*. Computer Aided Drug Design 1 : 257-273.

Lampiran 1. Skema Penelitian



Keterangan:

H0 : Hari ke-0

H1-H9 : Hari ke-1 sampai hari ke-9

H10 : Hari ke-10

H11 : Hari ke-11

H12 : Hari ke-12

H13 : Hari ke-13

H240 : Hari ke-240

H254 : Hari ke-254

Lampiran 2. KEP UB No. 935



**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARENCE"**

No: 935-KEP-UB

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:

PENELITIAN BERJUDUL : PEMANFAATAN INFUSA DAUN BELUNTAS (*Pluchea indica* L.) SEBAGAI OBAT ANTI DIARE PADA MENCIT (*Mus musculus*) YANG DIINDUKSI CASTROL OIL

PENELITI : TAMMAMY IZZATI

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 7 Mei 2018
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya



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

Lampiran 3. Perhitungan Infusa Daun Beluntas (Setiawati, 2015)

1. Infusa daun beluntas konsentrasi 5 % :

Simplisia daun beluntas 10 g kedalam panci berisi air 200cc yang dipanaskan selama 15 menit, volume pemberian 0,75 mL

2. Infusa daun beluntas konsentrasi 10 % :

Simplisia daun beluntas 10 g kedalam panci berisi air 100cc yang dipanaskan selama 15 menit, volume pemberian 0,75 mL

3. Infusa daun beluntas konsentrasi 20 % :

Simplisia daun beluntas 10 g kedalam panci berisi air 50cc yang dipanaskan selama 15 menit, volume pemberian 0,75 mL

Lampiran 4. Perhitungan Dosis Norit®

1. Konversi dosis dari manusia ke mencit :

$$\text{Manusia (70 kg)} \rightarrow \text{mencit (20 g)} = 0,0026$$

2. Dosis untuk mencit BB 20 g :

$$= \text{Dosis}_{\text{manusia}} \times \text{konfersi dosis}$$

$$= 750 \text{ mg} \times 0,0026$$

$$= 1,95 \text{ mg}$$

3. Dosis untuk mencit BB 25g :

$$= 25\text{g}/20\text{g} \times 1,95 \text{ mg} = 2,4375 \text{ mg}$$

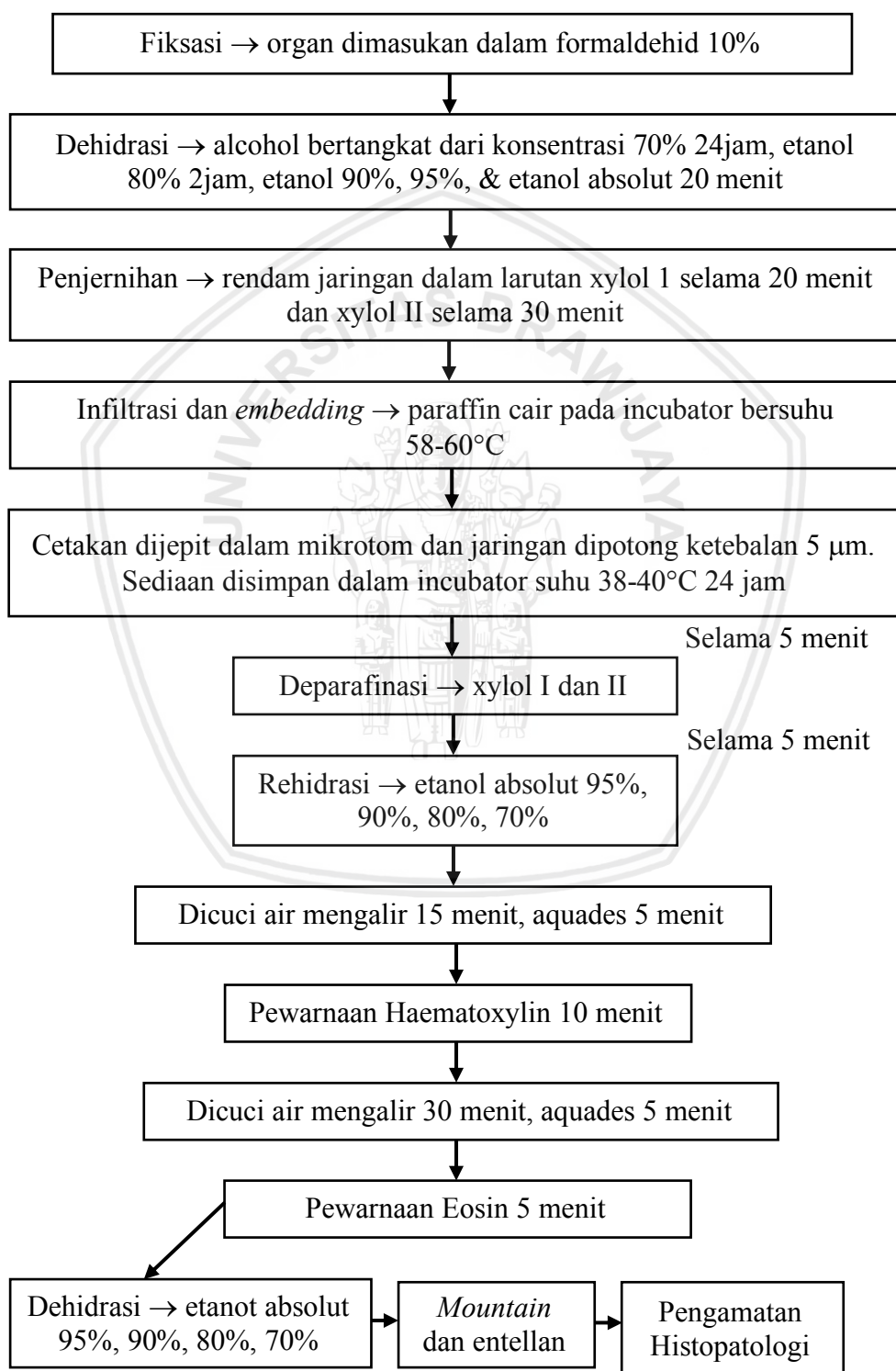
$$\text{Mencit BB 25g} = 2,4 \text{ mg}$$

