

**Pengaruh Air Alkali terhadap Aktivitas Amilase dan  
Gambaran Histopatologi Jejunum Model Inflammatory  
Bowel Disease pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Hasil  
Induksi Indometasin**

**SKRIPSI**

Oleh:

**TEDDY DWI TRISTIAWAN**

**NIM. 125130107111011**



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

repository.ub.ac.id

**Pengaruh Air Alkali terhadap Aktivitas Amilase dan  
Gambaran Histopatologi Jejunum Model Inflammatory  
Bowel Disease pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Hasil  
Induksi Indometasin**

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

**TEDDY DWI TRISTIAWAN**

**NIM. 125130107111011**



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

**LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI****Pengaruh Air Alkali terhadap Aktivitas Amilase dan Gambaran Histopatologi Jejunum Model Inflammatory Bowel Disease pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Hasil Induksi Indometasin****Oleh :****TEDDY DWI TRISTIAWAN  
NIM. 125130107111011**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
Pada tanggal 18 Juli 2019 dan  
Dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh  
gelar Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

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

**drh. Dyah Ayu OAP., M.Biotech**  
NIP. 19841026 200812 2 004

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya

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

**LEMBAR PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Teddy Dwi Tristiawan

NIM : 125130107111011

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulis Skripsi berjudul:

Pengaruh Air Alkali terhadap Aktivitas Amilase dan Gambaran Histopatologi Jejunum Model Inflammatory Bowel Disease pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Hasil Induksi Indometasin

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, 9 Agustus 2019

Yang menyatakan,

**TEDDY D. TRISTIAWAN**

NIM. 125130107111011

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadapan Allah SWT yang melimpahkan rahmat, taufiq, dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan Skripsi yang berjudul “*Pengaruh Air Alkali terhadap Aktivitas Amilase dan Gambaran Histopatologi Jejunum Model Inflammatory Bowel Disease pada Tikus (Rattus norvegicus)*” dapat diselesaikan, holawat dan salam semoga tetap tercurahkan kepada Nabi Agung Muhammad SAW. Sripsi ini disusun sebagai salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan. Penelitian ini adalah penelitian payung yang diketuai oleh Prof. Dr. Aulanni’am, drh., DES.

Penulisan penyusunan Skripsi ini penulis ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada pihak-pihak yang telah membantu :

1. Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc selaku dosen pembimbing pertama dan drh. Dyah Ayu OAP., M.Biotech selaku dosen pembimbing kedua yang telah berkenan memberikan bimbingan, waktu, kesabaran, motivasi dan bantuan dalam penulisan Skripsi ini.
2. drh. Desi Wulansari, M.Vet dan drh. Fidi Nur Aini EPD, M.Si selaku dosen penguji yang telah berkenan memberikan tanggapan, masukan, kritik dan saran untuk penyempurnaan penulisan selama ujian Skripsi.
3. Dr. Ir. Sudarminto S. Yuwono, M.App.Sc selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
4. Prof. Dr. Aulanni’am, drh., DES selaku ketua penelitian ini sudah diperbolehkan untuk ikut dalam penelitiannya.
5. Orangtua dan keluarga tercinta yang senantiasa memberikan dukungan, materi, semangat, doa, kasih sayang dan cinta serta motivasi yang diberikan kepada penulis.
6. Teman-teman kelompok IBD, teman-teman SPMK dan Vena 12, Mas anton, Mbak Ninik, Mbak Pupik, Mbak Anita, Pak Har, Pak Mar, Denis, dan Mas Hilman yang sudah penulis anggap sebagai keluarga, sahabat dan teman dekat sendiri yang telah memberikan banyak bantuan, bimbingan, nasehat dan motivasi pada penulis.

7. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan karya tulis ini yang tidak sempat disebutkan.

Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan dan Skripsi ini dapat memberikan manfaat dan wawasan tidak hanya bagi penulis namun juga bagi para pembaca.

Malang, 9 Agustus 2019

Penulis



**Pengaruh Air Alkali terhadap Aktivitas Amilase dan Gambaran Histopatologi Jejunum Model Inflammatory Bowel Disease pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Hasil Induksi Indometasin**

**ABSTRAK**

Inflammatory Bowel Disease (IBD) adalah penyakit yang disebabkan oleh banyak faktor salah satunya penggunaan obat anti inflamasi *non-steroid* seperti indometasin. Indometasin bekerja dengan menghambat prostaglandin sehingga gastrointestinal menjadi asam dan menghasilkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) tinggi. Air alkali memiliki *Oxidation Reduction Potential* (ORP) tinggi dan pH basa dapat digunakan untuk mengurangi sifat asam dan ROS. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh terapi air alkali terhadap perubahan histopat jejunum serta aktivitas amilase. Penelitian ini menggunakan model rancangan acak lengkap (RAL). Model tikus yang dipakai dalam penelitian ini adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan berumur 8-12 minggu dengan berat 150-200 gram. Tikus dibagi menjadi 4 perlakuan yaitu tikus kontrol negatif, tikus yang diinduksi indometasin, tikus terapi 1 (induksi indometasin dan terapi dengan volume 1 ml/ekor), dan tikus terapi 2 (induksi indometasin dan terapi dengan volume 2 ml/ekor). Induksi indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB dan terapi air alkali dilakukan dua kali per hari dalam satu minggu. Pengukuran aktivitas amilase dengan metode *Nelson-Somogyi* secara spektrofotometri, hasil diuji dengan ANOVA dan uji lanjutan *Tukey* dengan  $\alpha = 0,05$ . Pengamatan histologis dilakukan dengan pewarnaan *Hematoxylin-Eosin*. Terapi air alkali terutama pada volume 2 mL/ekor mempengaruhi secara signifikan aktivitas amilase sebesar 61% dan memperbaiki histopatologi jejunum berupa perbaikan mukosa vili dan bertambahnya sel goblet tikus yang diinduksi indometasin. Kesimpulan pada pemberian air alkali sebanyak 2 mL/ekor merupakan volume efektif dengan menurunkan aktivitas amilase dan memperbaiki histopatologi jejunum.

Kata Kunci: Air Alkali, Aktivitas Amilase, Indometasin, Inflammatory Bowel Disease, Jejunum, *Rattus norvegicus*



## Effect of Alkaline Water as a Theurapeutic in Indomethacin-induced Rat IBD Models Towards Amylase Activity and Description of Histopathology of Jejunum

### ABSTRACT

Inflammatory Bowel Disease (IBD) is a diseases that caused by a lot of factors, one of the causative factor is indomethacin, a non-steroidal of anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Indomethacin works by inhibiting prostaglandin that create a condition on gastrointesinal to be an acidic and produce more Reactive Oxygen Species (ROS). Alkaline-Ionic water have a high Oxidation Reduction Potential (ORP) and base pH that can reduce the acidic properties effect and ROS. This study aimed to determine the effect of alkaline water therapy on jejunal histopathic changes and amylase activity. This research used method by Fully Randomized Design. The rats (*Rattus norvegicus*) were 8-12 weeks old rats that have 150-200 grams body weight. The treatment was divided in to 4 groups (I): negative control rats, (II): positive control rats with indomethacin-induce, (III): IBD rats which was alkaline water therapy with a volume of 1 ml/rat, and (IV): IBD rats which was alkaline water therapy with a volume of 2 ml/rat. The IBD rats were induced with indomethacin in oral at dosage of 15mg/KgBW in a day and treated with alkaline-ionic water twice per day in a week. Amylase activity was measured with Nelson-Somogyi and used spectrophotometry, the result was statistically analyzed with ANOVA and Tukey's HSD post hoc test ( $\alpha = 0,05$ ). Histopathology of jejunum was stained using Hematoxylin-Eosin and analyzed descriptively. Treatment using 2 mL of alkaline water significantly affected amilase activity up to 61% and improved jejunal histopathology by regenerating villous mucosa and increasing its goblet cells. It was conculed that the effective volume to decrease the amylase activity and repairing jejunal histopathology was treatment of 2 mL of alkaline water per rat.

Keywords : Alkali-Ionic Water, Amilase Activity, Indomethacin, Inflammatory Bowel Disease, Jejunum, *Rattus norvegicus*

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	ii
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	iii
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	iv
<b>ABSTRAK</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	vii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	viii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	x
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xi
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xii
<b>DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG</b> .....	xiv
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Batasan Masalah .....	4
1.4 Tujuan Penelitian .....	5
1.5 Manfaat Penelitian .....	5
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	6
2.1 Inflammatory Bowel Diseases .....	6
2.2 Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) Model Inflammatory Bowel Disease .....	7
2.3 Indometasin .....	9
2.4 Jejunum .....	11
2.5 Enzim Amilase .....	12
2.6 Air Alkali .....	14
<b>BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN</b> .....	18
3.1. Kerangka Konsep .....	18
3.2. Hipotesis Penelitian .....	20
<b>BAB IV METODOLOGI PENELITIAN</b> .....	21
4.1. Waktu dan Tempat Penelitian .....	21
4.2. Hipotesis Penelitian .....	21
4.2.1 Hewan Coba .....	21
4.2.2 Alat dan Bahan Penelitian .....	21
4.6.3.1 Alat Penelitian .....	21
4.6.3.2 Bahan Penelitian .....	22
4.3. Sampel Penelitian .....	22
4.4. Rancangan Penelitian .....	23
4.5. Variabel Penelitian .....	24
4.6. Tahap Penelitian .....	25
4.6.1 Preparasi Hewan Coba .....	25
4.6.2 Persiapan Hewan Model IBD dengan .....	25

4.6.3	Tata Laksana Pemberian Air Terapi Alkali .....	26
4.6.4	Pengambilan Organ Jejunum .....	26
4.6.4.1	Pengambilan Sampel dan Fiksasi .....	26
4.6.4.2	Dehidrasi dan Clearing .....	27
4.6.4.3	Infiltrasi, Embedding, dan Sectioning .....	27
4.6.5	Pewarnaan Hematoksilin-Eosin .....	28
4.6.6	Pengamatan Histopatologi .....	28
4.6.7	Isolasi Amilase .....	29
4.6.8	Pengukuran Aktivitas Amilase .....	29
4.6.8.1	Pembuatan Kurva Standar Glukosa .....	29
4.6.8.2	Pengukuran Aktivitas Amilase .....	30
4.7.	Analisis Data .....	30
<b>BAB IV</b>	<b>METODOLOGI PENELITIAN</b> .....	<b>32</b>
5.1.	Pemberian Air Alkali terhadap Aktivitas Amilase Hewan Model Inflammatory Bowel Disease (IBD) .....	32
5.2.	Pengaruh Air Alkali terhadap Gambaran Histopatologi Jejunum Hewan Coba Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) yang Diinduksi Indometasin .....	39
<b>BAB VI</b>	<b>PENUTUP</b> .....	<b>43</b>
6.1.	Kesimpulan .....	43
6.2.	Saran .....	43
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	.....	<b>44</b>
<b>LAMPIRAN</b>	.....	<b>49</b>

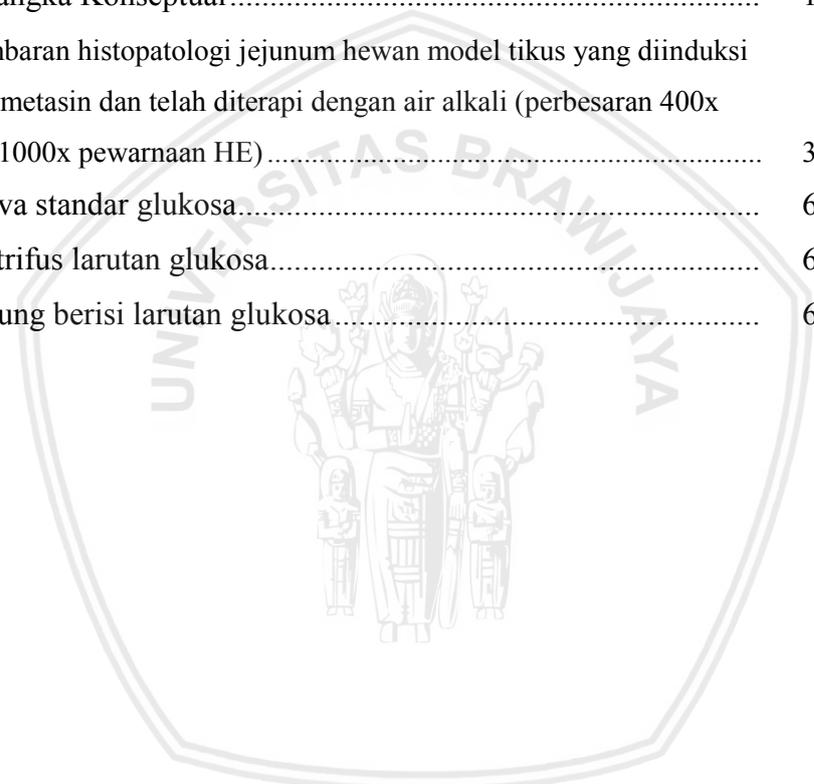
## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
4.1 Rancangan Kelompok Penelitian .....	25
5.1 Aktivitas Amilase pada Jejunum Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) yang dipapar Indometasin dan pasca diterapi dengan Air Alkali.	32
L.1 Absorbansi Larutan Standar Glukosa .....	60
L.2 Absorbansi Glukosa Setiap Kelompok .....	61
L.3 Hasil Aktivitas Amilase .....	63



## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar</b>	<b>Halaman</b>
2.1 <i>Rattus norvegicus</i> .....	8
2.2 Electrochemical preparation of reduced water, mineral nanoparticles and mineral hydrides.....	14
2.3 Proses Hidrogen Aktif dalam Air Alkali.....	15
3.1 Kerangka Konseptual.....	18
5.1 Gambaran histopatologi jejunum hewan model tikus yang diinduksi indometasin dan telah diterapi dengan air alkali (perbesaran 400x dan 1000x pewarnaan HE).....	39
L.1 Kurva standar glukosa.....	60
L.2 Sentrifus larutan glukosa.....	67
L.3 Tabung berisi larutan glukosa.....	67



## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran</b>	<b>Halaman</b>
1. Sertifikat Laik Etik .....	50
2. Skema Penelitian .....	51
3. Penyiapan Indometasin .....	52
3.1 Perhitungan Dosis Indometasin .....	52
3.2 Pembuatan Stok Indometasin .....	52
4. Pembuatan Larutan .....	53
4.1 Pembuatan PBS-Azida .....	53
4.2 Pembuatan PFA 4% .....	53
4.3 Pembuatan Phosphate Buffer Saline (PBS) .....	53
4.4 Pembuatan NaCl-fisiologis 0,9% .....	53
4.5 Pembuatan Buffer Tris-HCl 0,9% .....	54
5. Pembuatan Reagen .....	55
5.1 Pembuatan Reagen Nelson A .....	55
5.2 Pembuatan Reagen Nelson B .....	55
5.3 Pembuatan Reagen Nelson-Somogyi .....	55
5.4 Pembuatan Arsenomolibdat .....	55
6. Pembuatan Preparat Hematoksin-Eosin Jaringan Jejunum .....	56
6.1 Pembuatan Preparat .....	56
6.2 Pewarnaan Hematoksin-Eosin .....	56
7. Langkah-Langkah Pengukuran Aktivitas Amilase .....	58
7.1 Ekstraksi Enzim Amilase .....	58
7.2 Pembuatan Kurva Standar Glukosa .....	58
7.3 Uji Aktivitas Enzim Amilase .....	59
8. Pengukuran Aktivitas Amilase .....	60
8.1 Pembuatan Kurva Baku Standar Glukosa .....	60
8.2 Hasil Absorbansi Glukosa .....	61
8.3 Perhitungan Aktivitas Amilase .....	62
8.4 Data Aktivitas Amilase .....	63

8.5 Persentasi Peningkatan Aktivitas Amilase terhadap Kontrol..	63
8.6 Persentasi Penurunan Aktivitas Amilase.....	64
9. Uji Statistik Aktivitas Amilase.....	65
9.1 Uji Normalitas menggunakan SPSS.....	65
9.2 Uji Homogenitas.....	65
9.3 Uji ANOVA .....	65
9.4 Uji BNJ/ Tukey .....	66
10.Dokumentasi Penelitian .....	67



## DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

<u>Simbol/singkatan</u>	Keterangan
°C	Derajat celsius
μl	mikroliter
μm	mikrometer
μmol	mikromol
BB	Berat badan
BNJ	Beda Nyata Jujur
CD	<i>Crohn's disease</i>
COX	Siklooksigenase
GIT	<i>Gastrointestinal tract</i>
HE	Hematoxylin dan Eosin
IBD	<i>Inflammatory Bowel Disease</i>
IBDU	<i>Inflammatory Bowel Disease type unclassified</i>
IL-1β	<i>Interleukin-1β</i>
iNOS	<i>inducible Nitric Oxide Synthase</i>
kg	kilogram
mg	milligram
min	menit
mL	mililiter
NF-kB	Nuclear Factor-kappaB
nm	nanometer
NO	Nitrogen monoksida
NSAID	<i>Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs</i>
OAINS	Obat antiinflamasi nonsteroid
ORP	<i>Oxidation Reduction Potential</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PFA	Paraformaldehid
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>

PGI <sub>2</sub>	Prostaglandin I <sub>2</sub>
pH	potential of Hydrogen
RNS	Peroksi nitrit
rpm	rotasi per menit
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
TNF- $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
UC	<i>Ulcerative colitis</i>



## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

*Inflammatory Bowel Disease* (IBD) adalah merupakan suatu penyakit peradangan kronis yang terjadi pada saluran pencernaan berasal manifestasi utama dari *Ulcerative colitis* (UC) dan *Crohn's disease* (CD) dan *indeterminate colitis*. IBD merupakan inflamasi yang terjadi pada bagian saluran pencernaan meliputi gastrointestinal. Penyakit ini dapat ditemukan pada manusia dan hewan. Pada hewan kecil awal mula dilaporkan sekitar 31 tahun yang lalu, penemuan histopatologi memastikan 83 dari 153 terdiagnosa IBD pada anjing diantaranya 57 jantan (66,3%) dan 29 betina (43,7%) (Maria et al, 2017).

