

repository.ub.ac.id

**SUSU KUDA SUMBAWA SEBAGAI EFEK PREVENTIF
PADA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) MODEL
IBD (*Inflammatory Bowel Disease*) HASIL
INDUKSI INDOMETASIN TERHADAP
JUMLAH SEL RADANG DAN
TNF- α LAMBUNG**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

RISTIA MAHFUZH

155130101111030



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

repository.ub.ac.id

**SUSU KUDA SUMBAWA SEBAGAI EFEK PREVENTIF
PADA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) MODEL
IBD (*Inflammatory Bowel Disease*) HASIL
INDUKSI INDOMETASIN TERHADAP
JUMLAH SEL RADANG DAN
TNF- α LAMBUNG**

SKRIPSI

Oleh:
RISTIA MAHFUZH
155130101111030



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

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

SUMBAWA HORSE MILK AS A PREVENTIVE EFFECT ON RAT (*Rattus norvegicus*) MODEL INFLAMMATORY BOWEL DISEASE RESULTS OF INDOMETHACIN INDUCTION TO NUMBER OF RAD CELLS AND TNF- α GASTRIC

ABSTRACT

Inflammatory Bowel Disease (IBD) is an inflammatory disease of the digestive tract organs including the stomach. . One of the factors causing IBD is the induction of NSAID drugs such as indomethacin. This is because the mechanism of action of indomethacin inhibits the performance of the COX enzyme (cyclooxygenase) which will result in an increase in ROS in gastric tissue and lead to the production of proinflammatory cytokines such as TNF- α . Sumbawa horse milk contains bioactive peptides, namely lisosim and lactoferin that act as antioxidants, anti-inflammatory and antibacterial. This content has the potential to suppress TNF- α expression and repair gastric organ tissue damage due to IBD disease. This study was carried out by giving sumbawa horse milk as a preventive therapy (volume : 0.5 mL, 1 mL, 1.5 mL) in the rat (*Rattus norvegicus*) induced by indomethacin (dose: 15 mg / kgBB). The parameters observed in this study were the expression of TNF- α using the flowcytometry method and calculation of the number of inflammatory cells. While the data analysis of the results of the study was carried out by a one-way ANOVA (Analysis of Variance) method with a confidence level of 95% ($P < 0.05$) and continued with a BNJ (Honestly Significant Difference) follow-up test to find out the most significantly different results by using the SPSS 22.0 application. The results of this study indicate that administration of sumbawa horse milk in the white rat (*Rattus norvegicus*) induction model indomethacin, with a volume of 0.5 mL can improve gastric histopathology, decrease inflammatory cell infiltration, and decrease TNF- α expression by 45.00 ± 4.47 (% cells).

Key words: IBD, indomethacin, sumbawa horse milk, TNF- α , inflammatory cells, gastric.

DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
5.1	Rata-Rata Ekspresi TNF- α pada Lambung Tikus Putih	43
5.2	Rata-Rata Jumlah Sel Radang Organ Lambung Tikus Putih.....	50



**SUSU KUDA SUMBAWA SEBAGAI EFEK PREVENTIF PADA TIKUS PUTIH
(*Rattus norvegicus*) MODEL IBD (*Inflammatory Bowel Disease*) HASIL
INDUKSI INDOMETASIN TERHADAP JUMLAH SEL
RADANG DAN TNF- α LAMBUNG**

ABSTRAK

Inflammatory Bowel Disease (IBD) merupakan penyakit peradangan pada organ saluran pencernaan termasuk lambung. Salah satu faktor penyebab IBD adalah induksi obat-obatan NSAID seperti indometasin. Hal ini disebabkan mekanisme kerja indometasin menghambat kinerja enzim COX (siklooksigenase) yang akan mengakibatkan kenaikan ROS pada jaringan lambung dan menimbulkan produksi sitokin proinflamatori seperti TNF- α . Susu kuda sumbawa memiliki kandungan peptide bioaktif yaitu lisosim dan laktoferin yang berperan sebagai antioksidan, antiinflamasi dan antibakteri. Kandungan tersebut berpotensi dalam menekan ekspresi TNF- α serta memperbaiki kerusakan jaringan organ lambung akibat penyakit IBD. Penelitian ini dilakukan dengan memberikan susu kuda sumbawa sebagai terapi preventif (volume: 0,5 mL, 1 mL, 1,5 mL) pada tikus (*Rattus norvegicus*) model IBD yang diinduksi dengan indometasin (dosis: 15 mg/kgBB). Parameter yang diamati pada penelitian ini berupa ekspresi TNF- α menggunakan metode *Flowcytometry* dan perhitungan jumlah sel radang. Sedangkan analisa data hasil penelitian dilakukan dengan metode ANOVA (*Analysis of Variance*) satu arah dengan tingkat kepercayaan 95% ($P < 0,05$) dan dilanjutkan dengan uji lanjutan BNJ (Beda Nyata Jujur) untuk mengetahui hasil yang paling berbeda nyata dengan menggunakan aplikasi SPSS 22.0. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian susu kuda sumbawa pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) model IBD induksi indometasin, dengan volume pemberian 0,5 mL dapat memperbaiki gambaran histopatologi lambung, penurunan infiltrasi sel radang, serta penurunan ekspresi TNF- α sebesar $45,00 \pm 4,47$ (%sel).

Kata kunci : IBD, indometasin, susu kuda Sumbawa, TNF- α , sel radang, lambung.

DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

:	: Banding
α	: Alpha
%	: Persen
°C	: Derajat Celcius
ATP	: <i>Adenosin Triphosphat</i>
BB	: Berat Badan
IBD	: <i>Inflammatory Bowel Disease</i>
Ig	: <i>Immunoglobulin</i>
IL	: Interleukin
CD	: <i>Crohn's disease</i>
COX	: Siklooksigenase
Kg	: Kilogram
mL	: Milliliter
MN	: <i>Mononuclear</i>
NSAID	: <i>Non Steroid Anti Inflammation Drugs</i>
PGE	: Prostaglandin
PMN	: <i>Polimrfonuklear</i>
ROS	: <i>Reactive Oxide Species</i>
TNF	: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
UC	: <i>Ulcerative colitis</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
GI	: Gastrointestinal

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SINGKATAN.....	xiii
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.....	6
2.1 Etiologi <i>Inflammatory Bowel Disease</i> (IBD).....	6
2.1.1 Terapi	7
2.1.2 Patomekanisme IBD oleh Indometasin	8
2.2 Indometasin	10
2.3 Lambung.....	11
2.3.1 Histologi Lambung.....	12
2.3.2 Mukosa Lambung.....	13
2.3.3 Fisiologi Lambung	15
2.4 Kuda Sumbawa	16
2.5 Susu Kuda Sumbawa.....	16
2.6 Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α)	20
2.7 Sel Radang.....	21
2.6.1 Sel Radang Neutrofil	22
2.6.2 Sel Radang Eosinofil	23
2.6.2 Sel Radang Basofil	23
2.8 Hewan Percobaan Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>).....	24
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	26
3.1 Kerangka Konseptual	26
3.2 Hipotesis Penelitian.....	28
BAB 4 METODE PENELITIAN.....	29
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	29
4.2 Materi Penelitian	29
4.2.1 Alat.....	29
4.2.2 Bahan.....	29
4.3 Tahapan Penelitian	30
4.4 Rancangan Penelitian	30

4.5 Variabel Penelitian	31
4.6 Prosedur Kerja.....	32
4.6.1 Persiapan Hewan Coba.....	32
4.6.2 Induksi IBD dengan Indometasin.....	32
4.6.3 Pemberian Susu Kuda Sumbawa	33
4.6.4 Isolasi Organ Lambung	33
4.6.5 Pembuatan Preparat Histopatologi Lambung.....	34
4.6.6 Perhitungan Jumlah Sel Radang	37
4.6.7 Perhitungan Ekspresi TNF- α dengan <i>Flowcytometry</i>	38
4.7 Analisa Data	39
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN	40
5.1 Kondisi tikus Pasca Induksi Indometasin.....	40
5.2 Susu Kuda Sumbawa Sebagai Efek Preventif pada Tikus Putih (<i>Rattus Norvegicus</i>) Model IBD (<i>Inflammatory Bowel Disease</i>) Hasil Induksi Indometasin Terhadap Ekspresi TNF- α Lambung....	42
5.3 Susu Kuda Sumbawa Sebagai Efek Preventif pada Tikus Putih (<i>Rattus Norvegicus</i>) Model IBD (<i>Inflammatory Bowel Disease</i>) Hasil Induksi Indometasin Terhadap Jumlah Sel Radang Lambung	46
BAB 6 PENUTUP.....	53
DAFTAR PUSTAKA.....	54



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Inflammatory Bowel Disease (IBD) merupakan suatu penyakit inflamasi kronis yang terjadi pada saluran pencernaan dan dimediasi oleh sistem imun. IBD terdiri dari 3 jenis, yaitu *Ulcerative Colitis* (UC), *Crohn's disease* (CD), dan apabila sulit membedakan kedua jenis tersebut, maka bisa dimasukkan pada kategori *indeterminate colitis* (Djojoningrat, 2006). *Crohn's disease* (CD) merupakan inflamasi yang terjadi pada bagian saluran pencernaan meliputi mulut, esophagus, lambung dan usus halus, sedangkan *Ulcerative Colitis* (UC) hanya terbatas pada usus besar, dan rektum (Kappelmen *et al.*, 2007). Gejala umum pada hewan yang mengalami IBD adalah penurunan berat badan terus menerus dan diare (Kathrani, 2011).

Inflammatory Bowel Disease (IBD) pada hewan sering menyerang anjing dan kucing usia tua. Penyakit ini secara tidak langsung diakibatkan oleh sistem reaksi pada sistem imun hipersensitifitas yang tidak mampu membedakan antigen-antigen, termasuk bakteri saluran pencernaan dan pakan (Fitri, 2018). Penyakit *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) dapat disebabkan karena efek samping penggunaan obat anti-inflamasi. Salah satu obat yang sering digunakan adalah golongan obat NSAID yang memiliki efek samping pendarahan pada gastrointestinal, seperti indometasin (Darson *et al.*, 2009). Pemilihan induksi indometasin karena salah satu penyebab IBD adalah efek samping dari penggunaan obat golongan NSAID seperti indometasin (Podolsky, 2002), peradangan yang ditimbulkan tidak terlokalisasi di usus

besar tetapi di seluruh bagian gastrointestinal termasuk lambung, serta indometasin lebih mudah didapatkan (Piepoli *et al.*, 2005).

Indometasin menghambat siklooksigenase 1 (COX-1), sintesis prostaglandin dan produksi mukus yang melindungi saluran pencernaan terhadap infeksi bakteri dan virus (Achkar, 2000). Indometasin dapat meningkatkan produksi Reactive Oxygen Species (ROS), radikal O_2^- , OH- dan H_2O_2 berasal dari kebocoran elektron dari rantai transpor elektron tertentu. Metabolit indometasin dari proses oksidasi desmetil-deschlorobenzoil-indometasin (DMBI) menghasilkan imunoquinone yang reaktif sehingga dapat mengaktivasi neutrofil dan makrofag (proses fagositosis). Pada lambung penurunan sintesis prostaglandin menyebabkan berkurangnya aliran darah mukosa, penurunan sekresi mukus dan bikarbonat, yang mengakibatkan sekresi HCL meningkat. Meningkatnya HCL dalam lambung menyebabkan kerusakan mukosa lambung dan terjadi peningkatan ROS. Selain itu, metabolisme indometasin akan menghasilkan metabolit imunokuinon yang sangat reaktif. Imunokuinon dapat menginduksi terjadinya inflamasi dengan mengaktivasi NF- κ B yang bisa memicu pelepasan sitokin pro-inflamasi seperti Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) dari mukosa lambung (Takeuchi *et al.*, 2003).

Pengobatan kasus IBD dilakukan dengan menggunakan hasil *dairy farm*, yang bertujuan untuk mengurangi keadaan inflamasi dibandingkan dengan pemberian menggunakan bahan kimia. Hasil *dairy farm* yang digunakan yaitu susu kuda Sumbawa. Susu kuda Sumbawa dipercaya dapat

menyembuhkan berbagai penyakit seperti asma, hipertensi, diabetes dan gastrointestinal. Hasil penelitian menunjukkan bahwa susu kuda liar murni mengandung gizi yang tinggi serta komponen bioaktif protein dengan berat molekul rendah yang menunjukkan adanya senyawa lisosim dan senyawa antitripsin, dan mengandung 11 jenis asam amino (esensial dan non esensial) dan 12 jenis asam lemak (jenuh dan tak jenuh). Beberapa komponen bioaktif dalam susu kuda sumbawa yang dapat meningkatkan kesehatan dan mengurangi resiko beberapa penyakit yaitu, laktoferin, peptid antihipertensi, imunoglobulin, asam linoleat, asam butirrat, dan asam laurat (Yun *et al.*, 2012).

Senyawa peptida bioaktif yang terdapat dalam susu kuda Sumbawa dapat mengurangi kerusakan DNA yang disebabkan oleh adanya radikal bebas yang menghambat pertumbuhan mikroba. Senyawa tersebut adalah laktoferin dan peptida lainnya yang mempunyai aktivitas antimikroba, antioksidan, dan antiinflamasi. Kegunaan utama dari senyawa tersebut terutama pada saluran pencernaan yaitu bisa menjadi flora normal di saluran pencernaan. Berdasarkan efek antimikroba, antioksidan dan antiinflamasi, maka penyakit IBD (*Inflammatory Bowel Disease*) dapat dicegah dengan pemberian susu kuda Sumbawa yang dapat menurunkan kadar sitokin pro inflamasi, terutama TNF- α . Pelepasan dari TNF- α dapat mengaktivasi neutrofil sehingga terjadi peningkatan jumlah neutrofil yang signifikan serta akan menyebabkan kerusakan jaringan lambung (Fornai *et al.*, 2011).

