

**PENGARUH PEMBERIAN INFUSA DAUN BELUNTAS (*Pluchea indica*  
L) TERHADAP EKSPRESI TNF- $\alpha$  DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI  
ILEUM PADA MENCIT (*Mus musculus*) MODEL DIARE  
HASIL INDUKSI CASTOR OIL (*Oleum ricini*)**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**ANNISA NOVIANTI ARIFAH**  
**155130101111078**



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

**PENGARUH PEMBERIAN INFUSA DAUN BELUNTAS (*Pluchea indica*)  
TERHADAP EKSPRESI TNF- $\alpha$  DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI  
ILEUM PADA MENCIT (*Mus musculus*) MODEL DIARE  
HASIL INDUKSI CASTOR OIL (*Oleum ricini*)**

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:  
**ANNISA NOVIANTI ARIFAH**  
**155130101111078**



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

**LEMBAR PENGESAHANSKRIPSI**

**PENGARUHPEMBERIAN INFUSA DAUN BELUNTAS (*Pluchea indica L.*)  
TERHADAP EKSPRESI TNF- $\alpha$  DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI  
ILEUM PADA MENCIT (*Mus musculus*) MODEL DIARE  
HASIL INDUKSI CASTOR OIL(*Oleum ricini*)**

**Oleh:**  
**ANNISA NOVIANTI ARIFAH**  
**155130101111078**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
Pada tanggal 1 Oktober 2019  
Dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh  
gelar Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

**Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES drh. Viski Fitri Hendrawan, M.Vet**  
NIP. 196009031988022001 NIP. 198805182015041003

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 : Annisa Novianti Arifah

NIM : 155130101111078

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulisan Skripsi berjudul:

Pengaruh Pemberian Infusa Daun Beluntas (*Pluchea indica L.*) terhadap Ekspresi TNF- $\alpha$  dan Gambaran Histopatologi Ileum pada Mencit (*Mus musculus*) Model Diare Hasil Induksi Castor Oil (*Oleum ricini*)

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, 1 Oktober 2019

Yang menyatakan,

(Annisa Novianti Arifah)

NIM. 155130101111078

**Pengaruh Pemberian Infusa Daun Beluntas (*Pluchea indica L.*) terhadap Ekspresi TNF- $\alpha$  dan Gambaran Histopatologi Ileum pada Mencit (*Mus musculus*) Model Diare Hasil Induksi Castor Oil(*Oleum ricini*)**

**ABSTRAK**

Diare merupakan gangguan pencernaan yang ditandai dengan frekuensi defekasi yang melebihi frekuensi normal, konsistensi yang encer dan bersifat akut maupun kronis. Bahan induksi diare yang digunakan pada penelitian ini adalah minyak jarak (*castor oil*) yang bersifat iritan pada saluran pencernaan. Infusa daun beluntas dapat digunakan sebagai bahan pengobatan diare karena mengandung flavonoid dan tanin yang berguna dalam proses penyembuhan diare. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh infusa daun beluntas (*Pluchea indica L.*) terhadap ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- $\alpha$ ) ileum dan gambaran histopatologi ileum pada mencit (*Mus musculus*) model diare hasil induksi *castor oil*. Hewan coba yang digunakan sebanyak 30 ekor mencit jantan dengan berat badan 20-25 gram berusia 40-60 hari yang dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan yaitu kontrol negatif (tanpa perlakuan/mencit sehat), kontrol positif (diinduksi *castor oil* tanpa diterapi), kelompok terapi pembanding (diinduksi *castor oil* dan diterapi norit<sup>®</sup>), kelompok perlakuan 1,2,3 (diinduksi *castor oil* dan terapi infusa daun beluntas konsentrasi bervariasi 5, 10, 20%). Pengamatan ekspresi TNF- $\alpha$  dengan metode imunohistokimia dideskripsikan menggunakan *software* immunorasio yang dianalisa dengan uji *One-Way Anovadan* uji lanjutan *Tukey* dengan tingkat kepercayaan 95% ( $\alpha= 0,05$ ) dan memperoleh hasil uji yang menunjukkan bahwa mencit diare yang diterapi infusa daun beluntas mengalami penurunan ekspresi TNF- $\alpha$ . Pengamatan gambaran histopatologi ileum dengan pewarnaan *Haematoxyllin-Eosin* (HE) dianalisa secara deskriptif kualitatif berdasarkan kerusakan jaringan mukosa ileum. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terapi infusa daun beluntas secara signifikan ( $p<0,05$ ) mampu menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  dan memperbaiki histopatologi ileum dengan konsentrasi terbaik adalah 20%. Kesimpulan dari penelitian ini yaitu pemberian infusa daun beluntas (*Pluchea indica L.*) dengan konsentrasi 20% dapat digunakan sebagai alternatif terapi diare pada mencit (*Mus musculus*).

**Kata kunci :** Diare, daunbeluntas, TNF- $\alpha$ , histopatologi ileum

**The Potency of Beluntas (*Pluchea indica L.*) Leaf Infusion towards TNF- $\alpha$  Expression and Ileum Histopathology on Diarrhea Mice (*Mus musculus*) Induced by Castor Oil (*Oleum ricini*)**

**ABSTRACT**

Diarrhea is a digestive disorder characterized by a frequency of defecation that exceeds the normal frequency, the consistency is dilute and is acute or chronic. Diarrhea induction material used in this study was castor oil which stimulates irritation in the digestive tract. Beluntas leaf infusion can be used as a treatment for diarrhea because it contains flavonoids and tannins which are useful in the healing process of diarrhea. This study was aimed to determine the effect of infusion of beluntas (*Pluchea indica L.*) leaves on expression of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ) and ileal histopathology in mice (*Mus musculus*) diarrhea model caused by castor oil induction. The animal used in this study was 30 male mice with a body weight of 20-25 grams aged 40-60 days, which were divided into 6 treatment groups namely negative control (without treatment / healthy mice), positive control (castor oil induced, without therapy), therapy comparison group (castor oil induced and treated with norit<sup>®</sup>), and treatment group 1, 2, 3 (castor oil induced and infusion therapy of beluntas leaves concentration varied 5, 10, 20%). Observation of TNF- $\alpha$  expression by immunohistochemistry method was described using immunoratio software that was analyzed by *One-Way Anova* test and *Tukey* follow-up test with a confidence level of 95% ( $\alpha = 0.05$ ) and obtained test results showed that diarrhea mice treated with infusion of beluntas leaves decreased TNF- $\alpha$  expression. Observation of ileal histopathology with *Haematoxyllin-Eosin* (HE) stain was analyzed descriptively and qualitatively based on ileal mucosal tissue damage, and the results of the study showed that therapy of beluntas leaf infusion was able to reduce damage to ileal mucosal tissue. The results of the study showed that the beluntas leaf infusion can reduce the expression of TNF- $\alpha$  significantly ( $p < 0,05$ ) and reduce the damage of ileal mucosal tissue with optimal dose of 20% beluntas leaf infusion.. The conclusion of this study is the dose of 20% beluntas leaf infusion can be used as an alternative therapy for diarrhea in mice (*Mus musculus*).

**Keywords:**Diarrhea, beluntas leaves, TNF- $\alpha$ , ileum histopathology

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan yang Maha Esa atas berkat dan anugerah-Nya penulis menyusun skripsi penelitian dengan judul **“Pengaruh Pemeberian Infusa Daun Beluntas (*Pluchea indica L.*) terhadap Ekspresi TNF- $\alpha$  dan Gambaran Histopatologi Ileum pada Mencit (*Mus musculus*) Model Diare Hasil Induksi Castor Oil(*Oleum ricini*)”** sebagai tugas akhir/skripsi sebagai syarat kelulusan menjadi Sarjana Kedokteran Hewan.

Skripsi ini disusun berdasarkan diskusi dengan berbagai pihak serta literatur yang penulis baca dari beberapa referensi. Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada :

1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES dan drh. Viski Fitri Hendrawan, M.Vetselaku dosen pembimbing yang telah menyisihkan waktunya untuk membimbing penulis pada saat penulisan skripsi ini.
2. drh. Aldila Noviatri, M.Biomed dan drh. Wawid Purwatiningsih, M.Vet, M.Sc selaku dosen penguji atas segala ilmu, dukungan, serta saran dan masukan dalam penyempurnaan penulisan tugas akhir ini.
3. Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang.
4. Papa, Mama, dan keluarga besar tercinta yang selalu memberi kasih sayang, dorongan, dukungan dan doa untuk menyelesaikan studi penulis serta perhatiannya akan kebutuhan penulis baik secara moril maupun materi.

5. Rekan seperjuangan Neny Fitria, Farisa Fitriana, Elga Afrindha, Fidia Hestikasari, Putri Dwiarishaatas kerjasama, kasih sayang, semangat, dan dukungan dalam menyelesaikan penelitian ini.
6. Seluruh dosen dan civitas akademika yang telah membimbing, memberikan ilmu, dan mewadahi penulis selama menjalankan studi di Program Studi Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
7. Seluruh kolegium Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya, khususnya kepada teman-teman DNA, Kolegium FKH UB

Penulis sadar bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna. Penulis berharap skripsi ini dapat bermanfaat khususnya bagi penulis dan umumnya bagi pembaca untuk itu saran yang membangun sangat penulis harapkan.

Penulis

Annisa Novianti Arifah

## DAFTAR ISI

|  | Halaman     |
|--|-------------|
| <b>HALAMAN JUDUL</b> .....                                     | <b>ii</b>   |
| <b>LEMBAR PENGESAHAN</b> .....                                 | <b>iii</b>  |
| <b>LEMBAR PERNYATAAN</b> .....                                 | <b>iv</b>   |
| <b>ABSTRAK</b> .....   | <b>v</b>    |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | <b>vi</b>   |
| <b>KATA PENGANTAR</b> .....                                    | <b>vii</b>  |
| <b>DAFTAR ISI</b> .....  | <b>ix</b>   |
| <b>DAFTAR GAMBAR</b> .....                                     | <b>xi</b>   |
| <b>DAFTAR TABEL</b> .....                                      | <b>xii</b>  |
| <b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....                                   | <b>xiii</b> |
| <b>DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG</b> .....                        | <b>xiv</b>  |
| <b>BAB 1 PENDAHULUAN</b> .....                                 | <b>1</b>    |
| 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           |
| <b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b> .....                            | <b>7</b>    |
| 2.1 Diare .....  | 7           |
| 2.2 Minyak Jarak ( <i>Oleum ricini</i> ) .....                 | 8           |
| 2.3 Tanaman Beluntas ( <i>Pluchea indica L.</i> ) .....        | 10          |
| 2.4 Norit® .....   | 12          |
| 2.5 Hewan Coba Mencit ( <i>Mus musculus</i> ) .....            | 13          |
| 2.5.1 Ileum .....  | 15          |
| 2.6 TNF- $\alpha$ ( <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i> ) ..... | 17          |
| <b>BAB 3 KERANGKA KONSEP</b> .....                             | <b>19</b>   |
| 3.1 Kerangka Konseptual .....                                  | 19          |
| 3.2 Hipotesa Penelitian .....                                  | 24          |
| <b>BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN</b> .....                       | <b>25</b>   |
| 4.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....                          | 25          |
| 4.2 Alat dan Bahan Penelitian .....                            | 25          |
| 4.3 Rancangan Penelitian .....                                 | 26          |
| 4.4 Sampel Penelitian .....                                    | 26          |



|  |           |
|--|-----------|
| 4.5 Variabel Penelitian .....  | 28        |
| 4.6 Tahapan Penelitian .....   | 28        |
| 4.6.1 Persiapan Hewan Coba.....  | 28        |
| 4.6.2 Pembuatan Infusa Dari Daun Beluntas ( <i>Pluchea indica L.</i> ) .....   | 28        |
| 4.6.3 Induksi Diare Dengan <i>Castor Oil (Oleum Ricini)</i> .....  | 29        |
| 4.6.4 Induksi Terapi Infusa Daun Beluntas dan Obat Pembeding<br>(Norit <sup>®</sup> ) .....                                      | 30        |
| 4.6.5 Isolasi Organ Ileum .....  | 30        |
| 4.6.6 Pembuatan Preparat Histopatologi Ileum.....  | 31        |
| 4.6.7 Pembuatan Preparat IHK.....  | 34        |
| 4.7 Analisis Data .....  | 35        |
| <b>BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>  | <b>36</b> |
| 5.1 Pengaruh Infusa Daun Beluntas ( <i>Pluchea indica L.</i> ) Terhadap Ekspresi<br>TNF- $\alpha$ Ileum Mencit Model Diare.....  | 36        |
| 5.2 Pengaruh Infusa Daun Beluntas ( <i>Pluchea indica L.</i> ) Terhadap<br>Gambaran Histopatologi Ileum Mencit Model Diare ..... | 44        |
| <b>BAB 6 PENUTUP.....</b>  | <b>55</b> |
| 6.1 Kesimpulan.....  | 55        |
| 6.2 Saran.....   | 55        |
| <b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>  | <b>56</b> |
| <b>LAMPIRAN.....</b>   | <b>60</b> |

## DAFTAR GAMBAR

| Gambar   | Halaman |
|--|---------|
| 2.1 Tanaman beluntas ( <i>Pluchea indica L.</i> ).....   | 10      |
| 2.2 Mencit ( <i>Mus musculus</i> ) .....   | 13      |
| 2.3 Histologi normal ileum mencit .....  | 17      |
| 3.1 Kerangka Konsep Penelitian .....   | 19      |
| 5.1 Ekspresi TNF- $\alpha$ pada jaringan ileum .....   | 37      |
| 5.2Gambaran histopatologi ileum mencit mukosa ileum mencit pewarnaan HE<br>perbesaran 100x dan 400x pada kelompok kontrol negatif (K-) ..... | 45      |
| 5.3Gambaran histopatologi ileum mencit mukosa ileum mencit pewarnaan HE<br>perbesaran 100x dan 400x pada kelompok kontrol positif (K+) ..... | 46      |
| 5.4Gambaran histopatologi ileum mencit mukosa ileum mencit pewarnaan HE<br>perbesaran 100x dan 400x pada kelompok norit .....                | 46      |
| 5.5Gambaran histopatologi ileum mencit mukosa ileum mencit pewarnaan HE<br>perbesaran 100x dan 400x pada kelompok perlakuan 1 (P1) .....     | 47      |
| 5.6Gambaran histopatologi ileum mencit mukosa ileum mencit pewarnaan HE<br>perbesaran 100x dan 400x pada kelompok perlakuan 2 (P2) .....     | 47      |
| 5.7Gambaran histopatologi ileum mencit mukosa ileum mencit pewarnaan HE<br>perbesaran 100x dan 400x pada kelompok perlakuan 3 (P3) .....     | 48      |

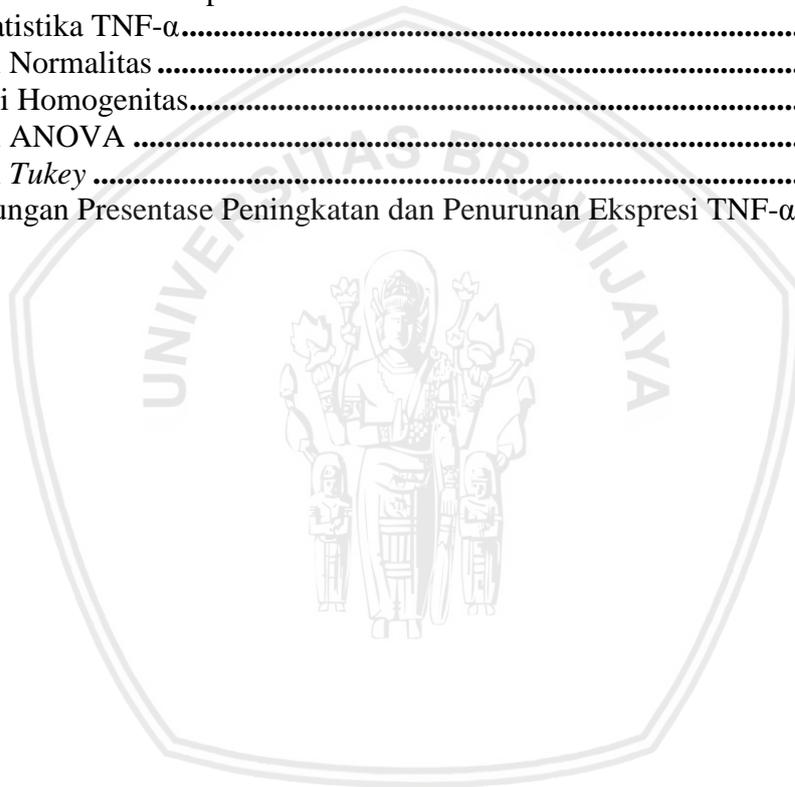
## DAFTAR TABEL

| <b>Tabel</b>  | <b>Halaman</b> |
|---|----------------|
| 4.1 Rancangan Kelompok Penelitian .....   | 27             |
| 5.1 Rata-rata ekspresi TNF- $\alpha$ pada ileum mencit yang diinduksi <i>castor oil</i> dan<br>diterapi infusa daun beluntas( <i>Pluchea indica L.</i> )..... | 39             |



## DAFTAR LAMPIRAN

| Lampiran   | Halaman |
|--|---------|
| 1. Laik Etik Penelitian .....  | 61      |
| 2. Perhitungan Konsentrasi Infusa Daun Beluntas( <i>Pluchea indica L.</i> )..... | 62      |
| 3. Perhitungan <i>Castor Oil</i> (MinyakJarak).....                              | 63      |
| 4. Perhitungan Dosis Norit <sup>®</sup> .....                                    | 64      |
| 5. SkemaPenelitian.....  | 65      |
| 6. Metode Pembuatan Preparat Histopatologi Ileum .....                           | 66      |
| 7. Metode PembuatanPreparatImmunohistokimia .....                                | 67      |
| 8. Uji Statistika TNF- $\alpha$ .....  | 69      |
| 8.1 Uji Normalitas .....   | 70      |
| 8.2 Uji Homogenitas.....   | 70      |
| 8.3 Uji ANOVA .....  | 71      |
| 8.4 Uji <i>Tukey</i> .....   | 71      |
| 9. Perhitungan Presentase Peningkatan dan Penurunan Ekspresi TNF- $\alpha$ ..... | 72      |



## DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

| <u>Simbol/singkatan</u> | : | <u>Keterangan</u>                                  |
|-------------------------|---|--|
| %                       | : | Persen   |
| °C                      | : | Derajat celcius                                    |
| cc                      | : | <i>Cubic centimeter</i>                            |
| cm <sup>3</sup>         | : | <i>Centimeter cubic</i>                            |
| ANOVA                   | : | <i>Analysis Of Variance</i>                        |
| APCs                    | : | <i>Antigen Presenting Cells</i>                    |
| ATPase                  | : | <i>Adenosine Trifosfatase</i>                      |
| dkk                     | : | dan kawan-kawan                                    |
| DAB                     | : | <i>Diaminobenzidine</i>                            |
| <i>et all</i>           | : | <i>et all</i>                                      |
| g                       | : | Gram   |
| HE                      | : | Hematoxylin Eosin                                  |
| HRP                     | : | <i>Horseradish peroxidase</i>                      |
| IHK                     | : | Imunohistokimia                                    |
| K+                      | : | Kalium   |
| L.                      | : | Less   |
| LPS                     | : | <i>Lipopolisakarida</i>                            |
| MHC                     | : | <i>Major Histocompatibility Complex</i>            |
| ml                      | : | Mili liter   |
| Na+                     | : | Natrium  |
| NF-kB                   | : | <i>Nuclear Factor kappa B</i>                      |
| NK                      | : | <i>Natural Killer</i>                              |
| PBS                     | : | <i>Phosphate Buffer Saline</i>                     |
| PUFA                    | : | <i>Polyunsaturated Fatty Acid</i>                  |
| RAL                     | : | Rancangan Acak Lengkap                             |
| ROS                     | : | <i>Reactive Oxygen Species</i>                     |
| SPSS                    | : | <i>Statistical Package for the Social Sciences</i> |
| TNF- $\alpha$           | : | <i>Tumor Necrosis FactorAlpha</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 Chotiah, 2012 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).