Penyebab utama IBD secara pasti tidak ada akan tetapi secara umum disebabkan oleh kerusakan organ dan penurunan sistem kekebalan tubuh, dan faktor lain yang dapat memunculkan penyakit radang ini adalah genetik, sistem imun yang tidak normal, faktor mikroba usus, umur, dan obat-obatan seperti obat antiinflamasi nonsteroid (OAINS)/ Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAID). Secara patofisiologi sulit untuk diketahui sepenuhnya, namun diduga disebabkan oleh interaksi kompleks antara mikroba usus, disregulasi sistem kekebalan imunitas host, kerentanan genetik dan faktor lingkungan. Gejala umum pada anjing yang mengalami IBD adalah penurunan berat badan terus menerus dan diare (Kathrani, 2011).

Pembuatan hewan model IBD dilakukan dengan induksi indometasin (Piepoli *et al.*, 2005). Indometasin umumnya digunakan untuk pengobatan meringankan nyeri, bengkak, kaku sendi yang diakibatkan adanya arthritis, gout,

bursitis, dan tendonitis. Mekanisme kerja indometasin pada peradangan dengan cara menghambat pembentukan prostaglandin yang merupakan terbentuknya peradangan dan faktor proteksi usus. Penggunaan indometasin memiliki efek samping seperti gejala IBD yaitu diare, penurunan berat badan, pendarahan pada gastrointestinal, mual, dan nyeri perut diakibatkan turunnya faktor proteksi dalam usus dan permeabilitas usus meningkat akan menyebabkan terjadinya invasi mikroba. Invasi tersebut akan memunculkan sistem imun seperti neutrofil dan makrofag untuk fagositosis mikroba dan nantinya akan didegradasi oleh *Reactive Oxygen Species* (ROS) sebagai oksidan seperti  $\cdot\text{O}_2^-$ ,  $\cdot\text{OH}$  dan  $\text{H}_2\text{O}_2$ . ROS akan mengaktifkan sel imun dan sel inflamasi yang menyebabkan kerusakan pada mukosa usus. Adanya inflamasi pada usus mengakibatkan usus mengalami hiperperistaltik yang berujung tidak optimalnya proses metabolisme lemak, protein, dan karbohidrat dan tidak masuknya nutrisi penting ke dalam usus. Gangguan pada metabolisme karbohidrat pada pencernaan salah satunya adalah enzim amilase. Peningkatan enzim amilase mengindikasikan adanya inflamasi pada usus.

Air Alkali adalah air yang terbentuk dari hasil proses elektrolisis air ( $\text{H}_2\text{O}$ ) yang diberi listrik melalui katoda dan anoda untuk menghasilkan oksigen ( $\text{O}_2$ ), gas hidrogen ( $\text{H}_2$ ) dan memiliki sifat basa. Air alkali pertama kali dikembangkan di Jepang dan banyak digunakan pengobatan alternatif di Jepang dan Korea. Penggunaan air alkali sebagai terapi IBD dapat digunakan karena memiliki kandungan antioksidan yang tinggi, pH diatas 7, molekul air mikro kluster, dan nilai *Oxidation Reduction Potential* (ORP) negatif. Hewan model IBD yang

diinduksi indometasin dalam gastrointestinalnya mempunyai sifat asam dan ROS yang menginisiasi terjadinya peradangan dapat dikurangi dengan pemberian air alkali dengan memiliki kandungan pH diatas 7 akan menetralkan sifat asam dan mengurangi ROS dengan nilai ORP negatif dapat menyumbangkan elektron ke sel yang kehilangan elektron akibat diambil ROS atau dapat dijadikan antioksidan. Antioksidan ini didapat dari kestabilan molekul H<sub>2</sub> dan O<sub>2</sub> yang dimuat dalam pH 8-10,5 serta kandungan mineral seperti magnesium dan kalsium yang terdapat dalam air alkali sehingga mampu mengurangi ROS (Bamosa *et al.*, 2013). Kandungan pada air alkali diharapkan dapat mengurangi peradangan pada gastrointestinal sehingga terjadinya perbaikan pada sel usus dan penurunan aktivitas amilase.

Pada penelitian ini digunakan hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) IBD yang diinduksi indometasin dan diterapi dengan air alkali. Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui efek terapi air alkali terhadap penurunan aktivitas enzim amilase dan perbaikan pada jejunum tikus model IBD.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka rumusan masalah dari penelitian ini yaitu :

1. Apakah terdapat pengaruh pemberian terapi air alkali dapat menurunkan aktivitas amilase di jejunum tikus IBD hasil induksi indometasin?
2. Apakah terapi air alkali berpengaruh terhadap perubahan histopatologi jejunum tikus IBD hasil induksi indometasin?

### 1.3 Batasan Masalah

Batasan Masalah pada penelitian ini adalah :

1. Hewan model yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar, umur 8-12 minggu dengan berat badan 150-200 gram yang diperoleh dari Laboratorium Biosains, Universitas Brawijaya Malang. Penggunaan hewan coba dalam penelitian ini telah mendapatkan sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya No. 527-KEP-UB.
2. Air alkali yang digunakan merupakan air yang didapatkan dari pabrikan melalui proses elektrolisis yang memiliki pH 9,1.
3. Pembuatan keadaan IBD pada hewan model tikus putih dilakukan dengan cara pemberian indometasin sebanyak 15 mg/kgBB secara per oral sebanyak 1 kali pada hari ke-8 (Aulanni'am et al., 2012).
4. Volume Air Alkali yang digunakan adalah 1 mL/ekor dan 2 mL/ekor diberikan 2 kali sehari selama 7 hari secara per oral dengan volume pemberian disesuaikan dengan volume lambung tikus.
5. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah dengan melihat aktivitas enzim amilase dengan metode *Somogyi-Nelson* secara kuantitatif dan perbedaan gambaran jejunum dengan menggunakan pewarnaan Hemotoxylin-Eosin (HE) secara kualitatif.

#### 1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah :

1. Mengetahui pengaruh terapi air alkali terhadap penurunan aktivitas amilase jejunum tikus (*Rattus norvegicus*) model IBD yang mendapat induksi indometasin.
2. Mengetahui pengaruh terapi air alkali terhadap perbaikan histologi jejunum tikus (*Rattus norvegicus*) model IBD induksi indometasin.

#### 1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah diharapkan dapat mengetahui peran air alkali terhadap penurunan aktivitas amilase dan perubahan histopat jejunum pada tikus (*Rattus norvegicus*) hasil induksi indometasin. Sehingga nantinya air alkali dapat digunakan sebagai alternatif pengobatan untuk inflamasi yang terjadi pada saluran pencernaan.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Inflammatory Bowel Disease (IBD)

*Inflammatory Bowel Disease* (IBD) menggambarkan kondisi peradangan saluran cerna kronik dan idiopatik. Secara umum dibagi atas *Ulcerative colitis* (UC), *Crohn's disease* (CD) dan IBD type unclassified (IBDU, dulu dikenal sebagai indeterminate colitis). Etiopatogenesis IBD belum sepenuhnya dimengerti. Faktor genetik dan lingkungan dalam saluran cerna seperti perubahan bakteri usus dan peningkatan permeabilitas epitel saluran cerna diduga berperan dalam gangguan imunitas saluran cerna yang berujung pada kerusakan saluran cerna (Firmansyah, 2013).

*Inflammatory Bowel Disease* (IBD) memiliki gejala umum yaitu diare, sakit bagian abdomen, vomit, serta perdarahan pada daerah sekitar saluran pencernaan (Xavier and Podolsky, 2007). Sampel biopsi yang telah dianalisa di Bagian Patologi Veteriner, Universitas Perugia (Italia). Penilaian histopatologi secara subjektif sudah dimulai dari 2006 sampai 2008, ketika pengenalan standarisasi untuk hewan kecil yang terkena IBD. Penemuan histopatologi memastikan 83 dari 153 terdiagnosa IBD pada hewan kecil diantaranya 57 jantan (66,3%) dan 29 betina (43,7) (Maria *et al*, 2017).

Secara umum, diperkirakan bahwa proses patogenesis IBD diawali adanya infeksi, toksin, produk bakteri atau diet intralumen kolon pada individu rentan dan dipengaruhi oleh faktor genetik, defek imun, dan lingkungan sehingga terjadi proses inflamasi pada gastrointestinal (Bernstein *et al.*, 2010). Banyak mediator

inflamasi telah dikenali dalam patogenesis IBD. Sitokin yang dilepaskan oleh makrofag sebagai respon terhadap berbagai stimulus antigenik akan berikatan dengan beragam reseptor dan menghasilkan efek autokrin, parakrin, dan endokrin. Sitokin mengubah limfosit menjadi sel T dimana sel T helper-1 (Th-1) dan sel T helper-2 (Th-2). Respon imun ini akhirnya akan merusak mukosa saluran cerna dan memicu terjadinya proses inflamasi kronik. Berdasarkan Suryanto (2003), menyatakan bahwa kerusakan pada jaringan akan menyebabkan produksi sitokin pro-inflamasi dan aktivasi neutrofil serta melepaskan enzim protease.

## **2.2 Tikus (*Rattus norvegicus*) Model *Inflammatory Bowel Diseases***

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) banyak digunakan sebagai hewan percobaan pada berbagai penelitian. Tikus putih tersertifikasi diharapkan lebih mempermudah para peneliti dalam mendapatkan hewan percobaan yang sesuai dengan kriteria yang dibutuhkan. Ciri-ciri morfologi *Rattus norvegicus* adalah memiliki hidung tumpul, panjang badan 18-25 cm, kepala dan badan lebih pendek dari ekornya, telinga relatif kecil. Tikus dan mencit untuk kepentingan penelitian atau laboratorium merupakan jenis albino yang kehilangan pigmen melaninnya, sifat tersebut menurun pada anak-anaknya (Barnett, 2002).

Taksonomi tikus yang digunakan adalah (Sullivan, 2003):

Kingdom	: Animalia
Divisi	: Chordata
Kelas	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Famili	: Muridae

Subfamili : Murinae  
Genus : *Rattus*  
Spesies : *Rattus norvegicus*



**Gambar 2.1** *Rattus norvegicus* (Ronaghy *et al.*, 2002)

*Rattus norvegicus* merupakan hewan coba yang sering digunakan dalam penelitian karena berbagai pertimbangan, antara lain omnivora, pemeliharaan dan penanganan yang mudah, potensi reproduksi tinggi, masa bunting pendek, dan resisten terhadap pakan yang mengandung kolesterol (Sirois, 2005). Tikus ini memiliki kebutuhan pakan yaitu 28 gr/hari. Menurut Corridoni *et al.*, (2004), menyatakan bahwa tikus digunakan sebagai hewan model IBD karena mudah diinduksi secara kimia. Tikus putih juga merupakan hewan yang ideal untuk uji toksikologi karena memiliki fisiologis yang mirip dengan manusia (Kusumawati, 2004).

Pembuatan hewan model *Inflammatory Bowel Disease* dengan cara pemberian indometasin karena salah satu penyebab IBD adalah efek samping dari penggunaan obat golongan NSAID seperti indometasin (Podolsky, 2002). Indometasin merupakan obat yang banyak digunakan untuk pengobatan

Rheumatoid Arthritis. Indometasin merupakan salah satu obat NSAID yang sangat efektif dalam menekan kejadian inflamasi dengan menghambat produksi prostaglandin, namun dalam penggunaan jangka panjang indometasin mampu menyebabkan inflamasi pada saluran pencernaan (Kazuhide *et al.*, 2009).

Dosis indometasin untuk menghasilkan saluran pencernaan mengalami IBD akut yaitu 15 mg/kgBB dengan pemberian per oral (Aulanni'am *et al.*, 2012). Indometasin bekerja dengan menghambat jalur COX-1 dan COX-2. Indometasin melakukan hambatan COX-2 untuk mengurangi inflamasi dan rasa sakit, sedangkan pada COX-1 indometasin akan mengakibatkan penurunan sintesis prostaglandin dan jumlah mukus pada saluran pencernaan (Takeuchi *et al.*, 2002).

### 2.3 Indometasin

Indometasin adalah obat anti-inflamasi yang termasuk golongan *Nonsteroidal anti-inflammatory drug* (NSAID). Golongan obat ini sering digunakan untuk pengobatan penyakit *Reumathoid Arthritis*, *Osteoarthritis*, dan *spondylitis*, karena dapat menghilangkan atau mengurangi tanda dari gejala radang. Namun penggunaan obat ini memiliki efek samping yang dapat menyebabkan kerusakan jaringan maupun organ berupa inflamasi pada seluruh bagian dari *Gastrointestinal Tract* (GIT), baik pada hewan maupun manusia (Bures, 2011). Indometasin bekerja dengan menghambat aktivitas enzim siklooksigenase (COX) 1 dan 2. Penghambatan pada COX-2 berfungsi sebagai pengurangan nyeri. Namun, penghambatan terhadap COX-1 akan menghambat sintesis prostaglandin (Takeuchi *et al.*, 2002).

Indometasin berpengaruh terhadap pembentukan ROS yang mengakibatkan kerusakan epitel GIT dan kerusakan mitokondria. Kerusakan mitokondria akan menyebabkan kenaikan ROS intramitokondria, hal ini menunjukkan bahwa terjadi stress oksidatif. Reactive Oxygen Species (ROS) ada hubungan dengan proses aktivitas peradangan dalam rusaknya jaringan gastrointestinal (Suleyman *et al.*, 2010).

Indometasin menyebabkan penurunan prostaglandin mukosa (inhibisi COX-1) Penurunan prostaglandin mukosa menyebabkan tidak ada perlindungan terhadap barier mukosa. Kondisi ini memudahkan invasi bakteri yang menyebabkan aktivasi makrofag, aktivasi neutrofil, induksi iNOS, produksi radikal NO, pembentukan peroksi nitrit (RNS) dan pembentukan oksigen radikal (ROS) sehingga menyebabkan kerusakan mukosa usus. Penghambatan COX-1 sebenarnya dapat meningkatkan pengaturan ekspresi COX-2, tetapi karena indometasin dapat menghambat COX-2 maka produksi prostaglandin dapat ditekan. Asupan oral indometasin pada tikus menggunakan dosis 15-16 mg/kg BB dapat menginduksi ulserasi pada mukosa, edema dan perdarahan (Krieglstein *et al.*, 2001). Tikus dinyatakan positif IBD setelah 24 jam pemaparan indometasin (Aulanni'am *et al.*, 2012) yang diketahui dari kerusakan mukosa (vili) jejunum usus halus berdasarkan hasil histopatologinya. Absorbsinya setelah pemberian secara oral cukup baik, 92-99% terikat pada protein plasma. Metabolismenya terjadi di hati, apabila indometasin digunakan secara oral maka 60% akan terekskresi secara *predominant urine* dalam bentuk *glucuronidated* dan 40% lebihnya pada feses setelah sekresi di

empedu. Kadar puncak indometasin dalam serum mencapai 2 jam dengan konsentrasi efektif antara 0,3-3 mg/l (Setter and Baker, 2010).

## 2.4 Jejunum

Jejunum merupakan bagian kedua dari usus halus, dimulai dari flexura duodenojejunalis dimana traktus gastrointestinalis kembali menjadi intraperitoneal. Sebagian besar jejunum berada di kuadran kiri atas abdomen dan lebih besar diameternya serta memiliki dinding yang lebih tebal dibandingkan ileum. Lapisan bagian dalam mukosa jejunum ditandai dengan adanya banyak lipatan menonjol yang mengelilingi lumennya (plika sirkularis). Karakteristik unik jejunum adalah adanya arcade arteriae yang kurang jelas dan vasa recta yang lebih panjang dibandingkan dengan yang ada di ileum (Hartanto *et al.*, 2018).

Histologi duodenum segmen bawah, jejunum dan ileum memiliki karakteristik yang hampir sama dengan duodenum segmen atas. Hanya kelenjar duodenal (Brunner) yang hanya terdapat pada submukosa duodenum segmen atas dan tidak ditemukan di jejunum maupun ileum. Inti dari plica circularis dibentuk oleh jaringan ikat padat submukosa yang terdapat arteri dan vena di dalamnya. Usus halus dikelilingi oleh muskularis eksterna yang tersusun atas otot polos sirkuler dan longitudinal. Diantara vili-vili terdapat kelenjar intestinal. Di dasar kelenjar intestinal terdapat sel paneth yang merupakan kelenjar eksokrin memproduksi lisozim. Sel paneth juga memiliki fungsi fagositosis dengan demikian sel ini memiliki fungsi penting untuk mengontrol flora mikroba pada usus halus (Hartanto *et al.*, 2018)

Jejunum memiliki panjangnya 2-3 meter dan berkelok-kelok, terletak di sebelah kiri atas intestinum minor. Dengan perantara lipatan peritoneum yang berbentuk kipas (mesentrium) memungkinkan keluar masuknya arteri dan vena mesentrika superior, pembuluh limfe, dan saraf ke ruang antara lapisan peritoneum. Penampang jejunum lebih lebar, dindingnya lebih tebal, dan banyak mengandung pembuluh darah. Proses selanjutnya yaitu absorpsi zat-zat penting dari makanan yang telah dicerna sebelumnya. Absorpsi gula, asam amino dan lemak sebagian besar terjadi di duodenum dan jejunum, begitu pula absorpsi besi dan kalsium yang membutuhkan vitamin D. Vitamin larut lemak (A, D, E, K) di absorpsi di duodenum dan dibutuhkan garam-garam empedu dalam prosesnya (Sherwood, 2012).

### **2.5 Enzim Amilase**

Amilase adalah kelompok enzim yang memiliki kemampuan untuk memutuskan ikatan glikosida yang terdapat pada molekul amilum. Hasil hidrolisis atau pemecahan molekul amilum adalah molekul-molekul yang lebih kecil seperti maltosa, dekstrin dan terutama molekul glukosa sebagai unit terkecil (Reddy *et al.*, 2000). Aktivitas enzim dipengaruhi oleh suhu, pH dari lingkungan tempat enzim bekerja, konsentrasi substrat, activator dan inhibitor enzim.