Berdasarkan latar belakang diatas maka penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh preventif susu kuda Sumbawa terhadap ekspresi

TNF- α dan jumlah sel radang organ lambung hewan model *Inflammatory Bowel Disease* hasil induksi indometasin.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang sudah diuraikan, maka dapat dirumuskan beberapa permasalahan sebagai berikut :

1. Bagaimana pengaruh preventif susu kuda Sumbawa terhadap jumlah sel radang pada organ lambung tikus (*Rattus Norvegicus*) model IBD hasil induksi indometasin?
2. Bagaimana pengaruh preventif susu kuda Sumbawa terhadap ekspresi TNF- α pada organ lambung tikus (*Rattus Norvegicus*) model IBD hasil induksi indometasin?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang maka penelitian ini dibatasi pada :

1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus Norvegicus*) jantan strain wistar, umur 8-12 minggu dengan berat badan tikus 150-200 gram. Penggunaan hewan coba telah lolos sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya (KEP-UB).
2. Pembuatan model hewan IBD dilakukan dengan induksi indometasin dengan dosis 15 mg/kg yang diberikan satu kali secara peroral dengan menggunakan sonde lambung.
3. Susu kuda Sumbawa yang digunakan dalam penelitian ini diambil langsung dari peternakan kuda di Sumbawa, NTT.

4. Terapi preventif susu kuda Sumbawa diberikan dengan volume 0,5 mL, 1 mL, dan 1,5 mL selama 14 hari secara sonde lambung.
5. Variabel yang diamati pada penelitian ini adalah ekspresi TNF- α dengan metode flowcitometri dan perubahan jumlah sel radang organ lambung dengan pewarnaan HE.

1.4 Tujuan

1. Mengetahui potensi terapi preventif susu kuda sumbawa pada tikus (*Rattus Norvegicus*) model IBD yang diamati dari ekspresi TNF- α organ lambung.
2. Mengetahui potensi terapi preventif susu kuda sumbawa pada tikus (*Rattus Norvegicus*) model IBD yang diamati dari jumlah sel radang organ lambung.

1.5 Manfaat

Maka dari penelitian ini, diharapkan susu kuda Sumbawa dapat menjadi salah satu pilihan alternatif untuk preventif atau pencegahan pada gangguan *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) dan dapat digunakan sebagai kajian ilmiah tentang kemampuan susu kuda sumbawa sebagai preventif penyakit *Inflammatory Bowel Disease* (IBD).

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Etiologi *Inflammatory Bowel Disease* (IBD)

Inflammatory Bowel Disease (IBD) merupakan penyakit yang disebabkan peradangan pada usus yang tidak diketahui penyebabnya, kemungkinan melibatkan reaksi sistem imun tubuh terhadap saluran pencernaan. Secara umum, *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) ditandai dengan diare kronik dengan atau tanpa darah dan nyeri perut. Selain itu kerap dijumpai manifestasi di luar saluran cerna (ekstraintestinal), seperti uveitis, pioderma gangrenosum, eritema nodosum, dan kolangitis (Tamboli, 2007).

Menurut Friedman (2010), terdapat faktor-faktor penyebab aktivasi respon imun pada IBD yaitu organisme patogenik (contoh: *Giardia sp.*; *Toxoplasma sp.*; *Mycobacteria sp.*), adanya respon imun terhadap antigen intraluminal (contohnya protein dari susu sapi), karena efek samping obat-obatan seperti penggunaan NSAID, serta adanya agen penyebab idiopatik seperti Lymphocytic-plasmacytic enteritis (LPE), Eosinophilic gastroenterocolitis (EGE), Granulomatous enteritis, dan Neutrophilic enteritis. *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) muncul dengan gejala diare yang lama (diare kronik) yang disertai dengan perdarahan buang air besar dan rasa sakit pada perut akibat kerusakan mukosa dan ulseratif pada saluran gastrointestinal, muntah, adanya pendarahan pada rektum, nyeri abdominal, demam dan penurunan berat badan (Hall, 2012).

Penyakit IBD berawal dari faktor agen penyebab serta menurunnya toleransi organ intestinal pada flora normal sehingga menyebabkan terjadinya

inflamasi kronis pada usus. Salah satu penyebab dari IBD yaitu penggunaan *Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs* (NSAIDs) yang menyebabkan penghambatan enzim siklooksigenase baik COX-1 maupun COX-2. Dampak dari penurunan enzim siklooksigenase menyebabkan produksi prostaglandin (PGE₂) menurun yang diikuti dengan peningkatan sekresi HCL dan penurunan sekresi mukus sehingga lambung mengalami inflamasi. Inflamasi tersebut menyebabkan kerusakan jaringan dan meningkatkan aktivitas fagositosis dari makrofag. Fagositosis makrofag merangsang keluarnya sitokin proinflamatori, peningkatan mediator inflamasi, serta peningkatan produksi *Reactive Oxide Species* (ROS) yang akhirnya menyebabkan terjadinya *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) (Kaser *et al.*, 2010).

2.1.1 Terapi

Terapi pada IBD (*Inflammatory Bowel Disease*) dilakukan untuk mengurangi proses inflamasi yang terjadi, mencegah komplikasi atau perburukan penyakit tersebut, memperbaiki status nutrisi dan kualitas hidup. Tujuan terapi dilakukan untuk mengendalikan proses inflamasi, menghilangkan gejala klinis, mencegah komplikasi, dan mencegah relaps, mencegah dan mengurangi relaps, dengan obat aminosalisilat (sulfasalasin, mesalamin), kortikosteroid (prednisone, metilprednisone), imunomodulator (azathioprine), anti-tumor nekrosis factor (infliximab), anti-inflamasi (NSAIDs), dan antibiotik (metronidazole). Tidak hanya dengan terapi obat, banyak penelitian yang melakukan pemberian probiotik dan prebiotik pada penyakit IBD

(*Inflammatory Bowel Disease*). Probiotik dapat mengubah flora traktus gastrointestinal dengan mekanisme kompetitif, menghasilkan zat antimikroba, atau mempengaruhi respon kekebalan lokal. Ada juga yang mengatakan bahwa interaksi probiotik dengan sel epitel dapat mempercepat penyembuhan proses inflamasi. Efek prebiotik dapat ditingkatkan dengan pemberian prebiotik yang dapat merangsang pertumbuhan probiotik (Hyams, 2004).

2.1.2 Patomekanisme IBD oleh Indometasin

Indometasin bekerja dengan menghambat enzim siklooksigenase yang mengkonversi asam arakhidonat menjadi Prostaglandin (PGI₂), prostaglandin E₂ (PGE₂) dan Tromboxan A₂ (TXA₂). Enzim siklooksigenase (COX) mempunyai dua isoform yaitu COX 1 dan COX 2. Kedua isoform ini mengkatalisir perubahan asam arakhidonat menjadi endoperoxidase (termasuk di dalamnya prostaglandin). Pada lambung, peran COX 1 lebih dominan dibandingkan COX 2. COX 1 menjaga permukaan mukosa lambung tetap utuh dengan mencegah pembentukan asam lambung, meningkatkan produksi bikarbonat dan mucus. Selain itu COX 1 memelihara homeostatis di saluran pencernaan, ginjal, dan trombosit. COX 2 yang terdapat pada makrofag, leukosit, fibroblas, dan endothel berperan dalam pembentukan prostaglandin dalam kondisi inflamasi akut (Valle, 2001).

Prostaglandin berperan penting pada proses-proses fisiologis normal dan pemeliharaan fungsi regulasi berbagai organ. Pada selaput

lendir traktus gastrointestinal, prostaglandin berefek protektif. Prostaglandin meningkatkan resistensi selaput lendir terhadap iritasi mekanis, osmotis, termis atau kimiawi. Prostaglandin juga meningkatkan aliran darah ke mukosa lambung dan mengurangi sekresi asam lambung. Prostaglandin pada lambung berfungsi mempertebal lapisan mukosa, menurunkan pH, memacu sekresi bikarbonat dan meningkatkan aliran darah ke mukosa lambung (Kartasmita, 2002).

Indometasin menghambat COX 1 dan COX 2 tetapi lebih efektif menghambat COX 1 sehingga sering menimbulkan efek samping pada saluran pencernaan, penghambatan selektif terhadap COX 2 dapat menghilangkan gejala inflamasi, yang dalam hal ini menguntungkan bagi penderita. Namun bahan-bahan atau obat yang selektif terhadap COX 2 bukan berarti tidak mempunyai efek samping pada dosis terapeutik (Hardman, 2001).

Pemberian indometasin pada tikus putih galur wistar berpengaruh pada peradangan dan nekrosis mukosa lambung. Penghambatan aktivitas enzim siklooksigenase oleh indometasin dalam metabolisme asam arakhidonat akan menyebabkan biosintesis prostaglandin, protasiklin, dan tromboksan terhambat. Prostaglandin berperan penting pada timbulnya nyeri, demam, dan reaksi-reaksi peradangan, maka obat antiradang non steroid melalui penghambatan aktivitas enzim siklooksigenase, mampu menekan gejala-gejala tersebut (Subrahmanyam *et al.*, 2003).

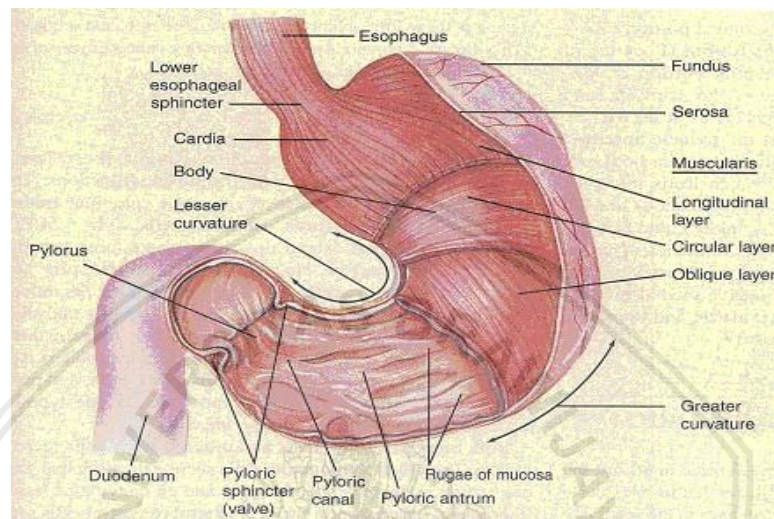
2.2 Indometasin

Indometasin adalah salah satu obat yang termasuk ke dalam golongan NSAIDs (*Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs*) yang digunakan sebagai obat anti inflamasi pada tubuh. NSAIDs (*Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs*) digunakan untuk pengobatan beberapa penyakit (Taiwo, 2008). Penggunaan NSAIDs (*Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs*) dapat menimbulkan efek samping yaitu toksisitas pada gastrointestinal seperti pembentukan erosi, perdarahan pada saluran pencernaan atas. Efek samping yang bisa terjadi yaitu dapat mengakibatkan kolitis dan inflamasi pada usus halus (Klein dan Eliakim, 2010).

Indometasin akan diserap oleh sel epitel yang menghambat produksi dua enzim yaitu enzim siklooksigenase-1 (COX-1) dan siklooksigenase-2 (COX-2). Penghambatan terhadap enzim (COX-1) dan (COX-2) dapat menghambat produksi prostaglandin, menurunkan produksi mukus dan peningkatan motilitas usus. Penurunan produksi mukus akan menyebabkan perlindungan mukosa pada usus berkurang. Selain itu indometasin akan menghambat fosforilasi oksidatif ATP (*Adenosin Triphosphat*) di mitokondria. Fosforilasi oksidatif adalah proses pembentukan ATP (*Adenosin Triphosphat*) di dalam sel. Penghambatan fosforilasi oksidasi ATP (*Adenosin Triphosphat*) akan mengakibatkan apoptosis pada sel. Sel yang mengalami apoptosis akan menghasilkan ROS (*Reactive Oxygen Species*). Adanya pengikatan ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang berlebih akan mengakibatkan keadaan stress oksidatif. Keadaan stress oksidatif di dalam jaringan akan menyebabkan

peroksidasi lipid sehingga mengakibatkan kerusakan pada epitel lambung (Takeuchi *et al.*, 2003).

2.3 Lambung



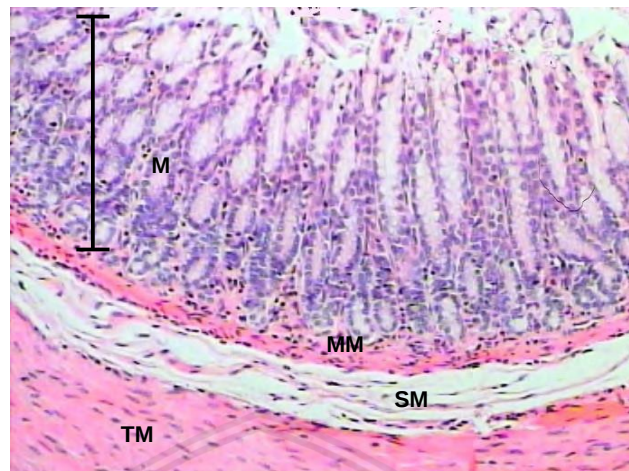
Gambar 2.1 Anatomi eksternal dan internal lambung mamalia.