4. Volume pemberian per ekor mencit dengan konsentrasi norit® 3 mg/mL :

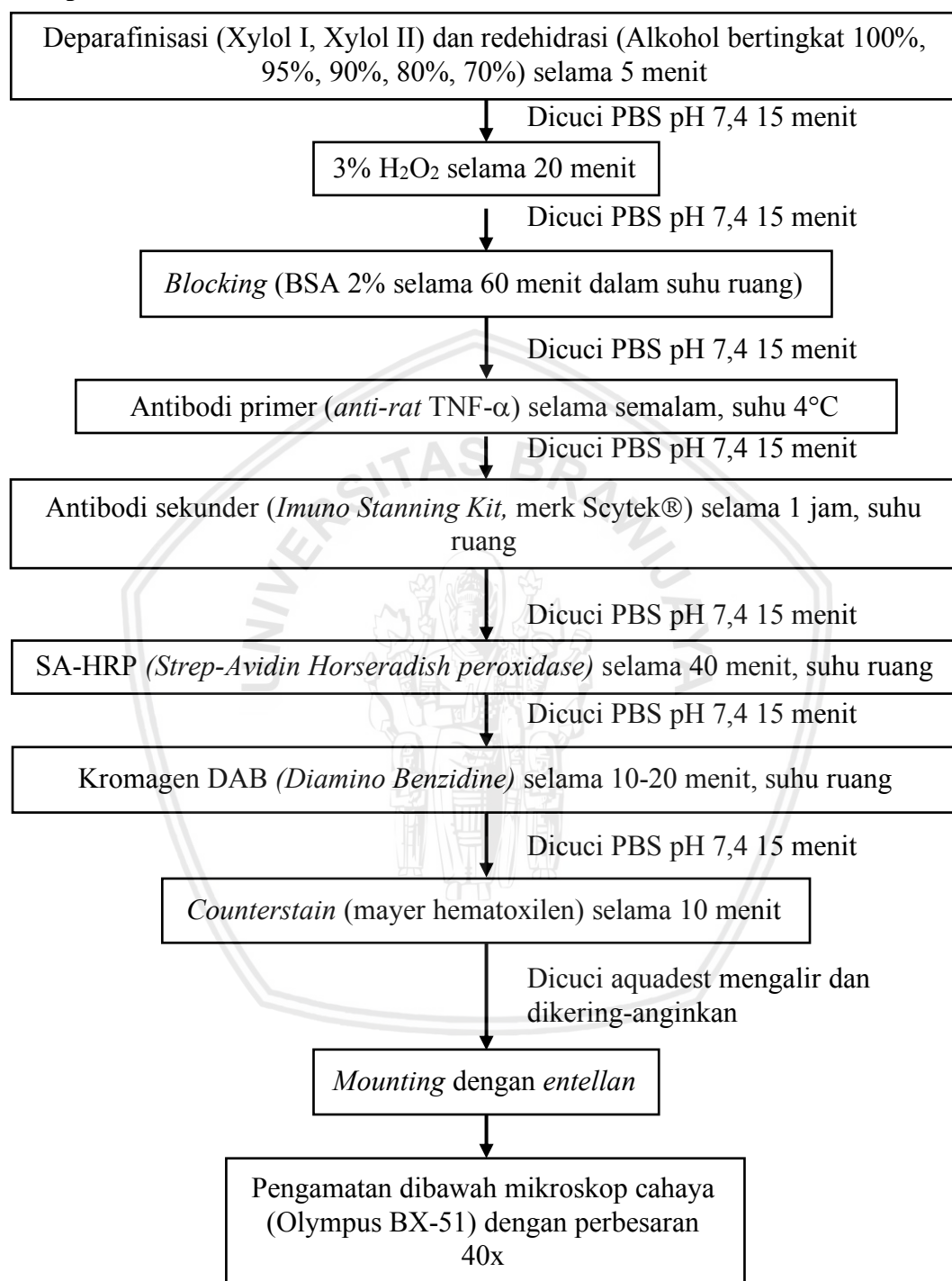
$$= 0,8 \text{ mL}$$

Lampiran 5. Pembuatan Preparat Histopatologi Duodenum

Proses pembuatan sediaan histopatologi dan pewarnaan Hematoxyllin-Eosin :



Lampiran 6. Skema Metode Pembuatan IHK



Lampiran 7. Data Presentasi Ekspresi TNF- α

Mencit ke-	Kontrol Negatif	Kontrol Positif	Norit®	Perlakuan 1	Perlakuan 2	Perlakuan 3
1	1,5	9,6	1,4	5,78	3,2	2,04
2	1,35	8,22	1,64	4,94	3	1,78
3	1,1	8,66	1,5	4,5	2,7	1,95
4	1,9	9,12	1,7	4,2	3,15	2,3
Rata-rata	1,46	8,9	1,56	4,85	3,01	2,01

Induksi *castor oil* mampu meningkatkan ekspresi TNF- α duodenum mencit (*Mus musculus*) dan terapi kuratif infusa daun beluntas dapat menurunkan ekspresi TNF- α . Presentasi peningkatan ekspresi TNF- α adalah sebagai berikut :

a. Presentase peningkatan (%) = $\frac{\text{Kontrol positif} - \text{Kontrol negatif}}{\text{Kontrol negatif}} \times 100 \%$