Pencernaan utama karbohidrat terjadi di usus halus dan enzim yang berperan adalah amilopsin, yaitu enzim amilase yang berasal dari pankreas, dan enzim-enzim disakaridase yang dihasilkan oleh mukosa usus sendiri. Hasil akhir pencernaan karbohidrat adalah monosakarida (glukosa, fruktosa, galaktosa) yang kemudian diserap melalui mukosa usus halus, dibawa ke sistem darah vena portal (Sumardjo, 2006).

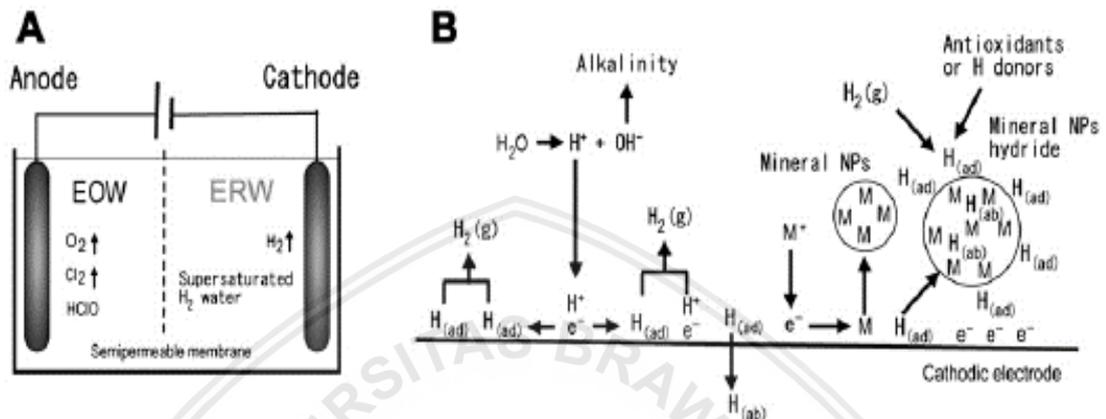
Amilase adalah enzim pemecah karbohidrat dari bentuk kompleks menjadi bentuk yang lebih sederhana. Enzim ini terdapat dalam air liur (ptialin) dan getah pankreas. Darah normal juga mengandung sedikit amilase dari hasil pemecahan sel yang berlangsung secara normal. Menurut Aiyer (2005) pada penyakit radang pankreas, radang usus, dan kencing manis kadar amilase dalam darah mengalami peningkatan. Radang usus dapat memicu peningkatan aktivitas amilase, dimana pada keadaan jejunum yang mengalami inflamasi kadar aktivitas amilase semakin meningkat dikarenakan produksi enzim yang dihasilkan oleh pankreas tidak diimbangi dengan optimalnya penyerapan yang terjadi pada organ jejunum.

Pada kelompok hewan  $\alpha$ -amilase merupakan enzim pencernaan amilum yang utama. Enzim  $\alpha$ -amilase merupakan kelompok metaloenzim yang tidak dapat bekerja sama sekali bila tidak ada ion kalsium. Disebut juga dengan 1,4  $\alpha$ -D-glukan glukanohidrolase atau glukogenase. Enzim ini bekerja memutus ikatan  $\alpha$ -1,4 glikosida pada amilum secara acak terutama pada rantai yang panjang sehingga menghasilkan maltotriosa dan maltosa dari polimer amilosa pada amilum dan menghasilkan glukosa dan sedikit dekstrin dari polimer amilopektin penyusun amilum. Karena sifatnya yang dapat memutus ikatan glikosida secara acak, enzim ini bekerja lebih cepat dibanding amilase lainnya (Aiyer, 2005).

## 2.6 Air alkali

Air alkali disebut pula dengan *Electrochemically Reduced Water* (ERW), *Alkaline Electrolyzed water*, *Alkali-Ionic Water*, *Alkaline Cathodic Water* dan *Alkaline Ionized Water* (Shirahata *et al.*, 2007). Sedangkan, menurut Lark *et al.*, (2000) air alkali disebut pula sebagai *hexagonal water*, *spawater*, *microwater*,

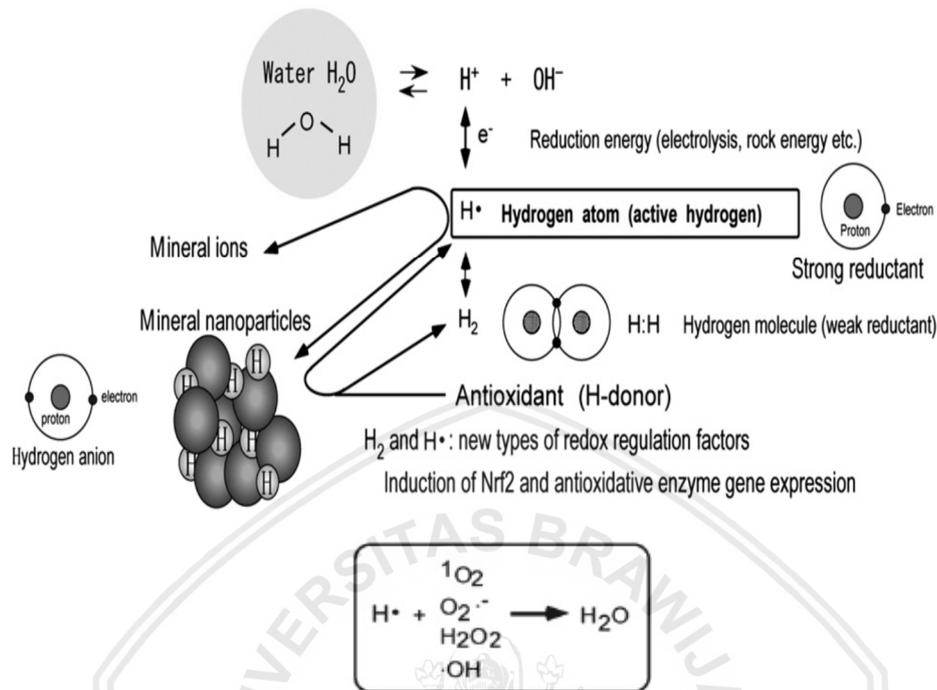
*ionized water dan living water*. Air alkali didapatkan dengan proses elektrolisis, dimana terjadi penguraian senyawa air ( $\text{H}_2\text{O}$ ) menjadi oksigen ( $\text{O}_2$ ) dan gas hidrogen ( $\text{H}_2$ ) dengan menggunakan arus listrik yang melalui air tersebut.



**Gambar 2.2** Electrochemical preparation of reduced water, mineral nanoparticles and mineral hydrides (Shirahata *et al.*, 2012).

**Keterangan:** **A.** Secara elektrokimia air direduksi di sekitar katoda adalah air yang kaya dengan molekul hidrogen sedangkan air dioksidasi di sekitar anoda mengandung gas oksigen, gas klorida, dan asam hipoklorit jika dalam air mengandung ion Cl. **B.** Terjadi reaksi pada permukaan platinum elektroda. Proton yang lepas dari air direduksi menjadi atom H teradsorpsi ( $\text{H}_{\text{ad}}$ ) pada permukaan pelat platinum.  $\text{H}_{\text{ad}}$  diubah menjadi atom  $\text{H}_2$ .  $\text{H}_{\text{ad}}$  diserap ke dalam logam Pt untuk menghasilkan H teradsorpsi ( $\text{H}_{\text{ab}}$ ). Ion mineral dalam *original water* direduksi menjadi atom logam dan kemudian terorganisir membentuk mineral nanopartikel. Mineral nanopartikel dilindungi oleh pelindung organik yang stabil dan tersebar di dalam air untuk waktu yang lama. Mineral nanopartikel *adsorb* atau atom H teradsorpsi dengan adanya  $\text{H}_2$ - atau H-donor.

Elektrolisis air menghasilkan keadaan pereduksi yang kuat di sekitar katoda, karena sebagian besar tegangan diterapkan pada lapisan air di dekat katoda, membentuk medan listrik yang sangat tinggi. Mineral nanopartikel dan mineral nanopartikel hidrida juga terbentuk. Nanopartikel yang dihasilkan mengaktifkan atom hidrogen (Hamasaki *et al.*, 2008; Kajita *et al.*, 2007).



**Gambar 2.3** Proses Hidrogen Aktif dalam Air Alkali (Shirahata *et al.*, 2012).

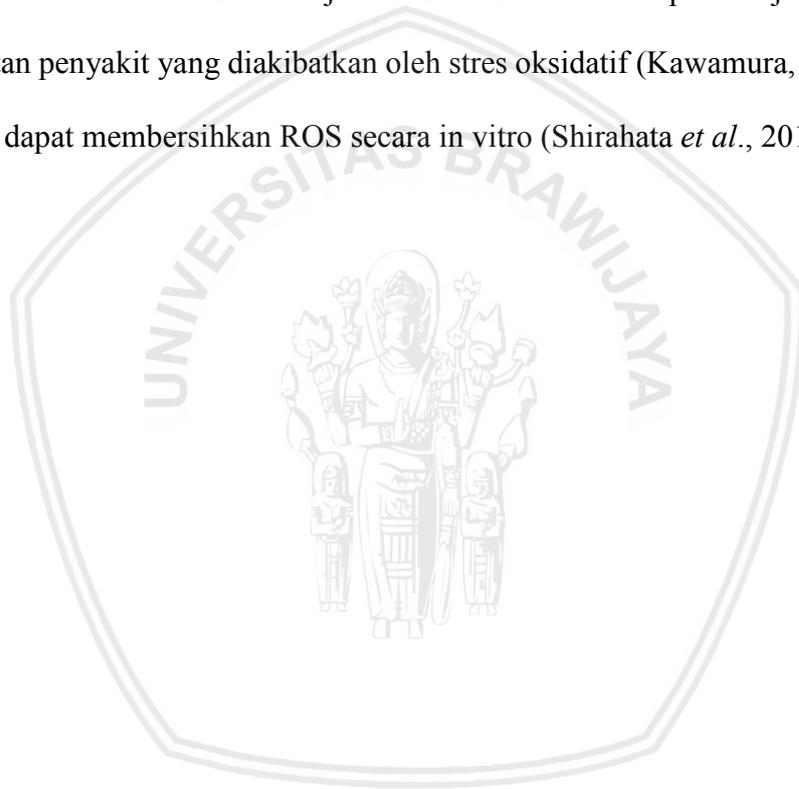
Air direduksi dengan energi listrik dan energi lainnya untuk menghasilkan hidrogen aktif (H atom) dan mineral nanopartikel. Atom H menghasilkan molekul hidrogen,  $H_2$  berfungsi sebagai H-donor. Mineral nanopartikel dapat mempertahankan *reduction energy*, karena nanopartikel secara bertahap memisahkan ion mineral, dan melepaskan elektron. Mineral nanopartikel merangsang atom H merilis berbagai zat organik seperti antioksidan dan metanol untuk meningkatkan *reducibility*. Mineral nanopartikel hibrida dapat melepaskan anion hidrogen, yang dapat berfungsi sebagai reduktan. Molekul hidrogen dan hidrogen aktif merupakan faktor regulasi redoks yang dapat menginduksi ekspresi enzim antioksidan. Enzim antioksidan adalah jalur utama pertahanan terhadap radikal bebas pada sel hewan dan tumbuhan (Shirahata *et al.*, 2012).

Air alkali atau air basa berfungsi sebagai penyeimbang kelebihan asam dalam tubuh. Air alkali merupakan air yang mengandung beberapa komponen tertentu seperti pH di atas 7, molekul air mikro kluster, nilai *Oxidation Reduction Potential* (ORP) negatif dan hidrogen terlarut sangat tinggi (Jin *et al*, 2006; Kim, 2006). Semakin negatif nilai ORP suatu cairan maka semakin besar pula ia menyumbangkan elektron ke sel-sel yang kehilangan elektron akibat dicuri atau diambil oleh radikal bebas. Air alkali tidak hanya memiliki pH tinggi dan nilai *Oxidation Reduction Potential* (ORP) negatif, tetapi juga mengandung ion magnesium dan kalsium yang mampu mencegah penyakit dan menetralkan keadaan tubuh yang asam. Efek yang menguntungkan lainnya akan mempengaruhi pH darah. Keluarnya komponen asam di lambung akan dinetralkan oleh air alkali disertai membantu menyeimbangkan pH darah, sehingga membantu mempertahankan homeostasis fisiologis dalam tubuh (Vorobjova, 2005).

Sejauh ini, hasil lebih lanjut diperkuat dengan hasil penelitian Kim dan Yokoyama (1997) dan Watanabe *et al.*, (1997) menunjukkan bahwa penggunaan air alkali dalam jangka panjang dapat meredakan gejala diabetes melitus tipe 1. Air alkali bekerja dengan mempengaruhi sistem imun, bertindak pada respon imun lokal mempengaruhi penurunan ekspresi IL-1 $\beta$  dan TNF- $\alpha$  di saluran pencernaan. Penurunan ekspresi IL-1 $\beta$  dan TNF- $\alpha$  menunjukkan proteksi terhadap produksi sitokin Th1 dan *oksida nitrat* (NO) yang mengarah pada kondisi inflamasi parah, termasuk kerusakan jaringan (Shirahata *et al.*, 2012).

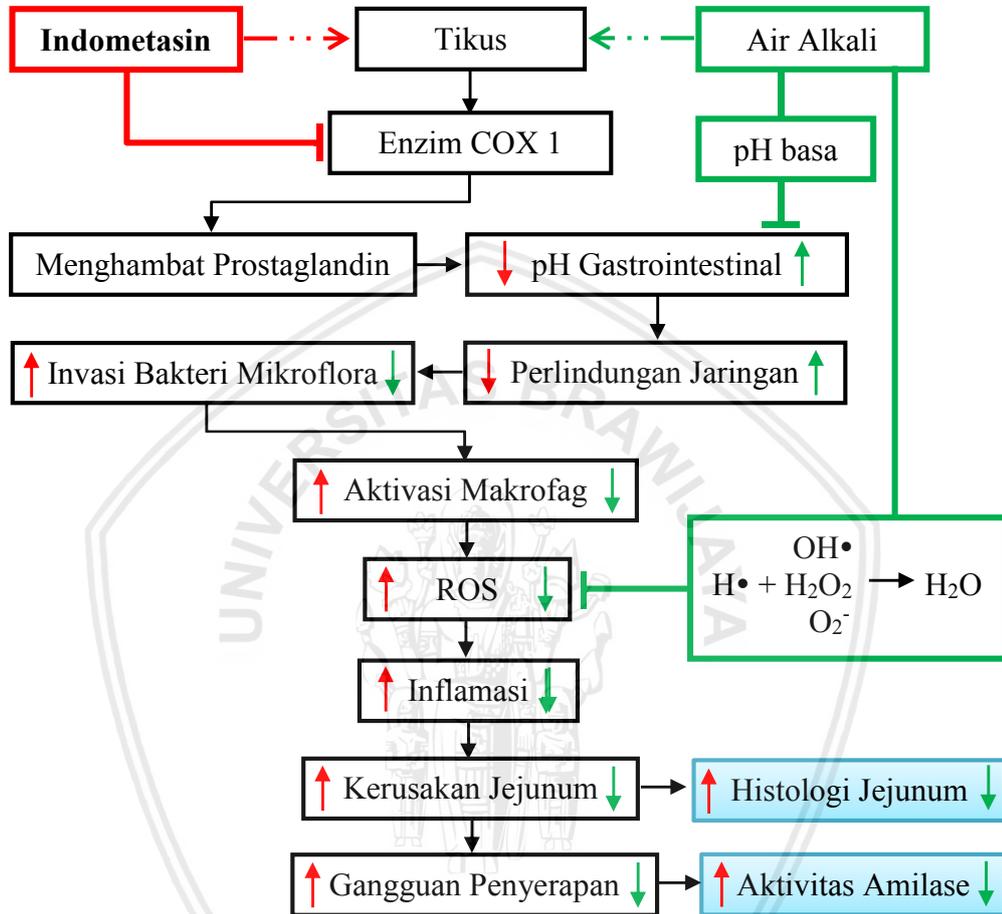
Air alkali menunjukkan pH yang tinggi dibandingkan dengan air keran, sehingga pH air alkali yang basa dapat menetralkan keasaman diusus akibat

berlebihnya asam lambung. Efek yang menguntungkan lainnya dari penggunaan air alkali yaitu mempengaruhi pH darah, sehingga dapat mempertahankan keseimbangan asam basa dan dapat membantu mempertahankan proses homeostasis fisiologis dalam tubuh (Shirahata *et al.*, 2012). Menurut Shirahata *et al* (2011), merekomendasikan hidrogen aktif air alkali sebagai mekanisme dasar kerja air alkali. Data klinis menunjukkan bahwa air alkali dapat menjadi alternatif pengobatan penyakit yang diakibatkan oleh stres oksidatif (Kawamura, 2002) serta air alkali dapat membersihkan ROS secara *in vitro* (Shirahata *et al.*, 2011).



BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konseptual

Keterangan :

- .-> / -.-> : Paparan
- ↑ : Pengaruh indometasin
- ↓ : Pengaruh air alkali
- ⊥ : Menghambat
- ⊥ : Reaksi pemberian terapi
- (Red) : Induksi indometasi
- (Green) : Terapi air alkali
- (Blue) : Variabel yang Diamati

Hewan coba dipapar dengan indometasin melalui rute oral menggunakan sonde. Jalur paparan indometasin melalui rute oral akan melewati saluran pencernaan yaitu mulai dari mulut, faring, esophagus, lambung dan menuju usus. Indometasin bekerja sebagai obat anti-inflamasi nonsteroid (OAINS) dengan menghambat siklooksigenase (COX) terutama COX 1 untuk sintesis prostaglandin. Indometasin akan menghambat sintesis prostaglandin menyebabkan berkurangnya aliran darah mukosa, penurunan sekresi mukus yang mengakibatkan lambung mengeluarkan cairan HCl yang bersifat asam secara berlebihan. Kondisi itu akan mengakibatkan *mucosa barrier* (pertahanan mukosa) menjadi lemah atau berkurang dan dapat membentuk *ulcer* di gastrointestinal.