Lambung atau gaster merupakan salah satu organ pencernaan yang penting bagi tubuh makhluk hidup. Pada lambung, terjadi proses penghancuran makanan secara mekanis maupun kimiawi menjadi senyawa yang lebih mudah untuk diserap ke dalam tubuh dengan bantuan enzim-enzim di dalam lambung. Lambung terletak di bagian kiri dari diafragma bagian belakang, dimana diafragma merupakan suatu lembaran muskuler berbentuk kubah sebagai pemisah antara rongga dada dan rongga perut. Lambung sebagai salah satu organ pencernaan memiliki fungsi utama sebagai tempat penumpukan dan penyimpanan makanan. Pada akhir lambung menuju usus, terdapat tempat yang merupakan jalan masuk getah pankreas menuju usus halus, dan usus yang melekat dengan pankreas dinamakan duodenum (Murti, 2003).

Lambung (ventrikulus) merupakan kantung yang terletak pada sebelah kiri rongga perut. Pada lambung, terdapat 3 bagian utama, yaitu bagian atas yang berbatasan dengan esofagus (kardiak), bagian tengah yang membulat (fundus), dan bagian paling bawah yang akan menuju usus (pilorus) (Gambar 2.1). Bagian kardiak berlekatan dengan organ hati, dan berhubungan dengan esofagus dan kerongkongan, sedangkan pilorus, berhubungan langsung dengan usus dua belas jari (duodenum). Pada masing-masing bagian (kardiak dan pilorus), terdapat klep atau katup yang merupakan tempat keluar masuknya makanan pada lambung (saktiyono, 2004).

2.3.1 Histologi Lambung

Lambung dibagi menjadi bagian depan (nonkelenjar), dimana memiliki mukosa dengan epitel berbentuk pipih berlapis dan tertutupi lapisan keratin. Bagian kedua pada lambung yaitu lambung nonkelenjar yang bagian mukosanya memiliki epitel peralihan menjadi silindris sebaris. Histologi umum lambung dibedakan menjadi beberapa lapisan, diantaranya lapisan mukosa, submukosa, muskularis dan serosa. Gambar 2.2 berikut merupakan gambaran histopatologi lambung menurut Puspitasari (2008).

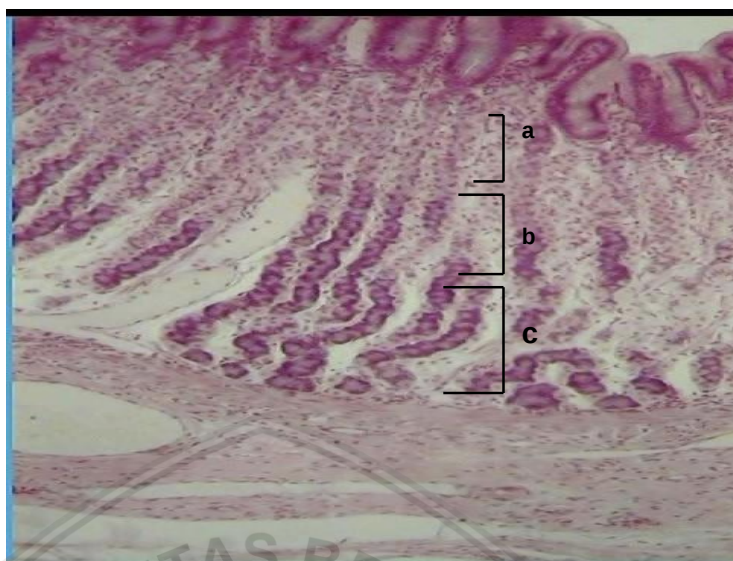


Gambar 2.2 Histologi lambung tikus bagian pilorus.
M= mukosa; MM= muskularis mukosa;
SM= submukosa; TM= tunika muskularis.
(Puspitasari, 2008).

2.3.2 Mukosa Lambung

Membran mukosa lambung berbentuk irreguler seperti tiang, membentuk lipatan longitudinal yang disebut *rugae* dan jumlahnya tergantung pada tinggi rendahnya rentangan organnya. Membran mukosa terdiri dari tiga komponen yaitu epitelium, lamina propia dan muskularis mukosa. Epitel permukaan mukosa ditandai oleh adanya lubang sumuran yang terletak rapat satu dengan yang lain dan dilapisi epitel sejenis. Bentuk dan kedalaman dari sumuran ini serta sifat kelenjarnya berbeda pada tiap bagian lambung. Di bawah epitel terdapat suatu lamina propia dan lapisan di bawah sumuran ini mengandung kelenjar lambung.

Kelenjar lambung berbentuk simpel dan tipe tubular yang meluas hingga basal lubang sumuran. Kelenjar lambung dibagi menjadi tiga daerah yaitu isthmus, leher dan basal (Gambar 2.3).



Gambar 2.3 Histologi kelenjar lambung bagian fundus yang terdiri atas isthmus (a), leher (b) dan basal (c). (Puspitasari, 2008).

Sel lendir pada bagian leher memiliki jumlah relatif sedikit, dan berfungsi untuk mensekresikan mukus pada lambung. Sel yang melapisi bagian bawah kelenjar pada lambung memiliki bentuk serosa yang khas, mengandung sebagian besar mitokondria serta granula sekresi mengandung pepsinogen. Sel pelapis bagian bawah kelenjar lambung terdiri atas sel-sel utama (*peptic cell*) yang menyebabkan fungsi utamanya dalam sekresi pepsinogen (Puspitasari, 2008).

2.3.3 Fisiologi Lambung

Lambung memiliki dua fungsi utama yaitu, fungsi pencernaan dan fungsi motorik. Fungsi pencernaan dan sekresi lambung berkaitan dengan pencernaan protein, sintesis dan sekresi enzim-enzim pencernaan. Selain mengandung sel-sel yang

mensekresi mukus, mukosa lambung juga mengandung dua tipe kelenjar tubular yang penting yaitu kelenjar oksintik (gastrik) dan kelenjar pilorik. Kelenjar oksintik terletak pada bagian corpus dan fundus lambung, meliputi 80% bagian proksimal lambung. Kelenjar pilorik terletak pada bagian antral lambung. Kelenjar oksintik bertanggung jawab membentuk asam dengan mensekresikan mukus, asam hidroklorida (HCl), faktor intrinsik dan pepsinogen. Kelenjar pilorik berfungsi mensekresikan mukus untuk melindungi mukosa pilorus, juga beberapa pepsinogen, renin, lipase lambung dan hormon gastrin (Guyton dan Hall 2007).

Fungsi motorik lambung terdiri atas penyimpanan sejumlah besar makanan sampai makanan dapat diproses dalam duodenum, pencampuran makanan dengan sekresi lambung hingga membentuk suatu campuran setengah cair yang disebut kimus (*chyme*) dan pengosongan makanan dari lambung ke dalam usus dengan lambat pada kecepatan yang sesuai untuk pencernaan dan absorpsi dalam usus halus (Guyton dan Hall 2007).

2.4 Kuda Sumbawa

Kuda sumbawa merupakan salah satu rumpun kuda lokal Indonesia yang mempunyai sebaran asli geografis di Pulau Sumbawa, Provinsi Nusa Tenggara Barat, dan telah ditetapkan melalui Keputusan Menteri Pertanian Nomor 2917/Kpts/OT.140/6/2011 tanggal 17 Juni 2011. Kuda sumbawa mempunyai ciri khas yang tidak dimiliki oleh kuda dari bangsa lainnya dan

merupakan sumber daya genetik ternak Indonesia yang perlu dijaga dan dipelihara kelestariannya sehingga dapat memberikan manfaat dalam peningkatan kesejahteraan dan kemakmuran rakyat Indonesia dalam hal industri pangan. Ciri Spesifik Sifat Kualitatif pada kuda Sumbawa yaitu warna tubuh dominan berwarna terang sampai gelap, bentuk tubuh kompak dan relatif kecil dengan punggung rata, sedangkan pada tipe pacu punggung agak cekung, hidung dan mulut relatif besar, ekor panjang dan berbulu lebat. Sedangkan ciri spesifik sifat kuantitatif dari kuda Sumbawa yaitu memiliki tinggi pundak untuk jantan $\pm 120,80$ cm dan betina $\pm 113,25$ cm. Untuk bobot badan kuda Sumbawa yaitu berkisar antara $\pm 213,40$ kg sampai $\pm 281,75$ kg, dan persentase karkas sebesar 35%. Umur pubertas pada kuda Sumbawa yaitu 12– 18 bulan dengan siklus birahi 22 – 23 hari dan lama kebuntingan sekitar 330 – 350 hari dengan tingkat produksi susu sebanyak 1 – 2 liter/ekor/hari (Ditjen PKH, 2015).

2.5 Susu Kuda Sumbawa

Susu adalah salah satu diantara hasil produksi peternakan yang penting dan mempunyai nilai gizi yang tinggi. Susu merupakan sumber protein hewani paling baik, tetapi susu juga mempunyai kelemahan karena merupakan media yang baik untuk pertumbuhan mikroba, sehingga mudah rusak dan bahkan dapat bertindak sebagai sumber penularan penyakit. Komponen bioaktif susu dapat berasal dari berbagai sumber, termasuk protein, lemak, vitamin dan mineral. Salah satu sumber yang paling dominan berasal dari protein. Casein merupakan salah satu sumber protein utama susu,

yang berjumlah sekitar 80% total protein susu. Sedangkan whey merupakan bentuk protein lainnya dengan kontribusi sekitar 20% total protein susu. Sedangkan Lemak tidak terbatas pada trigliserida saja, tetapi semua yang termasuk dalam golongan lipida (Ressang *et al.*, 2009).

Susu kuda sumbawa mempunyai kelebihan karena susu kuda sumbawa sudah terfermentasi secara alami sehingga menghambat pertumbuhan mikroba, tidak mudah rusak dan bahkan dapat bertindak sebagai tujuan pengobatan. Susu kuda Sumbawa bersifat asam, pH 3-4, tidak mengandung bakteri pathogen, nilai gizinya baik, berwarna putih hingga biru putih dan mempunyai rasa manis disebabkan kadar laktosa tinggi (6,5%). Kadar lemak dan proteinnya rendah yaitu 1.09% dan 1.89%. Susu kuda sumbawa merupakan bahan makanan tradisional yang diduga mempunyai berbagai manfaat gizi dan kesehatan. Bahkan susu kuda dapat digunakan sebagai penunjang kekebalan tubuh karena adanya kandungan vitamin dan mineral serta kandungan bioaktif susu yaitu immunoglobulin dan lactoferin (Yun *et al.*, 2012).

Susu kuda sumbawa mengandung zat bioaktif dengan berat molekul yang rendah yaitu antara 14.400 kD (Lisosim) dan 21.000 kD (anti tripsin). Lisosim memiliki aktivitas antibakterial. Enzim ini berfungsi dalam kaitannya dengan laktoferin dan imuno-globulin A (*IgA*). Lisosim efektif terhadap *Escherichia coli* bila bekerja sama dengan *IgA* yang juga banyak terdapat pada susu. Dengan demikian, risiko sakit perut atau diare akibat mengonsumsi susu kuda dapat dikurangi. Kemampuan lisosim dalam

membatasi migrasi *neutrofil* ke jaringan yang rusak memberikan kemungkinan untuk menggunakan lisosim sebagai agen *antiinflamatori* (antiradang). Sedangkan enzim tripsin yang ada dalam usus dimana fungsinya sebagai pemecah protein akan dihambat oleh faktor antitripsin agar imunoglobulin pelindung tidak akan dipecah oleh tripsin. Keunggulan lain dari susu kuda adalah terdapatnya aktifitas anti mikroba yang sangat kuat, hal tersebut tidak ditemukan pada susu sapi (Yun *et al.*, 2012).

Menurut Diana (2005) diketahui bahwa susu kuda Sumbawa mempunyai keistimewaan yaitu tidak mengalami penggumpalan dan kerusakan meskipun tidak dipasteurisasi dan tanpa diberi bahan pengawet apapun. Keunikan lainnya susu ini tahan disimpan pada suhu kamar sampai 5 bulan. Sifat ini memberi petunjuk bahwa dalam susu kuda Sumbawa terkandung zat yang dapat menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri yang berupa senyawa antimikroba alami.

Lisozim (BM 17 kDa) dan laktoferin (BM 75 kDa) ialah protein indigenus yang berfungsi sebagai senyawa antimikroba. Salah satu ciri khas susu kuda ialah kandungan lisozimnya yang tinggi. Selain itu, lisozim susu kuda dilaporkan sangat termostabil, resisten terhadap asam dan protease. Kadar laktoferin susu kuda memiliki kapasitas pengkelat Fe yang sebanding susu ASI. Lisozim dan laktoferin bekerja secara sinergis sebagai antimikroba dan antiinflamasi (Uniacke-Lowe *et al.*, 2010).

Laktoferin merupakan protein yang bersifat antimikroba dan antivirus, oleh karena itu susu berlaktoferin tinggi dapat berpotensi sebagai

pangan kesehatan dan pengobatan. Laktoferin merupakan asam amino glikoprotein-703 yang berasal dari susu. Hasil penelitian Sacharczuk *et al.* (2005), menunjukkan laktoferin pada mamalia mempunyai fungsi utama yaitu berhubungan langsung dengan sistem kekebalan tubuh. Berdasarkan kemampuannya dalam mengikat Fe, laktoferin mempunyai peran yang penting dalam pengikatan Fe di mukosa usus dan beraksi sebagai agen bakteriostatik dengan mengikat Fe yang berasal dari Fe yang diperlukan untuk pertumbuhan bakteri. Keberadaannya di neutrofil dan pelepasannya selama radang, memperkuat dugaan bahwa laktoferin juga berperan dalam pemusnahan fagosit dan imunitas. Sebagai tambahan, laktoferin dapat bergantung pada pengikatan Fe, contoh sebagai faktor pertumbuhan, dan sebagai suatu agen antibakteri.