Beberapa gejala yang disebabkan oleh diare yaitu dehidrasi, penurunan berat badan, hewan seringkali merejan atau dan tenesmus. Peningkatan frekuensi defekasi bisa sampai 3-4 kali dalam sehari dan jumlah feses yang dikeluarkan juga banyak, serta berbentuk cair atau lebih cair (Rahmadani, 2015). Terganggunya proses penyerapan makanan di usus mengakibatkan feses berair karena air tidak sempat diserap oleh dinding usus halus. Usus halus mempunyai area permukaan yang dirancang agar fungsi intestinal yaitu digesti, absorpsi dan sekresi berjalan optimal. Kondisi ileum yang mengalami diare tampak adanya kerusakan usus berupa terjadinya inflamasi, erosi vili dan pengelupasan epitel, sehingga mengganggu fungsi dari mukosa usus dan menyebabkan diare menjadi makin

berat. Secara spesifik, kasus diare akan menimbulkan gejala frekuensi defekasi (buang air besar) biasanya akan meningkat dari frekuensi normal.

Pengobatan antidiare yang beredar dipasaran yaitu pengobatan norit® yang tentunya memiliki efek samping seperti mual, nyeri perut, pusing-pusing, mulut kering, dan kelainan kulit mendadak (eksantema). Sedangkan untuk manfaatnya berfungsi sebagai antidiare yang bekerja dengan memulihkan sel-sel yang berada dalam keadaan hipersekresi ke keadaan reabsorpsi normal kembali (Tjay dan Rahardja, 2002). Masyarakat Indonesia juga meyakini bahwa diare yang seringkali terjadi tersebut dapat juga ditangani secara alami dengan obat herbal, yaitu dengan memanfaatkan daun dari tanaman beluntas (*Pluchea indica L.*) yang dapat digunakan sebagai alternatif pengobatan kuratif pada diare. Kelebihan infusa 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.

Tanaman beluntas (*Pluchea indica L.*) adalah salah satu tanaman asli Indonesia yang berpotensi untuk dikembangkan karena mengandung flavonoid (4,18%), alkaloid (0,316%), tannin (2,351%), minyak atsiri (4,47%), asam klorogenik, natrium, kalium, magnesium, dan fosfor yang dapat dimanfaatkan sebagai obat tradisional (Triyanto, dkk., 2014). Daun beluntas memiliki berbagai senyawa aktif antara lain flavonoid, alkaloid, tanin, lignan, terpena, fenilpropanoid, benzenoid, alkana, sterol, katekin, fenol hidrokuinon, dan saponin. Beberapa kandungan bahan aktif pada daun beluntas memiliki fungsi sebagai

antidiare adalah tanin dan flavonoid. Tanin sebagai bahan aktif daun beluntas yang memiliki sifat *adstringent* yang diperlukan untuk mengatasi diare. Sifat *adstringent* ini memiliki efek dapat mengendapkan protein pada permukaan usus. Keadaan tersebut dapat membentuk formasi lapisan (*barrier*) yang dapat menyebabkan perapatan sel terluar sehingga menghambat sekresi cairan dan elektrolit yang dikeluarkan ke dalam usus. Tanin juga memiliki efek sebagai antiiritan dan antisekretori dan mampu menghambat motilitas sehingga memperlama waktu transit usus.

Menurut Tjahjani (2015), beluntas (*Pluchea indica L.*) mempunyai senyawa aktif flavonoid golongan kuersetin sebagai antidiare dengan menghambat pelepasan asetilkolin pada saluran pencernaan yang menyebabkan motilitas usus juga akan menurun. Flavonoid mampu menurunkan motilitas usus, mengurangi sekresi air dan elektrolit akibat pemecahan minyak jarak (*castor oil*) serta memperlama waktu transit usus. Senyawa-senyawa aktif flavonoid dapat menghambat produksi TNF- $\alpha$  dengan cara menekan aktivasi NF- $\kappa$ B yang akan melemahkan respon inflamasi. NF- $\kappa$ B merupakan pengatur untuk gen dari beberapa sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$ , sehingga penurunan kadar TNF- $\alpha$  akan mencegah stress oksidatif yang dapat menyebabkan kerusakan jaringan ileum yang dapat dilihat secara histopatologi. Aktivitas tersebut kemudian mampu memperbaiki kontinuitas sel epitel usus, mengurangi erosi dan ruptur villi usus dan memulihkan permeabilitas permukaan mukosa usus ke arah normal.

Berdasarkan latar belakang tersebut, tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui adanya pengaruh infusa daun beluntas (*Pluchea indica L.*) terhadap

ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- $\alpha$ ) ileum dan gambaran histopatologi ileum pada mencit (*Mus musculus*) model diare hasil induksi *castor oil*(*oleum ricini*).

### 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diraikan, maka dapat dirumuskan beberapa masalah berikut :

1. Bagaimana pengaruh infusa daun beluntas (*Pluchea indica. L*) terhadap ekspresi TNF- $\alpha$  ileum pada mencit (*Mus musculus*) model diare hasil induksi *castor oil*(*oleum ricini*)?
2. Bagaimana pengaruh infusa daun beluntas (*Pluchea indica. L*) terhadap gambaran histopatologi ileum pada mencit (*Mus musculus*) model diare hasil induksi *castor oil*(*oleum ricini*)?

### 1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan, maka penelitian ini dibatasi pada:

- 1) Hewan model yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) jantan strain *Balb-C* dengan berat badan 20-25 gram dan berumur 40-60 hari. Penggunaan hewan coba telah lolos sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya (KEP-UB) dengan no. 935-KEP-UB (**Lampiran 1**).

- 2) Pemberian perlakuan diare pada hewan model mencit (*Mus musculus*) dilakukan dengan cara menginduksi *castor oil* yang didapatkan dari Materia Medica Kota Batu dengan volume 0,5 mL secara sonde lambung.
- 3) Pemberian terapi infusa daun beluntas (*Pluchea indica. L*) dengan konsentrasi bervariasi 5 %, 10 %, dan 20 % sebanyak 0,75 mL dan simplisia daun beluntas didapatkan dari Materia Medica Kota Batu .
- 4) Norit® sebagai obat pembanding sebanyak 0,8 mL secara sonde lambung.
- 5) Variabel yang diamati pada penelitian ini adalah Ekspresi TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor-Alpha*) dengan metode imunohistokimia dan perubahan histopatologi ileum pewarnaan *Haematoxyllin-Eosin* (HE).

#### 1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang penelitian, maka tujuan penelitian ini adalah :

1. Mengetahui pengaruh infusa daun beluntas (*Pluchea indica. L*) terhadap ekspresi *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) ileum pada mencit (*Mus musculus*) model diare hasil induksi *castor oil* (*oleum ricini*).
2. Mengetahui pengaruh infusa daun beluntas (*Pluchea indica. L*) terhadap gambaran histopatologi ileum pada mencit (*Mus musculus*) model diare hasil induksi *castor oil* (*oleum ricini*).

#### 1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk menambah ilmu pengetahuan dan membuktikan pengaruh pemberian infusa daun beluntas (*Pluchea indica. L*) terhadap ekspresi *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) ileum dan gambaran histopatologi ileum pada mencit (*Mus musculus*) model diare hasil induksi *castor oil*.



## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Diare

Diare adalah buang air besar (defekasi) dengan feses berbentuk cair atau setengah cair (setengah padat) dan kandungan air pada feses lebih banyak dari biasanya. Diare merupakan gangguan saluran pencernaan yang ditandai dengan terjadinya peningkatan peristaltik usus, sekresi cairan, volume dan frekuensi buang air besar dengan konsistensi feses lunak dan cair. Lindsay, dkk, (2011) menyebutkan bahwa rata-rata kematian ternak sapi yang disebabkan oleh diare di seluruh dunia mencapai 2,2 juta setiap tahunnya.

Menurut Rahmadani (2015), diare dapat disebabkan akibat terganggunya proses penyerapan makanan di usus sehingga dampaknya menyebabkan feses berair karena air tidak sempat diserap oleh dinding usus halus. Usus halus mempunyai area permukaan yang dirancang agar fungsi intestinal yaitu digesti, absorpsi dan sekresi berjalan optimal. Pada diare terjadi perubahan histologi usus berupa vili menjadi pendek dan lapisan sel epitel kolumnar berkurang, sehingga mengganggu fungsi kerja dari mukosa usus dan menyebabkan diare menjadi makin berat. Secara spesifik, kasus diare akan menimbulkan gejala frekuensi defekasi (buang air besar) biasanya akan meningkat dari frekuensi normal. Peningkatan frekuensi defekasi bisa sampai 3-4 kali dalam sehari dan jumlah feses yang dikeluarkan juga banyak, serta berbentuk cair atau lebih cair. Diare dapat menyebabkan beberapa gejala, seperti dehidrasi, penurunan berat badan, hewan seringkali merejan dan disertai dengan tenesmus. Diare berdasarkan dari

pada gangguan transportasi cairan usus, perpindahan air melalui membran usus berlangsung secara pasif dan hal ini ditentukan oleh aliran larutan secara aktif maupun pasif, terutama natrium, klorida, dan glukosa. Gangguan diare dapat melibatkan lambung dan usus (*Gastroenteritis*), usus halus (*Enteritis*), kolon (*Kolitis*) atau kolon dan usus (*Enterokolitis*) (Pane, 2014).

Diare berkaitan dengan penyakit tertentu pada saluran gastrointestinal yang dapat menyebabkan dehidrasi karena tubuh kekurangan cairan, kekurangan kalium, dan elektrolit dalam jumlah yang banyak. Ada tiga mekanisme patofisiologis umum pengganggu keseimbangan elektrolit dan air yang menyebabkan diare yaitu perubahan transportasi aktif ion dengan perubahan motilitas usus, peningkatan osmolaritas luminal, dan peningkatan tekanan hidrostatik jaringan (Rachmawati, 2016).

## **2.2 Minyak Jarak (*Oleum ricini*)**

Minyak jarak (*oleum ricini*) diperoleh dari biji tanaman jarak (*Ricinus communis*) dan terdiri dari senyawa trigliserida asam lemak. Minyak jarak telah lama dikenal sebagai bahan baku dalam berbagai industri khususnya industri farmasi dan kosmetik. Bahan baku yang tersedia relatif mudah diperoleh, karena biji tanaman jarak (*Ricinus communis*) tumbuh baik di iklim tropis. Komposisi minyak jarak adalah sekitar 87% asam risinoleat, 7% asam oleat, 3% asam linoleat, 2% asam palmitat, 1% asam stearat dan asam dihydroxystearic dalam jumlah kecil (Widyasanti, dkk., 2017).

Minyak jarak berupa minyak kental berwarna kuning jernih, hampir tidak berwarna atau pucat, memiliki sedikit bau dan rasa yang awalnya hambar hingga sedikit tajam. Minyak jarak larut dalam kloroform, dietil eter, etanol, asam asetat glasial, dan metanol. Massa jenis minyak jarak adalah 0.955-0.968 g/cm<sup>3</sup> pada suhu 25 °C. Minyak jarak tidak menjadi berbau tengik kecuali jika dipanaskan berlebihan (Felisia, 2016).

Minyak jarak (*oleum ricini*) yang masuk ke dalam usus akan terhidrolisis oleh enzim lipase menjadi gliserol dan asam risinoleat. Asam risinoleat inilah yang merupakan bahan aktif sebagai pencahar dan sebagai agen iritan saluran pencernaan. Sebagai pencahar obat ini tidak banyak digunakan lagi karena banyak obat yang lebih aman. Minyak jarak menyebabkan kolik, dehidrasi dan disertai gangguan elektrolit. Minyak ini merupakan bahan induksi diare pada penelitian diare secara eksperimental pada hewan percobaan sebelumnya (Teke, et al., 2007). Asam risinoleat hasil hidrolisis minyak jarak, merupakan senyawa iritan lokal yang dapat meningkatkan motilitas usus. Mula kerjanya cepat dan berlangsung terus sampai senyawa ini diekskresi melalui kolon berupa pengeluaran buang air besar berbentuk encer (Anwar, 2000).

### **2.3 Tanaman Beluntas (*Pluchea indica L.*)**

Menurut Fitriansyah dan Indradi (2018), beluntas memiliki klasifikasi taksonomi sebagai berikut :

Kingdom : Plantae  
Divisi : Spermatophyta  
Sub divisi : Angiospermae  
Kelas : Dicotyledonae  
Bangsa : Compositales  
Suku : Compositae  
Marga : Pluchea  
Spesies : *Pluchea indica* L.



**Gambar 2.1** Tumbuhan beluntas (Fitriansyah dan Indradi, 2018)

Beluntas (*Pluchea indica* L.) merupakan tanaman yang termasuk dalam herba famili *Asteraceae* yang tumbuh secara liar di daerah kering di tanah yang keras dan berbatu atau ditanam sebagai tanaman pagar. Tanaman perdu tegak yang sering bercabang banyak ini memiliki ketinggian 0,5-2 m dan memiliki daun berambut halus berwarna hijau muda. Helaian daun beluntas berbentuk oval atau bulat telur terbalik dengan pangkal daun runcing dan tepi daunnya bergerigi. Letak daun beluntas berseling dan bertangkai pendek dengan panjang dan sebesar 2,5-9 cm dan lebarnya 1-5,5 cm (Fitriansyah dan Indradi 2018) .

Tanaman beluntas (*Pluchea indica L.*) memiliki kandungan senyawa aktif yang beragam. Beluntas mengandung flavonoid, tanin, alkaloid, minyak atsiri, saponin, asam klorogenik, natrium, kalium, magnesium dan fosfor. Kandungan kimia daun beluntas yaitu flavanoid (4,18 %), tanin (2,351%), alkaloid (0,316 %), minyak atsiri (4,47%), phenolik, asam khlorogenik, natrium, kalsium, magnesium dan fosfor. Daun beluntas mengandung protein sebesar 17,78 – 19.02 %, vitamin C sebesar 98,25 mg/100 g, dan karoten sebesar 2.55 g/100 gram (Triyanto, dkk., 2014).

Menurut Umam, dkk (2010), daun beluntas memiliki kandungan senyawa aktif antara lain alkaloid, flavonoid, polifenol, tanin, monoterpen, sterol dan kuinon. Kandungan flavanoid di dalam daun beluntas membuat daun ini memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri gram positif. Kandungan senyawa fenolnya berguna untuk mengganggu pertumbuhan bakteri gram gram negatif. Tanaman beluntas yang merupakan tanaman perdu ini dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai lalapan, obat penghilang bau badan dan juga sebagai pagar pekarangan. Padahal daun beluntas memiliki banyak manfaat yang lain karena daun beluntas mengandung senyawa antibakteri seperti mengandung alkaloid, flavonoid, tanin, minyak atsiri (Septiana, dkk., 2016).

Tanaman beluntas (*Pluchea indica L.*) memiliki beberapa manfaat diantaranya adalah akar dan daun beluntas memiliki sifat astringen dan antipiretik. Daunnya digunakan sebagai anti peradangan, meningkatkan nafsu makan, penurun demam, menghilangkan bau badan serta meningkatkan kerja sistem pencernaan dengan cara menghambat pertumbuhan bakteri patogen yang

berlebih di dalam saluran pencernaan sehingga fungsi pencernaan bekerja secara optimal (Fitriansyah dan Indradi 2018).

#### 2.4 Norit<sup>®</sup>

Norit<sup>®</sup> adalah obat yang terbuat dari bahan karbon aktif atau arang aktif (karbo adsorben) sebagai obat jenis adsorbensia yang mempunyai daya serap pada permukaan (adsorpsi) yang kuat sehingga mampu menyerap zat-zat yang molekulnya besar misalnya toksin bakteri dan zat asing beracun yang ada dalam saluran pencernaan. Arang aktif adalah arang yang sudah diaktifkan, sehingga pori-porinya terbuka dan permukaannya bertambah luas. Permukaan arang aktif yang semakin luas ini menyebabkan daya adsorbsinya terhadap gas atau cairan makin tinggi (Lenntech, 2004). Kemampuan arang aktif (norit<sup>®</sup>) sebagai adsorben dapat digunakan untuk menyerap senyawa organik non polar seperti mineral, minyak, fenol poliaromatik hidrokarbon, menyerap bau, rasa, produk-produk fermentasi dan substansi non polar yang tidak larut dalam air.

Secara umum norit<sup>®</sup> yang masuk ke dalam usus bekerja dengan melapisi permukaan mukosa dinding saluran pencernaan sehingga toksin dan mikroorganisme tak bisa masuk menembus dan merusak mukosa usus. Selain itu, adsorben juga mengikat bakteri penyebab atau racun yang kemudian dieliminasi melalui feses. Manfaat norit<sup>®</sup> yang paling utama adalah untuk mengatasi diare dan manfaat lainnya selain itu adalah norit<sup>®</sup> ternyata juga dapat mengatasi masalah kelebihan gas di lambung (Suherman dkk, 2013).