 $= \frac{8,90 - 1,46}{1,46} \times 100 \%$
 $= 509,58 \%$

b. Presentase Penurunan (%)

Terapi obat norit® = $\frac{\text{Kontrol positif} - \text{Terapi norit®}}{\text{Kontrol positif}} \times 100 \%$
 $= \frac{8,90 - 1,56}{8,90} \times 100 \%$
 $= 82,47 \%$

Terapi konsentrasi 5% = $\frac{\text{Kontrol positif} - \text{Perlakuan 1}}{\text{Kontrol positif}} \times 100 \%$
 $= \frac{8,90 - 4,85}{8,90} \times 100 \%$
 $= 45,50 \%$

Terapi konsentrasi 10% = $\frac{\text{Kontrol positif} - \text{Perlakuan 2}}{\text{Kontrol positif}} \times 100 \%$
 $= \frac{8,90 - 3,01}{8,90} \times 100 \%$
 $= 66,17 \%$

Terapi konsentrasi 20%

$$\begin{aligned}
 &= \frac{\text{Kontrol positif} - \text{Perlakuan 3}}{\text{Kontrol positif}} \times 100 \% \\
 &= \frac{8,90 - 2,01}{8,90} \times 100 \% \\
 &= 77,41 \%
 \end{aligned}$$



Lampiran 8. Uji Statistika Ekspresi TNF- α

TNF- α

Descriptives

tnf

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol negatif	4	1,4625	,33510	,16755	,9293	1,9957
kontrol positif	4	8,9000	,59397	,29698	7,9549	9,8451
norit	4	1,5600	,13565	,06782	1,3442	1,7758
perlakuan 1	4	4,8550	,68748	,34374	3,7611	5,9489
perlakuan 2	4	3,0125	,22500	,11250	2,6545	3,3705
perlakuan 3	4	2,0175	,21701	,10850	1,6722	2,3628
Total	24	3,6346	2,70356	,55186	2,4930	4,7762

Uji Normalitas

Tests of Normality

kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
tnf kontrol negatif	,205	4	.	,981	4	,906
kontrol positif	,157	4	.	,993	4	,970
norit	,222	4	.	,954	4	,740
perlakuan 1	,201	4	.	,947	4	,700
perlakuan 2	,229	4	.	,895	4	,404
perlakuan 3	,209	4	.	,981	4	,910

Data diatas menunjukan bahwa hasil uji normalitas memiliki nilai signifikansi (p) > 0,05, sehingga H_0 dapat diterima dan data yang digunakan memiliki distribusi yang tersebar normal.

Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

tnf

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,510	5	18	,068

Data diatas menunjukkan bahwa hasil uji homogenitas varian memiliki nilai signifikansi (p) sebesar 0.068, yang berarti nilai tersebut > 0.05 . Oleh karena nilai $p > 0.05$ maka H_0 dapat diterima dan data yang digunakan memiliki ragam yang homogen.

Pengujian nilai normalitas dan homogenitas sampel telah memenuhi syarat sehingga dapat dilanjutkan pengujian menggunakan ANOVA.

Uji ANOVA TNF- α

ANOVA

tnf

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	164,951	5	32,990	187,829	,000
Within Groups	3,162	18	,176		
Total	168,113	23			

Pada hasil uji statistik ANOVA didapat nilai signifikansi (p) $< 0,05$, sehingga H_0 ditolak yang berarti terdapat perbedaan signifikan antar perlakuan.

Uji Tukey

tnf

Tukey HSD^a

kelompok	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
kontrol negatif	4	1,4625			
norit	4	1,5600			
perlakuan 3	4	2,0175			
perlakuan 2	4		3,0125		
perlakuan 1	4			4,8550	
kontrol positif	4				8,9000
Sig.		,448	1,000	1,000	1,000

Lampiran 9. Dokumentasi Kegiatan



Pembuatan infusa daun beluntas



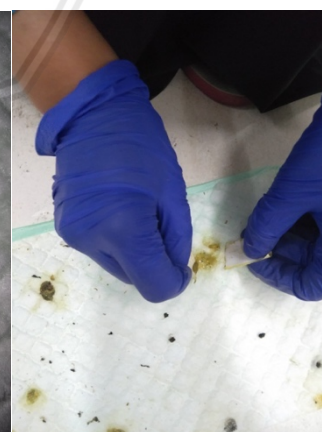
Aklimatisasi selama 9 hari



Sonde *castor oil*



Feses normal



Feses mulai encer



Frekuensi defekasi meningkat



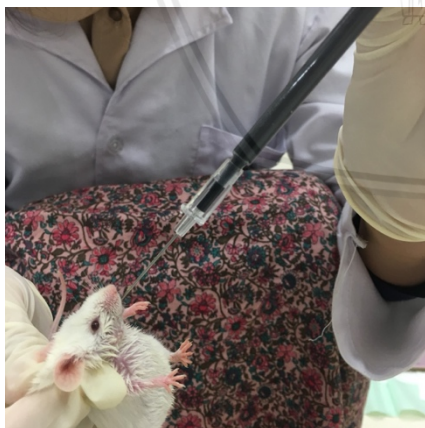
Konsistensi feses lebih encer



Frekuensi defekasi menurun & feses memadat



Sonde infusa daun beluntas



Sonde terapi obat norit®



Obat norit®



Alat sonde mencit



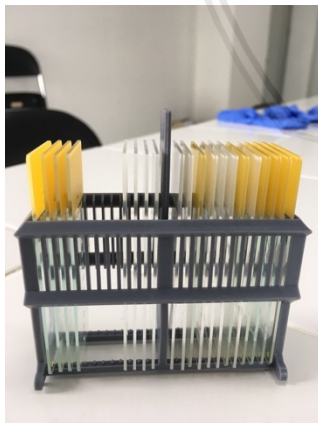
Castor oil yang didapatkan langsung dari Makmur Sejati Malang



Nekropsi



Koleksi organ



Pembuatan preparat pewarnaan IHK