Lisozim atau nasetil neuramide glikan hidrolase, merupakan suatu enzim penghidrolisis yang dapat membunuh kuman tertentu. Lisozim merupakan suatu protein dengan berat molekul 14.600, yang terdiri atas 129 asam amino berbentuk rantai polipeptida tunggal, dengan empat ikatan silang. Lisozim merupakan suatu senyawa protein yang mengandung antibiotik yang dapat menghancurkan beberapa bakteri, sehingga dapat membantu untuk mencegah terjadinya kerusakan yang dikarenakan oleh aktivitas bakteri (Bollag *et al.*, 1996). Fungsi lisozim adalah melisis sel bakteri sebagai pertahanan konstitutif melawan bakteri patogen. Beberapa bakteri gram positif sangat sensitif terhadap lisozim meskipun dalam konsentrasi yang sangat rendah. Lisozim efektif terhadap *Escherichia coli* bila bekerja sama

dengan IgA yang juga banyak terdapat pada susu. Dengan demikian, risiko sakit perut atau diare akibat mengonsumsi susu kuda dapat dikurangi. Kemampuan lisozim dalam membatasi migrasi *neutrofil* ke jaringan yang rusak memberikan kemungkinan untuk menggunakan lisozim sebagai agen *antiinflamatori* (antiradang) (Yun *et al.*, 2012).

2.6 Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α)

Tumor Necrosis Factor Alpha adalah sitokin proinflamasi utama yang memiliki berat molekul sebesar 26 kDa yang kemudian dipecah menjadi 17 kDa. TNF- α berfungsi sebagai mediator penting untuk menjembatani antara respon imun spesifik dengan proses inflamasi akut. TNF- α adalah suatu sitokin yang bersifat pleiotropik, yang sebagian besar dihasilkan oleh monosit, makrofag, dan sel T (Gonzales, 2008). Penyebab teraktivasi TNF- α adalah faktor-faktor eksogen dan endogen. Faktor eksogen merupakan antigen atau benda asing yang berasal dari luar tubuh seperti enterotoksin, protein dinding sel jamur, virus, dan komponen parasit. Faktor endogen meliputi sitokin-sitokin yang lain dibawah kondisi yang sama yakni IL-1, IFN- γ , TNF- α (Green *et al.*, 2000).

Akibat adanya faktor eksogen dan endogen, dapat memicu aktivasi makrofag (proses fagositosis) yang dilakukan sebagian besar oleh ROS. Keadaan ini direspon oleh sistem imun dengan mengaktivasi I κ B yang mengalami degradasi proteosomal dan NF- κ B mengalami transkripsi di nukleus. Di dalam nukleus, faktor NF- κ B berikatan dengan target gen dan menstimulasi terjadinya transkripsi gen inflamasi. Aktivasi NF- κ B yang

mengalami peningkatan direspon oleh makrofag untuk memproduksi dan mensekresi sitokin proinflamasi TNF- α sebagai indikator terjadinya inflamasi (Giugliano *et al.*, 2006). Cara kerja sitokin TNF- α adalah dengan mengatur aktivasi, diferensiasi, dan proliferasi sel dalam proses inflamasi. Meningkatnya kadar TNF- α terdapat pada keadaan inflamasi akut dan kronik (Popa *et al.*, 2007).

2.7 Sel Radang

Sel radang merupakan sel-sel yang muncul akibat suatu proses inflamasi (peradangan) pada jaringan. Sel-sel radang tersebut biasanya dapat ditemukan pada eksudat tempat terjadinya inflamasi (radang), serta jaringan ikat (sel-sel fibrosis). Yang termasuk sel PMN (*polymorphonuclear*) adalah sel neutrofil, eosinofil, dan basofil. Yang termasuk sel MN (*mononuclear*) adalah sel limfosit, monosit, dan sel plasma (Sudiono, dkk., 2001).

2.7.1 Sel radang Neutrofil

Sel radang seperti neutrofil banyak terdapat pada respon inflamasi akut, berkembang didalam sum-sum tulang belakang (medulla spinalis) yang dikeluarkan menuju sirkulasi. Sel ini merupakan salah satu leukosit terbanyak yang beredar, yaitu sebanyak 60-70% dari leukosit yang beredar di dalam tubuh. Neutrofil memiliki 1 inti dan 2-5 lobus. Banyaknya sitoplasma pada neutrofil terisi oleh granula-granula spesifik (0,3-0,8 μ m) yang berwarna merah muda. Granula pada neutrofil ada dua macam, yaitu azurofilik dimana mengandung enzim lisosom dan

peroksidase dan granul spesifik yang lebih kecil mengandung fosfatase alkali serta zat yang bersifat bakterisidal dinamakan fagositin. Neutrofil merupakan pertahanan seluler yang aktif memfagosit partikel kecil (Effendi, 2003).

Neutrofil secara morfologis terdiri dari nukleus yang memiliki 3 atau lebih bolus yang berhubungan dan sitoplasma berisi lisosom serta granula khusus. Neutrofil dijumpai saat tingkat inflamasi akut. Walaupun fungsi utama neutrofil adalah memfagositosis bakteri, neutrofil juga diperkirakan memfagositosis serta melisiskan fibrin dan debris seluler. Migrasinya neutrofil menuju pembuluh darah diakibatkan oleh suatu proses yang disebut dengan kemotaksis arena bakteri atau komplemen tertentu yang melepaskan senyawa kimia bersifat toksik pada tubuh. Neutrofil memiliki kisaran umur yang pendek, dimana mereka akan dihancurkan pada tempat terjadinya inflamasi bila cairan jaringan turun dengan pH 6,5. Perubahan jaringan ini disebabkan produksi asam yang meningkat selama proses fagositosis. Perusakan neutrofil juga menyebabkan pelepasan enzim proteolitik, pepsin dan cathepsin, yang berakibat lisisnya jaringan (Hoffbran, 2006).

2.7.2 Sel Radang Eosinofil

Eosinofil merupakan 2-5% dari sel darah putih. Eosinofil juga memiliki fungsi sebagai fagositosis. Eosinofil mengandung

berbagai macam granul yang bersifat toksik dan bila dilepas dapat menghancurkan sel sasaran. Fungsi utama eosinofil adalah melawan infeksi parasit dan dapat juga memakan kompleks antigen antibodi (Hoffbran, 2006).

2.7.3 Sel Radang Basofil

Jumlah sel basofil yang ditemukan dalam darah sangatlah sedikit yaitu $<0,5\%$ dari seluruh sel darah putih. Basofil juga diduga dapat fagositosis. Basofil melepaskan bahan-bahan yang mempunyai aktivitas biologik, antara lain meningkatkan vaskuler, respons inflamasi dan mengerutkan otot polos bronkus (Hoffbran, 2006).

2.8 Hewan Percobaan Tikus Putih (*Rattus novergicus*)

Hewan coba merupakan hewan yang dipelihara dan ditenakan untuk dimanfaatkan sebagai hewan model dengan tujuan untuk mempelajari dan mengembangkan pengetahuan melalui kegiatan penelitian. Tikus putih (*Rattus novergicus*) merupakan salah satu hewan coba yang sering digunakan untuk kegiatan penelitian karena memiliki kecocokan DNA dengan manusia hingga 99%. Berat badan tikus jantan dewasa mencapai 450-520 gram, sedangkan pada tikus betina mencapai 250-300 gram dengan masa hidup berkisar antara 2.5-3.5 tahun (Alexandru, 2011). Bentuk fisik dari tikus putih (*Rattus novergicus*) strain Wistar dapat dilihat pada **Gambar 2.4.**



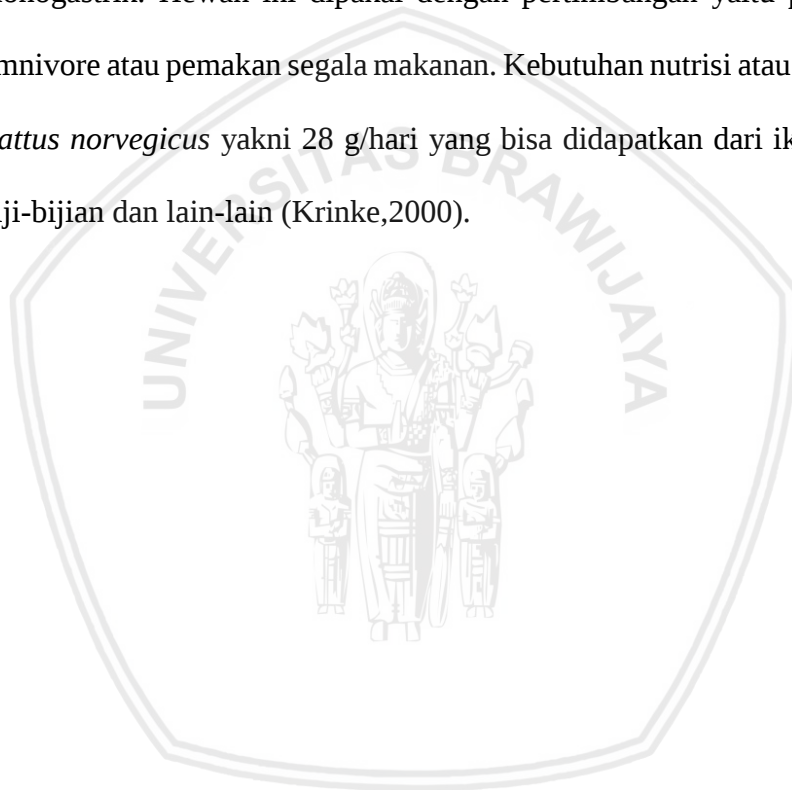
Gambar 2.4 Tikus putih (*Rattus novrgicus*) strain Wistar (Alexandru, 2011)

Menurut Myers dan Armitage (2004), kedudukan tikus putih (*Rattus novergicus*) dalam taksonomi hewan secara lengkap adalah sebagai berikut:

Kerajaan : *Animalia*
 Divisi : *Chordata*
 Kelas : *Mammalia*
 Ordo : *Rodentia*
 Subordo : *Myomorpha*
 Famili : *Muridae*
 Genus : *Rattus*
 Spesies : *Rattus novergicus*

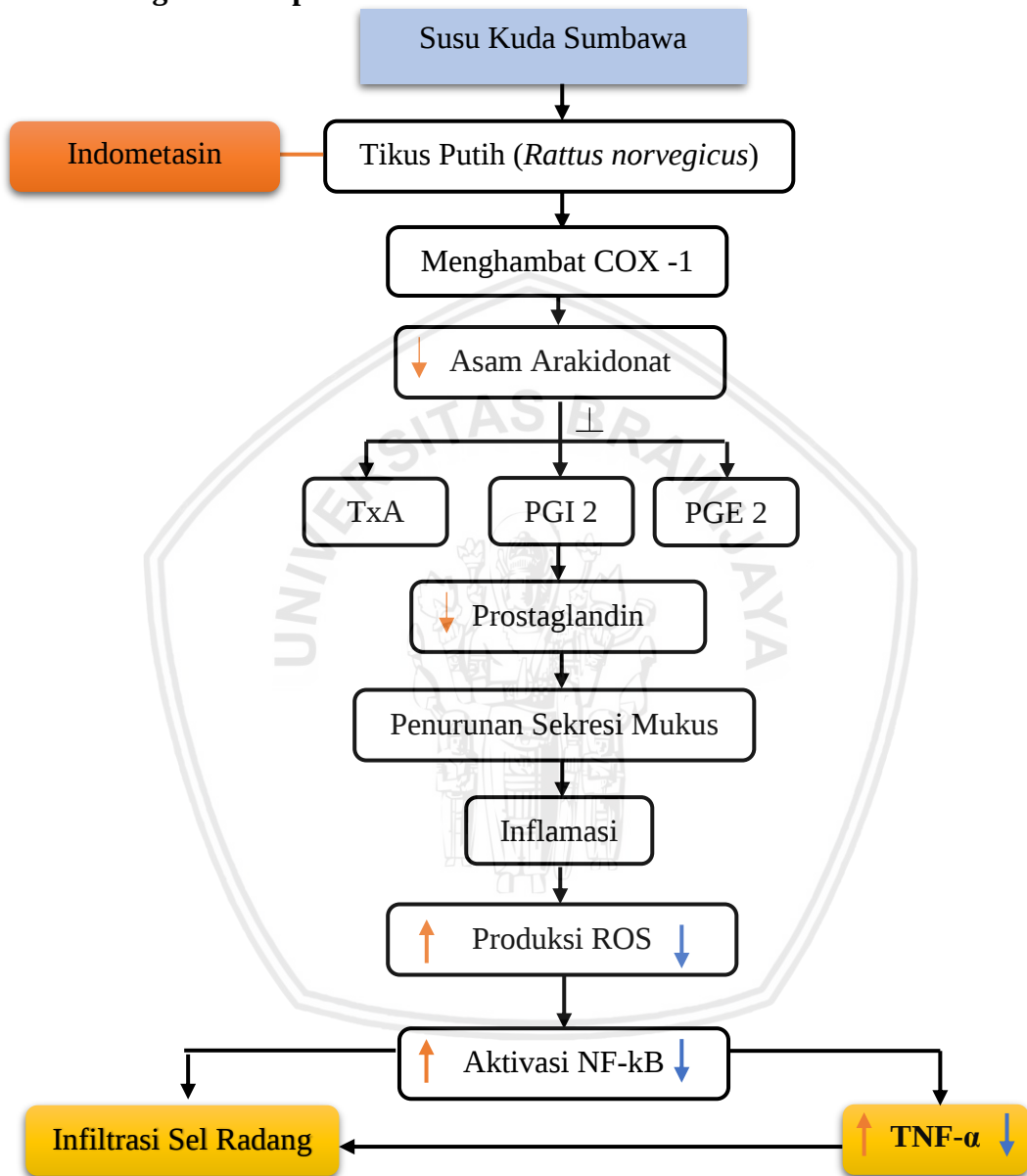
Tikus putih strain Wistar memiliki karakteristik yaitu kepala lebar, telinga memanjang dan ukuran ekor yang lebih pendek dibandingkan dengan panjang badan tikus. Tikus Wistar termasuk ke dalam tikus albino

yang masuk dalam spesies *Rattus norvegicus*, yang pertama kali dikembangkan oleh institut Wistar pada tahun 1906 untuk kepentingan penelitian biologi dan kesehatan (Alexandru, 2011). *Rattus norvegicus* adalah hewan percobaan paling populer dalam penelitian yang berkaitan dengan pencernaan karena memiliki saluran pencernaan dengan tipe monogastrik. Hewan ini dipakai dengan pertimbangan yaitu pola makan omnivore atau pemakan segala makanan. Kebutuhan nutrisi atau pakan tikus *Rattus norvegicus* yakni 28 g/hari yang bisa didapatkan dari ikan, daging, biji-bijian dan lain-lain (Krinke, 2000).



BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1. Kerangka Konseptual Penelitian

↕ : Pengaruh Induksi Susu Kuda

↕ : Efek Induksi Indometasin

⊥ : Menghambat

■ : Variabel yang diamati

■ : Preventif susu kuda

■ : Induksi Indometasin

Susu kuda sumbawa memiliki kandungan peptide bioaktif (Lisosim dan laktoferin) yang berfungsi sebagai antioksidan, antiinflamasi dan antibakteri. Laktoferin berpotensi menurunkan proses inflamasi yang akan menghambat pengeluaran sitokin proinflamasi seperti TNF- α , IL-6, dan IL-1 β dan terbukti berfungsi sebagai antioksidan. Lisosim memiliki aktifitas antibakteri, kemampuan lisosim dalam membatasi migrasi neutrofil ke jaringan yang rusak memberikan kemungkinan untuk menggunakan lisosim sebagai agen inflamatori.

Induksi indometasin pada tikus putih dapat menyebabkan Inflammatory Bowel Disease (IBD). Indometasin akan menghambat enzim siklooksigenase yang terdiri dari isoenzim COX-1 dan COX-2 yang akan berakibat hambatan pada prostaglandin. Kedua isoform ini mengkatalisir perubahan asam arakhidonat menjadi endoperoksidase (termasuk di dalamnya prostaglandin). COX-1 menjaga permukaan mukosa lambung tetap utuh dengan mencegah pembentukan asam lambung, meningkatkan produksi bikarbonat dan mucus. Hambatan dari COX-1 mengakibatkan prostaglandin menurun dan hal ini akan menurunkan ketahanan pada mukosa saluran pencernaan. Ketahanan mukosa saluran pencernaan ditentukan oleh faktor defensif yang terdiri dari lapisan pre epitel, epitel, dan sub epitel. Peranan mukus dan sekresi bikarbonat merupakan faktor utama dalam pencegahan primer maupun sekunder lesi mukosa akut oleh indometasin. Selanjutnya terjadi pembengkakan disertai kerusakan sel epitel dan inflamasi. Kerusakan sel-sel lambung menyebabkan terjadi peningkatan molekul-molekul radikal

bebas seperti H_2O_2 , O_2^- , dan OH^- . Oksigen reaktif yang terlepas menyebabkan ketidaksinambungan antara radikal bebas, dan antioksidan intrasel, sehingga menimbulkan stress oksidatif dalam tubuh yang menyebabkan peningkatan dari ROS (Reactive Oxygen Spesies). Stress oksidatif memicu fosfolirasi inhibitor NF- κ B dan aktivasi NF- κ B yang nantinya akan bermigrasi dalam nukleus dan mengaktifkan lebih banyak makrofag lainnya. Makrofag akan mengaktifasi sitokin pro inflamasi. Sitokin proinflamasi akan memicu migrasi sel radang ke jaringan, salah satunya TNF- α . Peningkatan produksi TNF- α akan mengakibatkan agregasi dan aktivasi neutrofil sehingga menyebabkan terjadinya inflamasi dan kerusakan jaringan pada lambung. Kandungan laktoferin dan lisosim dalam susu kuda sumbawa dapat membatasi migrasi neutrofil ke jaringan yang rusak sebagai agem inflamatori (anti radang). Inflamasi yang terjadi pada lambung meningkatkan kerusakan epitel, berpengaruh terhadap histopatologi mukosa dan submukosa lambung beserta jumlah infiltrasi sel radang.

3.2 Hipotesa Penelitian

1. Pemberian susu kuda sumbawa mampu menurunkan ekspresi TNF- α organ lambung pada gangguan IBD (Inflammatory Bowel Disease) pada tikus putih (*Rattus norvegicus*).
2. Pemberian susu kuda sumbawa mampu menurunkan jumlah sel radang organ lambung pada gangguan IBD (Inflammatory Bowel Disease) pada tikus putih (*Rattus norvegicus*).

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari 2019- Februari 2019 di Laboratorium Fisiologi Hewan, Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang.

4.2 Materi Penelitian

4.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain, kandang tikus, botol minum tikus, tempat pakan tikus, sekam, masker, mikropipet, sarung tangan (*glove*), *dissecting set*, *object glass*, *cover glass*, rak kaca objek, autoclave, timbangan, sonde, penyaring karet, gelas ukur, timbangan digital, inkubator, kapas, aluminium foil, *blue tip*, *yellow tip*, pH meter digital, sentrifugator, pot organ, cover slip, papan fiksasi, mikroskop cahaya, *waterbath*, *microtube* 1,5 mL.

4.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain tikus putih (*Rattus Norvegicus*) berjenis kelamin jantan galur Wistar dengan berat 120-150 gram, pakan, air minum, minyak jagung, formalin, pewarnaan HE (*Hematoxylin Eosin*), aquades, parafin, xylol, PBS, parafin cair, antibodi IL-6, pewarna kromagen DAB (*Diamino Benzindine*), antibodi sekunder *Goat Anti Rat* berlabel biotin.

4.3 Tahapan Penelitian

1. Rancangan penelitian dan persiapan hewan coba
2. Perlakuan preventif susu kuda sumbawa dengan volume 0,5 mL, 1 mL, dan 1,5 mL dengan sonde lambung.
3. Perlakuan pemberian indometasin per oral hingga kedalaman lambung secara sonde.
4. Ekspresi TNF- α dengan metode flowcytometer.
5. Pengambilan dan pembuatan preparat histologi lambung
6. Pengamatan preparat histopatologi lambung dengan pewarnaan HE (*Hematoxycilin Eosin*)
7. Pengamatan jumlah sel radang.
8. Anaisis data.

4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Berdasarkan desain kelompok penelitian yang menggunakan 5 kelompok perlakuan, maka jumlah ulangan untuk masing-masing kelompok perlakuan adalah sebagai berikut, menurut Kusrieningrum (2008) :

P (n-1)	≥ 15
5 (n-1)	≥ 15
5n – 5	≥ 20
n	≥ 4

Keterangan :

P : jumlah kelompok hewan coba

n : jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk lima kelompok hewan coba diperlukan jumlah ulangan paling sedikit empat kali dalam setiap kelompok, sehingga dibutuhkan 20 ekor hewan coba.

Hewan coba dalam penelitian ini dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan yaitu :

1. Kelompok 1 (Kontrol negatif) adalah tikus yang tidak diinduksi indometasin dan tidak diberikan susu kuda sumbawa.
2. Kelompok 2 (Kontrol positif) adalah tikus diinduksi indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB, tanpa pemberian susu kuda sumbawa.
3. Kelompok 3 (Preventif 1) adalah tikus diterapi susu kuda sumbawa 0,5 mL lalu dilakukan induksi indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB.
4. Kelompok 4 (Preventif 2) adalah tikus diterapi susu kuda sumbawa 1 mL lalu dilakukan induksi indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB.
5. Kelompok 5 (Preventif 3) adalah tikus diterapi susu kuda sumbawa 1,5 mL lalu dilakukan induksi indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB.

4.5 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

Variabel bebas : Susu Kuda Sumbawa volume 0,5 mL; 1 mL dan 1,5 mL.

Variabel terikat : Ekspresi TNF- α dan jumlah sel radang lambung.

Variabel kontrol: Homogenitas tikus meliputi jenis kelamin, berat badan, umur pakan dan kandang.

4.6 Prosedur Kerja

4.6.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar yang berumur 8-12 minggu dengan berat rata-rata 200 gram. Tikus yang akan digunakan untuk penelitian di aklimatisasi selama tujuh hari dan diberi pakan yang berupa ransum basal standar yang disusun berdasarkan AOAC (2005) dengan komposisi kandungan karbohidrat, protein 10%, lemak 3-7%, protein 15%, mineral, kalsium 0,9-1,1%, vitamin dan air 12%. Rata-rata konsumsi pakan tikus per hari (5g/100g BB/hari). Tikus dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan dan setiap kelompok terdiri dari 4 ekor tikus.

Tikus ditempatkan pada kandang yang berupa bak plastik yang ditutup dengan penutup berbahan kawat. Kandang tikus diletakkan pada ruangan yang tenang, bebas dari polutan, dan ventilasi yang cukup sehingga tikus tidak stres. Suhu optimum untuk kandang tikus adalah 22-24°C dan kelembaban udara yaitu 50-60% (Asrini, 2013).

4.6.2 Induksi IBD dengan Indometasin

Hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) dikelompokkan menjadi 5 kelompok perlakuan dengan masing-masing kelompok berjumlah 4 ekor. Indometasin diinduksikan secara per oral menggunakan sonde lambung dengan dosis 15 mg/kg BB tikus (Aulanni'am, 2012). Dosis indometasin yang diberikan pada setiap ekor

tikus adalah 3mg/200g tikus. Indometasin sebelum diberikan pada tikus harus dilakukan pengenceran dengan minyak jagung terlebih dahulu. Adapun pengenceran indometasin sebanyak 45 mg dibutuhkan 4 ml minyak jagung sebagai pelarutnya (Bures, 2011).

Perhitungan dosis indometasin dan minyak jagung yang diberikan per oral adalah sebagai berikut (misal BB tikus 200g) :

Kebutuhan indometasin : $15\text{mg/kg BB} \times 0,2 \text{ kg} = 3 \text{ mg}$

Kebutuhan minyak jagung : $3 \text{ mg}/45 \text{ mg} \times 4 \text{ ml} = 0,26 \text{ mL/tikus}$

Campuran indometasin dengan minyak jagung dihomogenkan dengan menggunakan vorteks. Kemudian diinkubasi selama 24 jam. Hasil induksi indometasin dapat mengakibatkan kerusakan sel-sel mukosa pada lambung dan usus.

4.6.3 Pemberian Susu Kuda Sumbawa

Susu kuda sumbawa diperoleh dari peternakan kuda yang terdapat di Sumbawa, NTT. Susu kuda sumbawa diberikan sebagai preventif satu kali dalam sehari dengan volume 0,5 mL, 1 mL, 1,5 mL selama 7 hari dengan menggunakan sonde lambung (Reni, 2010).

4.6.4 Isolasi Organ Lambung

Setelah dilakukan perlakuan, hewan coba kemudian di euthanasia yang bertujuan untuk mengoleksi organ agar dapat melihat efek preventif yang dihasilkan. Metode euthanasia yang digunakan yaitu teknik dislokasi os. Occipitale.

Setelah dilakukan proses euthanasia, hewan coba di lentangkan pada papan lilin. Posisi hewan yaitu dorsoventral yang bertujuan untuk memudahkan pengambilan organ lambung. Kemudian dilakukan insisi pada area abdomen sehingga cavum abdomen terbuka, setelah itu dikoleksi organ lambung menggunakan pinset dan diisolasi dicuci dengan NaCl fisiologis kemudian dimasukkan ke dalam pot organ yang berisi formalin 10% supaya organ tetap awet.

4.6.5 Pembuatan Preparat Histopatologi Lambung

Organ lambung bagian pilorus yang telah difiksasi dalam larutan formalin 10%, kemudian dibuat preparat histopatologi. Menurut Jusuf (2009), 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 alkohol 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 hematoksilin untuk memberi warna pada inti sel dan memberikan warna biru (basofilik), serta eosin yang merupakan *counterstaining* hematoksilin, digunakan untuk memulas sitoplasma sel dan jaringan penyangga, sehingga memberikan warna merah muda. Langkah pewarnaan HE meliputi :

- a. Proses deparafinasi dengan menggunakan xylol I dan II selama 5 menit.
- b. Proses rehidrasi dengan menggunakan alkohol 95%, 90%, 80%, dan 70% secara berurutan masing-masing selama 5 menit.
- c. Pencucian sediaan dengan air mengalir selama 15 menit dan dilanjutkan dengan aquades selama 5 menit.
- d. Pewarnaan dengan pewarna *hematoxylin* selama 10 menit kemudian dicuci dengan air selama 30 menit dan akuades selama 5 menit.
- e. Pewarnaan dengan pewarna eosin selama 5 menit dan dicuci kembali dengan air mengalir selama 10 menit.
- f. Dehidrasi dengan etanol 80%, 90%, dan 95% selama 5 menit.
- g. Pengeringan sediaan dan pelapisan (*mounting*) dengan menggunakan *entellan*.
- h. Pengamatan histopatologi lambung.