## 2.5 Hewan Coba Mencit (*Mus musculus*)

Hewan coba adalah hewan yang sengaja dipelihara untuk digunakan sebagai hewan model yang berkaitan untuk pembelajaran dan mengembangkan berbagai macam bidang ilmu dalam skala penelitian atau pengamatan laboratorium. Hewan laboratorium yang sering digunakan yaitu mencit (*Mus musculus*), tikus putih (*Rattus norvegicus*), kelinci, dan hamster. Sekitar 40-80% penggunaan mencit (*Mus musculus*) sebagai hewan model laboratorium karena siklus hidupnya relatif pendek, jumlah anak per kelahiran banyak, variasi sifat-sifatnya tinggi, mudah ditangani, dan sifat anatomis dan fisiologinya terkarakterisasi dengan baik (Tolistiawaty dkk, 2014). Menurut Sari (2016), mencit (*Mus musculus*) memiliki bulu yang pendek halus dan berwarna putih serta ekor berwarna kemerahan dengan ukuran lebih panjang dari badan dan kepalanya (Gambar 2.2).



**Gambar 2.2** Mencit (*Mus musculus*) (Sari, 2016).

Adapun klasifikasi ilmiah tikus putih menurut Sari (2016) adalah sebagai berikut:

|         |            |
|---------|------------|
| Kingdom | : Animalia |
| Filum   | : Chordata |
| Kelas   | : Mamalia  |

|         |                       |
|---------|-----------------------|
| Ordo    | : Rodentia            |
| Famili  | : Muridae             |
| Genus   | : Mus                 |
| Spesies | : <i>Mus musculus</i> |

Mencit(*Mus musculus*) laboratorium memiliki berat badan yang bervariasi antara 20-35 g dan mencapai dewasa kelamin setelah berumur 35 hari dengan berat dewasa tubuh jantan dan betina secara berturut-turut 20-40 g dan 18-35 g dan suhu tubuh normal pada mencit yaitu sekitar 36,5 °C. Mencit(*Mus musculus*) merupakan hewan nokturnal yang sering melakukan aktivitasnya malam hari. Selain itu, mencit (*Mus musculus*) memiliki kebiasaan mengerat. Perilaku mencit(*Mus musculus*) dipengaruhi oleh beberapa faktor internal seperti kondisi seksual, perbedaan umur, hormon, kebuntingan, dan penyakit. Sedangkan faktor eksternal seperti makanan, minuman, dan lingkungan disekitarnya. Hewan pengerat digunakan ruangan dengan suhu 22°C ( $\pm 3$  °C), kelembapan relatif 30-70%, dan penerangan 12 jam terang dan 12 jam gelap. (Sari, 2016).

Menurut Ridwan (2013), penelitian yang memanfaatkan hewan coba harus menggunakan hewan coba yang sehat dan berkualitas sesuai dengan materi penelitian. Pemilihan mencit (*Mus musculus*) sebagai hewan coba karena mewakili kelas mamalia sehingga sistem reproduksi, pernapasan, pencernaan dan peredaran darah menyerupai manusia. Syarat mencit(*Mus musculus*) dapat digunakan sebagai hewan percobaan adalah hewan harus bebas dari kuman patogen, karena adanya kuman patogen dapat mengganggu jalannya reaksi pada percobaan yang akan diujikan. Pemanfaatan hewan coba pada penelitian kesehatan harus mengkaji

kelayakan dan alasan pemanfaatan hewan dengan mempertimbangkan penderitaan yang akan dialami oleh hewan coba.

Mencit (*Mus musculus*) model diare dihasilkan oleh induksi minyak jarak (*oleum ricini*) dengan cara pemberian sonde lambung. Minyak jarak (*oleum ricini*) di dalam usus akan terhidrolisis oleh enzim lipase menjadi gliserol dan asam risinoleat. Asam risinoleat inilah yang merupakan bahan aktif sebagai iritan lokal yang dapat menyebabkan iritasi dan inflamasi pada dinding mukosa usus. Keadaan tersebut dapat mengganggu membran permeabilitas elektrolit pada mukosa usus sehingga terjadi hipersekresi cairan dan elektrolit disertai dengan peningkatan aktivitas peristaltik usus. Penumpukan cairan dalam usus akibat hipersekresi disertai berkurangnya resorpsi cairan dan elektrolit dapat menyebabkan terjadinya diare (Anwar, 2000).

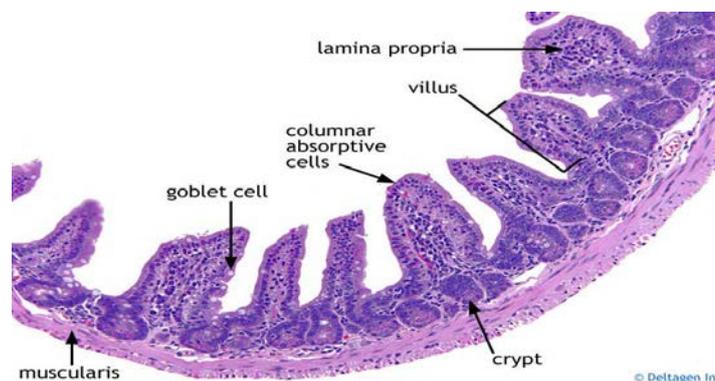
### 2.5.1 Ileum

Ileum merupakan usus halus yang terletak disebelah kanan bawah berhubungan dengan sekum dengan perantaraan lubang orificium ileokelis yang diperkuat *sfincter* dan katup *valvula ceicalis* (*valvular bauchini*) yang berfungsi mencegah cairan dalam kolon agar tidak masuk lagi ke ileum. Ahmed dan Osman (2011), mengatakan bahwa ileum normal dapat terlihat mukosa dengan vili, sel-sel epitel kolumnar dengan sel goblet, lapisan sub mukosa, lapisan muskularis mukosa, lapisan muskular dan lapisan serosa.

Ileum merupakan bagian ketiga dari usus halus yang akan berakhir pada *ileocecal junction*. Lapisan mukosa ileum terdiri dari lipatan, yang memiliki

banyak proyeksi seperti jari kecil yang dikenal sebagai vili. Vili mengandung sejumlah besar kapiler, yang menyerap asam amino dan glukosa pada proses pencernaan. (Saladin, 2004). Dibandingkan dengan jejunum, ileum memiliki dinding yang lebih tipis, lipatan-lipatan mukosa (plika sirkularis) yang lebih sedikit dan kurang menonjol, *vasa recta* yang lebih pendek, lemak mesenterium lebih banyak, dan lebih banyak *arcade arteriae* (Hartanto, 2018). Sel-sel yang melapisi ileum mengandung protease dan enzim karbohidrase yang bertanggung jawab untuk tahap akhir pencernaan protein dan karbohidrat. Enzim-enzim ini terdapat dalam sitoplasma sel epitel (Hildebrand & Goslow, 2001).

Ileum yang merupakan 3/5 bagian distal terletak pada bagian kanan bawah rongga abdomen ini digantungkan dengan mesenterium yang melekatkannya ke dinding posterior abdomen. Ileum yang merupakan bagian paling ujung dari usus halus ini berfungsi dalam proses penyerapan nutrisi dikarenakan penyerapan terbesar terjadi dalam ileum. Ileum memiliki peranan mengabsorpsi nutrisi seperti asam amino, vitamin, dan monosakarida (Siagian, 2016). Menurut Theodore, dkk. (2017), ileum mengandung sedikit vili yang sempit dan pendek, epitel pada ileum mengandung lebih banyak sel goblet dibandingkan dengan duodenum dan jejunum.



**Gambar 2.3** Histologi normal ileum mencit(*Mus musculus*)(Theodore, 2017).

## 2.6 TNF- $\alpha$ (*Tumor Necrosis Factor Alpha*)

*Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) dibentuk atas 212 asam amino diatur pada homotrimers yang stabil dengan berat molekul 51 kDa. TNF- $\alpha$  adalah suatu sitokin yang bersifat *pleiotropik*, yang sebagian besar dihasilkan oleh monosit, makrofag, dan sel T. Penelitian pada saat ini memperlihatkan bahwa, TNF- $\alpha$  dapat disimpan di dalam sel dalam bentuk proaktif, dan enzim yang dapat merubah TNF- $\alpha$  secara cepat meningkatkan ekspresi TNF- $\alpha$  yang aktif. Meningkatnya ekspresi TNF- $\alpha$  terdapat pada keadaan inflamasi akut dan kronik (Popa *et al.*, 2007).

TNF- $\alpha$  akan teraktivasi karena 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 dari parasit. TNF- $\alpha$  merupakan sitokin yang memiliki peranan besar dalam aktivasi sistem imun dibandingkan dengan sitokin lainnya. TNF- $\alpha$  memiliki peranan penting dalam mendukung proses kemotoksis sel-sel inflamasi, mengaktivasi sel-sel inflamasi baik TNF- $\alpha$  sendiri maupun sitokin lain, merangsang sel-sel endotel untuk mengekspresikan molekul adhesi, merangsang APCs untuk meningkatkan ekspresi molekul MHC kelas I dan mendukung fungsi sel T-*cytotoxic*. Efek yang ditimbulkan oleh TNF- $\alpha$  diantaranya adalah inisiator neutrofil dan monosit ke tempat-tempat infeksi, menginisiasi ekspresi molekul adhesi sel, menginduksi apoptosis sel-sel inflamasi (Cohen and Bonta, 2004).

Infeksi yang berat dapat memicu produksi TNF dalam jumlah besar yang menimbulkan reaksi sistemik. TNF- $\alpha$  memiliki sumber utama berupa fagosit mononuklear dan sel T yang diaktifkan antigen, sel NK, dan sel mast. *Lipopolisakarida* (LPS) merupakan rangsangan poten terhadap makrofag untuk mensekresi TNF. TNF- $\alpha$  mempunyai beberapa fungsi dalam proses inflamasi, yaitu dapat meningkatkan peran protrombotik dan merangsang molekul adhesi dari sel leukosit serta menginduksi sel endotel, berperan dalam mengatur aktivitas makrofag dan respon imun dalam jaringan dengan merangsang faktor pertumbuhan dan sitokin lain, berfungsi sebagai regulator dari *hematopoetik* serta komitogen untuk sel T dan sel B serta aktivitas sel neutrofil dan makrofag. TNF- $\alpha$  juga memiliki fungsi tambahan yang menguntungkan termasuk peranannya dalam respon imun terhadap bakteri, virus, jamur, dan invasi parasit (Supit, dkk.,2015).

Keberadaan TNF- $\alpha$  pada jaringan ileum dapat menjadi indikasi kondisi patologi jaringan yang dapat digambarkan melalui metode *imunohistokimia*. Proses inflamasi di dalam sel akan menyebabkan teraktivasinya makrofag yang akan memproduksi sitokin proinflamasi salah satunya TNF- $\alpha$ . Pada awalnya *oleum ricini* sebagai agen iritan lokal yang dapat meningkatkan motilitas usus dan selanjutnya akan menimbulkan inflamasi dan produksi TNF- $\alpha$ . Keberadaan TNF- $\alpha$  ini sangat penting sebagai parameter kerusakan usus.



## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Diare

Diare adalah buang air besar (defekasi) dengan feses berbentuk cair atau setengah cair (setengah padat) dan kandungan air pada feses lebih banyak dari biasanya. Diare merupakan gangguan saluran pencernaan yang ditandai dengan terjadinya peningkatan peristaltik usus, sekresi cairan, volume dan frekuensi buang air besar dengan konsistensi feses lunak dan cair. Lindsay, dkk (2011) menyebutkan bahwa rata-rata kematian yang disebabkan oleh diare di seluruh dunia mencapai 2,2 juta setiap tahunnya.

Menurut Rahmadani (2015), diare dapat disebabkan akibat terganggunya proses penyerapan makanan di usus sehingga dampaknya menyebabkan feses berair karena air tidak sempat diserap oleh dinding usus halus. Usus halus mempunyai area permukaan yang dirancang agar fungsi intestinal yaitu digesti, absorpsi dan sekresi berjalan optimal. Pada diare terjadi perubahan histologi usus berupa vili menjadi pendek dan sel epitel kuboid berkurang, sehingga mengganggu fungsi dari mukosa usus dan menyebabkan diare menjadi makin berat. Secara spesifik, kasus diare akan menimbulkan gejala frekuensi defekasi (buang air besar) biasanya akan meningkat dari normal. Peningkatan frekuensi defekasi bisa sampai 3-4 kali dalam sehari dan jumlah feses yang dikeluarkan juga banyak, serta berbentuk cair atau lebih cair. Diare dapat menyebabkan beberapa gejala, seperti dehidrasi, penurunan berat badan, hewan seringkali merejan atau disertai dengan tenesmus.

Diare berdasarkan dari pada gangguan transportasi larutan usus, perpindahan air melalui membran usus berlangsung secara pasif dan hal ini ditentukan oleh aliran larutan secara aktif maupun pasif, terutama natrium, klorida, dan glukosa. Gangguan diare dapat melibatkan lambung dan usus (*Gastroenteritis*), usus halus (*Enteritis*), kolon (*Kolitis*) atau kolon dan usus (*Enterokolitis*) (Pane, 2014).

Diare berkaitan dengan penyakit tertentu dari saluran gastrointestinal atau dengan penyakit luar saluran pencernaan. Diare yang hebat dapat menyebabkan dehidrasi karena tubuh kekurangan cairan, kekurangan kalium, dan elektrolit dalam jumlah yang banyak. Ada tiga mekanisme patofisiologis umum pengganggu keseimbangan elektrolit dan air yang menyebabkan diare yaitu perubahan transportasi aktif ion dengan perubahan motilitas usus, peningkatan osmolaritas luminal, dan peningkatan tekanan hidrostatik jaringan (Rachmawati, 2016).

## **2.2 Minyak Jarak (*Oleum ricini*)**

Minyak jarak (*oleum ricini*) diperoleh dari biji tanaman jarak (*Ricinus communis*) dan terdiri dari trigliserida asam lemak. Minyak jarak telah lama dikenal sebagai bahan baku dalam berbagai industri khususnya industri farmasi dan kosmetik. Bahan baku yang tersedia relatif mudah diperoleh, karena biji tanaman jarak (*Ricinus communis*) tumbuh baik di iklim. Komposisi minyak jarak adalah sekitar 87% asam risinoleat, 7% asam oleat, 3% asam linoleat, 2% asam

palmitat, 1% asam stearat dan asam dihydroxystearic dalam jumlah kecil (Widyasanti, dkk.,2017).

Minyak jarak berfungsi sebagai emolien, pembawa fase minyak dan pelarut. Minyak jarak berupa minyak kental berwarna kuning jernih, hampir tidak berwarna atau pucat, memiliki sedikit bau dan rasa yang awalnya hambar hingga sedikit tajam. Minyak jarak larut dalam kloroform, dietil eter, etanol, asam asetat glasial, dan metanol. Massa jenis minyak jarak adalah 0.955-0.968 g/cm<sup>3</sup> pada suhu 25 °C. Minyak jarak stabil jika tidak berkelebihan (Felisia, 2016).

Minyak jarak (*oleum ricini*) di dalam usus akan terhidrolisis oleh enzim lipase menjadi gliserol dan asam risinoleat. Asam risinoleat inilah yang merupakan bahan aktif sebagai pencahar. Minyak jarak juga bersifat emolien. Sebagai pencahar obat ini tidak banyak digunakan lagi karena banyak obat yang lebih aman. Minyak jarak menyebabkan kolik, dehidrasi yang disertai gangguan elektrolit. Minyak ini merupakan bahan induksi diare pada penelitian diare secara eksperimental pada hewan percobaan (Teke, et al.,2007).

Asam risinoleat hasil hidrolisis minyak jarak, merupakan iritan lokal yang dapat meningkatkan motilitas usus. Mula kerjanya cepat dan berlangsung terus sampai senyawa ini diekskresi melalui kolon. Dosis *oleum ricini* adalah 2-3 sendok makan (15-30 ml), diberikan sewaktu perut kosong. Efeknya timbul 1 sampai 6 jam setelah pemberian, berupa pengeluaran buang air besar berbentuk encer (Anwar, 2000).

### 2.3 Tanaman Beluntas(*Pluchea indica L.*)

Menurut Fitriansyah dan Indradi (2018), beluntas memiliki klasifikasi taksonomi sebagai berikut :

Kingdom : Plantae

Divisi : Spermatophyta

Sub divisi : Angiospermae

Kelas : Dicotyledonae

Bangsa : Compositales

Suku : Compositae

Marga : *Pluchea*

Spesies : *Pluchea indica L.*



**Gambar 2.1**Tumbuhan beluntas (Fitriansyah dan Indradi, 2018)

Beluntas (*Pluchea indica L.*) merupakan tanaman yang termasuk dalam herba famili Asteraceae yang tumbuh secara liar di daerah kering di tanah yang keras dan berbatu atau ditanam sebagai tanaman pagar. Tanaman perdu tegak yang sering bercabang banyak dan memiliki ketinggian 0,5-2 m ini memiliki daun

berambut dan berwarna hijau muda. Helaian daun beluntas berbentuk oval elips atau bulat telur terbalik dengan pangkal daun runcing dan tepi daunnya bergerigi. Letak daun beluntas berseling dan bertangkai pendek dengan panjang dan sebesar 2,5-9 cm dan lebarnya 1-5,5 cm (Fitriansyah dan Indradi 2018) . Berikut adalah gambar batang dan daun beluntas:

Tanaman beluntas (*Pluchea indica L.*) memiliki kandungan senyawa aktif yang beragam. Beluntas mengandung alkaloid, flavonoid, tanin, minyak atsiri, asam klorogenik, natrium, kalium, magnesium dan fosfor. Daun beluntas memiliki berbagai senyawa aktif antara lain tanin , flavonoid, alkaloid, tanin, lignan, terpena, fenilpropanoid, benzenoid, alkana, sterol, katekin, fenol hidrokuinon, dan saponin. Kandungan kimia daun beluntas yaitu alkaloid (0,316 %), flavonoid (4,18 %), tanin (2,351%), minyak atsiri (4,47%), phenolik, asam klorogenik, natrium, kalsium, magnesium dan fosfor. Daun beluntas mengandung protein sebesar 17,78 – 19.02 %, vitamin C sebesar 98,25 mg/100 g, dan karoten sebesar 2.55 g/100 gram (Triyanto, dkk., 2014).

Menurut Umam, dkk (2010), daun beluntas memiliki kandungan kimia antara lain alkaloid, flavonoid, polifenol, tanin, monoterpen, sterol dan kuinon. Kandungan flavonoid di dalam daun beluntas membuat daun ini memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri gram positif. Kandungan senyawa fenolnya berguna untuk mengganggu pertumbuhan bakteri gram gram negatif.

Tanaman beluntas yang merupakan tanaman perdu ini dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai lalapan, obat penghilang bau badan dan juga sebagai pagar pekarangan. Padahal daun beluntas memiliki banyak manfaat yang lain karena

daun beluntas mengandung senyawa antibakteri seperti mengandung alkaloid, flavonoid, tanin, minyak atsiri (Septiana, dkk., 2016).

Tanaman beluntas (*Pluchea indica L.*) memiliki beberapa manfaat diantaranya adalah akar dan daun beluntas memiliki sifat astringen dan antipiretik. Daunnya digunakan sebagai tonik saraf dan peradangan fortreating, meningkatkan nafsu makan, penurun demam, menghilangkan bau badan serta meningkatkan kerja sistem pencernaan dengan cara menghambat pertumbuhan bakteri patogen yang berlebih dalam saluran pencernaan sehingga metabolisme bekerja secara optimal (Fitriansyah dan Indradi 2018).

#### 2.4 Norit®

Norit® adalah obat yang terbuat dari bahan karbon aktif atau arang aktif (karbo adsorben) sebagai obat jenis adsorbensia yang mempunyai daya serap pada permukaan (adsorpsi) yang kuat sehingga mampu menyerap zat-zat yang molekulnya besar misalnya alkaloida, toksin bakteri dan zat asing beracun yang ada dalam saluran pencernaan. Arang aktif adalah arang yang sudah diaktifkan, sehingga pori-porinya terbukad dan permukaannya bertambah luas. Permukaan arang aktif yang semakin luas ini menyebabkan daya adsorbsinya terhadap gas atau cairan makin tinggi (Lenntech, 2004). Kemampuan arang aktif (norit®) sebagai adsorben dapat digunakan untuk menyerap senyawa organik non polar seperti mineral, minyak, fenol poliaromatik hidrokarbon, menyerap bau, rasa, produk-produk fermentasi dan substansi non polar yang tidak larut dalam air.

Secara umum norit<sup>®</sup> melapisi permukaan mukosa dinding saluran pencernaan sehingga toksin dan mikroorganisme tak bisa masuk menembus dan merusak mukosa usus. Selain itu, adsorben juga mengikat bakteri penyebab atau racun, yang kemudian dieliminasi melalui feses. Manfaat norit<sup>®</sup> yang paling utama adalah untuk mengatasi diare. Manfaat lainnya selain itu adalah norit<sup>®</sup> ternyata juga dapat mengatasi masalah kelebihan gas di lambung (Suherman dkk, 2013).

### 2.5 Hewan Coba Mencit (*Mus musculus*)

Hewan coba adalah hewan yang sengaja dipelihara untuk digunakan sebagai hewan model yang berkaitan untuk pembelajaran dan mengembangkan berbagai macam bidang ilmu dalam skala penelitian atau pengamatan laboratorium. Hewan laboratorium yang sering digunakan yaitu mencit (*Mus musculus*), tikus putih (*Rattus norvegicus*), kelinci, dan hamster. Sekitar 40-80% penggunaan mencit sebagai hewan model laboratorium karena siklus hidupnya relatif pendek, jumlah anak per kelahiran banyak, variasi sifat-sifatnya tinggi, mudah ditangani, dan sifat anatomis dan fisiologinya terkarakterisasi dengan baik (Tolistiawaty dkk, 2014). Menurut Sari (2016), mencit memiliki bulu yang pendek halus dan berwarna putih serta ekor berwarna kemerahan dengan ukuran lebih panjang dari badan dan kepalanya (**Gambar 2.2**).



**Gambar 2.2** Mencit (*Mus musculus*) (Sari, 2016).

Adapun klasifikasi ilmiah tikus putih menurut Sari (2016) adalah sebagai berikut:

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

Mencit laboratorium memiliki berat badan yang bervariasi antara 18-20 g pada umur empat minggu. Mencit mencapai dewasa kelamin setelah berumur 35 hari dengan berat dewasa tubuh jantan dan betina secara berturut-turut 20-40 g dan 18-35 g dan suhu tubuh normal pada mencit yaitu sekitar 36,5 °C. Mencit merupakan hewan nokturnal yang sering melakukan aktivitasnya malam hari. Selain itu, mencit memiliki kebiasaan mengerat. Perilaku mencit dipengaruhi oleh beberapa faktor internal seperti seks, perbedaan umur, hormon, kehamilan, dan penyakit. Sedangkan faktor eksternal seperti makanan, minuman, dan lingkungan disekitarnya. Hewan pengerat digunakan ruangan dengan suhu 22°C ( $\pm 3$  °C),

kelembapan relatif 30-70%, dan penerangan 12 jam terang dan 12 jam gelap. (Sari, 2016).

Menurut Ridwan (2013), penelitian yang memanfaatkan hewan coba harus menggunakan hewan coba yang sehat dan berkualitas sesuai dengan materi penelitian. Pemilihan mencit sebagai hewan coba karena mewakili kelas mamalia sehingga sistem reproduksi, pernapasan, dan peredaran darah menyerupai manusia. Syarat mencit dapat digunakan sebagai hewan percobaan adalah hewan harus bebas dari kuman patogen, karena adanya kuman pathogen dapat mengganggu jalannya reaksi pada percobaan yang akan diujikan. Pemanfaatan hewan coba pada penelitian kesehatan harus mengkaji kelayakan dan alasan pemanfaatan hewan dengan mempertimbangkan penderitaan yang akan dialami oleh hewan coba.

Mencit (*Mus musculus*) model diare dihasilkan dari induksi minyak jarak (*oleum ricini*) dengan cara pemberian sonde lambung. Minyak jarak (*oleum ricini*) di dalam usus akan terhidrolisis oleh enzim lipase menjadi gliserol dan asam risinoleat. Asam risinoleat inilah yang merupakan bahan aktif sebagai iritan lokal yang dapat menyebabkan iritasi dan inflamasi pada dinding mukosa usus. Keadaan tersebut dapat mengganggu membran permeabilitas elektrolit pada mukosa usus sehingga terjadi hipersekresi cairan dan elektrolit disertai dengan peningkatan aktivitas peristaltik usus. Penumpukan cairan dalam usus akibat hipersekresi disertai berkurangnya resorpsi cairan dan elektrolit dapat menyebabkan terjadinya diare (Anwar, 2000).

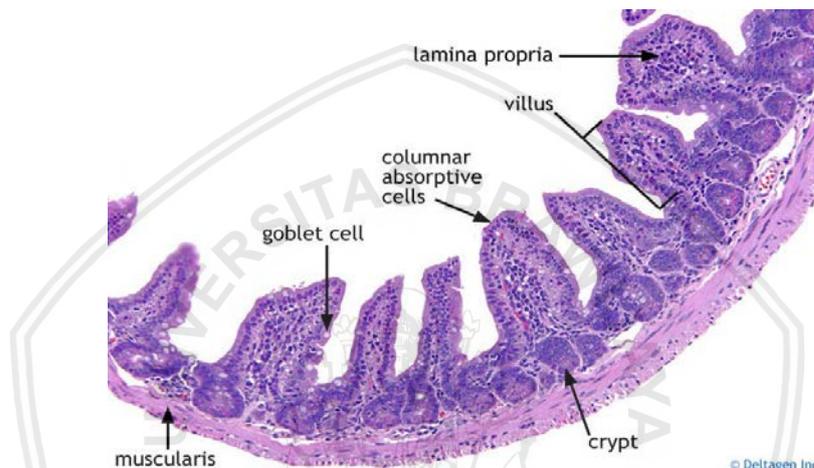
### 2.5.1 Ileum

Ileum merupakan usus halus yang terletak disebelah kanan bawah berhubungan dengan sekum dengan perantaraan lubang orificium ileokelis yang diperkuat *sfincter* dan katup *valvula ceicalis (valvular bauchini)* yang berfungsi mencegah cairan dalam kolon agar tidak masuk lagi ke ileum. Ahmed dan Osman (2011), mengatakan bahwa ileum normal dapat terlihat mukosa dengan vili, sel-sel epitel kolumnar dengan sel goblet, lapisan sub mukosa, lapisan muskularis mukosa, lapisan muskular dan lapisan serosa.

Ileum merupakan bagian ketiga dari usus halus yang akan berakhir pada *ileocecal junction*. Lapisan mukosa ileum terdiri dari lipatan, yang memiliki banyak proyeksi seperti jari kecil yang dikenal sebagai vili. Vili mengandung sejumlah besar kapiler, yang menyerap asam amino dan glukosa yang dalam proses pencernaan. (Saladin, 2004). Dibandingkan dengan jejunum, ileum memiliki dinding yang lebih tipis, lipatan-lipatan mukosa (plika sirkularis) yang lebih sedikit dan kurang menonjol, *vasa recta* yang lebih pendek, lemak mesenterium lebih banyak, dan lebih banyak *arcade arteriae* (Hartanto, 2018). Sel-sel yang melapisi ileum mengandung protease dan enzim karbohidrase yang bertanggung jawab untuk tahap akhir pencernaan protein dan karbohidrat. Enzim-enzim ini terdapat dalam sitoplasma sel epitel (Hildebrand & Goslow, 2001).

Ileum yang merupakan 3/5 bagian distal terletak pada bagian kanan bawah rongga abdomen ini digantungkan dengan mesenterium yang melekatkannya ke dinding posterior abdomen. Ileum yang merupakan bagian paling ujung dari usus halus ini berfungsi dalam proses penyerapan nutrisi dikarenakan penyerapan

terbesar terjadi dalam ileum. Ileum memiliki peranan mengabsorbpsi nutrisi seperti asam amino, vitamin, dan monosakara (Siagian, 2016). Menurut Theodore, dkk. (2017), ileum mengandung sedikit vili yang sempit dan pendek, epitel pada ileum mengandung lebih banyak sel goblet dibandingkan dengan duodenum dan jejunum.



**Gambar 2.3** Histologi normal ileum mencit (Theodore, 2017).

## 2.6 TNF- $\alpha$ (*Tumor Necrosis Factor Alpha*)

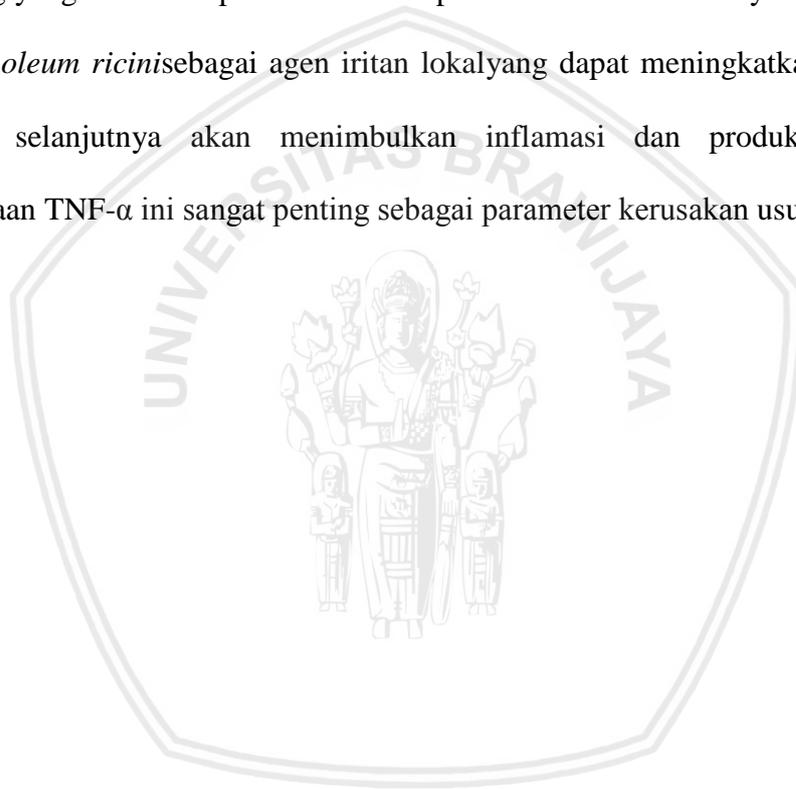
*Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) dibentuk atas 212 asam amino diatur pada homotrimers yang stabil dengan berat molekul 51 kDa. TNF- $\alpha$  adalah suatu sitokin yang bersifat *pleiotropik*, yang sebagian besar dihasilkan oleh monosit, makrofag, dan sel T. Penelitian pada saat ini memperlihatkan bahwa, TNF- $\alpha$  dapat disimpan di dalam sel dalam bentuk proaktif, dan enzim yang dapat merubah TNF- $\alpha$  secara cepat meningkatkan ekspresi TNF- $\alpha$  yang aktif. Meningkatnya ekspresi TNF- $\alpha$  terdapat pada keadaan inflamasi akut dan kronik (Popa *et al.*, 2007).

TNF- $\alpha$  akan teraktivasi karena 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 dari parasit. TNF- $\alpha$  merupakan sitokin yang memiliki peranan besar dalam aktivasi sistem imun dibandingkan dengan sitokin lainnya. TNF- $\alpha$  memiliki peranan penting dalam mendukung proses kemotoksis sel-sel inflamasi, mengaktivasi sel-sel inflamasi baik TNF- $\alpha$  sendiri maupun sitokin lain, merangsang sel-sel endotel untuk mengekspresikan molekul adhesi, merangsang APCs untuk meningkatkan ekspresi molekul MHC kelas I dan mendukung fungsi sel T-*cytotoxic*. Efek yang ditimbulkan oleh TNF- $\alpha$  diantaranya adalah inisiator neutrofil dan monosit ke tempat-tempat infeksi, menginisiasi ekspresi molekul adhesi sel, menginduksi apoptosis sel-sel inflamasi (Cohen and Bonta, 2004).

Infeksi yang berat dapat memicu produksi TNF dalam jumlah besar yang menimbulkan reaksi sistemik. TNF- $\alpha$  memiliki sumber utama berupa fagosit mononuklear dan sel T yang diaktifkan antigen, sel NK, dan sel mast. *Lipopolisakarida* (LPS) merupakan rangsangan poten terhadap makrofag untuk mensekresi TNF. TNF- $\alpha$  mempunyai beberapa fungsi dalam proses inflamasi, yaitu dapat meningkatkan peran protrombotik dan merangsang molekul adhesi dari sel leukosit serta menginduksi sel endotel, berperan dalam mengatur aktivitas makrofag dan respon imun dalam jaringan dengan merangsang faktor pertumbuhan dan sitokin lain, berfungsi sebagai regulator dari *hematopoetik* serta komitogen untuk sel T dan sel B serta aktivitas sel neutrofil dan makrofag. TNF- $\alpha$

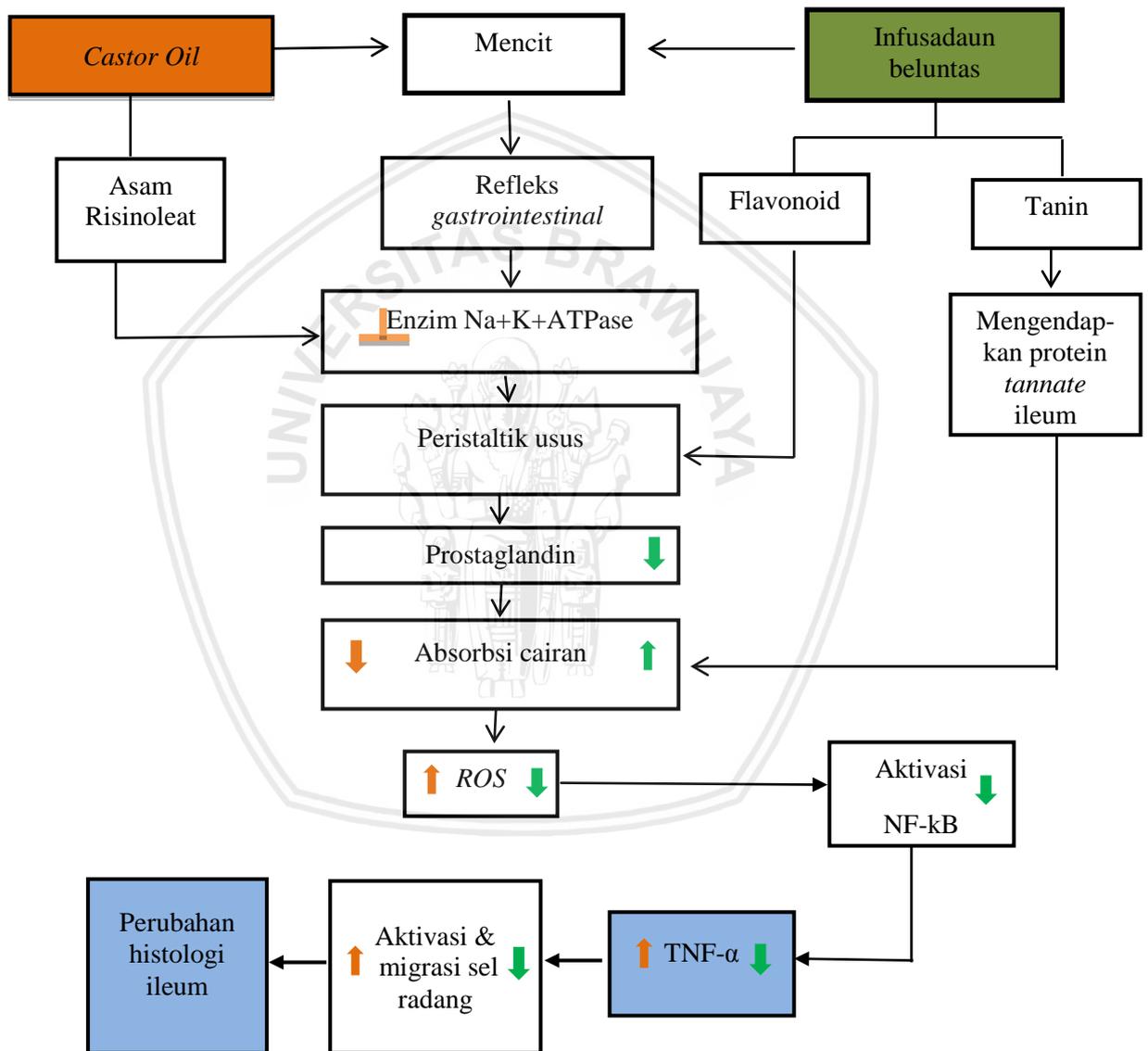
juga memiliki fungsi tambahan yang menguntungkan termasuk peranannya dalam respon imun terhadap bakteri, virus, jamur, dan invasi parasit (Supit, dkk.,2015).

Keberadaan TNF- $\alpha$  pada jaringan ileum dapat menjadi indikasi kondisi patologi jaringan yang dapat digambarkan melalui metode *imunohistokimia*. Proses inflamasi di dalam sel akan menyebabkan teraktivasi makrofag yang akan memproduksi sitokin proinflamasi salah satunya TNF- $\alpha$ . Pada awalnya *oleum ricini* sebagai agen iritan lokal yang dapat meningkatkan motilitas usus dan selanjutnya akan menimbulkan inflamasi dan produksi TNF- $\alpha$ . Keberadaan TNF- $\alpha$  ini sangat penting sebagai parameter kerusakan usus.



### BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESA PENELITIAN

#### 3.1 Kerangka Konsep Penelitian



**Gambar 3.1.** Mekanisme kerja induksi dan terapi diare pada mencit

Keterangan :

|   |                          |   |                                    |
|---|--------------------------|---|------------------------------------|
|  | : Paparan                |  | : Efek induksi <i>castor oil</i>   |
|  | : Parameter yang diamati |  | : Efek terapi infusa daun beluntas |
|  | : Terapi                 |  | : Menghambat                       |

Pembuatan hewan coba mencit (*Mus musculus*) model diare dengan menginduksi *castor oil* (minyak jarak). *Castor oil* diinduksikan ke mencit dengan cara sonde lambung mencit. Senyawa *castor oil* setelah sampai dilambung, terjadi gelombang peristaltik untuk merespon kedatangan *castor oil*. Gelombang tersebut diteruskan ke antrum, lalu antrum berkontraksi dan menyebabkan pencampuran isi lambung dan menutupnya *sphingter pilorik* (yang menghubungkan antrum dengan duodenum). Senyawa *castor oil* di lambung akan menyebabkan terjadinya refleks gastrointestinal (pendorongan massa) yang disebabkan oleh gastrin dan saraf otonom ekstrinsik dari lambung ke usus. Akhirnya refleks tersebut memicu *pleksus mienterikus* menggerakkan *castor oil* berpindah ke bagian distal pencernaan memasuki usus halus.

Senyawa aktif *castor oil* dipecah di usus menjadi senyawa aktif berupa asam risinoleat sebagai senyawa iritatif ini setelah mencapai usus menyebabkan penghambatan aktivitas enzim  $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ . Aktivitas pompa ini merupakan bagian integral dari membran sel usus yang berfungsi untuk mempertahankan gradien konsentrasi ion-ion  $\text{Na}^+$  dan  $\text{K}^+$  di ekstra dan intraseluler. Penghambatan transpor membran sel aktif  $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$  menyebabkan natrium masuk ke

dalam sel, kalium berdifusi ke luar sel dan terjadi gangguan potensial listrik pada membran sel usus. Penghambatan enzim  $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$  menyebabkan efek inotropik positif sehingga kadar aktivator ion  $\text{Ca}^{2+}$  meningkat dan meningkatnya ion  $\text{Ca}^{2+}$  akan meningkatkan kekuatan kontraksi pada otot polos saluran pencernaan sehingga meningkatkan peristaltik usus meningkat.

Peristaltik usus yang meningkat karena rangsangan asam risinoleat menyebabkan aktivitas kerja otot polos ileum meningkat dan menyebabkan kerusakan membran mukosa ileum dan adanya kerusakan tersebut memicu enzim fosfolipase diaktivasi untuk mengubah fosfolipid tersebut menjadi asam arakidonat, kemudian sebagian diubah oleh enzim siklooksigenase menjadi prostaglandin. Prostaglandin merupakan molekul pembawa yang berperan sebagai mediator utama inflamasi. Iritasi dan inflamasi pada dinding mukosa usus yang muncul karena induksi minyak jarak dapat menstimulasi pelepasan prostaglandin. Pelepasan prostaglandin menyebabkan pengaturan aktivitas motorik di sepanjang usus meningkat. Motilitas usus yang bertambah berhubungan dengan isi usus yang meninggi, inflamasi usus dan keadaan-keadaan terdapatnya *circulating humoral agent* (seperti prostaglandin) yang meningkat secara aktif. Terjadinya motilitas yang lebih cepat dan tidak teratur sehingga isi usus tidak sempat diabsorpsi menimbulkan terjadinya penurunan absorpsi cairan dan elektrolit pada ileum.

Inflamasi dinding mukosa ileum menyebabkan aktivasi makrofag untuk memfagositosis antigen, namun makrofag bekerja dengan cara melepaskan molekul radikal bebas (*ROS*). Jumlah molekul radikal bebas (*ROS*) yang

repository.ub.ac.id

berlebihan akan menyebabkan ketidakseimbangan antara antioksidan dan radikal bebas yang ada di dalam tubuh sehingga mengakibatkan stres oksidatif. Stres oksidatif memicu fosforilasi inhibitor NF<sub>κ</sub>B dan aktivasi NF<sub>κ</sub>B akan bermigrasi ke nukleus dan mengaktifkan lebih banyak makrofag lainnya. Makrofag inilah yang akan mengaktifkan sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$ . Peningkatan produksi TNF- $\alpha$  akan menyebabkan sel radang menjadi teraktivasi dan bermigrasi ke dalam jaringan. Migrasi sel radang akan mempengaruhi kerusakan jaringan ileum. 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 ileum.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Daun beluntas yang kaya akan kandungan alkaloid, flavonoid, tanin, minyak atsiri, asam klorogenik, natrium, kalium, magnesium dan fosfor diberikan kepada mencit yang telah mengalami diare akibat pemberian *castor oil*. Beberapa kandungan bahan aktif pada daun beluntas memiliki fungsi sebagai antidiare adalah flavonoid, tanin dan alkaloid. Tanin sebagai bahan aktif daun beluntas yang memiliki sifat *adstringent* yang diperlukan untuk mengatasi diare. Sifat *adstringent* ini memiliki efek dapat mengendapkan protein pada permukaan usus sehingga dapat membentuk formasi lapisan (*barrier*) pada permukaan saluran usus dan menjadikan permukaan usus menjadi lebih resisten. Lapisan (*barrier*) ini juga dapat menyebabkan perapatan sel terluar sehingga menghambat sekresi cairan dan elektrolit yang dikeluarkan ke dalam usus. Tanin juga memiliki efek sebagai antiiritan dan antisekretori.

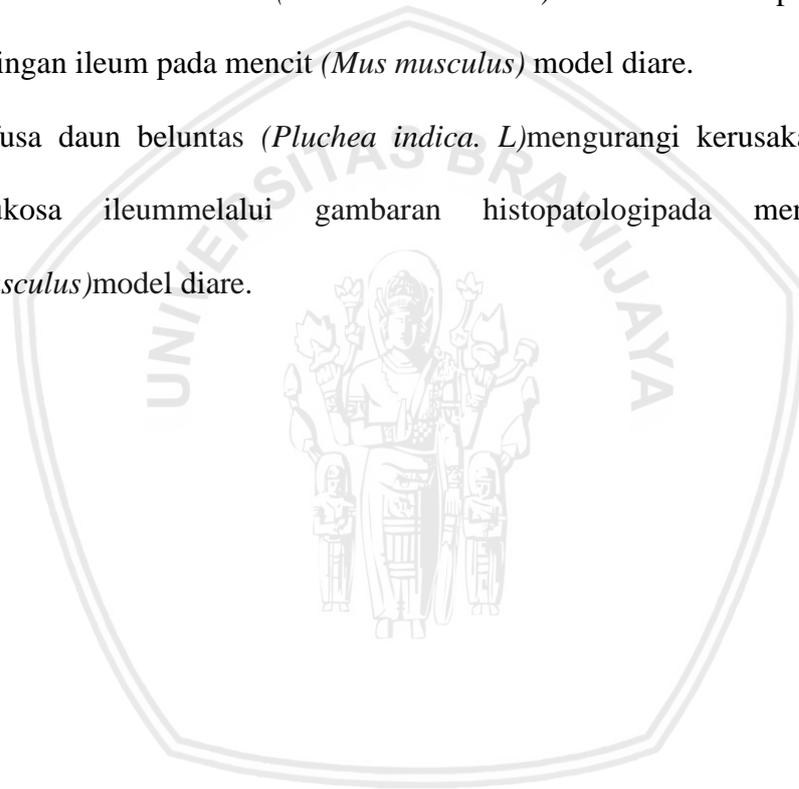
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Senyawa aktif lain yaitu flavonoid dan alkaloid sebagai antidiare adalah dengan menghambat pelepasan asetilkolin pada saluran pencernaan. Reseptor asetilkolin nikotinic memperantarai terjadinya kontraksi pada otot polos, sedangkan reseptor asetilkolin muskarinik tipe  $M_3$  mengatur kontraksi otot polos dan motilitas usus. Pelepasan asetilkolin yang terhambat menyebabkan motilitas usus juga akan terhambat sehingga aktivitas peristaltik yang berlebihan juga akan terhambat (Puspitaningrum, 2013). Flavonoid dan alkaloid mampu menghambat motilitas usus, mengurangi sekresi air dan elektrolit akibat pemecahan minyak jarak (*castor oil*) serta memperlama waktu transit usus. Flavonoid juga dapat berperan sebagai anti-radikal bebas karena kandungan antioksidannya yang dipercaya mampu menangkal radikal bebas dengan cara mendonorkan atom hidrogen pada radikal bebas yang menyebabkan senyawa tersebut menjadi stabil dan kurang reaktif. Keseimbangan antara oksidan dengan antioksidan akan menurunkan ROS, sejalan dengan itu terjadi penurunan stress oksidatif dan peroksidasi lipid. Adanya antioksidan dalam infusa daun beluntas dapat menghalangi laju kerusakan sel dengan menghambat radikal bebas dan memperbaiki permeabilitas lapisan mukosa ileum sehingga proses pencernaan bekerja normal kembali, kemudian kerusakan morfologi lapisan mukosa ileum yang terjadi akibat kondisi hipersekresi, peristaltik yang meningkat, dan absorpsi menurun akan mengalami regenerasi berupa perbaikan villi dan sel epitel, dan memulihkan permeabilitas permukaan mukosa usus ke arah normal dan perbaikan sel dapat diamati pada gambaran histopatologi ileum. (Syahrizal, 2008).

### 3.2 Hipotesa Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah, maka hipotesis dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Infusa daun beluntas (*Pluchea indica. L*) menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  jaringan ileum pada mencit (*Mus musculus*) model diare.
2. Infusa daun beluntas (*Pluchea indica. L*) mengurangi kerusakan jaringan mukosa ileum melalui gambaran histopatologi pada mencit (*Mus musculus*) model diare.



## BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

### 4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juni 2018 dengan pemeliharaan hewan coba, pembuatan preparat *Haematoxyllin-Eosin* (HE) ileum bertempat di Laboratorium Hewan dan Histopatologi Biosains Universitas Brawijaya, Malang. Pembuatan preparat imunohistokimia TNF- $\alpha$  ileum bertempat di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

### 4.2 Alat dan Bahan Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain kandang mencit, sonde lambung mencit, thermometer raksa, gelas ukur, kawat, kertas saring, botol obat, timbangan, alat pelindung diri, gunting, *scalpel handle*, *scalpel blade*, *sputit*, *pot sample*, *cover glass*, kertas label, kertas filter, slide kaca, mikrotom, oven dan mikroskop.

Bahan-bahan penelitian yang diperlukan selama melakukan penelitian antara lain : mencit *Balb-C*, daun beluntas, minyak jarak (*oleum ricini*), *aquadest*, *norit*<sup>®</sup>, *xylol*, alkohol (70%, 80%, 90%, 95% dan alkohol absolut), larutan PBS, bouin, parafin, air hangat, *haematoxyllin-eosin*, entelen dan sitokin TNF- $\alpha$ , antibodi primer (*Anti-rat TNF- $\alpha$* ), antibodi sekunder (*Goat anti-rat TNF- $\alpha$  labelled biotin*), enzim SA-HRP (*Strep Avidin Horse Radish Peroxidase*), substrat kromagen DAB (*Diamino Benzidine*).

### 4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorik dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), yaitu membagi subyek menjadi enam kelompok secara acak dengan setiap kelompok terdiri dari 5 ekor mencit jantan. Kelompok kontrol negatif adalah mencit tanpa perlakuan/ mencit sehat, kelompok kontrol positif adalah mencit yang diinduksi *castor oildan* tanpa diterapi apapun, kelompok terapipembanding (norit<sup>®</sup>) adalah kelompok mencit yang diinduksi *castor oildan* diterapi dengan norit<sup>®</sup> volume pemberian 0,8 mL, kelompok perlakuan 1 (terapi infusa daun beluntas 5%) adalah kelompok mencit yang diinduksi *castor oildan* diterapi infusa daun beluntas konsentrasi 5%, kelompok perlakuan 2 (terapi infusa daun beluntas 10%) adalah kelompok mencit diinduksi *castor oil* dan diterapi infusa daun beluntas konsentrasi 10%, dan kelompok perlakuan 3 (terapi infusa daun beluntas 20%) adalah mencit diinduksi *castor oildan* diterapi infusa daun beluntas konsentrasi 20%. **(Lampiran 5).**

### 4.4 Sampel Penelitian

Hewan model menggunakan mencit (*Mus musculus*) dengan strain *Balb-C* jantan dengan berat badan 20-25 gram berusia 40-60 hari yang didapatkan dari Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya, Malang. Hewan diadaptasikan selama sembilan hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008):

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

t = jumlah kelompok perlakuan

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

n = jumlah ulangan yang diperlukan

$$6n - 6 \geq 15$$

$$6n \geq 15 + 6$$

$$6n \geq 21$$

$$N \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk 6 kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan sebanyak 4 kali dalam setiap kelompok perlakuan. Total mencit yang dibutuhkan adalah 30 ekor.

**Tabel 4.1.** Rancangan Kelompok Penelitian

| Variabel yang Diamati                                     | Ulangan |   |   |   |
|---|---------|---|---|---|
| Eksresi TNF- $\alpha$ dan Gambaran Histopatologi Ileum    | 1       | 2 | 3 | 4 |
| Kelompok Kontrol Negatif                                  |         |   |   |   |
| Kelompok Kontrol Positif                                  |         |   |   |   |
| Kelompok Terapi Norit <sup>®</sup>                        |         |   |   |   |
| Kelompok Perlakuan 1<br>(Terapi Infusa Daun Beluntas 5%)  |         |   |   |   |
| Kelompok Perlakuan 2<br>(Terapi Infusa Daun Beluntas 10%) |         |   |   |   |
| Kelompok Perlakuan 3<br>(Terapi Infusa Daun Beluntas 20%) |         |   |   |   |

#### 4.5 Variabel Penelitian

- Variabel bebas :Induksi minyak jarak(*castor oil*), terapi infusa daun beluntas(*Pluchea indica L.*), terapi norit<sup>®</sup>
- Variabel tergantung : Ekspresi TNF- $\alpha$  ileum dan histopatologi ileum
- Variabel kontrol : Hewan coba mencit(*Mus musculus*) jantan strain Balb-C, berat badan, umur, pakan, minum, lingkungan.

#### 4.6 Tahapan Penelitian

##### 4.6.1 Persiapan Hewan Coba

Penyiapan hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) Balb-C jantan sebanyak 5 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 1x24 jam namun tetap diberikan minum sebelum dilakukan percobaan.

##### 4.6.2 Pembuatan Infusa Daun Beluntas (*Pluchea indica L.*)

Pembuatan infusa daun beluntas konsentrasi 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 konsentrasi 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 konsentrasi 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 Minyak Jarak (*Castor Oil*)**

Hewan coba mencit (*Mus musculus*) Balb-C dikelompokkan menjadi 6 kelompok perlakuan dengan masing-masing kelompok berjumlah 5 ekor. *Castor oil* diinduksikan secara per oral menggunakan sonde sebanyak 0,5 mL 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 Terapi Pembeding (Norit®)

Minyak jarak diinduksi minyak jarak dan setelah 4 jam kemudian diberi terapi infusa daun beluntas pada setiap kelompok dan diberi terapi Norit® sebagai terapi pembeding. Pada kelompok Norit® diberikan Norit® yang dilarutkan menggunakan *Naquade* dengan volume pemberian 0,8 mL. Perhitungan dosis Norit® dan *Naquade* yang diberikan per oral dapat dilihat pada Lampiran 4.

Terapi infusa daun beluntas diberikan pada 3 kelompok perlakuan 1,2,3 (5%, 10%, 20%), diberikan 1 kali terapi sebanyak 0,75 mL secara per oral dengan cara di sonde (Setiawati, 2015). Kemudian diamati gejala perubahannya sekitar 6 jam. Lalu dilanjutkan perlakuan nekropsis untuk mengoleksi organ.

#### 4.6.5 Isolasi Organ Ileum

Hewan coba yang sudah diberi perlakuan kemudian di *euthanasi* dan nekropsis, hal ini bertujuan untuk mengoleksi organ agar dapat melihat efek dari setiap perlakuan yang dihasilkan. Metode *euthanasia* yang

digunakan yaitu teknik dislokasi. *Occipitale*. Setelah itu, hewan coba di nekropsidengan di lentangkanposisi rebah dorsal padapapanlilin, kemudiandilakukan insisi pada area *abdomen linea alba (cauda midline)* sehingga *cavum abdomenterbuka*, setelah itu dikoleksi organ ileum menggunakan pinset, dikoleksi dicuci dengan NaCl fisiologis kemudian dimasukkan ke dalam pot sampel organ yang berisi formalin 10% untuk mengawetkan jaringan.

#### 4.6.6 Pembuatan Preparat Histopatologi Ileum

Organ ileum yang telah difiksasi dalam larutan formalin 10%, kemudian dibuat preparat histopatologi. Proses pembuatan preparat histopatologi terdiri dari proses 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 ke dalam larutan formalin 10%.

##### 2. Dehidrasi

Dehidrasi merupakan langkah kedua dalam pemrosesan jaringan yang 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 histopatologi. 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.

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 parafin. 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*

*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. *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 pewarna *Haematoxyllin-Eosin*(HE).

#### 7. Pewarnaan *Haematoxyllin-Eosin*(HE)

Pewarnaan *Haematoxyllin-Eosin*(HE) dilakukan dengan menggunakan zat pewarna *haematoxyllin* untuk memberi warna pada inti sel dan memberikan warna biru (*basofilik*) pada inti sel, serta *eosin* yang merupakan *counterstaining haematoxyllin* memberi warna merah muda pada sitoplasma.

Langkah pewarnaan HE (*Haematoxyllin-Eosin*) 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 *aquadest* selama 5 menit.
- d. Pewarnaan dengan pewarna *haematoxylin* selama 10 menit kemudian dicuci dengan air selama 30 menit dan *aquadest* selama 5-20 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 ileum.

#### 4.6.7 Pembuatan Preparat Imunohistokimia

Prosedur pewarnaan imunohistokimia dimulai dengan melakukan deparafinasi preparat terlebih dahulu direndam kedalam *xylol I*, *xylol II*, alkohol bertingkat yaitu 100%, 90%, 80%, 70%, *aquadest* diberikan selama 5 menit kemudian preparat dicuci menggunakan PBS pH 7,4 diulang selama 3 kali selama 5 menit, kemudian ditetaskan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% selama 10 menit. Setelah itu dilakukan pencucian kembali dengan PBS 7,4 dilakukan pengulangan 3 kali selama 5 menit dengan suhu ruang. Selanjutnya diinduksikan dengan antibodi primer (*Anti-rat TNF- $\alpha$* ) selama 24 jam dengan suhu 4°C kemudian dilakukan pencucian kembali dengan PBS pH 7,4 diulang 3 kali selama 5 menit, lalu diinkubasi dengan antibodi sekunder (*Goat anti rat labelled biotin*) selama satu jam dengan suhu ruangan kemudian dicuci kembali menggunakan PBS pH 7,4 diulang 3 kali dengan waktu 5 menit. Selanjutnya preparat ditetesi dengan SA-HRP (*Strep Avidin Horse Radish Peroxidase*) selama 40 menit dengan suhu ruang. Kemudian dicuci kembali menggunakan PBS pH 7,4 diulang 3 kali selama 5 menit. Setelah itu diinkubasi pada kromagen DAB selama 10-20 menit lalu di cuci dengan air mengalir selama 5 menit. Setelah itu dilakukan *counterstaining* menggunakan *haematoxyllin* selama 5 menit dan dicuci dengan air mengalir, kemudian

dilakukan dehidrasi dengan alkohol dan *xylol* selama 3 menit, kemudian di bilas dengan *aquadest* dan dikeringkan. Hal terakhir yang dilakukan adalah *mounting* dengan entellan dan kemudian ditutupi *cover glass* (Larasathi, dkk).

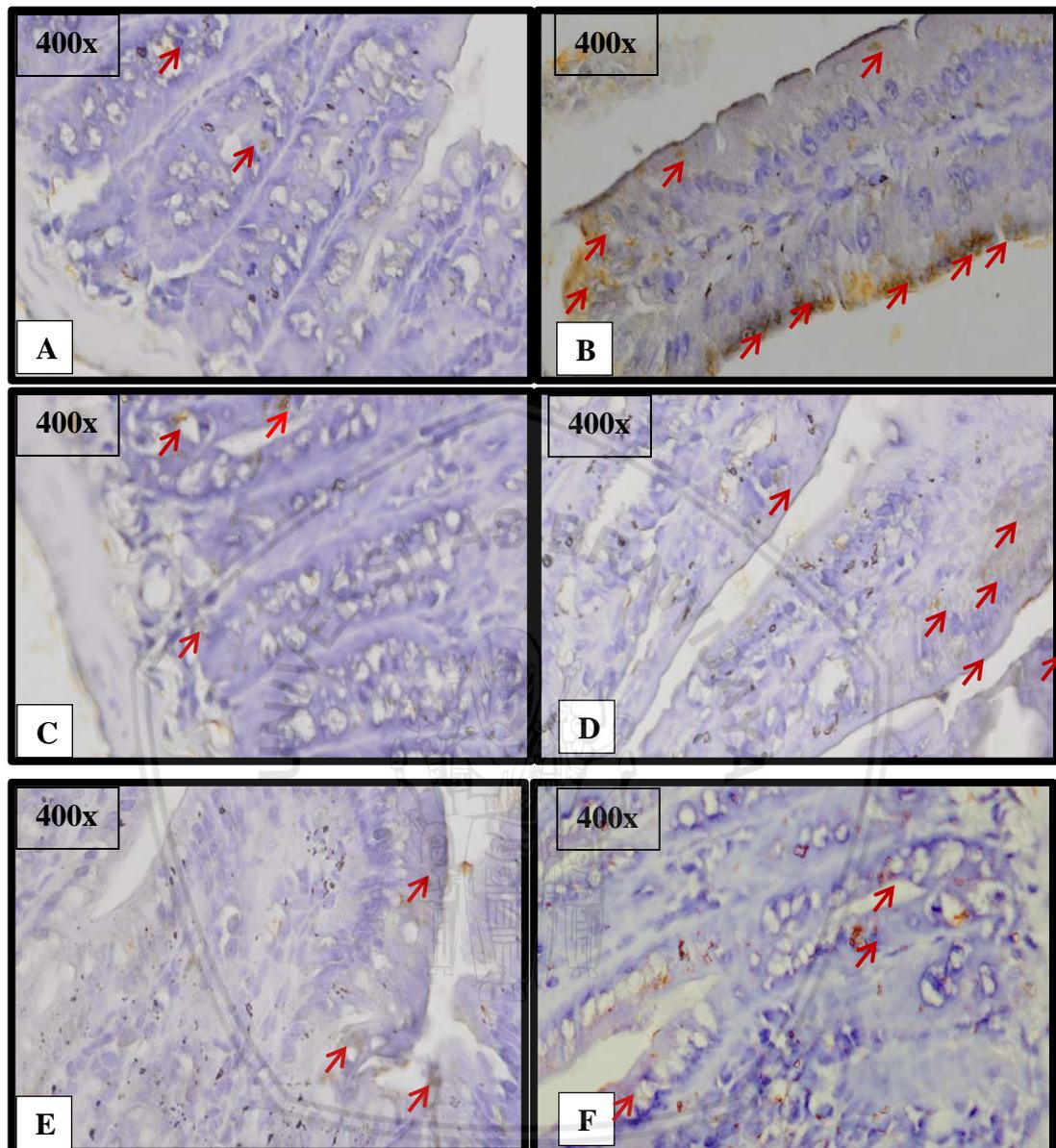
#### 4.7 Analisis Data

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Mencit dibedakan 6 kelompok perlakuan dengan 4 kali pengulangan. Hasil persentasi ekspresi TNF- $\alpha$  yang didapatkan dari input *software* imunorasio selanjutnya dilakukan analisis data ekspresi TNF- $\alpha$  menggunakan *One-Way Anova* dan uji lanjutan beda nyata jujur (BNJ)  $\alpha = 0,05$  untuk melihat dan menganalisa perbedaan antar kelompok perlakuan. Pengolahan data pada perubahan histopatologi ileum mencit (*Mus musculus*) dilakukan secara deskriptif dengan membandingkan gambaran histopatologi ileum dari masing-masing kelompok perlakuan.

## BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Pengaruh Infusa Daun Beluntas (*Pluchea indica L.*) Terhadap Ekspresi TNF- $\alpha$ Ileum Mencit Model Diare

Analisis ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- $\alpha$ ) pada penelitian ini dengan cara menghitung presentase ekspresi TNF- $\alpha$  ileum pada perbesaran 400x yang diproses melalui aplikasi *softwareImmunoratio* pada setiap mencit pada semua ulangan tiap perlakuan. Hasil perhitungan dari *softwareImmunoratio* berupa persentase area yang mengekspresikan TNF- $\alpha$ , kemudian dari data persentase tersebut dilakukan analisis uji statistika menggunakan *One-Way Anova* dengan aplikasi SPSS dan dilanjutkan dengan uji *Tukey* dengan taraf kepercayaan  $\alpha = 5\%$  (**Lampiran 8**). *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- $\alpha$ ) merupakan sitokin yang dihasilkan oleh makrofag sehingga memiliki peranan penting dalam terjadinya inflamasi. Ekspresi TNF- $\alpha$  dapat dilihat dengan metode imunohistokimia. Metode imunohistokimia merupakan suatu proses mengidentifikasi protein spesifik pada jaringan atau sel dengan menggunakan antibodi (Sukmadadari, 2012).



**Gambar 5.1** Ekspresi TNF- $\alpha$  pada jaringan ileum mencit perbesaran 400x

**Keterangan :** A = kontrol negatif ; B = kontrol positif ; C = terapi norit® ; D = terapi infusa daun beluntas 5% ; E = terapi terapi infusa daun beluntas 10% ; F = terapi terapi infusa daun beluntas 20% ; (↗) menunjukkan ekspresi TNF- $\alpha$ .

Penelitian ini dilakukan pada 6 kelompok mencit (*Mus musculus*) untuk mengetahui pengaruh pemberian infusa daun beluntas (*Pluchea indica L.*) terhadap ekspresi TNF- $\alpha$  pada ileum mencit (*Mus musculus*) model diare. Penurunan ekspresi TNF- $\alpha$  pada ileum ditunjukkan dengan makin sedikitnya warna

kecoklatan pada lamina propria dan sel epitel lapisan mukosa ileum (**Gambar 5.1**).

Hasil ekspresi TNF- $\alpha$  (**Gambar 5.1**) menunjukkan adanya warna coklat pada jaringan lapisan mukosa ileum mencit (*Mus musculus*) model diare dengan penggunaan antibodi TNF- $\alpha$  menggunakan metode imunohistokimia. Warna coklat yang timbul disebabkan dalam proses pembuatan preparat imunohistokimia antigen dalam ileum berikatan dengan antibodi primer (*Anti-rat TNF- $\alpha$* ) selanjutnya dilabeli oleh antibodi sekunder (*Goat anti rat Labelled Biotin*) sehingga terbentuk ikatan kompleks antigen-antibodi yang dikenali oleh enzim *Strep Avidin conjugated Horseradish Peroxidase* (SAHRP) yang akan terwarnai dengan substrat kromagen *Diaminobenzidine* (DAB) sehingga tervisualisasi warna kecoklatan pada sitokin TNF- $\alpha$  (Immunostar, 2010).

Hasil rata-rata ekspresi TNF- $\alpha$  yang didapatkan dari analisis statistika menggunakan *One-Way Anova* menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ ) dari seluruh perlakuan. Hal ini membuktikan adanya pemberian infusa daun beluntas setiap kelompok perlakuan dapat mempengaruhi penurunan dari ekspresi TNF- $\alpha$  pada jaringan ileum mencit yang diinduksikan oleh *castor oil*. Analisis statistika rata-rata dari ekspresi TNF- $\alpha$  pada ileum mencit pada masing masing kelompok perlakuan ditampilkan pada **Tabel 5.1**. Analisis dilanjutkan dengan uji *Tukey* atau BNJ (Beda Nyata Jujur) guna membandingkan rata-rata tiap uji kelompok perlakuan dari perbedaan notasi yang ada.

**Tabel 5.1** Rata-rata ekspresi TNF- $\alpha$  pada ileum mencit (*Mus musculus*) yang diinduksi *cator oildan* diterapi infusa daun beluntas

| Kelompok Perlakuan   | Rata-rata $\pm$ Standar deviasi TNF- $\alpha$ | % Peningkatan TNF $\alpha$ terhadap K- | % Penurunan TNF $\alpha$ terhadap K+ |
|----------------------|---|--|--------------------------------------|
| Kontrol negatif (K-) | 1,71 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>                  | -                                      | -                                    |
| Kontrol positif (K+) | 9,05 $\pm$ 0,67 <sup>d</sup>                  | 429,24                                 | -                                    |
| Norit <sup>®</sup>   | 1,81 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>                  | -                                      | 80                                   |
| Perlakuan 1 (5%)     | 5,52 $\pm$ 0,69 <sup>c</sup>                  | -                                      | 39,01                                |
| Perlakuan 2 (10%)    | 3,93 $\pm$ 0,41 <sup>b</sup>                  | -                                      | 56,57                                |
| Perlakuan 3 (20%)    | 2,36 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup>                  | -                                      | 74                                   |

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

Pada **Tabel 5.1** dapat dilihat bahwa kelompok mencit kontrol negatif yaitu mencit sehat tanpa perlakuan memiliki nilai rata-rata ekspresi TNF- $\alpha$  paling rendah (1,71 $\pm$ 0,33<sup>a</sup>) dan ditandai pada gambar imunohistokimia pada ileum (*Mus musculus*) (**Gambar 5.1.A**) terdapat sedikit warna coklat. Hal tersebut dikarenakan dalam keadaan normal sitokin TNF- $\alpha$  pasti terdapat didalam tubuh walaupun dalam jumlah yang sedikit sebagai sistem kekebalan tubuh. Menurut Baratawidjaja (2004), TNF- $\alpha$  merupakan suatu protein yang dihasilkan leukosit untuk merangsang dan mengaktifkan sistem imun terhadap respon inflamasi, dimana dalam keadaan normal patogen pada sistem kekebalan tubuh memicu reaktivitas imunitas.

Pada hasil kelompok kontrol positif yang didapatkan dari hasil uji *Tukey* menyatakan bahwa hasil kelompok kontrol positif (K+) berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap kontrol negatif (K-) yang ditandai dengan perbedaan notasi. Makna berbeda nyata ini menunjukkan hasil rata-rata TNF- $\alpha$  ekspresi pada kontrol positif yang merupakan kelompok mencit yang diinduksi *castor oil* tanpa diberi terapi berbeda dengan hasil rata-rata TNF- $\alpha$  ekspresi pada kontrol negatif yang merupakan kelompok mencit yang tanpa diberi perlakuan/ mencit sehat. Pada kontrol positif diinduksi *castor oil* terjadi peningkatan nilai ekspresi yang ditandai dengan adanya banyak warna coklat pada inti sel dan sitoplasma jaringan ileum (**Gambar 5.1.B**). Jumlah sel yang mengekspresikan TNF- $\alpha$  pada ileum kontrol positif memiliki rata-rata ekspresi yaitu  $9,05 \pm 0,67^d$  dengan presentase peningkatan terhadap kontrol negatif (K-) sebesar 429,24%. Peningkatan jumlah sel yang mengekspresikan TNF- $\alpha$  tersebut mengindikasikan terjadinya inflamasi pada ileum mencit kontrol positif hasil induksi *castor oil*. *Castor oil* masuk kedalam tubuh membentuk kompleks antigen yang dikenali oleh antibodi yang melekat pada membran sel ileum sehingga antigen menjadi indikator terjadinya proses inflamasi, selanjutnya dikenali oleh *Antigen Presenting Cell* (APC) berupa makrofag sehingga antigen tersebut terfagosit menjadi bagian yang lebih kecil yang akan berikatan dengan *Major Histocompatibility Complex* (MHC) dan antigen tersebut dibawa ke permukaan sitoplasma yang selanjutnya berikatan dengan sel intrinsik usus sehingga menghasilkan TNF- $\alpha$ . Peningkatan produksi TNF- $\alpha$  akan memicu peningkatan jumlah molekul radikal bebas (*ROS*) yang akhirnya dapat

merusak *fosfolipid bilayer* pada membran sel sehingga dinding sel ileum menjadi rusak dan rapuh (Gross, 2005).

Pada kelompok terapi obat norit<sup>®</sup> menunjukkan hasil yang terlihat pada inti sel dan sitoplasma jaringan ileum terwarnai coklat (**Gambar 5.1.C**) tidak berbeda nyata ( $p > 0,05$ ) terhadap kelompok kontrol negatif (K-) karena memiliki notasi yang sama dengan kelompok kontrol negatif (K-), namun sangat berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap kelompok kontrol positif (K+) yang ditandai dengan perbedaan notasi. Jumlah sel yang mengekspresikan TNF- $\alpha$  pada ileum mencit kelompok terapi obat norit memiliki rata-rata yaitu sebesar  $1,81 \pm 0,14^a$  dengan persentase penurunan terhadap kontrol positif sebesar 80%. Penurunan persentase ekspresi TNF- $\alpha$  tersebut disebabkan oleh kandungan karbon aktif dari obat norit<sup>®</sup> yang bersifat *adsorbent* yang berperan dalam memberikan efek antidiare dengan cara menyerap zat toksik senyawa *castor oil* lalu hasil serapan dibuang bersamaan dengan feses, sehingga kondisi ileum mengalami perbaikan.

Hasil rata-rata ekspresi TNF- $\alpha$  pada mencit (*Mus musculus*) sebagai antidiare induksi *castor oil* dengan terapi kuratif infusa daun beluntas menunjukkan terjadinya penurunan. Pada kelompok terapi konsentrasi 5% (**Gambar 5.1 D**), kelompok terapi konsentrasi 10% (**Gambar 5.1 E**), dan terapi konsentrasi 20% (**Gambar 5.1 F**), masing-masing menunjukkan adanya area berwarna coklat lebih sedikit pada jaringan ileum dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (K+) (**Gambar 5.1 B**). Pada perlakuan 1 yaitu kelompok terapi infusa daun beluntas konsentrasi 5%, didapatkan hasil terjadi penurunan ekspresi

TNF- $\alpha$  terhadap kontrol positif (K+) sebesar 39,01 % (**Tabel 5.1**) yang menandakan bahwa penurunan pada kelompok terapi kuratif infusa daun beluntas konsentrasi 5% (P1) berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap kelompok kontrol negatif (K-) dan kelompok kontrol positif (K+) karena saling berbeda notasi.

Pada kelompok terapi infusa daun beluntas konsentrasi 10% (P2) terjadi penurunan ekspresi TNF- $\alpha$  terhadap kontrol positif (K+) sebesar 56,57% (**Tabel 5.1**). Penurunan tersebut menunjukkan bahwa pada kelompok terapi infusa daun beluntas konsentrasi 10% (P2) berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap kelompok kontrol negatif (K-) dan kelompok kontrol positif (K+) karena saling berbeda notasi. Sedangkan pada kelompok terapi infusa daun beluntas konsentrasi 20% (P3) juga terjadi penurunan ekspresi TNF- $\alpha$  terhadap kontrol positif (K+) sebesar 74% (**Tabel 5.1**). Penurunan tersebut menunjukkan bahwa pada kelompok terapi infusa daun beluntas konsentrasi 20% (P3) tidak berbeda nyata ( $p > 0,05$ ) terhadap kelompok kontrol negatif (K-) karena memiliki notasi yang sama, namun berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap kelompok kontrol positif (K+) yang ditandai dengan perbedaan notasi.

Penurunan persentase ekspresi TNF- $\alpha$  tersebut disebabkan oleh kandungan senyawa aktif infusa daun beluntas (*Pluchea indica L.*) yaitu flavonoid yang berfungsi sebagai antioksidan (Triyanto, dkk., 2014). Mekanisme hambatan yang dilakukan oleh flavonoid sebagai antioksidan bisa terjadi secara langsung maupun tidak langsung. Flavonoid sebagai antioksidan secara langsung berfungsi untuk menetralkan efek toksik dari senyawa aktif *castor oil* yakni radikal bebas seperti ROS. Flavonoid akan mendonasikan atom hidrogen (H) dari

gugus hidroksil (OH) kepada radikal bebas sehingga flavonoid berubah menjadi radikal fenoksis flavonoid. Radikal fenoksis flavonoid mempunyai ikatan rangkap yang terkonjugasi sehingga flavonoid mampu menyeimbangkan dengan cara delokalisasi elektron sehingga menjadi senyawa kuinon yang stabil (Meng *et al.*,2010).

Flavonoid sebagai antioksidan secara tidak langsung yaitu dengan meningkatkan antioksidan untuk menangkal senyawa aktif *castor oil* berupa asam risinoleat sebagai radikal bebas. Hilangnya radikal bebas akibat diredam oleh flavonoid menyebabkan terhambatnya aktivasi NF- $\kappa$ B dan fosforilasi inhibitor NF- $\kappa$ B. Terhambatnya aktivasi NF- $\kappa$ B tersebut akan menyebabkan penurunan ekspresi TNF- $\alpha$ . Produksi TNF- $\alpha$  berkurang pada sel menyebabkan penurunan aktivasi neutrofil sehingga tidak terjadi kerusakan jaringan ileum.

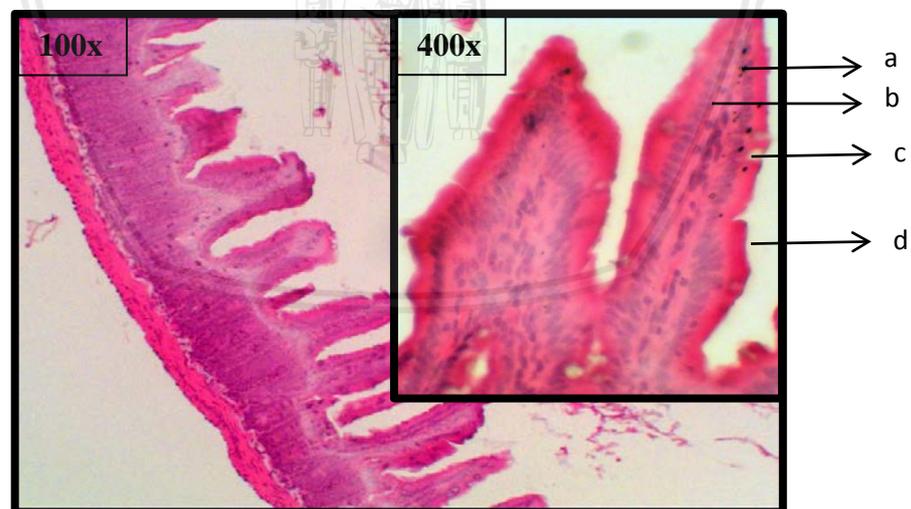
Senyawa aktif lain yaitu tanin sebagai senyawa aktif daun beluntas yang memiliki sifat *adstringent* yang diperlukan untuk mengatasi diare. Sifat *adstringent* ini memiliki efek dapat mengendapkan protein pada permukaan usus. Keadaan tersebut dapat membentuk formasi lapisan (*barrier*) pada permukaan saluran usus sehingga menjadikan permukaan usus lebih resisten. Lapisan (*barrier*) ini juga dapat menyebabkan perapatan sel terluar sehingga menghambat sekresi cairan dan elektrolit yang dikeluarkan ke dalam usus. Protein ini juga membuat mukosa usus menjadi lebih resisten terhadap rangsangan senyawa kimia dan toksin yang mengakibatkan diare (Kuddah, 2009). Mekanisme yang diperankan oleh flavonoid dan tanin dapat mengurangi kerusakan yang lebih parah pada mukosa ileum yang disebabkan oleh *castor oil*. Hal ini dapat menekan

produksi sitokin proinflamasi TNF- $\alpha$  akibat pemberian terapi kuratif infusa daun beluntas.

Berdasarkan hasil uji *One-WayAnova* yang dilanjutkan dengan uji *Tukey* menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antar kelompok perlakuan terapi konsentrasi 5%, terapi konsentrasi 10%, terapi konsentrasi 20% yang ditandai dengan perbedaan notasi. Mencit yang diberikan terapi infusa daun beluntas dengan konsentrasi 20% memiliki penurunan ekspresi TNF- $\alpha$  terhadap kontrol positif (K+) yang paling tinggi apabila dibandingkan dengan kelompok terapi konsentrasi 5% dan 10% yaitu mencapai 74%. Penurunan tersebut mendekati angka penurunan ekspresi TNF- $\alpha$  pada kelompok kontrol negatif yaitu kondisi normal dan terapi obat norit<sup>®</sup> yang memang terbukti sebagai obat antidiare. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi terapi infusa daun beluntas 20% merupakan konsentrasi yang paling efektif untuk menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  pada mencit model diare, dikarenakan nilai rata-rata ekspresi TNF- $\alpha$  mendekati kondisi normal dengan hasil nilai notasi kontrol (a) tidak berbeda nyata dengan konsentrasi terapi 20%. Adanya penurunan ekspresi TNF- $\alpha$  ini membuktikan bahwa terapi infusa daun beluntas berpengaruh terhadap perbaikan gambaran histopatologi jaringan ileum pada mencit (*Mus musculus*) yang mengandung flavonoid dan tanin mampu menurunkan terjadinya inflamasi pada mencit model diare yang induksi *castor oil*.

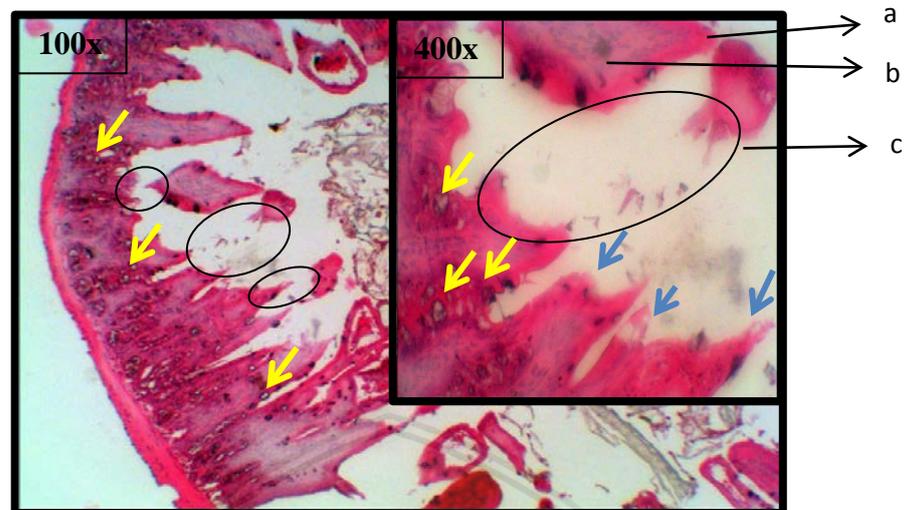
## **5.2 Pengaruh Infusa Daun Beluntas (*Pluchea indica L.*) Terhadap Gambaran Histopatologi Ileum Mencit Model Diare**

Histopatologi jaringan merupakan salah satu parameter untuk mengukur suatu tingkat keberhasilan dari terapi. Secara histologi ileum memiliki empat lapisan yaitu : (a) lapisan mukosa yang terdiri dari lapisan epitel, lamina basalis, lamina propria dan mukosa muskularis, (b) lapisan submukosa, (c) lapisan muskularis (Robert, 2001). Indikator tersebut dapat dijadikan acuan untuk mengetahui histopatologi ileum mencit (*Mus musculus*) model diare. Pengamatan erosi sel epitel dan ruptur villi dilakukan dengan melihat gambaran histopatologi menggunakan pewarnaan *Haematoxylin-Eosin* (HE) dengan perbesaran 100x dan 400x. Pengamatan histopatologi ini bertujuan untuk melihat kerusakan yang disebabkan oleh *castor oil* dan diharapkan bahwa terapi infusa daun beluntas (*Pluchea indica L.*) dapat berpengaruh dalam proses penyembuhan jaringan ileum mencit yang mengalami diare.



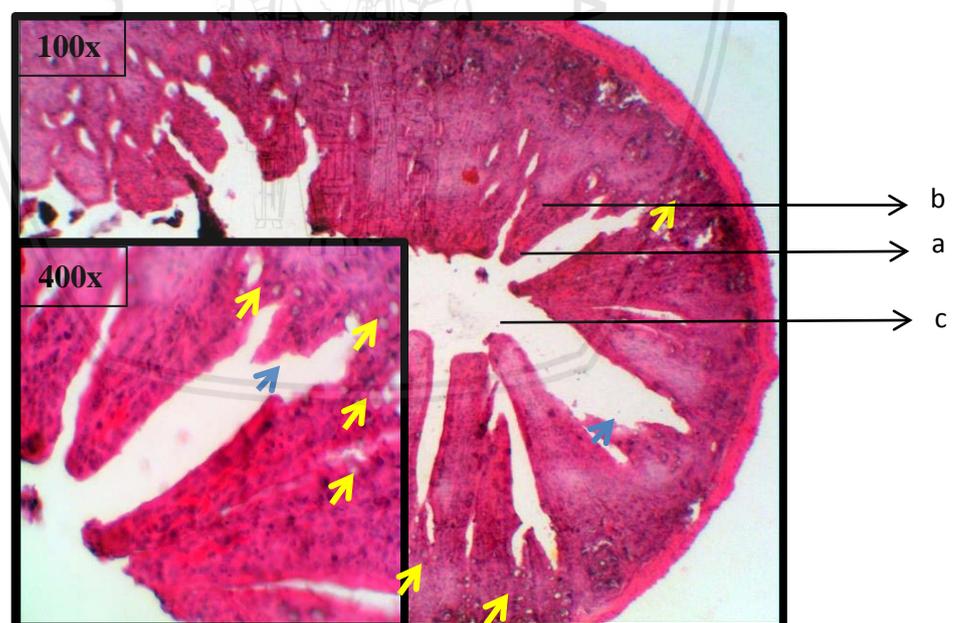
**Gambar 5.2** : Gambaran histopatologi ileum mencit dengan pewarnaan HE perbesaran 100x dan 400x pada kelompok kontrol negatif (K-)

**Keterangan** : Tunika mukosa ileum tidak menunjukkan adanya kerusakan seperti erosi epitel dan ruptur villi. (a) sel epitel kolumnar; (b) lamina propria; (c) sel goblet ; (d) lumen



**Gambar 5.3** : Gambaran histopatologi ileum mencit dengan pewarnaan HE perbesaran 100x dan 400x pada kelompok kontrol positif (K+)

**Keterangan** :Tunika mukosa ileum menunjukkan adanya kerusakan seperti erosi sel epitel, ruptur villi dan menghilangnya sel goblet. (↗) erosi sel epitel ; (○) ruptur vili ; (●) sel goblet. (a) sel epitel kolumnar ;(b) lamina propria; (c) lumen



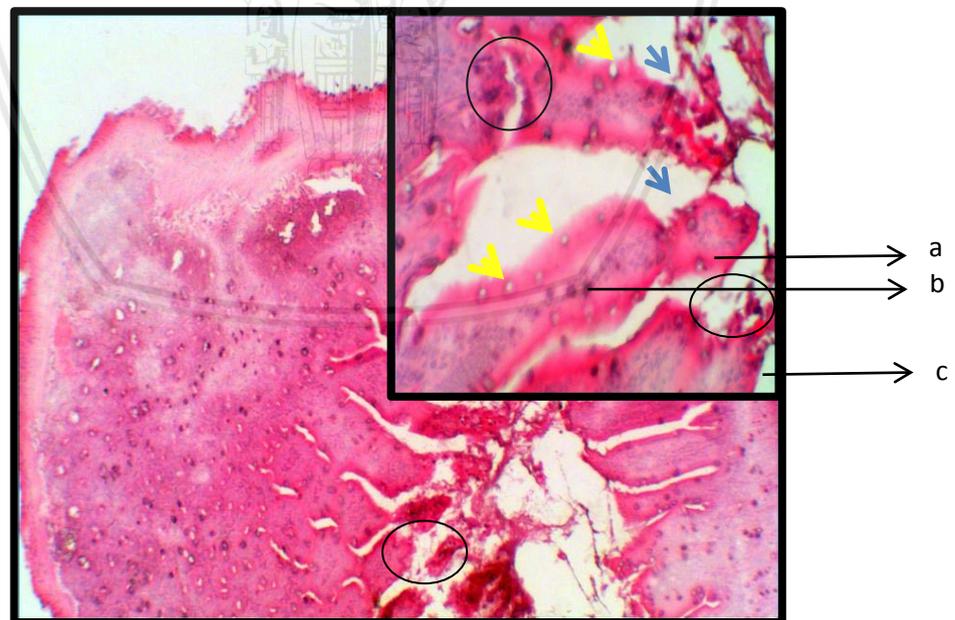
**Gambar 5.4** : Gambaran histopatologi ileum mencit dengan pewarnaan HE perbesaran 100x dan 400x pada kelompok nitrit<sup>®</sup>

**Keterangan** : (↗) erosi sel epitel ,(↗) sel goblet. (a) sel epitel kolumnar ;(b) lamina propria ; (c) lumen



**Gambar 5.5** : Gambaran histopatologi ileum menci dengan pewarnaan HE perbesaran 100x dan 400x pada kelompok perlakuan 1 (P1)

**Keterangan** : ( ) erosi epitel, ( ) ruptur vili, ( ) sel goblet . (a) sel epitel kolumnar ;(b) lamina propria ; (c) lumen



**Gambar 5.6** :Gambaran histopatologi ileum menci dengan pewarnaan HE perbesaran 100x dan 400x pada kelompok perlakuan 2 (P2)

**Keterangan** : ( ) erosi epitel, ( ) ruptur vili, ( ) sel goblet . (a) sel epitel kolumnar ;(b) lamina propria ; (c) lumen



**Gambar 5.7** :Gambaran histopatologi ileum mencit dengan pewarnaan HE perbesaran 100x dan 400x pada kelompok perlakuan 3 (P3)

**Keterangan** :erosi epitel ( ➡ ), sel goblet ( ➡ ). (a) sel epitel kolumnar ;(b) lamina propria ; (c) lumen

Pada kelompok mencit kontrol negatif (K-) atau mencit sehat (**Gambar 5.2**) yang tanpa diberi perlakuan induksi *castor oil* dan terapi apapun menunjukkan tidak ada kerusakan pada gambaran lapisan mukosa yang terdiri dari bentukan villi yang utuh, sel epitel yang tersusun teratur, dan tidak terdapat kerusakan sel goblet. Menurut Theodore, dkk. (2017), struktur mukosa ileum tampak kompak, hubungan antara sel saling rapat, sel epithelium villi interstinalis berbentuk selapis dengan inti yang berbentuk kolumnar dengan sitoplasma berwarna merah muda. Lamina propria terdapat diantara kelenjar interstinal dan ditengah villi terdiri dari sel muskularis yang terpencah yang menembus ke dalam inti villi usus, bersama dengan pembuluh darah dan limfe, saraf, jaringan penyambung, miofibroblas, dan sel-sel otot polos yang penting untuk absorpsi.

Pada mencit kelompok kontrol positif (K+) yang diinduksi *castor oil* (**Gambar 5.3**) menunjukkan adanya kerusakan pada struktur jaringan mukosa ileum dibandingkan dengan kontrol negatif (K-). Deretan epitel kolumnar pada bagian mukosa ileum mengalami erosisel epitel dan ruptur vili. Gambaran histopatologi kelompok positif ini dijadikan acuan perubahan atau kerusakan jaringan ileum karena induksi *castor oil*. Kerusakan yang terlihat berupa erosi sel epitel dan ruptur villi pada lapisan mukosa ileum yang terjadi karena reaksi senyawa aktif *castor oil* yang bersifat iritan. Menurut Balqis (2014), ketika usus terpapar zat asing dari luar tubuh maka terjadi abnormalitas transfer aktif ion-ion pada epitel usus yang menghasilkan perubahan aliran air yang berkontribusi pada sekresi diare sebagai gejala inflamasi saluran pencernaan. Efek reaksi paparan zat asing tersebut menyebabkan terjadinya gangguan fungsi *barrier intestinal* dan terjadi erosi sel-sel epitel dan terlepasnya vili ileum beserta sel goblet dari lamina basalis. Erosi sel epitel dan ruptur villi mengakibatkan ketebalan lapisan mukosa usus halus menjadi lebih rendah sehingga dapat mengganggu fungsi penyerapan nutrisi pada ileum (Asri, 2015).

Gambaran histopatologi ileum dengan pewarnaan *Haematoxyllin-Eosin* (HE) pada mencit (*Mus musculus*) kelompok kontrol (**Gambar 5.4**) dijadikan sebagai *goal standar* pada penelitian ini yang berguna untuk membandingkan keberhasilan pengobatan diare menggunakan bahan alami dari infusa daun beluntas (*Pluchea indica L.*) dengan pengobatan diare yang berasal dari bahan kimia yang telah beredar di pasaran dan terbukti sebagai obat antidiare. Hasil yang diperoleh pada gambaran histopatologi menunjukkan berkurangnya kerusakan

erosi sel epitel, ruptur vili, dan sel goblet. Gambaran yang ditunjukkan secara mikroskopis tersebut dikarenakan senyawa karbon aktif yang terdapat pada norit<sup>®</sup> berperan sebagai *absorbent* atau menangkap zat beracun dengan masuk ke dalam saluran pencernaan dan kemudian menyerap zat toksik *castor oil* dan terserap ke dalam permukaan pori arang aktif tersebut sehingga nantinya keluar bersamaan dengan feses. Menurut Puspitasari (2008), dalam keadaan normal, lapisan sel-sel epitel saluran pencernaan terus menerus berganti (regenerasi) dengan cara deskuamasi setiap 1-3 hari. Proses kerja regenerasi tersebut akan kurang maksimal apabila zat toksik dari *castor oil* terus-menerus berada di dalam ileum karena zat toksik tersebut akan terus merusak mukosa usus tanpa memberikan kesempatan mukosa usus untuk kembali ke morfologi normalnya. Cara kerja norit<sup>®</sup> sebagai *adsorbent* ini akan membantu proses regenerasi sel ileum tanpa adanya zat toksik yang terus-menerus merusak lapisan mukosa ileum (Suherman, dkk., 2013).

Gambaran histopatologi ileum dengan pewarnaan *Haematoxyllin-Eosin* (HE) pada mencit (*Mus musculus*) kelompok perlakuan 1 (P1) dengan terapi infusa daun beluntas (*Pluchea indica L.*) konsentrasi 5% (**Gambar 5.5**) menunjukkan masih adanya ruptur vili dan erosi sel epitel. Berdasarkan histopatologi P1, konsentrasi 5% infusa daun beluntas (*Pluchea indica L.*) belum menunjukkan efek terapi yang cukup baik pada hewan model diare. Sedangkan pada gambaran histopatologi ileum dengan pewarnaan *Haematoxyllin-Eosin* (HE) pada mencit (*Mus musculus*) kelompok perlakuan 2 (P2) dengan terapi infusa

daun beluntas (*Pluchea indica L.*) konsentrasi 10% juga masih terlihat adanya ruptur villi, erosi sel epitel ileum dengan keparahan yang sedikit berkurang.

Gambaran kerusakan ileum yang disebabkan oleh senyawa aktif *castor oil* sebagai senyawa iritan saluran pencernaan yang menyebabkan kerusakan fungsi *barrier intestinal* yakni berupa erosi sel-sel epitel dan ruptur vili ileum sehingga membran permeabilitas elektrolit pada mukosa ileum berubah dan terjadi hipersekresi mukus. Senyawa *castor oil* yang bersifat iritatif dapat merangsang perbanyakan sel goblet ileum (Indraswari, dkk., 2004). Menurut Puspitasari (2008), jumlah sel goblet pada mukosa usus bervariasi dan dapat meningkat apabila ada stimulan seperti pakan atau senyawa kimia iritatif seperti senyawa aktif *castor oil*. Menurut Yuniyanto, *et al.*, (2008) peningkatan jumlah sel goblet diakibatkan oleh pengeluaran mediator-mediator sel radang yang memicu pengaktifan dan agregasi neutrofil, maka akan terjadi transmigrasi neutrofil dari kapiler menuju jaringan. Jumlah sel goblet sangat berhubungan dengan keparahan kerusakan lapisan mukosa intestinal. Peningkatan jumlah sel goblet akan menginduksi peningkatan sekresi mukus. Sel goblet mensintesis dan mensekresikan glikoprotein dengan berat molekul mukus (lendir). Mukus yang dihasilkan sel goblet dilaporkan berperan sebagai *barrier* pertahanan fisik dan non-spesifik mukosa intestinal (Balqiset *al.*, 2015).

Gambaran histopatologi ileum dengan pewarnaan *Haematoxyllin-Eosin* (HE) pada mencit (*Mus musculus*) kelompok perlakuan 3 (P3) dengan terapi infusa daun beluntas (*Pluchea indica L.*) konsentrasi 20% (**Gambar 5.7**) menunjukkan berkurangnya kerusakan bila dibandingkan dengan kelompok terapi

infusa daun beluntas (*Pluchea indica L.*) konsentrasi 5% dan 10% yang ditandai adanya perbaikan struktur villi ileum (berkurangnya ruptur vili), meskipun masih bisa ditemukan adanya erosi epitel yang cukup berkurang.

Efek perlindungan dan pemulihan pada mencit (*Mus musculus*) yang diberi terapi infusa daun beluntas (*Pluchea indica L.*) berkaitan erat dengan kandungan senyawa antioksidan yang terdapat pada infusa daun beluntas. Menurut Sharma dan Shukla (2011), efek protektif dari senyawa antioksidan flavonoid mampu meningkatkan proses regenerasi dengan cara mendekstruksi radikal bebas, menyediakan substrat kompetitif untuk lipid tak jenuh dalam membran sehingga mempercepat mekanisme perbaikan membran sel ileum yang rusak. Hal tersebut berarti bahwa proses regenerasi sel epitel ileum yang telah terpapar senyawa iritatif *castor oil* akan menjadi lebih terbantu dengan adanya senyawa flavonoid dari daun beluntas tersebut. Menurut Puspitasari (2008), dalam keadaan normal, lapisan sel – sel epitel saluran pencernaan terus menerus berganti dan regenerasi dengan cara deskuamasi epitel setiap 1-3 hari.

Tanin sebagai senyawa aktif daun beluntas yang memiliki sifat *adstringent* memiliki efek dapat mengendapkan protein pada permukaan usus sehingga membentuk formasi lapisan (*barrier*) pada permukaan saluran usus sehingga menjadikan permukaan usus lebih resisten. Lapisan (*barrier*) ini juga dapat menyebabkan perapatan sel terluar sehingga menghambat sekresi cairan dan elektrolit yang dikeluarkan ke dalam usus. Adanya antioksidan dalam infusa daun beluntas (*Pluchea indica L.*) dapat menghalangi laju kerusakan sel dengan menghambat radikal bebas dan memperbaiki permeabilitas lapisan mukosa ileum

sehingga proses pencernaan bekerja normal kembali, kemudian kerusakan morfologi lapisan mukosa ileum yang terjadi akibat kondisi hipersekresi, peristaltik yang meningkat, dan absorpsi menurun akan mengalami regenerasi berupa perbaikan villi dan sel epitel, dan memulihkan permeabilitas permukaan mukosa usus ke arah normal dan perbaikan sel dapat diamati pada gambaran histopatologi ileum. (Syahrizal, 2008).

Regenerasi sel epitel pada saluran pencernaan berlangsung lebih cepat dibandingkan regenerasi sel-sel lainnya. Menurut Puspitasari (2008), dalam keadaan normal, lapisan sel-sel epitel saluran pencernaan terus menerus berganti (regenerasi) dengan cara deskuamasi epitel setiap 1-3 hari. Proses regenerasi berlangsung dengan cara mendekstruksi radikal bebas, menyediakan substrat kompetitif untuk lipid tak jenuh dalam membran sehingga mempercepat mekanisme perbaikan membran sel ileum yang rusak dengan mengganti sel-sel yang mati pada daerah superfisial dan digantikan dengan sel yang baru. Pada vili intestinal terdapat sel-sel progenitor yang disebut stem cell usus atau kelenjar induk usus. Stem cell terletak didasar kelenjar intestinal (kriptus) dan merupakan sumber sel-sel lainnya, baik didalam kriptus maupun pada vili. Sel-sel ini bermitosis dan sering melakukan mitosis untuk mempertahankan populasinya dan untuk membentuk sel-sel kolumnar, sel goblet, sel paneth dan sel enteroendrokin. Sumbayak (2010) menjelaskan bahwa pada waktu berkembang menjadi sel kolumnar, radiografi menunjukkan bahwa sel yang bergerak dari kriptus menuju ujung villus dalam waktu 3-5 hari dan kemudian dilepaskan, sehingga terjadi pembaharuan sel yang tidak terputus-putus pada epitel usus dengan migrasinya

sel-sel ke atas yang berlangsung terus dari kriptus ke villi. Menurut Samuelson (2007), pada bagian bawah villi terdapat kriptus dan kelenjar lieberkuhn yang terdiri atas sel punca dan sel goblet. Sel kriptus epitel ileum bermitosis setiap 10-14 jam pada mencit dan waktu transit sel dari kriptus ke ujung villi membutuhkan waktu selama 48 jam. Namun, karena faktor dari waktu penelitian yang dilakukan ini kurang dari 48 jam, maka regenerasi sel belum sempat mencapai sempurna sehingga pada kelompok terapi infusa daun beluntas (*Pluchea indica L.*) 20% (**Gambar 5.7**) masih terlihat adanya sedikit erosi sel epitel walaupun dominan gambaran yang ditunjukkan pada jaringantela mengurangi gambaran kerusakan jaringan. Adanya aktivitas iritan dari senyawa aktif *castor oil* yang telah diredam oleh senyawa flavonoid dan tanin dari infusa daun beluntas secara otomatis akan mengurangi peningkatan jumlah sel goblet dan mengurangi keparahan kerusakan lapisan mukosa intestinal.

Berdasarkan hasil histopatologi organ ileum yang telah dilakukan pada penelitian ini, pemberian infusa daun beluntas (*Pluchea indica L.*) konsentrasi 5% (P1) belum mampu mengurangi kerusakan mukosa ileum. Sedangkan pemberian infusa daun beluntas (*Pluchea indica L.*) konsentrasi 10% (P2) dan 20% (P3) lebih mampu mengurangi kerusakan mukosa ileum seperti erosi epitel dan ruptur villi dilihat dari struktur gambaran histopatologi ileum. Hasil ini juga didukung dengan rata-rata kadar TNF- $\alpha$  pada kelompok perlakuan 2 dan 3 mendekati rata-rata kadar TNF- $\alpha$  kontrol negatif.

## BAB 6 PENUTUP

### 6.1 Kesimpulan

1. Pemeberian terapi infusa daun beluntas (*Pluchea indica L.*) menurunkan ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- $\alpha$ ) pada jaringan ileum dengan konsentrasi terbaik 20% pada mencit model diare.
2. Pemeberian terapi infusa daun beluntas (*Pluchea indica L.*) mengurangi kerusakan berupa erosi epitel dan ruptur villi pada gambaran histopatologi mukosa jaringan ileum dengan konsentrasi efektif 20% pada mencit model diare hasil induksi *castor oil*.

### 6.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah didapatkan, perlu dilakukan adanya penelitian lebih lanjut dengan memberikan terapi infusa daun beluntas (*Pluchea indica L.*) lebih dari satu kali terapi untuk melihat perkembangan proses regenerasi sel epitel jaringan ileum.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anas, Y., D.N. Hidayati, A.Kurniasih, dan L.K.D.Sanjaya. 2015. 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.*
- Astuti, S. 2012. Isoflavon Kedelai dan Potensinya Sebagai Penangkap Radikal Bebas. *Jurnal Teknolohi Industri dan Hasil Pertanian*. Vol. 13. No.2. Jurusan Teknologi Pertanian. Fakultas Pertanian. Universitas Lampung. Lampung.
- Asri, A. 2015. *Gambaran Histopatologi Usus Ikan Dui-Dui di Danau Matano Luwu Timur Sulawesi Selatan yang Tercemar Logam Berat Nikel (Ni) dan Besi (Fe)*. [Skripsi]. Sarjana Kedokteran Hewan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin. Makassar.
- Balqis, U.,M. Hanafiah, J. Connie, M. Nur, A. Siti, dan F. Yudha. 2015. Jumlah Sel Goblet pada Usus Halus Ayam Kampung (*Gallur domesticus*) yang Terinfeksi *Ascaridia galli* secara Alami. *Jurnal Medika Veterinaria*, 9(1) : 1-6.
- Baratawidjaja, K. 2004. *Imunologi Dasar*. Ed.7. Jakarta: Fakultas Keokteran. Univertas Indonesia.
- Chotiah, S. 2012. Strategi Pengendalian Diare akteral pada Anak Sapi Potong. *JITV*17(3) : 234-243.
- Ciesla, W., P., R.L.Guerrant. 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.
- Cohen dan Bonta. 2004. *Copendium : an Inflammatory Disease*. Medical Word Bussiness Press.
- Evina, 2011. Uji Efektifitas Ekstrak Kelopak Rossela (*Hibiscus sabdariffa* L) Terhadap Penurunan Kadar Kolesterol Serum Darah Ayam Broiler. Jurusan Kimia FMIPA UNIMED. Medan
- Fassihi A, Sabet R. 2008. QSAR Study of p56lck Protein Tyrosine Kinase Inhibitory Activity of Flavonoids Derivatives Using MLR and GA-PLS. *Int.J.Mol.Sci*,1876-92
- Fawcett. 2002. *Buku Ajar Histologi Edisi 12*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 552-553
- Felisia, I. 2016. *Pengaruh Komposisi Minyak Jarak dan Lanolin Sebagai Basis Terhadap Sifat Fisik Stabilitas Lipstik Dengan Pewarna Ekstak Kulit Buah*

- Manggis*(*Garcinia mangostana L.*) [Skripsi]. Fakultas Farmasi. Universitas Sanata Dharma.
- Fitriansyah, M. I. dan R. B. Indradi. 2018. Reviw : Profil Fitokimia Dan Aktivitas Farmakologi Beluntas (*Pluchea indica L.*). *Farmaka Suplemen* 16(2) :337-342.
- Fратиwi, Y. 2015. The Potensial Of Guava Leaf (*Psidium guajava L.*) For Diarrhea. *Journal Majority* 4(1).
- Garlanda, C, Dinarelo C.A, Mantovani A, 2013. The Interleukin-1 Family: Back To the Future. PMC
- Gross J.L., L.H. Canani, M.L. Caramori. 2005. Diabetic Nephropathy : Diagnosis, Prevention, and Treatment. *Diabetes Care*. 28:164-175
- Hildebrand, M. & G. E.Goslow. 2001. Analysis of vertebrate structure. 5th ed. New York, John Wiley and sons Inc., pp 201-17.
- Immunostar, 2010. Immunohistochemistry Instruction Manual. Wisconsin: Immunostar, Inc.
- Indraswari, C, U. Kalsum, dan Sudjari.2004. Pengaruh Pemberian Temulawak pada Lambung Tikus yang Mengalami Ulkus Peptikum akibat Induksi Indometasin. *Jurnal Kedokteran Brawijaya* 10(2).
- Katzung, B.G. 2001. Farmakologi Dasar dan Klinik : Reseptor- reseptor Obat dan Farmakodinamik. Penerbit Buku Kedokteran EGC. pp. 23-4.
- Kuddah, A.H.S. 2009. *Pengaruh Pemberian Echinacea Purpurea Terhadap Produksi TNF- $\alpha$  Makrofag dan Indeks Apoptosis Sel Tumor Mencit C3H Dengan Adenokarsinoma Mamae Yang Mengalami Stress* [Thesis]. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Kusriningrum. 2008. Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap. Surabaya : Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga. 53-92.
- Larasathi, A.S., C.Mahdi, dan M.C. Padaga. 2010. Therapeutic Effect of Goat Milk Yogurt on Malondialdehyde (MDA) Levels and Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ) Expression in Liver of Hypercholesterolemic Animal Model *Rattus norvegicus*.
- Maiti A, D. Saikat., C.M.,Subhash. 2007. In vivoevaluation of anti diarrhoeal ectivity of the seed of *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae). *Tropical journal of Pharmaceutical Research* 6(2): 711-716.
- Meng, A.M. Larissa, L.F. Anthony and N.U. Vladmir. 2009. Effect of various Flavonoids On The  $\alpha$ -Synuclein fibrillation process. Department of Chemistry, University of California. Santa Cruz. USA.



- Nieman DC, D.A. Henson, M. David, E.A. Murphy, D.P. Jenkins, S.J, Gross. 2007. Quercetin Influence on Exercise-Induced Changes in Plasma Cytokins and Leukocyte Cytokine mRNA. *Jappphysiol*, 1728-35.
- Pane, M.D.C. 2014. *Kesesuaian Penatalaksanaan Penyakit Diare Pada Balita Dengan Pedoman Penatalaksanaan Diare Pada Balita Menurut Kemenkes RI Di Puskesmas Kota Karang Bandar Lampung Tahun 2013* [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Lampung.
- Popa, C., M.G. Netea, M. Van der Meer, J.W.A. Stalenhoef. 2007. The Role of TNF- $\alpha$  in Chronic Inflammatory Conditions, Intermediary Metabolism, and Cardiovascular Risk. *J Lipid Res* 48:751-762.
- Prahesti, K.I. 2005. *Aplikasi Tepung Daun Kelor (Moringa deifera lam) dalam Ransum Ayam Broiler terhadap Luas Permukaan Vili Ileum dan Gambaran Histopatologi Bursa Fabricius* [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Puspitasari, D.A. 2008. *Gambaran Histopatologi Lambung Tikus Putih (Rattus norvegicus) Akibat Pemberian Asam Asetil Salisilat* [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor.
- Rahmadani, S. 2015. *Evaluasi Helmintiasis Pada Anjing Penderita Diare Di Klinik Hewan Makassar* [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Hasanuddin.
- Reis, D.,M. Souza, Minco. 2001. Myosin and Inos Expression in Enhanced in Murine Macrophage. 34(2) : 221-226
- Ridwan, E. 2013. Etika Pemanfaatan Hewan Percobaan dalam Penelitian Kesehatan. *Journal Indon Med Assoc* 63(3) : 112-116.
- Robert, R. J. 2001. Fish Pathology. Edisi III. W.B.Saunders, London. Sydney.Toronto.
- Samuelson, D.A. 2007. Textbook of Veterinary Histology, China : Saunder Elsevier.
- Sari, J. E. 2016. *Struktur Tulang Belakang Fetus Mencit (Mus musculus) Setelah Pemberian Ekstrak Rimpang Teki (Cyperus rotundus)* [Skripsi]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Lampung.
- 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.
- Sharma, N. Shukla, S.2011. Hepatoprotective potential of aqueous extract of Butea monosperma against CCl<sub>4</sub>induced damage in rats. In press : 1 – 11.
- Siagian, Y.A. 2016. *Gambaran Histologis Dan Tinggi Vili Usus Halus Bagian Ileum Ayam Ras Pedaging Yang Diberi Tepung Daun Kelor (Mornga oleifera) Dalam Ransum* [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Hasanuddin.

- Suherman, L.P., H.Faizal, dan M.L. Pramukti. 2013. Efek Antidiare Ekstrak Etanol Daun Mindi (*Melia azedarach Linn*) Pada Mencit *Swiss Webster* Jantan. *Jurnal Ilmiah Farmasi* 1(1) : 38-44.
- Sukmadadari, A.E., R.Ratnawati and T.E. Hernowati. 2012. *Pengaruh Ekstrak Metanol Daun Kelor (Moringa oleifera) terhadap Ekspresi TNF- $\alpha$  Pada Jaringan Hepar Tikus Wistar yang Diinduksi DMBA* [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Malang.
- 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.
- Supit, I. A., D.H.C. Pangemanan, dan S.R. Marunduh. 2015. Profil Tumor Necrosis Factor (TNF- $\alpha$ ) Berdasarkan Indeks Massa Tubuh (IMT) Pada Mahasiswa Fakultas Kedokteran Unsrat Angkatan 2014. *Jurnal e-Biomedik* 3(2).
- Syahrizal, D. 2008. Pengaruh Proteksi Vitamin C terhadap Enzim Transaminase dan Gambaran Histopatologis Hati Mencit yang dipapar Plumbum [Tesis]. Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Theodore, V., S. Wangko, dan S.Kalangi. 2017. Gambaran Histologik Usus Halus Pada Hewan Coba Selama 24 Jam Postmortem. *Jurnal e- Biomedik* 5(1).
- Tjahjani, N.P. 2015. Effectiveness of Extract *Gratophyllum pictum* (L) Leaves to Reduce Level of TNF- $\alpha$  and NO [Tesis]. Fakultas Kedokteran. Universitas Diponegoro.
- Tolistiawaty, I., J.Widjaja, P. P. F., Sumolang, dan Oktaviani. 2014. Health Portrait of *Mus musculus* in Laboratory Condition. *Jurnal Vektor Penyakit* 8(1) : 27 – 32.
- Triyanto, V. D. Yuniyanto, dan B. Sukanto. 2014. Pengaruh Penggunaan Ekstrak Daun Beluntas (*Pluchea indica L.*) Sebagai Pengganti Klorin Terhadap Kecernaan Bahan Organik dan Retensi Nitrogen Ayam Broiler. *Animal Agriculture Journal* 3(2) : 341 – 352.
- Widyasanti, A., S.Junita, dan S.Nurjanah. 2017. Effect Of Virgin Coconut Oils And Castor Oil To The Physicochemical And Organoleptic Characteristics Of Liquid Soap. *Jurnal Teknologi dan Industri Pertanian Indonesia* 9(1).
- Wudu T, B.Kelay, 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.