Pada usus umumnya terdapat mikroorganisme yang membantu tubuh untuk pembentukan atau penyerapan nutrisi akan tetapi, akibat adanya luka pada jaringan maka terjadi peningkatan invasi enterobakteria. Muncullah makrofag akan memfagositosis mikroorganisme yang nantinya akan melakukan proses *Antigen Presentation* sebagai tanda adanya invasi. Aktivasi makrofag dalam melakukan proses *Antigen Presentation* akan menyebabkan peningkatan aktivitas dan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) dalam sel. Produksi ROS yang meningkat akan menyebabkan rusaknya mukosa pada gastrointestinal sehingga memicu pelepasan sitokin pro-inflamasi. Inflamasi yang terjadi menyebabkan mukosa jejunum menjadi rusak sehingga proses absorpsi dan sekresi terganggu yang berpengaruh pada kenaikan kadar aktivitas amilase karena produksi amilase tidak diimbangi proses penyerapan pada jejunum yang optimal.

Air alkali digunakan dalam proses terapi penyakit Inflammatory Bowel Disease (IBD) dikarenakan air alkali mengandung komponen tertentu seperti pH 9,1 dan nilai *Oxidation Reduction Potential* (ORP) negatif. pH basa air alkali dapat menetralkan keadaan pada gastrointestinal yang bersifat asam serta mengurangi kerusakan jaringan dan mampu menurunkan aktivitas amilase. Nilai *Oxidation Reduction Potential* (ORP) bernilai negatif dapat dijadikan sebagai antioksidan dalam mengikat radikal bebas seperti ROS seperti radikal  $O_2^-$ ,  $OH^-$  dan  $H_2O_2$ . ROS yang dihasilkan dari induksi indometasin akan dinetralkan oleh air alkali dikarenakan dalam kandungan hidrogen terlarut yang sangat tinggi dalam air alkali yang berperan sebagai antioksidan dengan menyumbangkan elektronnya pada sel yang kehilangan elektron akibat diambil oleh radikal bebas, sehingga diharapkan dapat menetralkan ROS. Dengan menurunnya ROS maka proses radikal yang dapat merusak mukosa jejunum dapat dikurangi. Mekanisme ini akan memberikan efek perbaikan terhadap jaringan yang rusak akibat indometasin yang menyebabkan stres oksidatif.

### 3.2 Hipotesis Penelitian

1. Terapi air alkali dapat menurunkan aktivitas amilase pada jejunum tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi indometasin.
2. Terapi air alkali dapat memperbaiki struktur jaringan organ jejunum pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi indometasin dengan menggunakan terapi air alkali.

## BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

### 4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari samapi Mei 2016 di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya, dan Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya.

### 4.2 Materi Penelitian

#### 4.2.1 Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar, jantan, berumur 8-12 minggu. Pemeliharaan hewan coba dilakukan di dalam kandang berupa bak plastik dengan tutup kawat beralas sekam yang ditempatkan di Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya Malang. Setiap pagi diberi pakan ransum (komposisi protein 15%, lemak 5%, serat kasar 16%, kalsium 1,35%, fosfor 0,7%) dan minum secara *adlibitum*.

#### 4.2.2 Alat dan Bahan Penelitian

##### 4.2.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain tabung reaksi, alat bedah (gunting tajam-tajam, gunting tajam-tumpul, pinset, scalpel, blade), sonde lambung, labu takar (100 mL, 500 mL, dan 1.000 mL), gelas ukur 500 mL, pipet tetes, pengaduk kaca, mortar, alumunium foil, tabung *microtube*, rak tabung reaksi, mikropipet (10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, dan 1.000  $\mu$ L), penangas air, *base mold*, mikrotom, cover glass, objek glass, label, mikroskop, lemari pendingin, alat sentrifugasi, *vortex*, timbangan digital, spektrofotometri, stirer, plastik klip, blue tip, yellow tip, *glove*, *autoclave*, sputit, dan *shakerbath*.

#### 4.2.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*), indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB tikus, air alkali yang diperoleh dari pabrik yang ada di Jawa Timur, minyak jagung, aquades steril, Organ jejunum, NaCl fisiologis, paraformaldehida (PFA) 4%, etanol (70%, 80%, 90%, 95%, etanol absolute I, II, III), cetakan blok paraffin, pewarna Hematoksilin, pewarna Eosin, aquades, balsem kanada, buffer asetat 0,2 M pH 5, glukosa, amilum, larutan pati 1%, buffer fosfat, reagen Nelson-Somogyi, reagen arseno molibdat.

#### 4.3 Sampel Penelitian

Sampel penelitian berupa hewan coba tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan yang berusia 8-12 minggu dengan berat badan 150-200 gram, kondisi sehat (berambut cerah, aktivitas baik, tidak ada abnormalitas anatomis, dan nafsu makan baik), lulus proses sertifikasi laik etik penelitian dengan no. 546-KEP-UB dan belum pernah digunakan penelitian. Hewan coba diaklimatisasi selama 7 hari yang ditempatkan di laboratorium Biosains Universitas Brawijaya Malang. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus Federer (Sudarmaja, 2014).

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

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

$$n \geq 5$$

Keterangan :

p = jumlah kelompok

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka diperoleh 4 kelompok perlakuan dengan 5 kali ulangan dalam setiap kelompok. Total tikus yang dibutuhkan adalah 20. Selanjutnya dibagi dalam 4 kelompok yaitu kontrol negatif, kontrol positif, perlakuan 1, perlakuan 2.

#### 4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental (*experiment design*) dengan menggunakan metode *Post test only control group design*, yaitu kegiatan percobaan (eksperimen) yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh yang timbul sebagai akibat dari adanya perlakuan tertentu. Hewan coba dibagi menjadi empat kelompok perlakuan, yakni kelompok 1 (kontrol negatif) tikus yang tidak mendapat perlakuan apapun, kelompok 2 (kontrol positif) adalah tikus yang diinduksi indometasin 15 mg/kg BB dan diinkubasi 24 jam, kelompok 3 tikus yang diinduksi indometasin 15 mg/kg BB dan diberikan terapi air alkali dengan volume 1 mL/ekor, dan kelompok 4 tikus yang diinduksi indometasin 15 mg/kg BB dan diberikan terapi air alkali dengan volume 2 mL/ekor. Rancangan penelitian dapat dilihat pada **tabel 4.1**.

**Tabel 4.1** Rancangan Kelompok Penelitian

Kelompok	Keterangan	Ulangan				
		1	2	3	4	5
KN (Kontrol Negatif)	Tikus dibiarkan hidup normal dengan pakan standart dan air minum <i>adlibitum</i> selama 7 hari, pada hari ke-8 dilakukan pembedahan.					
KP (Kontrol Positif)	Tikus diinduksi dengan indometasin pada hari ke-8 dengan dosis 15 mg/kg BB dan dilakukan pembedahan 24 jam setelah induksi indometasin.					
Terapi Air Alkali 1 1 mL/ekor 2 kali sehari	Pada hari ke-8 tikus diinduksi indometasin dengan dosis 15 mg/kgBB, selanjutnya pada hari ke-9 diberi air alkali dengan volume 1 mL/ekor diberikan pagi dan sore hari selama 7 hari berturut-turut dan pada hari ke-16 dilakukan pembedahan.					
Terapi Air Alkali 2 2 mL/ekor 2 kali sehari	Pada hari ke-8 tikus diinduksi indometasin dengan dosis 15 mg/kgBB, selanjutnya pada hari ke-9 diberi air alkali dengan volume 2 mL/ekor diberikan pagi dan sore hari selama 7 hari berturut-turut dan pada hari ke-16 dilakukan pembedahan					

#### 4.5 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah:

Variabel bebas : Induksi Indometasin dan terapi air alkali

Variabel tergantung : Aktivitas amilase dan histologi jejunum

Variabel kendali : Tikus (Umur, *strain*, jenis kelamin dan pakan) dan kondisi eksperimental.

## 4.6 Tahapan Penelitian

### 4.6.1 Preparasi Hewan Coba

Tikus dibagi dalam 4 kelompok perlakuan. Setiap kelompok perlakuan terdiri atas 5 ekor tikus. Tikus yang digunakan sebagai hewan coba diaklimatisasi selama 1 minggu. Dikandangkan pada kandang berukuran 50 x 40 x 20 cm. Jumlah tikus disesuaikan dengan ukuran kandang yang digunakan. Kandang terletak pada tempat yang bebas dari bising dan bebas dari asap serta polutan lainnya. Suhu optimum ruangan berkisar antara 22 – 24°C dan kelembapan 50% - 60% dengan ventilasi cukup (AOAC, 2005). Setiap hari alas dari kandang dibersihkan dan diganti dengan yang baru. Pakan yang diberikan berupa pakan standar dan diberikan pada setiap pagi hari. Pemberian air minum *adlibitum*.

### 4.6.2 Persiapan Hewan Model IBD dengan Induksi Indometasin

Pemberian indometasin menggunakan metode sonde lambung. Dosis indometasin yang digunakan adalah 15 mg/kg BB tikus. Berat rata-rata tikus yang digunakan kurang lebih 180 gram dan terdapat 4 kelompok perlakuan masing-masing 5 ekor tikus yang akan diinduksi indometasin, maka indometasin yang diperlukan untuk setiap tikus adalah :

$$0,18 \text{ kg} \times 15 \text{ mg/kgBB} = 2,7 \text{ mg/tikus}$$

Untuk membuat larutan stok, setiap 45 mg indometasin akan dilarutkan ke dalam 4 mL pelarut minyak jagung (Bures *et al.*, 2011). Banyaknya larutan yang diperlukan untuk pemberian per oral adalah :

$$\frac{2,7 \text{ mg}}{45 \text{ mg}} \times 4 \text{ mL} = 0,24 \text{ mL/tikus}$$

Minyak jagung ini berfungsi sebagai pelarut. Indometasin yang sudah dihitung dosisnya, lalu ditambahkan dengan minyak jagung. Setelah itu di *vortex* yang berfungsi untuk melarutkan indometasin. Induksi indometasin ini dapat mengakibatkan kerusakan sel-sel pada daerah gastrointestinal. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam.

#### **4.6.3 Tata Laksana Pemberian Terapi Air Alkali**

Volume pemberian air alkali yaitu 1 mL/tikus dan 2 mL/tikus yang diberikan sehari dua kali yaitu pagi dan sore hari karena mencegah lambung tikus tidak berlebih. Masing – masing kelompok terapi terdapat 5 ekor tikus. Pemberian air alkali dilakukan dengan cara sonde lambung. Terapi diberikan selama tujuh hari. Air alkali diperoleh dari salah satu pabrik yang terdapat di Jawa Timur.

#### **4.6.4 Pengambilan Organ Jejunum**

##### **4.6.4.1 Pengambilan Sampel dan Fiksasi**

Organ jejunum diambil pada hewan coba tikus putih (*Ratus norvergicus*) jantan dilakukan setelah pemberian terapi air alkali selama tujuh hari. Sebelumnya dipersiapkan terlebih dahulu tempat untuk bedah, dan peralatan bedah meliputi pinset anatomis, dan gunting. Hewan coba dieuthanasi dengan cara dislokasi leher, posisikan tikus pada papan bedah menggunakan pin dengan posisi rebah dorsal. Bedah mulai organ abdomen kemudian diambil organ-organnya salah satunya yaitu jejunum. Bedah organ jejunum dengan duodenum dan ileum adalah tidak adanya kelenjar brunner dan *peyer patches*. Organ jejunum lalu dicuci dalam NaCl fisiologis dan Kemudian jejunum dimasukkan ke dalam larutan Phosphate Buffer Saline-azida (PBS-azida) pH 7,4 untuk menjaga protein dalam organ agar tidak

rusak dan larutan paraformaldehid 4% (PFA) untuk menjaga atau mengawetkan jaringan agar tidak lisis.

#### 4.6.4.2 Dehidrasi dan Clearing

Dehidrasi bertujuan untuk mengeluarkan air dari dalam jaringan yang telah difiksasi. Proses dehidrasi pertama organ diambil dari proses fiksasi lalu direndam dalam alkohol 70% selama 24 jam, lalu dimasukkan ke dalam alkohol 80% selama dua jam, dilanjutkan dengan memasukkan ke dalam alkohol 90% dan 95% masing-masing 20 menit, dan terakhir dimasukkan ke dalam alkohol absolut I, II, III masing-masing selama satu jam.

Tujuan dari penjernihan ini adalah menggantikan tempat alkohol sementara dalam jaringan yang telah mengalami proses dehidrasi dengan suatu *solven* atau medium penjernih sebelum proses penanaman dalam parafin. Proses penjernihan dilakukan setelah dehidrasi dimasukkan ke dalam larutan xylol I, II, III dan setiap larutan dilakukan selama satu jam.

#### 4.6.4.3 Infiltrasi, *Embedding* dan *Sectioning*

Infiltrasi adalah suatu usaha menyusupkan media penanaman (*embedding media*) ke dalam jaringan dengan jalan menggantikan kedudukan dehidran dan bahan penjernih (*clearing agents*). Infiltrasi menggunakan paraffin cair I, II, III dan masing-masing larutan dimasukkan dalam oven selama satu jam.

Tujuan dari tahap ini adalah untuk membuat balok parafin yang berisi jaringan yang akan dibuat preparat permanen. Proses penyayatan (*Sectioning*) adalah pembuatan sayatan atau pita dari balok parafin yang telah terbentuk dengan

menggunakan mikrotom, yang bertujuan untuk membuat sayatan jaringan dan dapat dilihat jelas dari dalam mikroskop.

#### **4.6.5 Pewarnaan Hematoksilin-Eosin**

Pembuatan pewarnaan Hematoksilin-Eosin yaitu pertama preparat jejunum dilakukan deparafinasi dengan xylol selama lima menit, lalu dimasukkan ke dalam alkohol absolut selama lima menit, dilanjutkan ke dalam alkohol 95% selama lima menit, diteruskan dengan memasukkan ke dalam alkohol 90% selama lima menit, lalu lima menit selanjutnya dimasukkan alkohol 80%, preparat selanjutnya memasukkan ke dalam alkohol 70% selama lima menit, dan preparat dicuci dengan air mengalir 15 menit. Preparat sesuai dicuci dapat diwarnai dengan Hematoksilin selama 10 menit, dicuci dengan air mengalir selama 30 menit dibilas dan direndam dengan akuades selama lima menit, dan diteruskan dengan pewarnaan Eosin selama lima menit dan direndam kembali ke dalam akuades, diteruskan dengan memasukkan preparat ke dalam alkohol selama 10 menit setiap persentase yaitu 70%, 80, 90%, dan 95%. Preparat selanjutnya dengan memasukkannya ke dalam alkohol absolut I, II, III selama lima menit dan lima menit selanjutnya dimasukkan ke dalam larutan xylol dua kali lalu dikeringkan dan diberi balsem canada lalu ditutup dengan cover glass.

#### **4.6.6 Pengamatan Histopatologi**

Pengamatan histopatologi jejunum dilakukan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x dan 1000x yang ditampilkan dilayar monitor. Gambaran histopatologi yang diamati adalah infiltrasi sel radang, kerusakan vili dan mukosa.

#### **4.6.7 Isolasi Amilase**

Sampel dari organ jejunum dalam larutan PBS dihancurkan menggunakan mortar atau blender, kemudian ditambahkan 5 mL buffer asetat untuk setiap 1 gram sampel. Setelah itu diinkubasi selama 10 menit dan disaring filtrat yang didapat, selanjutnya disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 2000 rpm untuk diambil supernatnya. Lalu, supernatan diambil dan ditambah dengan etanol absolut dingin dengan perbandingan 1:1 dan dibiarkan selama semalam hingga terbentuk endapan, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit pada temperatur 4°C dan di ambil endapan yang terbentuk, endapan dikeringkan hingga bau etanol hilang, selanjutnya endapan ditambahkan larutan buffer Tris-HCL pH 6,5 dengan perbandingan volume 1:1 lalu dilakukan homogenasi.

#### **4.6.8 Pengukuran Aktivitas Amilase**

##### **4.6.8.1 Pembuatan Kurva Standar Glukosa**

Larutan glukosa standar dibuat dengan melarutkan 10 mg glukosa dalam 100 mL air suling, dan dilakukan pengenceran sehingga diperoleh larutan glukosa dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 mg/100 mL. Lima tabung reaksi disiapkan, masing-masing diisi dengan 1 mL larutan glukosa standar tersebut di atas. Satu tabung diisi 1 mL air suling sebagai blanko, masing-masing tabung di atas ditambahkan 1 mL reagen Nelson, dan semua tabung dipanaskan pada penangas air mendidih selama 20 menit. Semua tabung diambil dan segera didinginkan bersama-sama dalam gelas piala yang berisi air dingin sehingga suhu tabung mencapai 25°C.

Setelah dingin 1 mL reagen Arsenomolibdat ditambahkan dan dicampur sampai semua endapan larut sempurna, 7 mL air suling ditambahkan ke dalam tabung tersebut dan dicampur sampai homogen. Absorbansi masing-masing larutan tersebut diukur pada panjang gelombang 610 nm.

#### 4.6.8.2 Pengukuran Aktivitas Amilase

Uji aktivitas enzim amilase di dasarkan pada perhitungan gula pereduksi dari hasil hidrolisis pati dengan metode *Nelson-Somogyi*. Metode Somogyi-Nelson merupakan metode penetapan kadar gula pereduksi, dimana prinsipnya, gula pereduksi akan mereduksi ion  $\text{Cu}^{2+}$  menjadi ion  $\text{Cu}^+$ , kemudian ion  $\text{Cu}^+$  ini akan mereduksi senyawa arsenomolibdat membentuk kompleks berwarna biru kehijauan. Prosesnya yaitu diambil filtrate enzim hasil isolasi sebanyak 1 mL dan ditambahkan dengan larutan pati 1% sebanyak 0,5 mL dan 0,5 mL buffer fosfat, kemudian diinkubasi pada suhu  $100^{\circ}\text{C}$  selama 10 menit. Setelah itu ditambahkan 1mL reagen Nelson-Somogyi dan dididihkan selama 5 menit, lalu ditambahkan 1mL reagen Arsenomolibdat dan diaduk hingga homogen. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 610 nm. Aktivitas enzim amilase dapat dihitung dengan persamaan berikut:

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{C}{T} \times 1 \text{ unit}/1 \mu\text{mol}(1)$$

Keterangan:

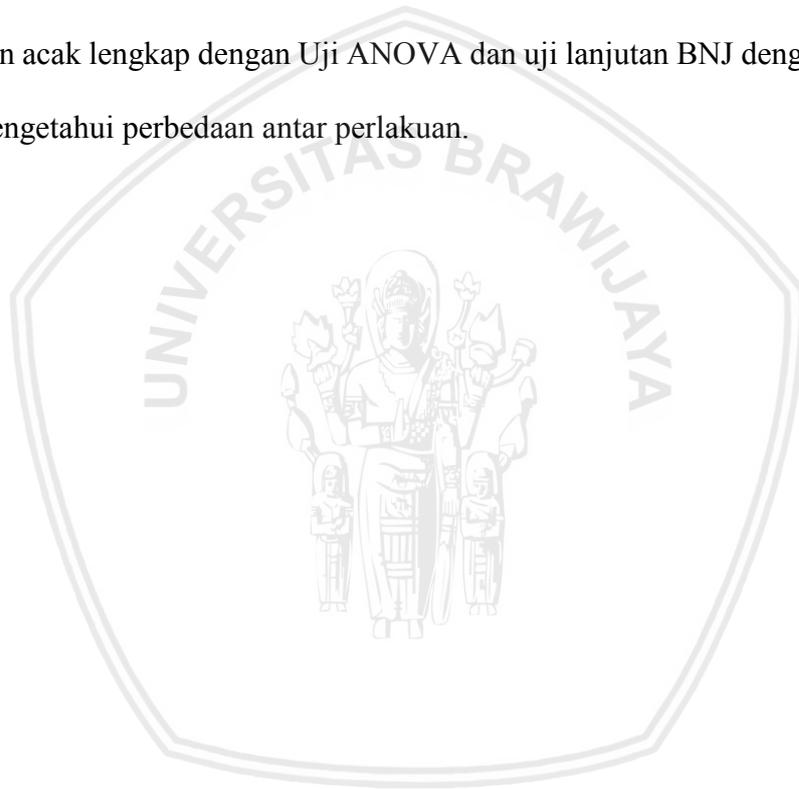
C = Konsentrasi glukosa per mL ekstrak enzim ( $\mu\text{mol}$ )

T = Waktu inkubasi (menit)

1 unit enzim amilase = besarnya aktivitas enzim yang dibutuhkan untuk membebaskan 1  $\mu\text{mol}$  glukosa per menit per mL enzim.

#### 4.7 Analisa Data

Analisa data yang digunakan dalam penelitian ini berupa data kualitatif berupa gambaran histopatologi jejunum dengan pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE) yang akan dianalisis dan disajikan secara deskriptif dan data kuantitatif untuk mengetahui aktivitas enzim amilase yang akan dianalisis dan disajikan dengan rancangan acak lengkap dengan Uji ANOVA dan uji lanjutan BNJ dengan  $\alpha = 0,05$  untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan.



## BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Pemberian Air Alkali terhadap Aktivitas Amilase Hewan Model *Inflammatory Bowel Disease* (IBD)

Pengukuran aktivitas amilase untuk mengetahui tingkat keparahan suatu inflamasi akibat kerusakan jaringan pada jejunum hasil induksi indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB dan setelah pemberian terapi air alkali. Unit aktivitas amilase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dibutuhkan untuk membebaskan 1 mikromol glukosa per menit pada kondisi optimum yaitu pH 6.7–7.0, suhu 25°C dan dengan waktu inkubasi 60 menit (Dian, 2012). Hasil pengukuran pada aktivitas amilase di jejunum tikus (*Rattus norvegicus*) pada tikus perlakuan ditunjukkan pada Tabel 5.1.

**Tabel 5.1** Aktivitas Amilase pada Jejunum Tikus (*Rattus norvegicus*) yang dipapar Indometasin dan pasca diterapi dengan Air Alkali

Perlakuan	Rata – rata aktivitas amilase (Unit)	Peningkatan aktivitas amilase (%) terhadap kontrol negatif	Penurunan aktivitas amilase (%) terhadap kontrol positif
Kontrol negatif	0,011 ± 0,001 <sup>a</sup>	-	-
Kontrol positif (IBD)	0,034 ± 0,001 <sup>d</sup>	200,32 %	-
Terapi air alkali 1mL/ekor	0,026 ± 0,001 <sup>c</sup>	-	25,22 %
Terapi air alkali 2mL/ekor	0,013 ± 0,001 <sup>b</sup>	-	61,42 %

Keterangan : Perbedaan notasi a, b, c dan d menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ( $\alpha < 0,05$ ) antara kelompok perlakuan.

Hasil analisa secara statistik *One Way Analysis of Variant* (ANOVA) menggunakan software SPSS.21 menunjukkan bahwa pemberian air alkali

mampu menurunkan aktivitas amilase pada hewan model IBD yang terinduksi indometasin sebagaimana ditunjukkan pada **Tabel 5.1**. Hasil lanjutan menggunakan *Tukey/Beda Nyata Jujur (BNJ)* menunjukkan aktivitas amilase berbeda signifikan ( $\alpha < 0,05$ ) antar perlakuan. Penurunan aktivitas amilase tertinggi didapatkan pada kelompok terapi dengan volume 2 mL/ekor yang diberikan dua kali sehari, sehingga volume air alkali 2 mL/ekor yang diberikan dua kali sehari merupakan volume terbaik.

Aktivitas amilase pada kelompok kontrol negatif sebesar  $0.011 \pm 0.001$  Unit ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ) merupakan standar yang dipergunakan untuk menentukan adanya peningkatan aktivitas amilase yang terjadi pada kelompok tikus IBD. Aktivitas amilase merupakan indikator terdapatnya radikal bebas. Secara normal, radikal bebas yang diproduksi oleh tubuh yakni dalam jumlah kecil sebagai akibat dari proses metabolisme yang ada di dalam tubuh. Menurut Astuti (2008), sel memproduksi radikal bebas sebagai konsekuensi akibat dari proses biokimia dari metabolisme sel atau metabolisme xenobiotik, radikal bebas yang diproduksi merupakan hasil samping dari proses metabolisme sel atau metabolisme xenobiotik berlangsung. Sehingga, rata-rata aktivitas amilase kelompok kontrol negatif merupakan kelompok keadaan normal karena tikus pada kelompok kontrol negatif tidak mendapatkan perlakuan apapun dan rata-rata aktivitas amilase yang terbentuk merupakan hasil dari proses metabolisme dalam tubuh.

Aktivitas amilase pada kelompok positif (IBD) yaitu  $0,034 \pm 0,001$  Unit. Hasil analisa dengan menggunakan ANOVA menunjukkan bahwa aktivitas amilase pada kelompok positif (IBD) berbeda signifikan ( $\alpha < 0,05$ ) terhadap

kelompok kontrol negatif dengan peningkatan sebesar 200.32 %. Peningkatan aktivitas amilase tersebut dikarenakan adanya peningkatan ROS yang disebabkan oleh induksi indometasin. Mekanisme kerja indometasin dengan menghambat aktivitas enzim siklooksigenase 1 (COX-1) dan enzim siklooksigenase 2 (COX-2) (Tanaka *et al.*, 2002). Penghambatan pada COX-2 akan berfungsi terhadap pengurangan nyeri, namun penghambatan COX-1 mengakibatkan penurunan sintesis prostaglandin yang menyebabkan berkurangnya aliran darah mukosa, penurunan sekresi mukus dan bikarbonat (Buchanan dan Andrews, 2003). Turunnya sekresi mukus dan bikarbonat menjadikan organ jejunum menjadi bersifat asam. Penurunan prostaglandin menyebabkan penurunan perlindungan terhadap mukosa barrier usus, sehingga memudahkan invasi bakteri patogen (Takeuchi *et al.*, 2003). Peningkatan ROS dapat mengaktifasi NF- $\kappa$ B sehingga dapat memicu pelepasan sitokin pro-inflamasi seperti Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) dari mukosa jejunum. Pelepasan TNF- $\alpha$  dapat mengaktifasi neutrofil sehingga terjadi peningkatan jumlah neutrofil yang signifikan akibat kerusakan sel. Berdasarkan Suryanto (2003), menyatakan bahwa kerusakan pada jaringan akan menyebabkan produksi sitokin proinflamasi (TNF- $\alpha$ ) dan aktivasi neutrofil. Rusaknya mukosa jejunum menyebabkan tidak terserapnya amilase sehingga aktivitas amilase meningkat. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang menunjukkan adanya peningkatan pada aktivitas amilase sebesar 200.32 % pada kelompok kontrol positif (IBD).

Hasil analisa statistika menunjukkan aktivitas amilase pada kelompok terapi 1 mL/ekor dan kelompok terapi 2 mL/ekor berbeda signifikan ( $\alpha < 0,05$ )

terhadap kelompok positif (IBD). Hal ini ditunjukkan adanya penurunan aktivitas amilase pada kelompok terapi air alkali dengan volume 1 mL/ekor yang diberikan dua kali sehari memiliki aktivitas amilase yaitu sebesar  $0.026 \pm 0.001$  Unit dan pemberian terapi air alkali dengan volume 2 mL/ekor yang diberikan dua kali sehari memiliki aktivitas amilase yaitu sebesar  $0.013 \pm 0.001$  Unit. Aktivitas amilase menunjukkan penurunan aktivitas amilase kelompok terapi dengan volume 1 mL/ekor dan 2 mL/ekor yang diberikan dua kali sehari dibandingkan dengan kelompok IBD. Volume pemberian terapi air alkali 2 mL/ekor mampu menurunkan aktivitas amilase sebesar 61,42% dibandingkan dengan kelompok terapi 1 mL/ekor yang mampu menurunkan aktivitas amilase sebesar 25,22%.

Hasil analisis statistika aktivitas amilase kelompok 2 mL/ekor yang diberikan dua kali sehari merupakan volume terbaik yang mampu menurunkan aktivitas amilase sebesar  $0.013 \pm 0.001$  Unit, namun hasil tersebut belum sama dengan kelompok kontrol negatif yang memiliki aktivitas amilase  $0.011 \pm 0.001$  Unit. Hal ini berkaitan dengan fungsi jejunum sebagai tempat untuk menyerap nutrisi makanan dan berlangsungnya aktivitas enzim. Makanan yang masuk ke dalam jejunum tikus merangsang enzim amilase memproses pati untuk dimetabolisme menjadi glukosa dan diserap oleh vili-vili usus untuk diedarkan lewat peredaran darah. Enzim amilase pada jejunum tikus dapat mempengaruhi hasil aktivitas amilase kelompok 2 mL/ekor sehingga hasil aktivitas amilase belum sama dengan kelompok kontrol negatif walaupun telah mengalami penurunan yang berbeda nyata dibandingkan dengan kelompok IBD.

Pengujian normalitas data pada penelitian ini menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov. Suatu data hasil penelitian dikatakan berdistribusi normal apabila nilai signifikan hasil analisis lebih besar dari 0,05. Hasil uji normalitas data yang didapatkan menunjukkan nilai signifikansi didapatkan hasil 0,096 atau lebih besar dari 0,05 sehingga disimpulkan data hasil penelitian berdistribusi normal. Pengujian homogenitas ragam pada penelitian didapatkan suatu kelompok data dikatakan memiliki ragam yang homogen apabila nilai signifikan hasil analisis lebih besar dari 0,05. Data hasil penelitian memiliki ragam yang homogen karena nilai signifikansi hasil analisis menunjukkan lebih besar dari taraf nyata 0,05.

Hasil analisis One-way ANOVA diperoleh nilai Fhitung dengan nilai signifikansi sebesar 0,000 atau kurang dari taraf nyata 0,05 maka disimpulkan terdapat perbedaan yang signifikan rata-rata Aktivitas Amilase antar perlakuan yang dibandingkan. Hasil analisis One-way ANOVA menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan maka untuk mengetahui perlakuan mana yang memiliki Aktivitas Amilase yang berbeda signifikan dengan lainnya maka selanjutnya dilakukan uji Tukey, uji tukey pada semua perlakuan dibandingkan dengan perlakuan lain menunjukkan dibawah 0,05 maka perlakuan beda signifikan. Uji tukey menunjukkan bahwa rata-rata Aktivitas Amilase tertinggi terdapat pada kontrol positif dan rata-rata Aktivitas Amilase terendah terdapat pada kontrol negatif. Kedua Perlakuan ini berada pada kolom yang berbeda, artinya kedua perlakuan ini memiliki Aktivitas Amilase yang berbeda signifikan.

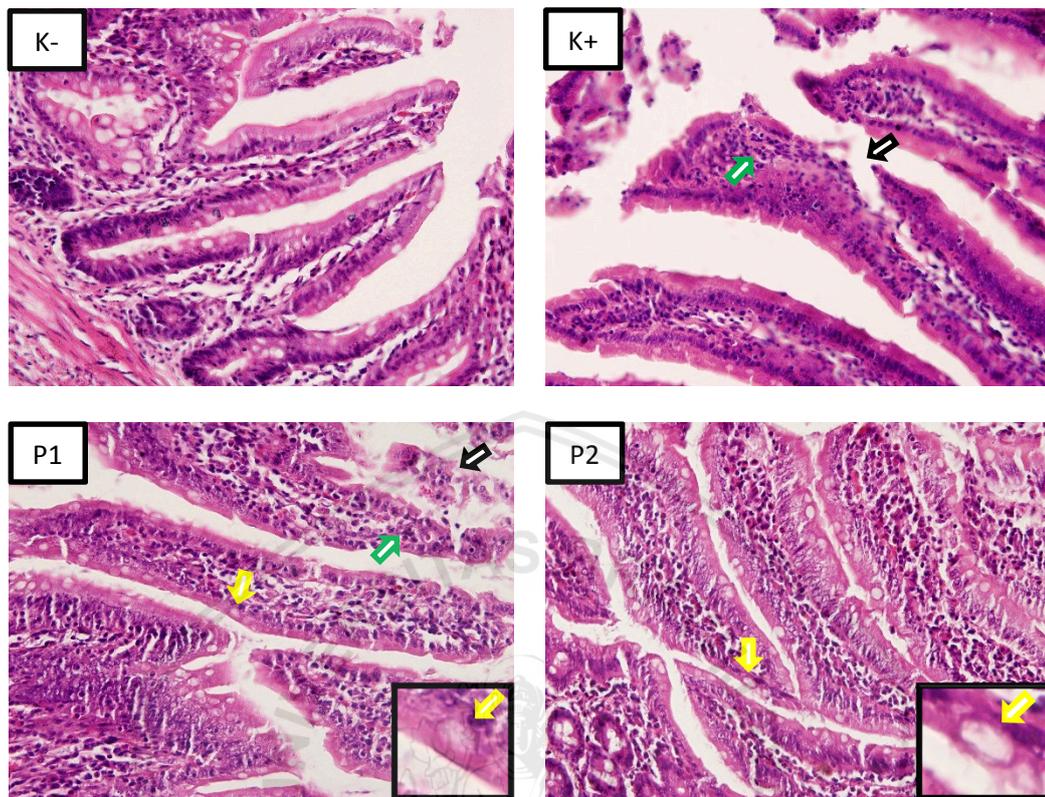
Penurunan aktivitas amilase dalam penelitian ini diduga karena kandungan air alkali. Air alkali yang memiliki pH basa 9,1 yang dapat menyeimbangkan asam akibat penurunan sekresi mukus dan bikarbonat, molekul air mikro kluster sehingga mudah diserap oleh tubuh, nilai ORP negatif dimana semakin negatif nilai ORP suatu cairan maka semakin besar pula ia menyumbangkan elektron ke se-sel yang kehilangan elektron akibat dicuri atau diambil oleh radikal bebas, serta memiliki kandungan antioksidan tinggi yang diperoleh dari proses elektrolisis air menghasilkan molekul hidrogen aktif sebagai reduktor kuat, yang berfungsi sebagai H-donor. Kandungan hidrogen terlarut yang sangat tinggi dalam air alkali berperan sebagai antioksidan dengan menyumbangkan elektronnya pada sel yang kehilangan elektron akibat diambil oleh radikal bebas, sehingga diharapkan dapat menetralkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) (Shirahata *et al.*, 2012). Antioksidan merupakan senyawa aktif yang berperan untuk menghambat reaksi oksidasi dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif sehingga kerusakan sel dapat dihambat (Andayani *et al.*, 2008).

## **5.2 Pengaruh Air Alkali terhadap Gambaran Histopatologi Jejunum Hewan Coba Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Indometasin**

Jaringan jejunum memiliki histologi yang hampir sama dengan bagian usus halus terdapat empat lapisan yaitu mukosa, sub mukosa, muskularis, dan serosa. Bagian mukosa terdiri dari epitel dan beberapa kelenjar dengan memiliki bentukan vili. Epitel jejunum berbentuk epitel kolumnar sederhana berisi beberapa sel seperti sel enterosit, sel goblet, sel enteroendokrin dan sel Paneth. Sel enterosit memiliki epitel simpel kolumnar yang terdapat mikrovili yang berfungsi untuk

menyerap nutrisi makanan. Sel goblet berfungsi untuk menghasilkan mukus sebagai perlindungan mukosa usus dari aktivitas enzim pepsin dan asam lambung. Inti dari plica circularis dibentuk oleh jaringan ikat padat submukosa yang terdapat di arteri dan vena di dalamnya. Diantara vili-vili terdapat kelenjar intestinal. Di dasar kelenjar intestinal terdapat sel paneth yang merupakan kelenjar eksokrin memproduksi lisozim. Sel Sel paneth juga memiliki fungsi fagositosis dengan demikian sel ini memiliki fungsi penting untuk mengontrol flora mikroba pada usus halus. Gambaran histopatologi jejunum yang diinduksi indometasin dan diterapi dengan air alkali diamati menggunakan teknik pewarnaan *Hematoxylin-Eosin* (HE) dapat dilihat pada **Gambar 5.1**.

Hasil pengamatan mikroskopis terhadap gambaran histologi jejunum pada kontrol negatif atau tikus sehat (K-) tampak tidak adanya kerusakan pada mukosa vili, sel entrosit masih utuh dengan bentuk epitel simpel kolumnar, adanya sel paneth didalam crypt Lieberkühn dan banyak terlihat sel goblet yang ada diantara mukosa epitel vili. Sel-sel goblet bekerja dengan mengeluarkan mukus, glikoprotein besar yang sebagian besar dibentuk oleh karbohidrat. Mukus terus menerus dibuat dan disekresikan oleh sel goblet untuk memperbaiki dan mengganti lapisan lendir yang ada (Adler et al., 2013).



**Gambar 5.1** Gambaran histopatologi jejunum hewan model tikus yang diinduksi indometasin dan telah diterapi dengan air alkali (perbesaran 400x dengan 1000x pewarnaan HE).

Keterangan : K- = Tikus kontrol negatif (sehat)  
 K+ = Tikus kontrol positif sakit  
 P1 = Terapi 1mL/kgBB  
 P2 = Terapi 2mL/kgBB.  
 Panah Hitam = Ruptur pada mukosa vili  
 Panah Hijau = Infiltrasi sel radang  
 Panah Kuning = Sel goblet

Berbeda dengan (K-), gambaran histopatologi (K+) yang merupakan kontrol positif hasil induksi indometasin terlihat vili jejunum mengalami ruptur, kerusakan epitel kolumnar, infiltrasi sel radang dan banyak sel goblet mengalami lisis. Kerusakan histologi mukosa jejunum terjadi karena zat indometasin akan menghambat prostaglandin untuk membentuk mukus yang berguna untuk perlindungan mukosa. Sel goblet yang berkurang akan menyebabkan jejunum

bersifat asam sehingga jejunum mudah di invasi bakteri dan akan mengaktivasi sistem imun. Sistem imun akan mengakibatkan tingginya ROS sehingga terjadi stres oksidatif. Menurut Suleyman et al., (2010) ROS ada hubungan dengan proses aktivitas peradangan dalam rusaknya jaringan gastrointestinal. Peningkatan ROS dapat mengaktivasi NF-kB sehingga dapat memicu pelepasan sitokin pro-inflamasi seperti Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) dari mukosa jejunum. Pelepasan TNF- $\alpha$  dapat mengaktivasi neutrofil sehingga terjadi peningkatan jumlah neutrofil yang signifikan akibat kerusakan sel.

Gambaran histopatologi jejunum (P1) dan (P2) menunjukkan adanya perbaikan yang setelah diberikan terapi air alkali selama 7 hari. Menurut Habold *et al.* (2004), mukosa jejunum akan kembali mengalami perbaikan sempurna setelah tiga hari perlakuan. Kelompok (P1) pemberian terapi air dengan volume 1 mL/kgBB menunjukkan perbaikan gambaran yaitu ditemukan beberapa sel goblet sudah banyak yang muncul akan tetapi masih adanya infiltrasi sel radang dan mukosa vili masih ada ruptur apabila dibanding kelompok kontrol positif (K+). Kelompok (P2) pemberian terapi air dengan volume 2 mL/kgBB menunjukkan perbaikan yang mendekati normal karena sudah muncul sel goblet yang banyak dan vili tidak ditemukan adanya ruptur. Peningkatan dosis terapi air alkali terbukti menunjukkan perbaikan gambaran histopatologi jejunum yang semakin baik setelah diinduksi indometasin yang menghasilkan zat radikal. Air alkali mengandung hidrogen aktif yang dihasilkan dari proses elektrolisis merupakan antioksidan alami yang dapat menurunkan tingkat ROS yang terjadi di sel mukosa, sehingga kerusakan sel mukosa di jejunum dapat terhenti. Selain itu,

pH air alkali yang basa akan mengurangi sifat asam yang dihasilkan, sehingga sintesis prostaglandin tak terhambat dan sel goblet akan kembali menghasilkan mukus untuk melindungi mukosa usus dari berbagai macam penyebab kerusakan seperti invasi bakteri dan asam lambung.

Pertahanan pada jejunum adalah lapisan mukus bikarbonat, yang berperan sebagai pertahanan *physicochemical* terhadap beberapa molekul termasuk ion hidrogen. Mukus dikeluarkan oleh sel epitel terutama pada permukaan duodenum yang disebabkan oleh keluarnya hormon secretin. Hormon ini menyebabkan pankreas mengeluarkan sejumlah besar natrium bikarbonat. Sodium bikarbonat ini yang akhirnya meningkatkan pH chyme dari 2 menjadi 7 (dari asam menjadi netral). Pada permukaan sel epitel terutama pada mukosa juga terdapat hormon kolesistikinin sebagai sinyal untuk pankreas mengeluarkan enzim. Adanya kerusakan pada mukosa usus dikarenakan rusaknya sel pada mukosa sehingga pengiriman hormon ke pankreas menjadi terganggu yang mengakibatkan mukus berkurang dan sel mudah terpapar oleh zat-zat toksik dan pH yang asam. Hal ini selaras dengan pernyataan Ahmed *et al.*, (2009) bahwa intensitas sedang yang ditemukan pada beberapa bagian usus diduga aktivitas sel goblet dalam menghasilkan substansi mukus sedang menurun, dan sebaliknya aktivitas tersebut meningkat. Penurunan intensitas reaksi diduga berkaitan dengan adanya regenerasi sel yang terjadi pada mukosa usus. Prostaglandin memainkan peran yang penting dalam hal pertahanan mukosa jejunum. Mukosa lambung mengandung banyak jumlah prostaglandin yang meregulasikan pengeluaran dari mukosa bikarbonat dan mukus untuk menghambat sekresi sel parietal, dan sangat

penting dalam mengatur aliran darah dan perbaikan dari sel epitel (Fauci et al, 2008).

Terapi air alkali memiliki sifat pH basa sehingga akan menetralkan sifat asam pada jejunum akibat terhambatnya sintesis prostaglandin pada sel dan akan meregenerasi sel-sel pada mukosa akibat netralnya permukaan jejunum. Pada gastrointestinal memiliki tingkat regenerasi yang berbeda, lambung dalam keadaan normal sel-sel epitel ini selalu diperbarui setiap 3 hari. Menurut Samba *et al.*, (2009) pada jejunum memiliki regenerasi sel epitel vili yang lebih lambat bila dibandingkan dengan duodenum dan ileum sehingga eliminasi EPEC yang menempel pada sel epitel vili juga menjadi lebih lambat. Berkurangnya invasi bakteri pada intestinal akan tidak mengaktivasi mediator sel radang seperti TNF- $\alpha$  maka sel radang akan menurun. Sel radang seperti sel mast dan neutrofil tidak teraktivasi maka akan menurunkan kadar protease dan menurunkan kadar radikal bebas sehingga kerusakan sel dapat berkurang dan terjadi perbaikan jaringan jejunum melalui proses regenerasi sel (Champbell et al., 2006).

## BAB 6. PENUTUP

### 6.1 Kesimpulan

1. Terapi air alkali pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi indometasin mampu menurunkan aktivitas amilase, volume terbaik pemberian terapi air alkali 2 mL/ekor mampu menurunkan aktivitas amilase sebesar 61,42% dari kontrol positif (IBD).
2. Terapi air alkali pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi indometasin mampu memperbaiki gambaran histopatologi jejunum, dibuktikan dengan berkurangnya infiltrasi sel radang, utuhnya mukosa vili dan banyaknya sel goblet dengan volume terapi terbaik yaitu 2 mL/ekor.

### 6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui volume efektif dengan memperpanjang lama terapi serta dilakukan penelitian

## DAFTAR PUSTAKA

- Adler, K.B., Tuvim, M.J. & Dickey, B.F. 2013. Regulated Mucin Secretion from Airway Epithelial Cells. *Front. Endocrinol.* 4, 129.
- Ahmed, Y.A., E.A.A. El-Hafez, E.A. Zayed. 2009. Histological and histochemical studies on the esophagus, stomach and small intestines of *Varanus niloticus*. *Journal Veterinary Anatomy* 2:35-48.
- Aiyer, P.V. 2005. Amylases and Their Application. *African Journal of Biotechnology*, Vol. 4 (13).
- Andayani, R., L. Yovita, dan Maimunah. 2008. Penentuan Aktivitas Antioksidan, Kadar Fenolat Total dan Likopen pada Buah Tomat (*Solanum lycopersicum*). *J. Sains dan Teknologi Farmasi*,13(1): 31-37.
- AOAC. 2005. *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists. Benjamin Franklin Station, Washington.
- Astuti, S. 2008. Isoflavon Kedelai dan Potensinya Sebagai Penangkap Radikal Bebas. *Jurnal Teknologi Industri*.
- Aulanni'am, A. Roosdiana and N. L. Rahmah. 2012. The Potency of Sargassum Duplicatum Bory Extract on Inflammatory Bowel Disease Therapy In *Rattus norvegicus*. *Journal of life Sciences* 6: 144-154.
- Barnett, S. A. 2002. *The Story of Rats: Their Impact on Us and Our Impact on Them*. Crows Nest NSW: Allen & Unwin
- Bamosa, A., E. Abdelsalam, K. Huda, A. M. Abdullah, A. Khalid, A. Sameeh. 2013. Zamzam Water Ameliorates Oxidative Stress and Reduces HemoglobinA1c in Type 2 Diabetic Patients. *J Diabetes Metab.* 4. 249. 10.4172/2155-6156.1000249.
- Bernstein, C.N., M. Fried, J.H. Krabshuis, H. Cohen, R. Eliakim, S. Fedail, R. Gearry, K.L. Goh, S. Hamid, Khan, A.G. LeMair, A.W. Malfertheiner, Q. Ouyang, J.F. Rey, A. Sood, F. Steinwurz, O.O. Thomsen, A. Thomson, G. Watermeyer. 2010. World Gastroenterology Organization Practice Guidelines for the Diagnosis And Management of IBD (Inflammatory Bowel Diseases). *Inflammatory Bowel Diseases*, 16(1): 112-24.
- Buchanan, B. R., and F. M. Andrews. 2003. Treatment and Prevention of Equine Gastric Ulcer Syndrome. *The Veterinary Clinic Equine Practice.* 19: 575- 597.
- Bures, J. J., J. Pejchal, A. Kvetina, S. Tichy, M. Rejchrt, Kunes, M. Kopacova. 2011. *Morphometric Analysis of The Porcine Gastrointestinal Tract in a 10- Day High- Dose Indomethacin Administration with or Without Probiotic Bacteria Escherichia Coli Nissle 1917*. Human and Experimental Toxicology, 30(12) 1955–1962.



- Campbell, K.J. and N.D Perkins. 2006. Regulation of NF-kB Function. *Biochem Soc Symp*, 73:165-180
- Corridoni, D., K.O. Arseneau, F. Cominelli. 2014. Inflammatory Bowel Disease. *Immunology Letters*. 161: 231-235.
- Dian, R. N., U. Rastuti, R. Kamaludin. 2012. Karakterisasi Enzim Amilase Dari Bakteri *Bacillus amyloliquefaciens*. *Pengembangan Sumber Daya Pedesaan dan Kearifan Lokal Berkelanjutan II*. Purwokerto. ISBN: 978-979-9204-79-0
- Fauci, A.S., D.L. Kasper, E. Braunwald, A.S Fauci, S.L Hauser, D.L. Longo, J.J. Larry, J. Loscalzo. 2008. *Harrison's Principles of Internal Medicine 17<sup>th</sup> ed.* McGraw-Hill Medical Publishing Division.
- Firmansyah, M. A. 2013. Perkembangan Terkini Diagnosis dan Penatalaksanaan Inflammatory Bowel Disease (IBD). *Cermin Dunia Kedokteran*. 40. 247-252.
- Habold, C., C. Chevalier, S. Dunel-Erb, C. Foltzer-Jourdainne, Y. Le Maho & J.-H. Lignot. 2004. Effects of Fasting and Refeeding on Jejunal Morphology and Cellular Activity in Rats in Relation to Depletion of Body Stores. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 39:6, 531-539
- Hamasaki, T., T. Kashiwagi, T. Imada, N. Nakamichi, S. Aramaki, K. Toh. 2008. *Kinetic Analysis of Superoxide Anion Radicals scavenging and Hydroxyl Radical-Scavenging Activities of Platinum Nanoparticles*. *Langmuir*, 24, 7354-7364.
- Hartanto, N.D. 2018. *Gambaran Histopatologi Usus Halus Tikus Wistar Akibat Luka Bakar Termal Seluas 30% Total Body Surface Area(Tbsa) Pada Fase Intravital, Perimortem Dan Postmortem*. Universitas Diponegoro Semarang.
- Jin, D., S.H. Ryu, H.Y. Kim, E.J. Yang, S.J. Lim, Y.S. Ryang, C.H. Chung, S.K. Park, K.J. Lee. 2006. Anti-Diabetic Effect of Alkaline-Reduced Water On OLEFT Rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70: 31-37.
- Kajita, M., K. Hikosaka, M. Iitsuka, A. Kanayama, N. Toshima, N., Y. Miyamoto. 2007. Platinum Nanoparticle is A Useful Scavenger of Superoxide Anion and Hydrogen Peroxide. *Free Radical Research*. 41, 615-626.
- Kathrani A., D. Werling, K. Allenspach. 2011. *Canine Breeds at High Risk of Developing Inflammatory Bowel Disease in The South-Eastern UK*. *Journal of Veterinary*, 169:635.
- Kawamura, M. 2011. *Suppressive Effects of Electrolyzed Reduced Water on Alloxan-Induced Apoptosis and Type 1 Diabetes Mellitus*. *Cytotechnol.* 63: 119-131.
- Kazuhide, H., E. Umegaki, T. Watanabe, Y. Yoda, E. Morita, M. Murano, S. Tokioka, T. Arakawa. 2009. Present status and strategy of NSAIDs-induced small bowel injury. *Journal Gastroenterol* 44:879-888

- Kim, H.K. and M.J. Kim. 2006. *Anti-Diabetic Effects of Electrolyzed Reduced Water in Streptozotocininduced and Genetic Diabetic Mice*. *Life Sci*. 79: 2288- 2292.
- Kriegelstein, C., W.S. James, H.C. Wolfgang, M.R. Janice, S. Guido, B. Matthias, L.F. Stephen, B.G. Matthew, G. Daniel. 2001. Role of Intercellular Adhesion Molecule 1 in Indomethacin-Induced Ileitis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 282. 635-42.
- Kusumawati, D. 2004. *Bersahabat dengan Hewan Coba*. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
- Lark, M., M.D. Susan, A.R. James. 2000. *The Chemistry of Success*. Bay Books. San Francisco, CA.
- Maria, T., J. Eleni, C. George, E. Panagiota. 2017. *Cypriot Patients with Inflammatory Bowel Disease and Quality of Life*. *Biomed J Sci and Tech Res* 1.
- Matsui, H., O. Shimokawa, T. Kaneko, Y. Nagano, K. Rai, I. Hyodo. 2011. The Pathophysiology of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug (NSAID)-Induced Mucosal Injuries in Stomach and Small Intestine. *J Clin Biochem Nutr*, 48(2):107–111.
- O’Sullivan, E. 2003. Bringing a Perspective of Transformative Learning to Globalized Consumption. *International Journal of Consumer Studies*, 27(4), 326-330.
- Piepoli, A.L., G. De Salvatore, M.A. De Salvia, C.L. Mitolo, G. Siro-Brigiani, P. Portincasa. 2005. Indometachin-Induced Ileitis is Associated with Tensiometric, Vascular and Oxidative Changes in The Rat Experimental Model. *J Clin Invest* 35: 271-278.
- Podolsky, D.K. 2002. Inflammatory Bowel Disease. *N. Engl. J. Med.* 347 (6): 417- 429
- Reddy, G., C. Vishnu, G. Seenayya. 2000. Direct Fermentation of Starch to L (+) Lactic Acid by Amylase Producing *Lactobacillus amylophilus* GV6. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 23: 155–8.
- Ronaghy, A., B.J. Prakken, K. Takabayashi, G.S. Firestein, D. Boyle, N.J. Zvailfer, S.T.A. Roord, S. Albani, D.A. Carson, E. Raz. 2002. Immunostimulatory DNA Sequences Influence The Course of Adjuvan Arthritis. *Journal Immunology* 168: 51-56.
- Samba-Louaka, A., J.P. Nougayrède, C. Watrin, E. Oswald, F. Taieb. 2009. The Enteropathogenic *Escherichia Coli* Effector Cif Induces Delayed Apoptosis in Epithelial Cells. *Infect Immunol*. 2009;77(12):5471–7.
- Setter, S.M. and D.E. Baker. 2010. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. In: Smith, Kelly M., Riche, Daniel M and Henyam, Nickole N, 11<sup>th</sup> ed. *Clinical Drug Data*. USA: McGraw.

- Sherwood, L. 2012. *Fisiologi Manusia dari Sel ke Sistem. 6th Ed.* Jakarta: EGC.
- Shirahata, S. 2011. *Suppressive Effects of Electrolyzed Reduced Water on Alloxan-Induced Apoptosis and Type 1 Diabetes Mellitus.* *Cytotechnol.* 63: 119-131.
- Shirahata, S., T. Hamasaki, K. Teruya. 2012. Advanced Research on The Health Benefit of Reduced Water. *Trends in Food Science and Technology.* 23: 124-131.
- Shirahata, S., Y. Li, T. Hamasaki, Z. Gadek, K. Teruya, S. Kabayama. 2007. Redox Regulation by Reduced Water as Active Hydrogen Donors and Intracellular ROS Scavengers for Prevention of Type 2 Diabetes. *In E. Smith (Ed.), Cell technology for cell products.* Dordrecht: Springer. pp. 99-101.
- Sirois. 2005. *Laboratory Animal Medicine: Principles and Procedures.* USA: Elsevier.
- Sudarmaja, M. 2014. Perbedaan Daya Fekunditas, Daya Tetas, Perkembangan Larva dan Perubahan Gambaran Esterase *Aedes aegypti* pada Beragam Tempat Berkembang Biak [Disertasi]. Denpasar: Universitas Udayana.
- Suleyman, H., A. Albayrak, M. Bilici, E. Cadirci, Z. Halici. 2010. *Different Mechanisms in Formation and Prevention of Indomethacin-Induced Gastric Ulcers.* Springer Science Business. 33. 224-34.
- Sumardjo, D.D. 2006. *Pengantar Kimia Buku Panduan Kuliah Mahasiswa Kedokteran.* Jakarta: EGC
- Suryanto, E. 2003. Patogenesis Asma. Pertemuan Ilmiah Khusus (PIK) X Paru, Sub Bagian Paru-Bagian Ilmu Penyakit Dalam FK-UNHAS /RS Dr. Wahidin S. Makasar. pp.35-41.
- Takeuchi, K., K. Amagase. 2017. *Roles of Prostaglandin E and EP Receptors in Mucosal Protection and Ulcer Healing in The Gastrointestinal Tract.* *Arch Dig Disord.* 1(2):8-16.
- Takeuchi, K., A. Tanaka, R. Ohno, A. Yokota. 2003. Role of COX Inhibition in Pathogenesis of NSAID-Induced Small Intestinal Damage. *Kyoto Pharmaceutical University.* Kyoto.
- Takeuchi, K., Y. Ogawa, S. Kagawa, H. Ukawa. 2002. Gastric mucosal ulcerogenic responses following barrier disruption in knockout mice lacking prostaglandin EP1 receptors. *Aliment Pharmacol Ther,* Vol.16, No.suppl 2, pp. 74– 82
- Tanaka, S., K. Kinugasa, Tanabe, and T. Tamura. 2002. *Spectral Database for Organic.* Compounds, SDBS.
- Tian, C., L. Cheng, X. Gu. 2017. Cord Blood TNF-A and IL-6 Levels as Diagnostic Indicators of Brain Damage In Neonates with Non-Asphyxia

Fetal Distress. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. Springer Berlin Heidelberg. pp 337–342.

Vorobjova, N.V. 2005. *Selective Stimulation of The Growth of Anaerobic Microflora in The Human Intestinal Tract by Electrolyzed Reducing Water*. *Med. Hypotheses*, 64: 543-546.

Xavier, R. J., D. K. Podolsky. 2007. *Unravelling The Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease*. *Nature*, 448: 427-34.

Yamato, M., W. Kudo, T. Shiba, K. Yamada, T. Watanabe, H. Utsumi. 2009. *Determination of Reactive Oxygen Species Associated with The Degeneration of Dopaminergic Neurons During Dopamine Metabolism*. *Free Radical Research*, 44(3):249-57.

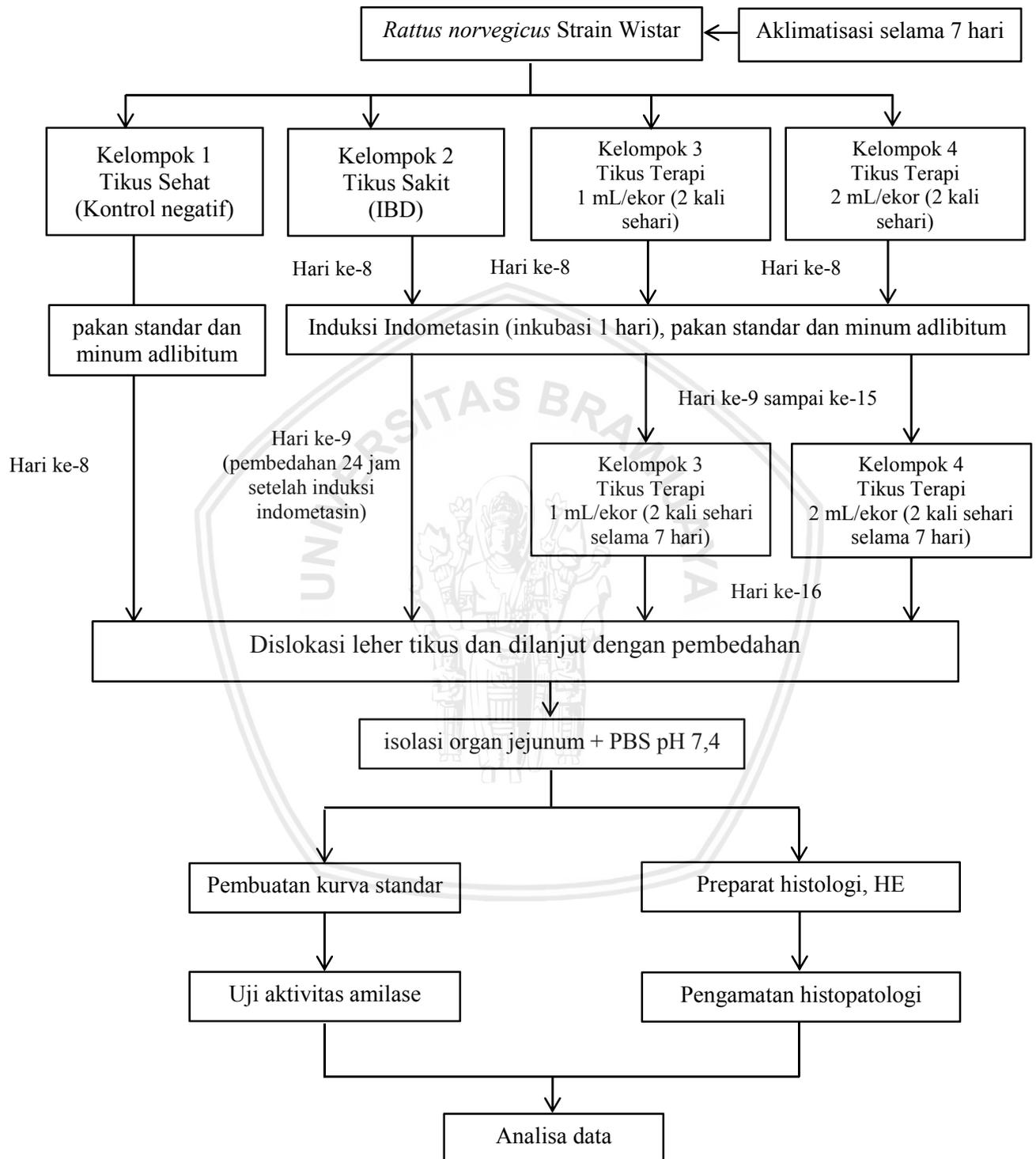




Lampiran 1. Sertifikat Laik Etik



## Lampiran 2. Skema Penelitian



### Lampiran 3. Penyiapan Indometasin

#### Lampiran 3.1 Perhitungan Dosis Indometasin

Pemberian dosis indometasin untuk IBD adalah 15 mg/kg BB (Aulanni'am, 2012), maka perhitungan dosis indometasin yang diperlukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

$$\text{Kebutuhan indometasin} = 15 \text{ mg/kg BB} \times 0,18 \text{ kg} = 2,7 \text{ mg/ekor}$$

$$\text{Kebutuhan indometasin per kandang} = 2,7 \text{ mg/ekor} \times 5 \text{ ekor} = 13,5 \text{ mg}$$

$$\text{Kebutuhan indometasin keseluruhan} = 13,5 \text{ mg/ekor} \times 3 \text{ kandang} = 40,5 \text{ mg}$$

#### Lampiran 3.2 Pembuatan Stok Indometasin

Pembuatan stok indometasin yaitu indometasin yang telah dihitung dosisnya kemudian dilarutkan dengan minyak jagung steril. Dosis indometasin 2,7 mg/ekor dilarutkan dengan minyak jagung sebanyak 200  $\mu$ l, sehingga kebutuhan minyak jagung untuk melarutkan indometasin keseluruhan kandang adalah:

$$= 3 \text{ kandang} \times 5 \text{ ekor} \times 200 \mu\text{l}$$

$$= 3000 \mu\text{l}$$

$$= 3 \text{ mL}$$

## Lampiran 4. Pembuatan Larutan

### Lampiran 4.1 Pembuatan PBS-Azida

Larutan PBS pH 7,4 dipipet 50 mL, kemudian ditambah 6 tetes azida 195 dan diaduk hingga homogen.

### Lampiran 4.2 Pembuatan PFA 4%

$$\begin{aligned} \text{Rumus : } V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 37\% &= 1000\text{mL} \times 4\% \\ V_1 &= 108,1 \text{ mL} \end{aligned}$$

Prosedur pertama yaitu dengan membuat larutan NaCl fisiologis 0,9% sebagai pelarutnya. Pembuatan larutan PFA 4% yaitu dengan mengambil 108,1 mL formaldehyde 37% yang dimasukkan ke dalam labu ukur 1000 mL dan ditambahkan dengan NaCl fisiologis sampai tanda batas.

### Lampiran 4.3 Pembuatan Phosphate Buffer Saline (PBS)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ditimbang 7,1 g kemudian dilarutkan dengan 250 mL akuades (larutan A).  $\text{Na}_3\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ditimbang 7,8 g kemudian dilarutkan dengan 250 mL akuades (larutan B). Larutan A dan B diukur pHnya dengan pH-meter (pH larutan sekitar 9,22 dan B sekitar 4,8). Larutan A sebanyak 200 mL ditambah larutan B sedikit demi sedikit sambil diaduk dan diukur pH-nya hingga mencapai pH 7.

### Lampiran 4.4 Pembuatan NaCl-fisiologis 0,9%

$$\begin{aligned} \text{NaCl fisiologis 0,9\%} &= (0,9/100) \times 1000 \text{ mL} \\ &= 9 \text{ g} \end{aligned}$$

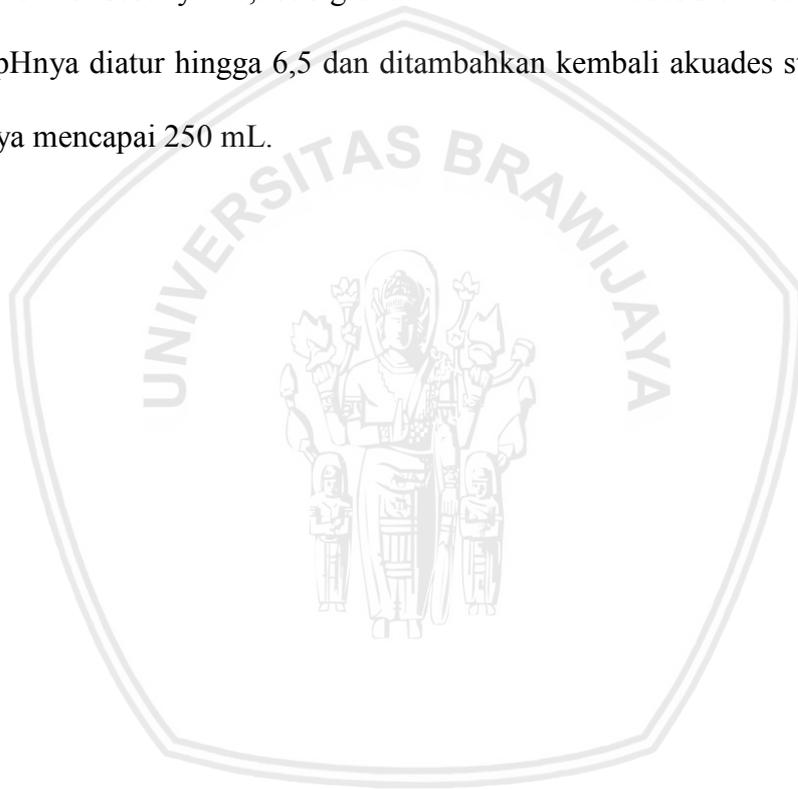
Ditimbang NaCl fisiologis sebanyak 9 g dan dilarutkan dengan aquades steril sebanyak 1000 mL.

#### Lampiran 4.5 Pembuatan Buffer Tris-HCl 0,9%

Mr (massa molekul relatif) Tris-HCl = 157,56 g/mol Untuk membuat buffer Tris-HCl 0,02 M sebanyak 250 mL, maka Tris-HCl yang diperlukan adalah:

$$\begin{aligned} G \text{ Tris-HCl} &= 157,56 \text{ g/mol} \times 0,02 \text{ mol/L} \times 0,25 \text{ L} \\ &= 0,7878 \end{aligned}$$

Tris-HCl sebanyak 0,7878 g dilarutkan dalam akuades steril sebanyak 100 mL dan pHnya diatur hingga 6,5 dan ditambahkan kembali akuades steril hingga volumenya mencapai 250 mL.



## **Lampiran 5. Pembuatan Reagen**

### **Lampiran 5.1 Pembuatan Reagen Nelson A**

Reagen Nelson A dapat dibuat dengan melarutkan 12,5 gram Natrium karbonat anhidrat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), 12,5 gram garam rochelle, 10 gram natrium bikarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) dan 100 gram natrium sulfat anhidrat ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) dalam 350 mL air suling. Kemudian diencerkan sampai 500 mL.

### **Lampiran 5.2 Pembuatan Reagen Nelson B**

Reagen Nelson B dibuat dengan cara dilarutkan 7,5 gram cupri sulfat pentahidrat ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) dalam 50 mL air suling dan ditambahkan 1 tetes asam sulfat pekat.

### **Lampiran 5.3 Pembuatan Reagen Nelson-Somogyi**

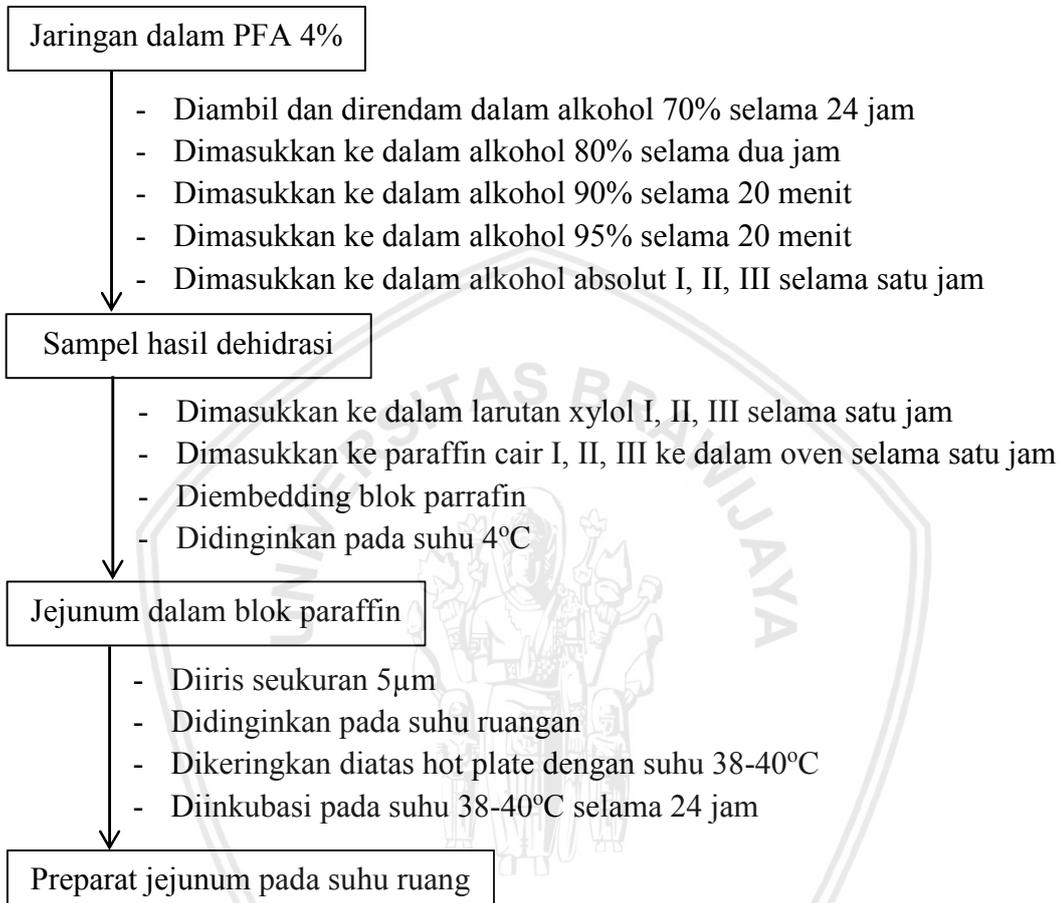
Reagen Nelson-Somogyi dibuat dengan cara mencampur bagian Reagen Nelson A dan bagian Reagen Nelson B dengan perbandingan 4:1.

### **Lampiran 5.4 Pembuatan Arsenomolibdat**

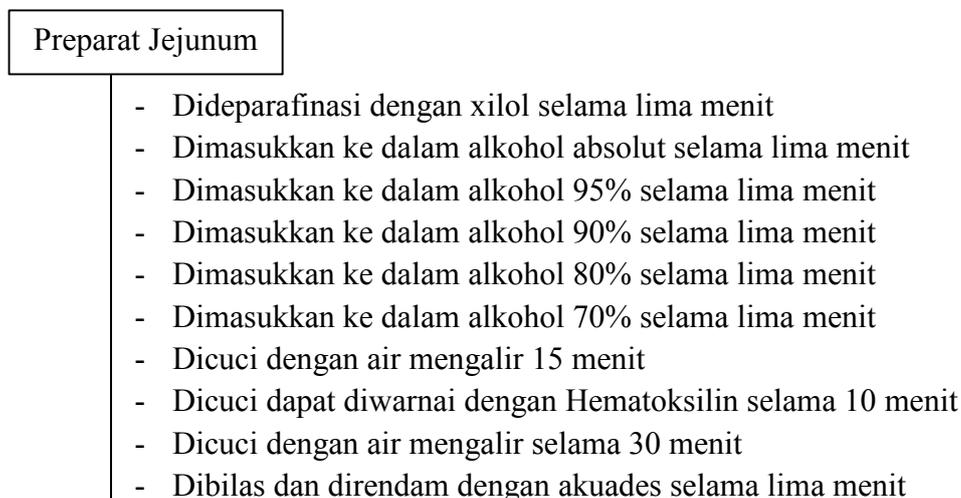
Sebanyak 25 gram Ammonium molybdat dilarutkan dalam 450 mL air suling dan ditambahkan 25 mL asam sulfat pekat. Kemudian, dilarutkan pada tempat yang 28 lain 3 gram  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$  dalam 25 mL air suling. Larutan dituang ke dalam larutan yang pertama disimpan ke dalam botol berwarna coklat dan diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 24 jam.

## Lampiran 6. Pembuatan Preparat Hematoksilin-Eosin Jaringan Jejunum

### 6.1 Pembuatan Preparat



### 6.2 Pewarnaan Hematoksilin-Eosin



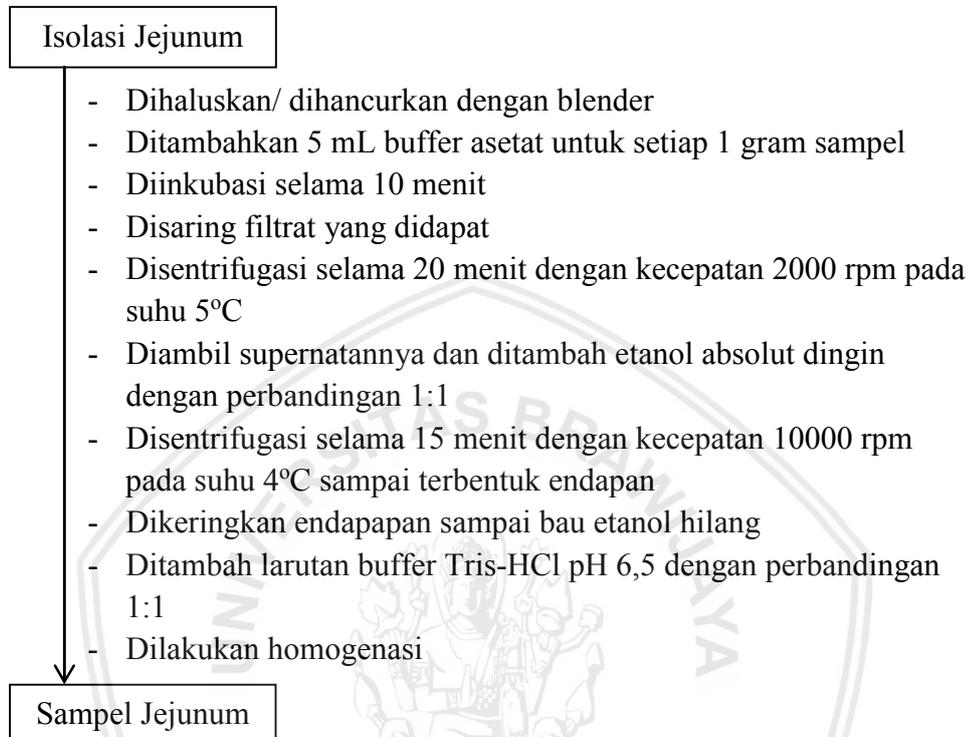
- Direndam ke dalam pewarnaan Eosin selama lima menit
- Direndam kembali ke dalam akuades
- Dimasukkan ke dalam alkohol 70% selama 10 menit
- Dimasukkan ke dalam alkohol 80% selama 10 menit
- Dimasukkan ke dalam alkohol 90% selama 10 menit
- Dimasukkan ke dalam alkohol 95% selama 10 menit
- Dimasukkan ke dalam alkohol I, II, III selama lima menit
- Dimasukkan ke dalam xylol 2x selama lima menit
- Dikeringkan
- Diberi balsem canada dan ditutup coverglass

Preparat Jejunum

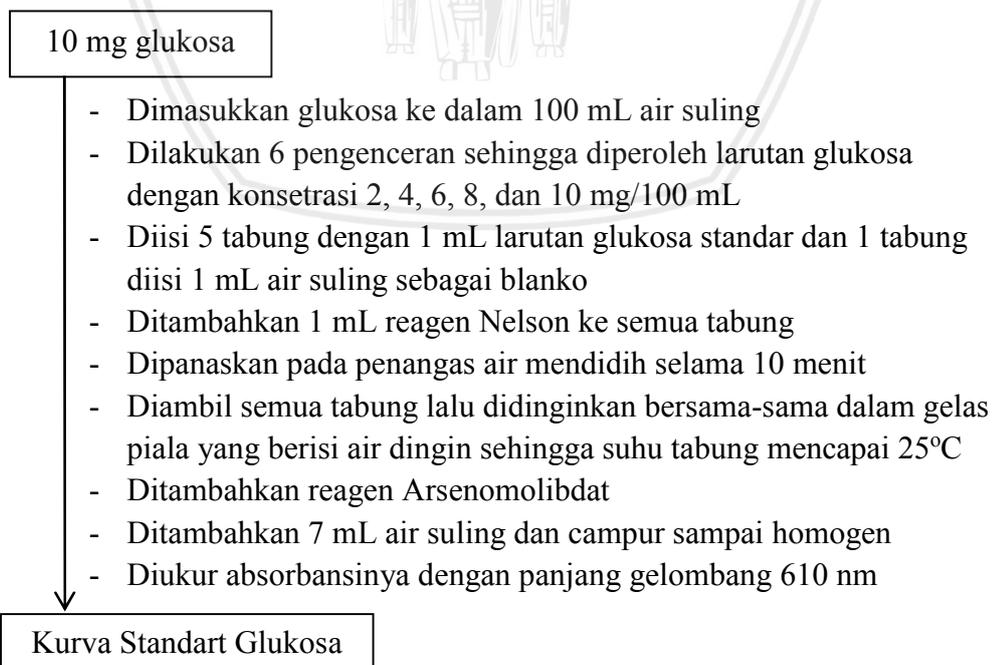


## Lampiran 7. Langkah-Langkah Pengukuran Aktivitas Amilase

### 7.1 Ekstraksi Enzim Amilase



### 7.2 Pembuatan Kurva Standar Glukosa

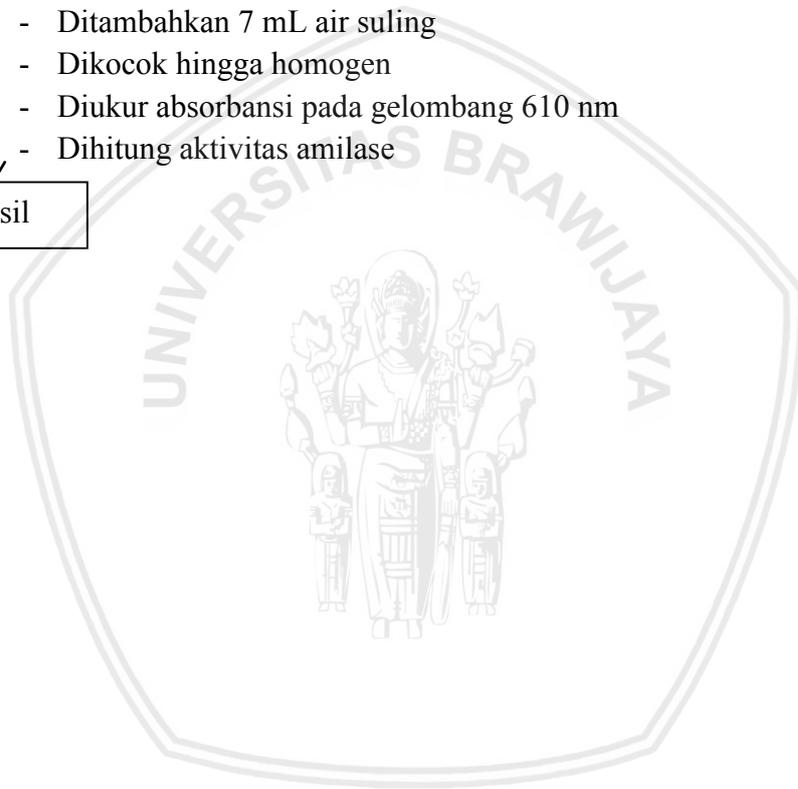


### 7.3 Uji Aktivitas Enzim Amilase

1 mL Enzim

- Larutan pati 1% sebanyak 0,5 mL dan 0,5 mL buffer fosfat 0,2 M pH 5,0
- Diinkubasi pada suhu 100°C selama 10 menit.
- Ditambahkan 1mL reagen Nelson-Somogyi
- Didihkan selama 5 menit sehingga sama dengan suhu kamar
- Ditambahkan 1 mL reagen arsenomolibdat
- Ditambahkan 7 mL air suling
- Dikocok hingga homogen
- Diukur absorbansi pada gelombang 610 nm
- Dihitung aktivitas amilase

Hasil

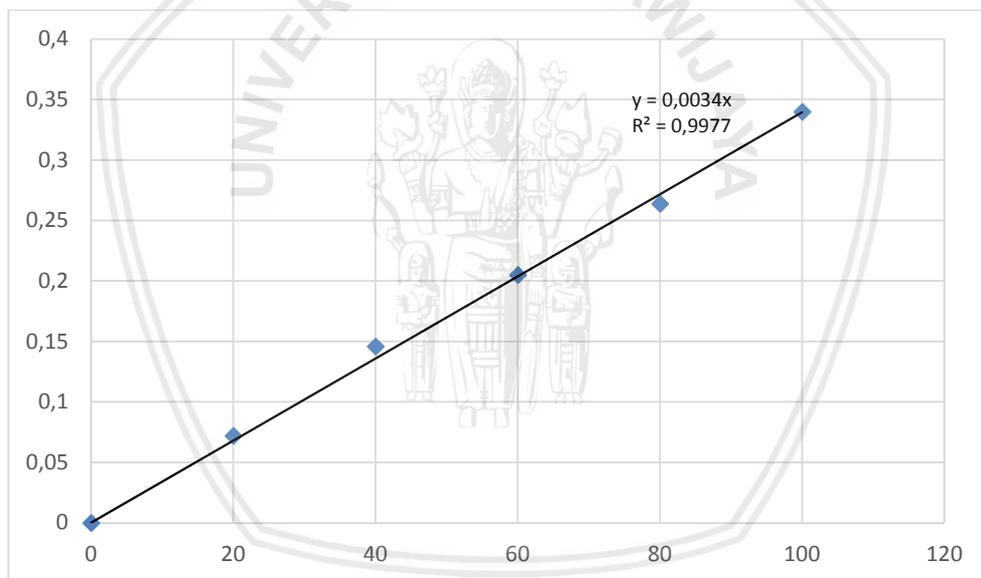


## Lampiran 8. Pengukuran Aktivitas Amilase

### 8.1 Pembuatan Kurva Baku Standar Glukosa

Tabel L.1 Absorbansi Larutan Standar Glukosa

Konsentrasi (ppm)	Absorpsi
0	0
20	0,072
40	0,146
60	0,205
80	0,264
100	0,340

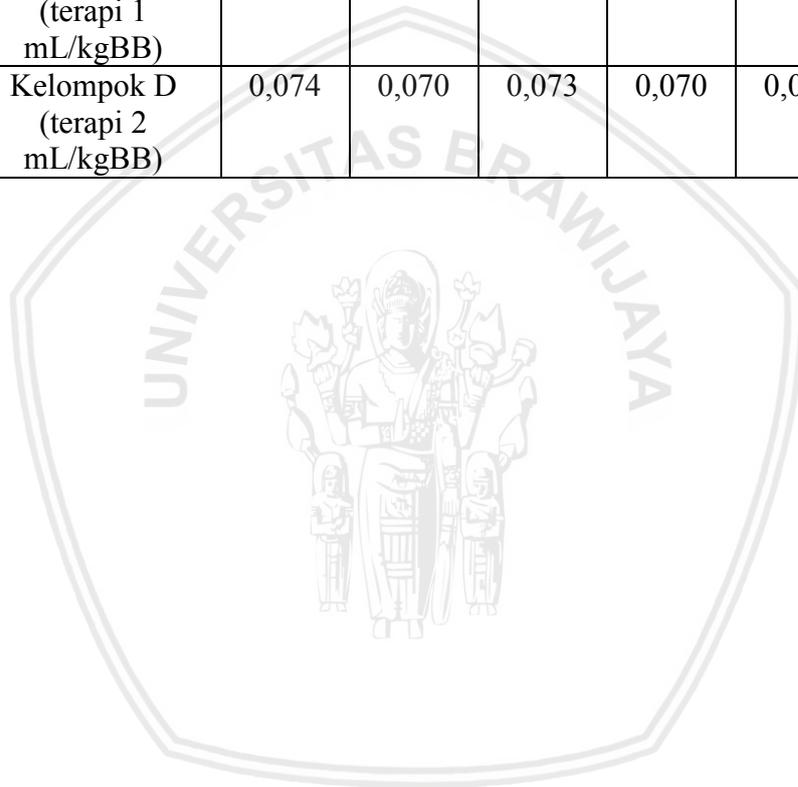


Gambar L.1 Kurva standar glukosa

## 8.2 Hasil Absorbansi Glukosa

**Tabel L.2** Absorbansi Glukosa Setiap Kelompok

Kelompok	Absorbansi Glukosa				
Kelompok A	0,068	0,064	0,063	0,055	0,059
Kelompok B (IBD)	0,189	0,183	0,184	0,185	0,187
Kelompok C (terapi 1 mL/kgBB)	0,141	0,135	0,143	0,136	0,139
Kelompok D (terapi 2 mL/kgBB)	0,074	0,070	0,073	0,070	0,071



### 8.3. Perhitungan Aktivitas Amilase

Rumus perhitungan

Misal : pengukuran aktivitas amilase kontrol dengan waktu inkubasi 10 menit dan suhu 37°C

Persamaan kurva baku :  $y = 0,003x$

Dimana  $x$  = konsentrasi sampel

Maka :

$$y = 0,003x$$

$$0,068 = 0,003x$$

$$x = 0,068/0,003$$

$$x = 23 \mu\text{g/mL}$$

Untuk menentukan aktivitas amilase digunakan persamaan

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas enzim amylase} &= C \times 1/T \times \text{lunit/1 mikromol} \\ &= 23 \mu\text{g/mL} \times 1/10 \text{ menit} \times 1 \text{ unit/180} \\ &= 0,013 \text{ unit} \end{aligned}$$

Keterangan:

C: Konsentrasi Sampel

T : Waktu Inkubasi

#### 8.4 Data Aktivitas Amilase

**Tabel L.3** Hasil Aktivitas Amilase

Perlakuan	Aktivitas Amilase
Kontrol negatif	0,013
	0,012
	0,012
	0,010
	0,011
IBD	0,035
	0,034
	0,034
	0,034
	0,035
Terapi 1 mL	0,026
	0,025
	0,026
	0,025
	0,026
Terapi 2 mL	0,014
	0,013
	0,014
	0,013
	0,013

#### 8.5 Persentasi Peningkatan Aktivitas Amilase terhadap Kontrol

Persentase peningkatan aktivitas amilase jejunum tikus hasil induksi indometasin terhadap tikus kontrol negatif adalah sebagai berikut:

$$\begin{aligned}
 \% \text{ Aktivitas Protease} &= \frac{\text{Rataan sakit} - \text{Rataan kontrol}}{\text{Rataan kontrol}} \\
 &= \frac{0,034 - 0,011}{0,011} \\
 &= 200,32\%
 \end{aligned}$$

## 8.6 Persentasi Penurunan Aktivitas Amilase

Persentasi penurunan aktivitas amilase jejunum tikus (*Rattus norvegicus*) model *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) hasil induksi indometasin yang diterapi dengan pemberian air alkali sebagai berikut:

1. Perlakuan tikus terapi dengan pemberian terapi air alkali 1 mL/ekor

$$\begin{aligned}\% \text{ Aktivitas Protease} &= \frac{\text{Rataan sakit} - \text{Rataan Terapi 1mL/ekor}}{\text{Rataan sakit}} \\ &= \frac{0,034 - 0,026}{0,034} \\ &= 25,22 \%\end{aligned}$$

2. Perlakuan tikus terapi dengan pemberian terapi air alkali 2 mL/ekor

$$\begin{aligned}\% \text{ Aktivitas Protease} &= \frac{\text{Rataan sakit} - \text{Rataan Terapi 2mL/ekor}}{\text{Rataan sakit}} \\ &= \frac{0,034 - 0,013}{0,034} \\ &= 61,42 \%\end{aligned}$$

## Lampiran 9. Uji Statistik Aktivitas Amilase

### 9.1 Uji Normalitas menggunakan SPSS

#### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		aktivitas amilase
N		20
Normal Parameters <sup>a</sup>	Mean	,02125
	Std. Deviation	,009575
	Absolute	,276
Most Extreme Differences	Positive	,276
	Negative	-,159
Kolmogorov-Smirnov Z		1,232
Asymp. Sig. (2-tailed)		,096

a. Test distribution is Normal.

### 9.2 Uji Homogenitas

#### Test of Homogeneity of Variances

aktivitas amilase

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,174	3	16	,131

### 9.3 Uji ANOVA

#### ANOVA

aktivitas amilase

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,002	3	,001	1050,273	,000
Within Groups	,000	16	,000		
Total	,002	19			

## 9.4 Uji BNJ/ Tukey

### Multiple Comparisons

#### Aktivitas Amilase

#### Tukey HSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	IBD	-,022800*	,000469	,000	-,02414	-,02146
	Terapi 1mL/ekor	-,014000*	,000469	,000	-,01534	-,01266
	Terapi 2 mL/ekor	-,001800*	,000469	,007	-,00314	-,00046
IBD	Kontrol	,022800*	,000469	,000	,02146	,02414
	Terapi 1mL/ekor	,008800*	,000469	,000	,00746	,01014
	Terapi 2 mL/ekor	,021000*	,000469	,000	,01966	,02234
Terapi 1mL/ekor	Kontrol	,014000*	,000469	,000	,01266	,01534
	IBD	-,008800*	,000469	,000	-,01014	-,00746
	Terapi 2 mL/ekor	,012200*	,000469	,000	,01086	,01354
Terapi 2 mL/ekor	Kontrol	,001800*	,000469	,007	,00046	,00314
	IBD	-,021000*	,000469	,000	-,02234	-,01966
	Terapi 1mL/ekor	-,012200*	,000469	,000	-,01354	-,01086

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

#### Aktivitas Amilase

Kelompok Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Kontrol	5	,01160			
Terapi 2mL/ekor	5		,01340		
Terapi 1mL/ekor	5			,02560	
IBD	5				,03440
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

## Lampiran 10. Dokumentasi Penelitian



**Gambar L.2** Sentrifus larutan glukosa



**Gambar L.3** Tabung berisi larutan glukosa