4.6.6 Perhitungan Jumlah Sel Radang

Pengamatan secara hispatologi dilakukan pada sediaan sampel lambung. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop cahaya. Pengamatan ini menggunakan parameter yaitu jumlah sel radang. Perhitungan jumlah sel radang dilakukan dengan menghitung jumlah sel neutrofil, limfosit, dan makrofag pada sediaan histopatologi lambung menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x. Perhitungan

dilakukan sebanyak 5 lapang pandang pada tiap sampel (Herdawati, 2018). Jumlah sel radang tersebut kemudian dirata-rata lalu dianalisis data menggunakan *software* SPSS 22 for windows.

4.6.7 Ekspresi TNF- α dengan *Flowcytometry*

Organ lambung yang sudah diterapi dengan susu kuda sumbawa berbagai macam dosis dan diinduksi indometasin, digerus dengan pangkal spuit pada 5ml PBS. Kemudian disaring dengan *wire* dan dimasukkan ke propilen 15ml hingga volume tertentu. Setelah itu homogenat disentrifugasi dengan kecepatan 2500rpm selama 5 menit dengan suhu 10⁰C. Supernatan hasil sentrifugasi dibuang dan menyisakan peletnya. Selanjutnya pelet diresuspensi dengan PBS 1ml dengan cara *pipeting*. Hasil suspensi dibagi ke beberapa microtube 1,5ml yang telah berisi 0,5ml PBS setiap microtube sebanyak 50 μ l. Lalu dihitung sel hasil isolasi. Suspensi lalu di sentrifugasi kembali dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit dengan suhu 10⁰C. Hasil dari sentrifugasi diambil bagian peletnya kemudian diwarnai dengan ditambahkan larutan fiksatif sebanyak 50 μ l, lalu diinkubasi selama 20 menit dengan suhu 4⁰C pada ruang gelap. Setelah itu ditambahkan larutan permeabilitas (*Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer*) sebanyak 500 μ l, kemudian dihomogenisasi, dan disentrifugasi lagi dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit dengan suhu 10⁰C. Setelah didapatkan pelet ditambahkan antibodi spesifik pada sel sebanyak 50 μ l, kemudian diinkubasi selama 20 menit dengan suhu 4⁰C pada ruang gelap, lalu

ditambahkan PBS 400 μ l, lalu dimasukkan ke dalam kuvet *flowcytometry* untuk dirunning (Wisudanti, 2017).

4.7 Analisis Data

Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekspresi TNF- α dan jumlah sel radang organ lambung yang diamati pada preparat histopatologi lambung. Analisis data ekspresi TNF- α dilakukan secara kuantitatif menggunakan *software flowcytometry* dan perhitungan jumlah sel radang pada preparat histopatologi dengan bantuan mikroskop cahaya (Olympus BX51) dengan perbesaran 100x dan 400x. Selanjutnya dilakukan analisis secara kuantitatif menggunakan uji ANOVA (Analysis of Variance) satu arah dengan tingkat kepercayaan 95% ($P < 0,05$) kemudian dilanjutkan dengan uji BNJ (Beda Nyata Jujur) untuk mengetahui hasil yang paling berbeda nyata (Kusriningrum, 2008).

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Kondisi Tikus (*Rattus norvegicus*) Pasca Induksi Indometasin

Tikus kelompok perlakuan diberikan terapi sebanyak 1 kali sehari selama 14 hari, yaitu pukul 9 pagi. Kelompok P1 diberi susu kuda Sumbawa secara peroral dengan menggunakan sonde lambung dengan volume 0,5 mL, kelompok P2 diberi susu kuda Sumbawa dengan volume 1 mL, kelompok P3 diberi susu kuda Sumbawa dengan volume 1,5 mL. Kelompok KP berlaku sebagai kontrol positif sehingga tidak diberi susu kuda Sumbawa.

Pembuatan tikus model *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) dilakukan dengan pemberian indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB. Indometasin diberikan satu kali secara peroral dengan menggunakan sonde lambung kemudian diinkubasi selama 7 hari. Berdasarkan hasil pengamatan selama penelitian, kondisi tikus 48 jam pasca induksi indometasin menimbulkan gejala klinis berupa diare dan penurunan berat badan pada tikus (**Lampiran 7**). Feses yang dikeluarkan oleh tikus yang mengalami diare memiliki konsistensi cair dan berwarna hitam. Feses tikus kelompok perlakuan KP (kontrol positif) memiliki konsistensi cair sedangkan feses tikus kelompok perlakuan KN (kontrol negatif) memiliki konsistensi padat (**Lampiran 11**). Diare tersebut terjadi dikarenakan adanya gangguan absorpsi di dalam lambung.

Gangguan absorpsi yang terjadi di lambung dikarenakan oleh efek dari pemberian indometasin. Indometasin yang bekerja menghambat COX-1 akan berperan dalam pembentukan prostaglandin pada lambung. Fungsi dari

prostaglandin itu sendiri yaitu sebagai penghasil mukus yang akan berfungsi sebagai barrier mukosa lambung (Takeuchi *et al.*, 2003). Apabila COX-1 dihambat maka akan terjadi penurunan prostaglandin pada lambung sehingga menyebabkan penurunan perlindungan di mukosa lambung yang akan memicu terjadinya inflamasi dan rusaknya mukosa pada lambung. Penurunan berat badan yang terjadi dikarenakan menurunnya nafsu makan akibat rasa nyeri yang dirasakan tikus pada bagian abdomen.

Pasca 7 hari induksi indometasin dan susu kuda Sumbawa, dilakukan pembedahan pada tikus kelompok perlakuan KP (kontrol positif), P1 (perlakuan 1), P2 (perlakuan 2), P3 (perlakuan 3). Secara makroskopis, organ lambung tikus kelompok perlakuan KP tampak kemerahan (**Gambar 5.1**). Kemerahan yang tampak pada organ lambung menunjukkan terjadinya inflamasi. Hal ini sesuai dengan penelitian Aulanni'am *et al.* (2012) yang menyatakan bahwa asupan indometasin secara oral dengan dosis 15 mg/kg BB dapat menyebabkan perdarahan (hemoragi) pada lambung dan usus.



Gambar 5.1 Gambaran makroskopis organ lambung tikus K⁺ dengan kondisi kemerahan dibagian pilorus (➡).

5.2 Susu Kuda Sumbawa Sebagai Efek Preventif pada Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Model IBD (*Inflammatory Bowel Disease*) Hasil Induksi Indometasin Terhadap Ekspresi TNF- α Lambung

Susu kuda Sumbawa yang diberikan pada beberapa dosis yang berbeda menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($p < 0,05$) terhadap ekspresi TNF- α organ lambung tikus (*Rattus Norvegicus*) model IBD yang diinduksikan dengan indometasin, seperti yang dapat dilihat pada **tabel 5.1**. Perhitungan statistika dilakukan dengan uji normalitas dan homogenitas (**Lampiran 9**) menunjukkan bahwa data terdistribusi normal dan homogen dan diperoleh hasil $p > 0,05$. Kemudian hasil pengukuran ekspresi TNF- α yang didapatkan dan diamati secara kuantitatif dengan *Software BD Cellquest ProTM* untuk melihat efek preventif susu kuda Sumbawa yang diberikan, dan dianalisa dengan menggunakan aplikasi *Microsoft excel* dan *SPSS for windows* dengan metode analisis statistik ragam *One Way ANOVA*. Selanjutnya data analisis statistika yang telah diperoleh dilanjutkan dengan uji Tukey dengan $\alpha = 0,05$ dan menunjukkan perbedaan rata-rata yang signifikan (**Lampiran 9**) dapat dilihat dalam **Tabel 5.1**.

Hasil uji Tukey terlihat perbedaan notasi yang ditunjukkan pada **Tabel 5.1** dan didapatkan bahwa hasil produksi kadar TNF- α pada kelompok kontrol negatif berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan kelompok kontrol positif. Perbedaan yang signifikan membuktikan bahwa induksi indometasin untuk tikus model *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) terbukti berdampak pada peningkatan kadar TNF- α secara signifikan.

Tabel 5.1 Rata-rata ekspresi TNF- α pada lambung tikus putih (*Rattus norvegicus*)

Kelompok	Rata-rata kadar TNF- α $\pm$ SD (% sel)
K- (Kontrol negatif)	31, 89 $\pm$ 2,18 ^a
K+ (Kontrol positif)	59,99 $\pm$ 3,68 ^c
P1 (Volume pemberian 0,5 mL susu kuda Sumbawa)	45,00 $\pm$ 4,47 ^b
P2 (Volume pemberian 1 mL susu kuda Sumbawa)	43,93 $\pm$ 5,25 ^b
P3 (Volume pemberian 1,5 mL susu kuda Sumbawa)	43,38 $\pm$ 3,68 ^b

Keterangan: notasi a,b dan c menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$)

Perhitungan data rata-rata TNF- α yang diperoleh dianalisa secara statistika sehingga diperoleh hasil bahwa rata-rata TNF- α tertinggi terdapat pada kontrol positif, terendah pada kontrol negatif, dan adanya penurunan pada setiap kelompok perlakuan jika dibandingkan dengan kontrol positif .

Pada kelompok kontrol negatif (K-) menunjukkan hasil rata-rata ekspresi TNF- α terendah dibandingkan dengan kontrol positif (K+), yaitu sebesar 31, 89 $\pm$ 2,18^a (**Tabel 5.1**). Kelompok perlakuan K- tetap terdapat sitokin di dalam tubuh meskipun hal tersebut hanya terdapat dalam jumlah sedikit sebagai sistem homeostasis tubuh. Sitokin TNF- α yang diproduksi secara tidak tepat dapat menyebabkan destruksi atau penyakit, sitokin yang diproduksi merupakan dasar untuk perkembangan perlindungan imun (Popa *et al.*, 2007).

Pada kelompok kontrol positif (K+) menunjukkan hasil rata-rata ekspresi TNF- α sebesar 59,99 $\pm$ 3,68^c. Adanya peningkatan TNF- α mengindikasikan adanya inflamasi pada lambung tikus putih (*Rattus*

norvegicus) akibat induksi NSAIDS yaitu indometasin. Indometasin bersifat lipofilik dan berikatan dengan membran sel yang tersusun dari fosfolipid sehingga terjadi pembentukan ROS yang meningkat dan mengaktivasi NF- κ B (*Nuclear Factor* κ B). Aktivasi NF- κ B yang meningkat akan direspon oleh makrofag untuk memproduksi dan mensekresi sitokin proinflamasi TNF- α sebagai indikator terjadinya inflamasi, dan TNF- α akan mengaktivasi dari neutrofil ke daerah yang terjadi inflamasi (Takeuchi *et al.*, 2013).

Pada kelompok perlakuan preventif terjadi penurunan ekspresi TNF- α . Pada kelompok perlakuan P1 (volume pemberian susu kuda Sumbawa 0,5mL) menunjukkan hasil rata-rata ekspresi TNF- α sebesar $45,00 \pm 4,47^b$. Pada kelompok perlakuan P2 (volume pemberian susu kuda Sumbawa 1mL) menunjukkan hasil rata-rata ekspresi TNF- α sebesar $43,93 \pm 5,25^b$. Pada kelompok perlakuan P3 (volume pemberian susu kuda Sumbawa 1,5 mL) menunjukkan hasil rata-rata ekspresi TNF- α sebesar $43,38 \pm 3,68^b$. Penurunan ekspresi TNF- α terjadi disebabkan karena adanya kandungan bioaktif lisozim dan laktoferin pada susu kuda Sumbawa.

Lisozim pada susu kuda Sumbawa mampu membatasi migrasi neutrofil ke jaringan yang rusak serta sebagai agen antiinflamatori (Yun *et al.*, 2012). Laktoferin berperan penting dalam pengikatan Fe di mukosa usus dan beraksi sebagai agen bakteristatis. Keberadaannya di neutrofil dan pelepasannya selama radang, memperkuat dugaan bahwa laktoferin juga berperan dalam pemusnahan fagosit dan imunitas. Susu kuda berpengaruh terhadap modulasi proses inflamasi melalui pengaruhnya terhadap penurunan

proses kemotaksis sel radang dan *respiratory burst* (kenaikan cepat ROS dari berbagai jenis sel), sehingga dapat mengobati inflamasi berulang (Ellinger *et al.*, 2002). Selain itu, susu kuda Sumbawa memiliki kandungan bakteri asam laktat yang tinggi yaitu sekitar $6,7 \times 10^6$ cfu/ml (**Lampiran 10**). probiotik yang terdapat dalam susu kuda Sumbawa mampu meningkatkan fungsi barrier imunologik mukosa usus melalui pengeluaran mikrobial patogenik, memulihkan permeabilitas permukaan mukosa usus ke arah normal pada penyakit alergi atau inflamasi, dan menurunkan produk sitokin pro-inflamasi (Diding, 2008).

Data kelompok kontrol positif (K+) dengan perlakuan, ditunjukkan bahwa penurunan kadar TNF- α secara signifikan ditunjukkan oleh kelompok pemberian susu kuda Sumbawa volume 0,5 mL, 1mL dan 1,5mL (P1, P2 dan P3). Perbandingan kelompok kontrol positif (K+) dengan kelompok perlakuan, dapat terlihat bahwa TNF- α mengalami penurunan secara signifikan dan ditunjukkan pada kelompok perlakuan dengan preventif susu kuda Sumbawa dengan volume pemberian 0,5 mL, 1mL dan 1,5mL (P1, P2 dan P3). Hal ini ditunjukkan oleh perbedaan notasi yang diberikan. Jika ditinjau dari rata-rata ekspresi TNF- α pada kelompok perlakuan 1,2 dan 3, bahwa dengan volume pemberian 0,5 mL saja sudah bisa menurunkan inflamasi dan ekspresi TNF- α .

Pemberian susu kuda Sumbawa dengan volume 0,5 mL mampu mencegah terjadinya inflamasi pada lambung, namun bukan merupakan dosis yang paling optimal sebagai antiinflamasi untuk kasus IBD sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut. Hal ini didukung oleh hasil penelitian pada

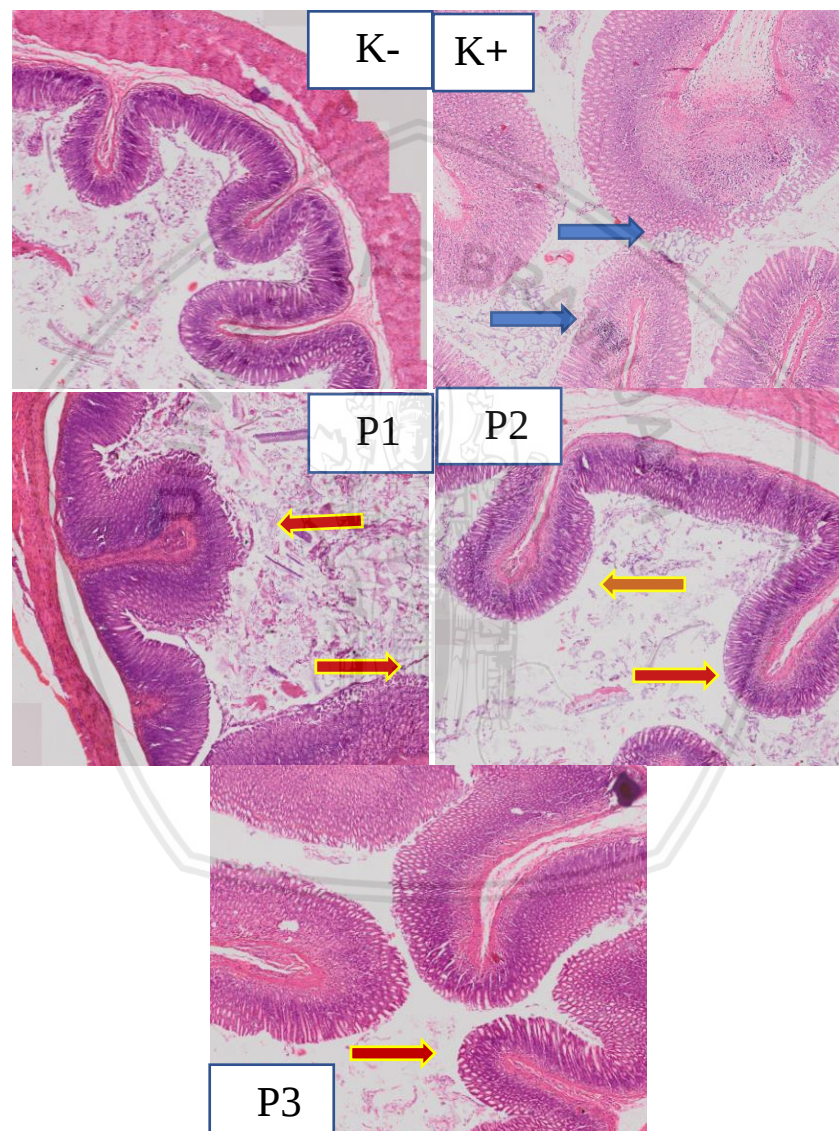
Tabel 5.1 yang menunjukkan rata-rata ekspresi TNF- α pada kelompok perlakuan P1, P2 dan P3 tidak sama dan hanya mendekati hasil rata-rata ekspresi TNF- α pada kelompok kontrol negatif.

5.3 Susu Kuda Sumbawa Sebagai Efek Preventif pada Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Model IBD (*Inflammatory Bowel Disease*) Hasil Induksi Indometasin Terhadap Jumlah Sel Radang Lambung

Sel radang yang dihitung pada lambung tikus (*Rattus norvegicus*) dilakukan dengan menggunakan pembuatan preparat histopatologi. Pembuatan preparat histopatologi dilakukan dengan pewarnaan HE (*Hematoxylin Eosin*) yang kemudian diamati histopatologi lambung terlebih dahulu pada perbesaran 100x, setelah itu lalu dihitung jumlah sel radang yang terdapat pada organ lambung. Jaringan organ lambung secara normal terdiri atas tunika mukosa, sub mukosa, muskularis, dan serosa (Tortora dan Bryan, 2008).

Pada hasil pengamatan mikroskopik histopatologi jaringan lambung kelompok kontrol negatif (K-) (**Gambar 5.2**) memperlihatkan gambaran lambung yang normal yaitu terdapatnya epitel silindris sebaris yang jelas. Selain itu bentukan dan batas antar gastric pit pada mukosa lambung terlihat jelas, reguler dan tidak mengalami erosi. Tidak terlihat ada inflamasi dan kondisi patologis lainnya. Sedangkan pada jaringan organ lambung kelompok kontrol positif (K+) (**Gambar 5.2**) menunjukkan erosi epitel mukosa lambung dan adanya infiltrasi sel radang. Pada beberapa bagian lamina propria vili juga ditemukan kumpulan sel eritrosit yang menandakan hemoragi sebagai tanda adanya inflamasi. Pada hasil pengamatan mikroskopik histopatologi organ lambung kelompok perlakuan (P1,P2 dan P3) (**Gambar 5.2**), pada semua

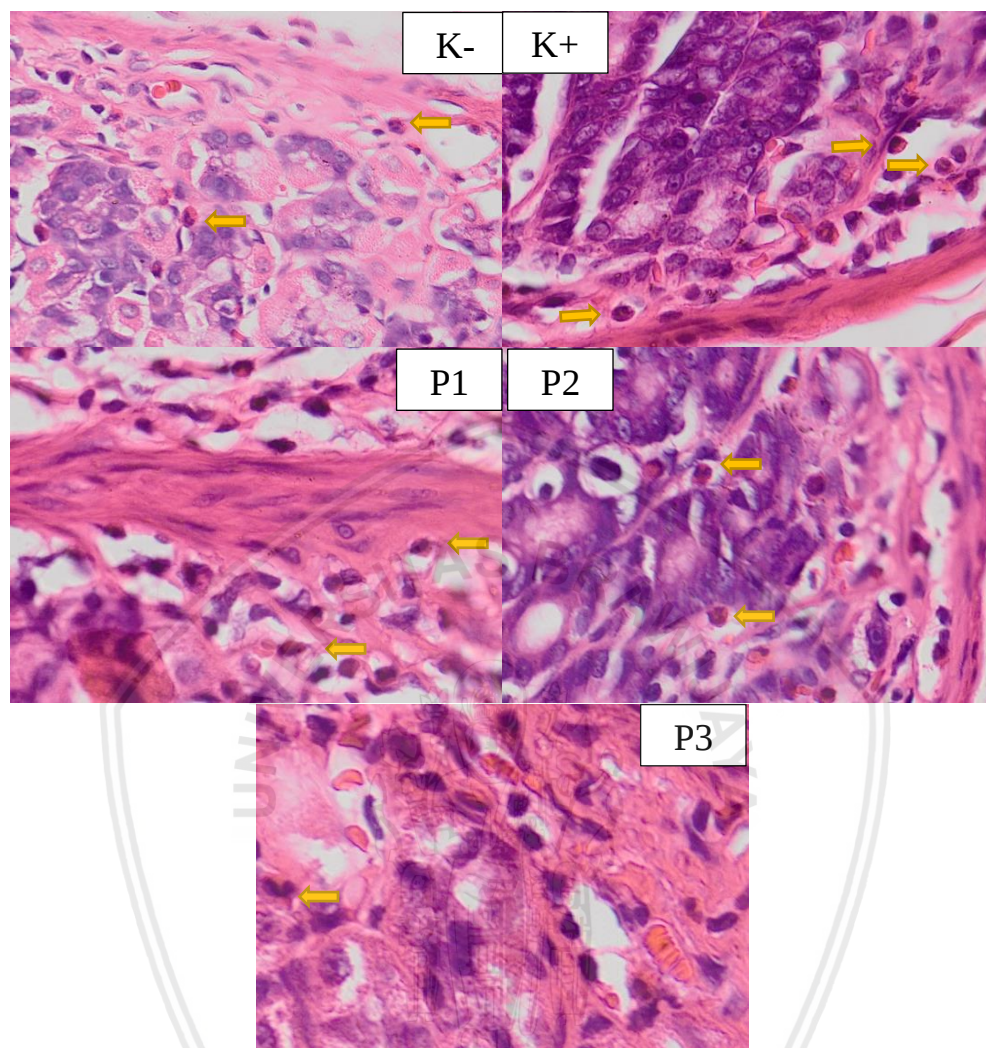
perlakuan mengalami perbaikan dari erosi sel epitel. Selain itu terjadi pengurangan infiltrasi sel radang dibandingkan dengan kontrol positif. Setelah itu dilakukan pengamatan histopatologi pada perbesaran 400x untuk menghitung jumlah sel radang lambung yang bisa dilihat pada **Gambar 5.3**.



Gambar 5.2 Histopatologi lambung tikus (*Rattus norvegicus*) dengan pewarnaan HE perbesaran 100x. Keterangan (↓) erosi epitel lambung, keterangan (↗) perbaikan epitel lambung.

Keterangan : K- tikus kontrol negatif; K+ tikus kontrol positif; P1 tikus dengan volume pemberian 0,5 mL; P2 tikus dengan volume pemberian 1 mL, P3 tikus dengan volume pemberian 1,5 mL.

Kerusakan jaringan, khususnya pada mukosa organ lambung pada hasil pemeriksaan histopatologi kelompok kontrol positif merupakan efek dari pemberian indometasin dengan dosis 15 mg/kgBB secara per oral pada tikus. Menurut Hatazawa *et al* (2006), bahwa indometasin dapat menghambat dua isoform COX, yaitu COX-1 dan COX-2, sehingga terjadi penurunan perlindungan mukosa lambung akibat dari menurunnya produksi mukus lambung dan peningkatan produksi HCL lambung. Oleh karena itu, terjadi kerusakan pada mukosa lambung akibat suasana asam pada lambung yang disertai dengan penurunan barier mukosa lambung, sehingga manifestasi berupa inflamasi dan infiltrasi sel radang (Yadav *et al*. 2012). Hasil dan jumlah rata-rata infiltrasi sel radang pada penelitian ini dapat dilihat pada **Tabel 5.2**.



Gambar 5.3 Histopatologi organ lambung tikus (*Rattus norvegicus*) dengan pewarnaan HE perbesaran 400x. Ket(↑) infiltrasi sel radang.

Keterangan : K- tikus kontrol negatif; K+ tikus kontrol positif; P1 tikus dengan volume pemberian 0,5 mL; P2 tikus dengan volume pemberian 1 mL, P3 tikus dengan volume pemberian 1,5 mL.

Susu kuda Sumbawa yang diberikan pada kelompok perlakuan P1, P2 dan P3 (**Gambar 5.3**), pada gambar diatas terlihat bahwa jumlah sel radang yang ada pada ketiga kelompok perlakuan tersebut lebih banyak daripada kelompok K- (kontrol negatif), tetapi masih lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok

K+ (kontrol positif). Hasil rata-rata jumlah sel radang lambung dapat dilihat pada **tabel 5.2.**

Tabel 5.2 Rata-rata jumlah sel radang organ lambung tikus putih (*Rattus norvegicus*)

Kelompok	Rata-rata jumlah sel radang $\pm$ SD (sel/lapang pandang)
K- (Kontrol negatif)	7,00 $\pm$ 0,63 ^a
K+ (Kontrol positif)	15,6 $\pm$ 0,96 ^d
P1 (Volume pemberian 0,5 mL susu kuda Sumbawa)	11,7 $\pm$ 0,68 ^c
P2 (Volume pemberian 1 mL susu kuda Sumbawa)	10,05 $\pm$ 1,20 ^{bc}
P3 (Volume pemberian 1,5 mL susu kuda Sumbawa)	8,60 $\pm$ 1,79 ^{ab}

Keterangan: notasi a,b,c dan d menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$)

Respon inflamasi pada gambaran histopatologi organ lambung tikus ditandai dengan adanya infiltrasi sel radang. Rata-rata infiltrasi sel radang pada kelompok kontrol negatif (K-) yaitu 7,00 $\pm$ 0,63^a sel/lapang pandang yang disertai tanpa adanya kondisi patologis lainnya serta jumlah sel radang yang rendah. Sel radang yang terdapat berupa neutrofil masih terlihat pada jaringan yang sehat meski jumlahnya sedikit. Sedangkan pada kelompok kontrol positif (+), jumlah sel radang yang terdapat yaitu 15,6 $\pm$ 0,96^c sel/lapang pandang dan merupakan jumlah sel radang paling tinggi dibandingkan kelompok perlakuan lain. Hal ini bersamaan dengan meningkatnya sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α yang terjadi pada kontrol positif, sehingga menyebabkan inisiasi infiltrasi sel radang pada situs inflamasi. Fungsi sel radang pada situs inflamasi adalah untuk

memfagosit dan mendegradasi benda asing termasuk indometasin. Jenis sel radang yang terinfiltrasi pada area kerusakan adalah limfosit dan neutrofil (Standyk *et al.*, 2002). Akan tetapi infiltrasi sel radang yang mendominasi adalah neutrofil dan limfosit. Hal ini karena neutrofil merupakan sel radang pada sistem kekebalan non-spesifik yang pertama kali datang pada saat terjadinya respon inflamasi. Sedangkan sel limfosit merupakan pertahanan alami pada organ digesti yang berasal dari sistem GALT (*Gut Assosiated Lymphoid Tissue*) yang terletak pada zona basal lamina propria mukosa organ lambung (Yamada, 2005).

Pada kelompok P1 ($11,7 \pm 0,68^{bc}$ sel/lapang pandang), P2 ($10,05 \pm 1,20^b$ sel/lapang pandang), dan P3 ($8,60 \pm 1,79^{ab}$ sel/lapang pandang) menunjukkan adanya penurunan jumlah sel radang dibandingkan dengan kelompok K+ (kontrol positif). Selain itu pada kelompok perlakuan juga terdapat perbaikan epitel lambung. Hal ini sejalan dengan hasil rata-rata ekspresi TNF- α yang menunjukkan penurunan pada setiap kelompok perlakuan. TNF- α bertindak sebagai mediator proinflamasi yang akan mengerahkan sel radang pada daerah inflamasi, sehingga pada saat inflamasi berkurang sel radang akan mengalami penurunan jumlah.

Susu kuda Sumbawa memiliki kandungan bioaktif yaitu lisozim dan laktoferin. Laktoferin mempunyai peran yang penting dalam pengikatan Fe di mukosa usus dan beraksi sebagai agen bakteriostatis. Keberadaannya di neutrofil dan pelepasannya selama radang, memperkuat dugaan bahwa laktoferin juga berperan dalam pemusnahan fagosit dan imunitas. Lisozim merupakan suatu senyawa protein yang mengandung antibiotik yang dapat menghancurkan

beberapa bakteri. Kemampuan lisozim dalam membatasi migrasi neutrofil ke jaringan yang rusak memberikan kemungkinan untuk menggunakan lisozim sebagai agen antiinflamatori (antiradang) (Yun *et al.*, 2012). Senyawa-senyawa tersebut akan menekan terjadinya aktivasi dan migrasi neutrofil dan sel radang lain ke jaringan lambung sehingga reaksi inflamasi yang terjadi pada jaringan lambung dan jumlah infiltrasi sel radang akan berkurang.

Berdasarkan penelitian didapatkan hasil bahwa susu kuda Sumbawa sebagai preventif pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) model IBD dapat memperbaiki gambaran histopatologi lambung dan mengurangi infiltrasi sel radang yang terjadi dengan mengembalikan kondisi kontinuitas lapisan epitel. Dosis terapi yang terbaik menunjukkan perbaikan, yaitu kelompok perlakuan 3 dengan volume susu kuda Sumbawa sebanyak 1,5 mL.

BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

1. Pemberian susu kuda Sumbawa dapat mencegah dan mengurangi efek inflamasi penyakit *inflammatory bowel disease* pada tikus putih (*Rattus novergicus*) berdasarkan penurunan ekspresi TNF- α .
2. Pemberian susu kuda Sumbawa dapat berpengaruh terhadap histopatologi organ lambung dan mengurangi jumlah infiltrasi sel radang organ lambung.

6.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka diperlukan penelitian lebih lanjut dengan penggunaan dosis yang lebih ditingkatkan mengenai susu kuda Sumbawa terhadap penyakit *inflammatory bowel disease* dan penyakit saluran pencernaan lainnya agar dapat diketahui khasiat dari susu kuda Sumbawa.

DAFTAR PUSTAKA

- Achkar, J. P. 2000. *Inflammatory Bowel Disease*. The American College of Gastroenterology. <http://www.acg.gi.org.html>. (akses 16 september 2018).
- Aulannia'am ., A.Roosdiana and N.L. Rahmah. 2012. The Potency of Sargassum duplicatum Bory Extract on Inflammatory Bowel Disease (IBD) in Rattus Norvegicus. *Journal of Life Sciences* 6 : 144-154.
- Alexandru, I., 2011, Experimental Use of Animals in Research Spa, Balneo-. *Research Journal*, 2(1): 131–139.
- AOAC. 2005. *Method of Analysis*. Association official analyse chemist. Washington D.C: AOAC.
- Bures, J, J. Pejchal, J.Kvetina, A. Tichy, S.Rejchrt, M. Kunes and M. Kopacova. 2011. Morphometric analysis of the porcine gastrointestinal tract in a 10-day high-dose indomethacin administration with or without probiotic bacteria *Escherichia coli* Nissle 1917. *Human and Experimental Toxicology*. 30(12) 1955– 1962.
- Darson, H. F., M. Albayrak, F. Bilici, H. 2009. *Gastroprotective and Antioxidant Effect of Opipramol on Indometacin induced Ulcer Rats*. *Yakugaku Zasshi* 129 : 861.
- Diding, HP., E. Listyaningsih dan AA. Subijanto. 2008. Pengaruh Probiotik Terhadap Gambaran Histologis Mukosa Usus pada Mencit Bal/C Model Alergi. *Jurnal Kedokteran Yarsi*. 16(1):006-12.
- Direktorat Jenderal PKH. 2015. Perbibitan dan Produksi Ternak Kuda Sumbawa dan Penetapan Rumpun Kuda Sumbawa. 1-3.
- Djojoningrat, D. 2006. *Inflammatory Bowel Disease : Alur Diagnosis dan Pengobatannya di Indonesia*. Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam. Jilid I. Edisi ke-4. Jakarta: FKUI; hal. 386-90.
- Fitri, W. 2018. *Inflammatory Bowel Disease pada Pet Animal*. Kumpulan Artikel Kesehatan Hewan. SemVet Jakarta.
- Fornai, M., L. Anton., C. Rocchina. 2011. *Pathophysiology of Gastric Ulcer Development and Healing : Molecular Mechanisms and Novel Therapeutic Options*. Department of Internal Medicine. Italy.
- Friedman S, and RS Blumberg. 2010 *Inflammatory Bowel Disease-Dalam, longo DL., Penyunting. Harrison's Gastroenterology and Hepatology*. Edisi ke-17. United States : The Mc Graw. 2010 ; 16 : 174.
- Giugliano, D., A. Cariello and K. Esposito. 2006. The Effect of Diet on Inflammation. *Journal of the American College of Cardiology* 48 : 677-685.

- Green, E. A and R. A. Flavell. 2000. The temporal importance of TNF alpha expression in the Development of arthritis reumatoid. *Journal immunity*, 12: 459-469.
- Guyton&Hall. 2007. *Susunan sistem saraf dan fungsi dasar sinaps, dan substansi transmitter*. Dalam: Buku ajar fisiologi kedokteran. Edisi 9. Jakarta: EGC. h. 761-772.Frappier, 2006.
- Hall E.J.M. 2017. *Inflammatory Bowel Disease In Dogs and Cats*. School of Veterinary Sciences, University of Bristol ; Langford House. England.
- Hardman, J.G., Limbrid L.E., dan Gilman, A.G. 2001. Analgesic-Antipyretic and Antiinflammatory agents and drugs employed in treatment of gout. In : Roberts, L.J. and Morrow, J.D. eds. *Goodman and Gillman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 10th edition. New York : Mc Graw Hill Companies. p: 687-691, 706
- Hatazawa, Ryo, Ryoko Ohno, Mayu Tanigami, Akiko Tanaka, and Koji Takeuchi. 2006. Roles of Endogenous Prostaglandins and Cyclooxygenase Isozymes in Healing of Indomethacin-Induced Small Intestinal Lesions in Rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. Vol. 318 (2): 691-699.
- Herdawati, T. 2018. Perbedaan Jumlah Sel Radang PMN dan MN pada Luka Bakar Derajat Ii Antara Pemberian Topikal Ekstrak Sel Punca Mesenkimal Tali Pusat Manusia Dengan Silver Sulfadiazinepada Tikus Putih Jantan (*Rattus Norvegicus*) Galur *Sprague Dawley*. *Jurnal Medis Universitas Negeri Lampung*.
- Hoffbrand., A.V., J.E Petit, P.A.H. Moss, *Kapita Selekta Hematologi Edisi 4*. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta 2005: 221,295.
- Hyams J. *Inflammatory Bowel Disease*. Richard EB, Robert MK, Hal BJ, editor. Nelson Textbook of Pediatrics. Edisi ke-17. Philadelphia: Saunders; 2004. Hal 1248-1255.
- Kappelman, M., S. L. Rifas, S., Kleinman. 2007. The Prevalence and Geographic Distribution of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis in the United States. *Clin Gastrointestinal* 5:1424:6.
- Kartasasmita, R. E., 2002. *Perkembangan obat anti radang bukan steroid*. *Acta Pharmaceutica Indonesia*. 27:75-91.
- Kaser, A., S. Zeissig and R.S Blumberg. 2010. *Inflammatory Bowel Disease*. *Annu Rev Immunol*. 28:573.
- Kathrani A., D. Werling. And K. Allenspach. 2011. *Canine breeds at high risk of developing inflammatory bowel disease*. *Journal of Veterinary*, 169:635.

- Klein, A. And Eliakim, R. 2010. Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs and Inflammatory Bowel Disease. *Pharmaceuticals* 3(4).
- Krinke, G.J. 2000. *The Handbook of Experimental Animals : The Laboratory Rat*. London: Academic Press.
- Kusriningrum. 2008. *Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap*. Fakultas Kedokteran Hewan : UNAIR Surabaya.
- Myers, P. and D. Armitage. 2004. *Rattus Norvegicus*. Diunduh melalui [Http://animaldiversity.org/site/accounts/information/Rattus_norvegicus.html](http://animaldiversity.org/site/accounts/information/Rattus_norvegicus.html) (Diakses 17 Agustus 2018).
- Piepoli, A. L., G. De Salvatore, M. A. De Salvia, C. 2005. *Indometacin-induced ileitis is associated with tensiometric, vascular and oxidative changes in rat*. *Eur J Clin Invest* 35: 271-278.
- Podolsky, 2002. *Inflammatory Bowel Disease*. *N. Engl. J. Med* 347(6):417-429.
- Popa, C, M.G. Netea, O. Van der Liel. 2007. The role of TNF alpha in chronic Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Lipid Research*. 48: 751-762.
- Price, S. A. Dan L. M. Wilson. 2006. *Patofisiologi : Konsep Klinis Proses Penyakit, Edisi 6, Volume 1*. Jakarta: EGC.
- Ressang, A. A., A. M. Nasution. 2009. *Pedoman Mata Pelajaran Ilmu Kesehatan Susu (Milk Hygiene)*. Edisi keempat. Bagian Kesehatan Masyarakat Veteriner. Fakultas Kedokteran IPB. Bogor.
- Reni, S., Sumarno., W. Edi. Susu Kuda Sumbawa Meningkatkan Respon Imun Seluler Makrofag Peritoneal Mencit Terhadap Salmonella Typhimurium. *Gizi Poltekkes Mataram*.
- Scholz, M., A. L. Blobaum, L. J. Mamett and E. H. Hawkins. 2011. Synthesis and Evaluation of Carbaborane Derivates of Indometacin as Cyclooxygenase Inhibitors. *Bioorganic and Medical Chemistry*. 19; 3242-324.
- Standyck A.W, C Dollard. 2002. Neutrophil Migration into Indomethacin Induced Rat Small Intestinal Injury. *Vol 50*: 629-635.
- Sudiono. 2001. Hubungan Inflammatory Bowel Disease dengan Kanker Kolorektal. *J Kedokteran dan Kesehatan*, 12(3): 61-74.
- Taiwo, V.O and Cotech, O.L. 2008. The Rodenticidal Effect of Indometacin: Pathogenesis and Pathology. *Veterinary Archive* 78(2) : 167-178.
- Takeuchi, H., H. Yamamoto, and Y. Kawachima. 2003. Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47: 39-54. Strus *et al.*, 2009

- Tamboli, C.P. 2007. Current Medical Therapy for Chronic Inflammatory Bowel Disease. *Surgical Clinic of North America* 87(3):697-725.
- Tortora, Gerald J. And Bryan Derrickson. 2008. *Principle of anatomy and Physiology*. UK. John Willey & Sons.
- Uniacke-Lowe. T., H. Thom. 2010. Equine Milk Proteins: Chemistry, Structure and Nutritional Significance. Vol: 20 609-629.
- Valle DJ, Peptic Ulcer Disease and Related Disorders, Harrison's Principle Internal Medicine 16th Edition, McGraw Hill, 2001: 1746-1762
- Wisudanti,D.D., 2017. Efek Kefir terhadap Respons Imun Sukarelawan Sehat Secara in vitro. *Journal of Agromedicine and Medical Sciences*. Vol. 3 : (2) 28-34
- Yadav, Sudhir K., Biplap Adhikary, Saraswati Chand, Biswanath Maity, Sandip., Bandyopadhyay and Subrata Chattopadhyay. 2012. Molecular Mechanism of Indomethacin-induced Gastropathy. *Free Radical Biology and Medicine*. Vol. 52 (7) : 1175-1187.
- Yamada, T. 2005. *Handbook of Gastroenterology 2nd Edition*. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins.
- Yun H., dan Ema Sahara, 2012. *Komponen Bioaktif Protein dan Lemak Dalam Susu Kuda Liar*. Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan