

**EFEK PEMBERIAN TEPUNG TAPIOKA TERHADAP  
AKTIVITAS PROTEASE DAN GAMBARAN  
HISTOPATOLOGI KOLON TIKUS (*Rattus  
norvegicus*) INFLAMMATORY BOWEL  
DISEASE (IBD) HASIL INDUKSI  
INDOMETASIN**

**SKRIPSI**

Oleh:

**ZAHRANIA MARSHA AMIRA SULHERMAN**

**155130107111001**



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

**EFEK PEMBERIAN TEPUNG TAPIOKA TERHADAP  
AKTIVITAS PROTEASE DAN GAMBARAN  
HISTOPATOLOGI KOLON TIKUS (*Rattus  
norvegicus*) INFLAMMATORY BOWEL  
DISEASE (IBD) HASIL INDUKSI  
INDOMETASIN**

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

**ZAHRANIA MARSHA AMIRA SULHERMAN  
155130107111001**



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

**LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI****EFEK PEMBERIAN TEPUNG TAPIOKA TERHADAP  
AKTIVITAS PROTEASE DAN GAMBARAN  
HISTOPATOLOGI KOLON TIKUS (*Rattus  
norvegicus*) INFLAMMATORY BOWEL  
DISEASE (IBD) HASIL INDUKSI  
INDOMETASIN****Oleh:****ZAHRANIA MARSHA AMIRA SULHERMAN  
155130107111001**

Setelah dipertahankan didepan Majelis Penguji  
pada tanggal 16 Juli 2019  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

**Prof. Dr Ir. Hendrawan S., M. Rur.Sc,**  
NIP. 19530602 198003 1 003

**drh. Fajar Shodiq Permata, M.Biotech**  
NIP. 19870501 201504 1 001

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya

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

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Zahrania Marsha Amira Sulherman

NIM : 155130107111001

Proram Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

EFEK PEMBERIAN TEPUNG TAPIOKA TERHADAP AKTIVITAS  
PROTEASE DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI KOLON TIKUS (*Rattus  
norvegicus*) *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) 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 di kemudian 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, 16 Juli 2019

Yang menyatakan,

**ZAHRANIA MARSHA AMIRA S.**

**NIM. 155130107111001**

**Efek Pemberian Tepung Tapioka Terhadap Aktivitas Protease  
dan Gambaran Histopatologi Kolon Tikus (*Rattus Norvegicus*)  
*Inflammatory Bowel Disease (IBD)* Hasil  
Induksi Indometasin**

**ABSTRAK**

*Inflammatory Bowel Disease (IBD)* adalah penyakit peradangan pada bagian *gastrointestinal tract (GIT)* terutama kolon yang disebabkan karena efek pemberian *Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAID)* seperti Indometasin dengan dosis pemberian 15 mg/kg BB per oral yang dapat menyebabkan inflamasi pada saluran cerna. Inflamasi pada saluran cerna akan menyebabkan peningkatan aktivitas protease sehingga menyebabkan kerusakan pada sel. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi *mucoprotectant* dari larutan tepung tapioka yang memiliki kandungan *resistant starch* sehingga diharapkan mampu menurunkan aktivitas protease dan memperbaiki kerusakan pada histopatologi kolon tikus (*Rattus norvegicus*) jantan usia 8-12 minggu dengan berat 150-200 gram. Tikus dibagi menjadi 5 perlakuan, yaitu kontrol negatif, kontrol positif, terapi 1 (0,9 mg/ 200 g BB), terapi 2 (1,8 mg/ 200 g BB), dan terapi 3 (3,6 mg/ 200 g BB). Terapi larutan tepung tapioka diberikan selama 14 hari. Pengaruh pemberian terapi diamati dengan pengamatan preparat histopatologi kolon dengan pewarnaan *Hematoksin-Eosin (HE)* dan pengukuran aktivitas protease dari mukosa kolon. Analisa hasil perubahan kadar aktivitas enzim protease kolon antar kelompok dihitung menggunakan Analisa One Way ANOVA dan uji lanjutan *Tukey* atau *BNJ (Beda Nyata Jujur)*  $\alpha < 0,05$  sedangkan analisa data histopatologi dari kolon dilakukan secara deskriptif kualitatif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian terapi tepung tapioka mampu menurunkan aktivitas protease secara signifikan pada kelompok terapi 3 dengan dosis 3,6 mg/ 200 g BB (P3) sebesar 66,76% dan rata-rata aktivitas protease  $1,24 \pm 0,04$   $\mu\text{mol}$  tirosin/g enzim menit serta mampu memperbaiki kerusakan pada mukosa kolon. Kesimpulan pada penelitian ini yaitu terapi larutan tepung tapioka dapat digunakan sebagai terapi alternatif IBD.

**Kata kunci :** *Inflammatory Bowel Disease*, indometasin, larutan tepung tapioka, aktivitas protease, dan histopatologi kolon.

**The Effect of Tapioca Flour Toward Protease Activity And  
Histopathological of *Inflammatory Bowel Disease* (IBD)  
Rat's (*Rattus norvegicus*) Colon as The Result of  
Indomethacin Induction**

**ABSTRACT**

Inflammatory Bowel Disease (IBD) is an inflammatory disease of the gastrointestinal tract (GIT) especially the colon caused by the effects of giving Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) such as Indomethacin at dose of 15 mg / kgBW orally. Indomethacin would be given an impact of increasing the number of proteases so that protease activity increased and caused damage to colonic tissue. This study aimed to determine the potential of mucoprotectant from tapioca flour solution that had resistant starch so that it was expected to reduce protease activity and repair damage of rat colon based on histopathology. The rats (*Rattus norvegicus*) were aged 8-12 weeks with a weight of 150-200 grams. Rats were divided into 5 groups, namely negative control, positive control, therapy 1 (0,9 mg / 200 g BW), therapy 2 (1,8 mg / 200 g BW), and therapy 3 (3,6 mg / 200 g BW). Therapy for tapioca flour solution was given for 14 days, then rats were euthanized and the colon was taken for protease activity test and histopathological examination. The effect of therapy was observed by the colon histopathology preparations with *Hematoxylin-Eosin* (HE) staining and measuring protease activity from the colon. Analysis of the results of changed in levels of colon protease enzyme activity among groups would be analyzed statistically using One Way ANOVA and continued to Tukey test with  $\alpha < 0.05$  and colon histopathology was analyzed qualitatively by tissue description. The results showed that tapioca flour therapy 3 with 3,6 mg / 200 g BW dose could reduce 66,76% of protease activity (1,24 $\pm$ 0,037  $\mu$ mol tyrosine/g enzyme minutes) and also be able to repair damage of the colon mucosa. The conclusion of this observation is tapioca flour therapy can be used as alternative therapy for IBD.

**Keywords:** *Inflammatory Bowel Disease*, indomethacin, tapioca flour solution, protease activity, and colon histology.

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan yang Maha Esa atas rahmat dan anugerah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Efek Pemberian Tepung Tapioka Terhadap Aktivitas Protease Dan Gambaran Histopatologi Kolon Tikus (*Rattus Norvegicus*) Inflammatory Bowel Disease (IBD) Hasil Induksi Indometasin**”.

Proposal ini dapat tersusun tak lepas dari bantuan berbagai pihak, baik secara materiil maupun dorongan semangat. Pada kesempatan kali ini, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M. App. Sc selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
2. Prof. Ir. Hendrawan S., M.Rur.Sc, Ph.D selaku dosen pembimbing I atas segala bantuan, nasihat, dorongan, dan bimbingan yang diberikan kepada penulis.
3. drh. Fajar Shodiq Permata, M.Biotech selaku dosen pembimbing II atas segala bantuan, nasihat, dorongan, dan bimbingan yang diberikan kepada penulis.
4. Secara khusus penulis mengucapkan terima kasih kepada Bapak Sulherman dan Ibu Depi Praharani yang telah memberikan kesempatan penulis menjalankan studi melalui doa, nasihat, dan dukungan materiil.
5. Rachmania Farah Alisha Sulherman yang menjadi motivasi penulis dalam berkuliah.

6. Teman-teman Asique Class yang telah menemani selama masa perkuliahan.
7. Vanneslya Leiwakabessy, Dyah Pramesti, dan Melita Nono Lebang sebagai rekan satu kelompok penelitian skripsi.
8. Nathania Aryani, Anris Alfani Purba, Yohana Novita Kristiani, Rina Andriyani, Agam Yudha Pratama yang membantu dan memberi semangat dalam menyelesaikan skripsi ini dengan baik.
9. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan skripsi ini yang tidak dapat disebutkan oleh penulis satu persatu.

Penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, maka saran dan kritik yang membangun dari semua pihak sangat diharapkan demi penyempurnaan selanjutnya.

Akhir kata, penulis berharap skripsi ini dapat bermanfaat tidak hanya bagi penulis tetapi juga bagi pembaca.

Malang, 16 Juli 2019

Penulis



## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>LEMBAR PENGESAHAN .....</b>	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN.....</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>v</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>vi</b>
<b>DAFTAR ISI .....</b>	<b>viii</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN.....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG.....</b>	<b>xiii</b>
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Batasan Masalah .....	3
1.4 Tujuan Penelitian .....	4
1.5 Manfaat Penelitian .....	4
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>5</b>
2.1 Tikus ( <i>Rattus novergicus</i> ) .....	5
2.2 Histopatologi Usus (Kolon).....	6
2.3 <i>Inflammatory Bowel Disease</i> (IBD) .....	7
2.4 Indometasin.....	11
2.5 Aktivitas Protease .....	13
2.6 Tepung Tapioka .....	15
2.7 Resistant Starch.....	16
2.7.1 Struktur Pati .....	16
2.7.2 <i>Resistant Starch</i> (Pati Resisten).....	21
2.8 Mukoprotectan .....	26
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN ....</b>	<b>29</b>
3.1 Kerangka Konseptual Penelitian .....	29
3.2 Hipotesis Penelitian.....	31



<b>BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN.....</b>	<b>32</b>
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	32
4.2 Sampel Penelitian .....	32
4.3 Rancangan Penelitian .....	33
4.4 Variabel Penelitian .....	33
4.5 Materi Penelitian .....	34
4.6 Tahapan Penelitian .....	34
4.6.1 Persiapan Hewan Coba .....	34
4.6.2 Induksi Indometasin .....	35
4.6.3 Terapi Pemberian Terapi Tepung Tapioka .....	35
4.6.4 Cara Pembuatan Preparat Histologi .....	36
4.6.4.1 Pembuatan Preparat Histopatologi Organ Kolon.....	36
4.6.4.2 Pewarnaan <i>Hematoksilin-Eosin</i> .....	37
4.6.5 Pengukuran Aktivitas Enzim Protease.....	39
4.6.5.1 Isolasi Protein Kolon .....	39
4.6.5.2 Pembuatan Kurva Baku Tiroksin.....	39
4.6.5.3 Pengukuran Aktivitas Protease .....	40
4.7 Analisa Data .....	41
<b>BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>42</b>
5.1 Pengaruh Terapi Tepung Tapioka Terhadap Feses Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) .....	44
5.2 Pengaruh Terapi Tepung Tapioka Terhadap Aktivitas Protease Kolon Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) IBD Hasil Induksi Indometasin .....	46
5.3 Pengaruh Terapi Tepung Tapioka Terhadap Gambaran Histopatologi Kolon Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) IBD Hasil Induksi Indometasin .....	52
5.4 Reaksi Asam dan Basa dengan Larutan Tepung Tapioka .....	58
5.5 Sukralfat .....	62
<b>BAB 6 PENUTUP.....</b>	<b>64</b>
6.1 Kesimpulan .....	64
6.2 Saran .....	64
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>65</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>75</b>



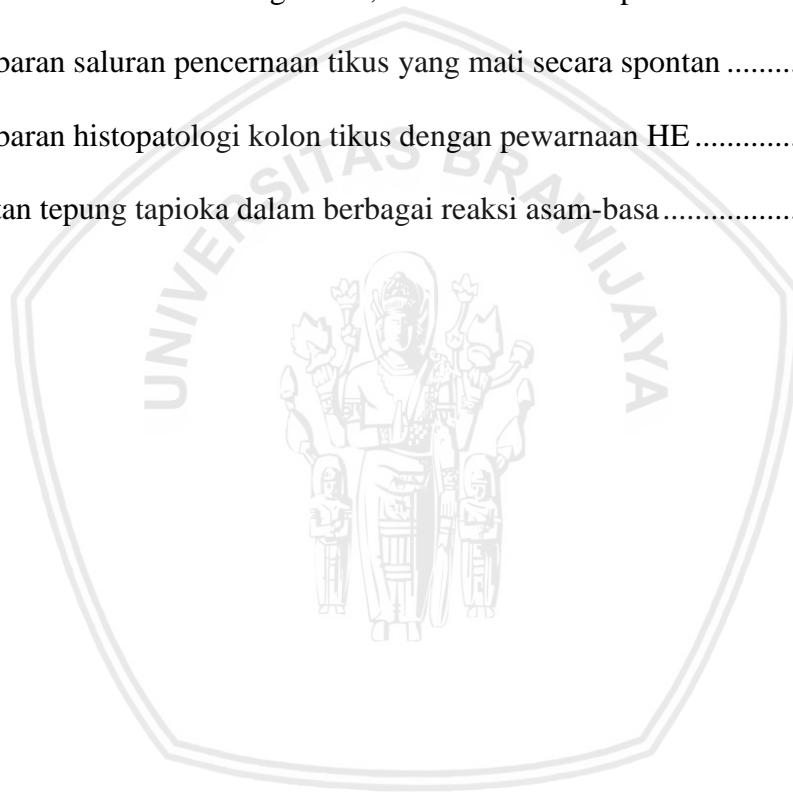
## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
5.1. Tampilan feses hewan coba .....	45
5.2. Aktivitas protease kolon tikus terapi tepung tapioka .....	47



## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar</b>	<b>Halaman</b>
2.1.Histologi kolon normal .....	6
2.2 Histopatologi kolon yang mengalami inflamasi .....	7
2.3 Struktur indometasin .....	11
2.4 Desain struktur dasar unit glukosa, amilosa dan amilopektin.....	17
5.1 Gambaran saluran pencernaan tikus yang mati secara spontan .....	43
5.2 Gambaran histopatologi kolon tikus dengan pewarnaan HE .....	54
5.3 Larutan tepung tapioka dalam berbagai reaksi asam-basa.....	59



## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran</b>	<b>Halaman</b>
1. Sertifikat Laik Etik.....	75
2. Hasil Uji Aktivitas Protease Kolon Tikus.....	76
3. Skema Penelitian.....	77
4. Perhitungan Dosis Obat Cacing.....	78
5. Pembuatan Stok Indometasin.....	79
6. Perhitungan Dosis dan Suspensi Tepung Tapioka.....	80
7. Pembuatan Larutan.....	81
8. Pembuatan Preparat Histologi.....	82
9. Pengukuran Aktivitas Protease.....	85
10. Data Aktivitas Protease.....	89
11. Penentuan Statistika Aktivitas Protease Kolon Tikus.....	91
12. Foto Kegiatan.....	94

## DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

%	: persen
<	: kurang dari
=	: sama dengan
APC	: <i>antigen –presenting cell</i>
BB	: berat badan
CD	: crohn disease / penyakit crohn
COX	: siklooksigenase
g	: gram
HE	: Hematoxylin Eosin
IBD	: <i>Inflammatory Bowel Disease</i>
IFN- $\gamma$	: interferon- $\gamma$
IL	: interleukin
kg	: kilogram
mg	: milligram
mL	: mililiter
NF-kB	: <i>nuclear factor-kappa B</i>
NSAIDs	: <i>non steroidal anti-inflammatory drugs</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PFA	: Paraformaldehide
PGE2	: prostaglandin E2
pH	: potensial hidrogen
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SCFA	: <i>Short Chain Fatty Acid</i>
TNF $\alpha$	: <i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i>
UC	: colitis ulseratif

## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

*Inflammatory Bowel Disease* atau IBD adalah penyakit peradangan yang menyerang saluran pencernaan, terdiri atas dua tipe yaitu kolitis ulseratif dan penyakit *crohn* (Korpacka *et al.*, 2009). Penyakit *crohn* atau *Crohn Disease* merupakan inflamasi yang terjadi pada bagian lapisan dinding usus dan saluran pencernaan yang meliputi mulut, esofagus, lambung, dan usus halus. Sedangkan kolitis ulseratif atau UC hanya terbatas pada usus besar serta rektum, dan peradangan terjadi pada lapisan usus. *Inflammatory Bowel Disease* memiliki gejala yaitu diare, sembelit, rasa nyeri pada abdomen, sendawa, dan kembung (Kappelman *et al.*, 2007). Penyakit IBD dapat terjadi pada hewan peliharaan seperti anjing. Gejala klinis IBD pada anjing hampir sama dengan gejala klinis IBD pada manusia seperti penurunan berat badan, peningkatan frekuensi muntah atau diare (Ju and Uetrecht, 1998). Menurut catatan medis dari *The Queen Mother Hospital* pada tanggal 1 Agustus 2003 hingga 31 Desember 2009, tercatat ada 546 anjing dengan 86 ras yang berbeda pada kasus *Inflammatory Bowel Disease* (Katharani *et al.*, 2011).

Penyebab IBD yaitu virus atau bakteri patogen yang menginfeksi saluran pencernaan. Namun beberapa penelitian menyebutkan bahwa IBD dapat disebabkan oleh efek samping penggunaan obat anti inflamasi non-steroid (NSAID) seperti indometasin. Indometasin menghambat sintesis prostaglandin terkuat yang diabsorpsi dengan baik setelah pemberian per oral (Podolsky, 2002).

Indometasin yang menggunakan dosis 15 mg/kg BB dapat mengaktifkan makrofag yang akan melepaskan *Reactive Oxygen Species* (ROS). Produksi ROS yang berlebihan dalam sel akan menyebabkan aktivasi NF-kB dan fosforilasi inhibitor NF-kB. Kemudian NF-kB akan berpindah menuju nucleus dan mengekspresikan sitokin proinflamasi seperti TNF $\alpha$ . Produksi TNF $\alpha$  yang berlebihan pada sel akan menyebabkan inflamasi. Inflamasi akan meningkatkan aktivasi neutrofil serta pelepasan enzim protease yang menyebabkan kerusakan pada jaringan (Campbell and Perkins, 2006). Menurut Kaser *et al.* (2010) ketika terjadi IBD, produksi mukus menurun dan akan menyebabkan hilangnya *barrier* mukosa kolon yang harapannya kandungan pati resisten dari tepung tapioka yang diberikan secara per oral dapat menjadi terapi alternatif.

Penelitian ini menggunakan hewan model tikus (*Rattus novergicus*) IBD hasil induksi indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB yang diinkubasi selama 24 jam (Aulanni'am *et al.*, 2012). Diharapkan dalam penelitian ini, tepung tapioka dapat digunakan sebagai salah satu terapi alternatif kasus IBD pada tikus *Rattus novergicus* hasil induksi indometasin yang berpengaruh pada aktivitas protease dan gambaran histopatologi kolon.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dijelaskan, maka didapatkan rumusan masalah sebagai berikut :

1. Apakah terapi tepung tapioka dapat menurunkan aktivitas protease pada kolon tikus (*Rattus novergicus*) IBD hasil induksi indometasin?



2. Apakah terapi tepung tapioka dapat memperbaiki kerusakan histopatologi kolon tikus (*Rattus novergicus*) IBD yang terpapar indometasin?

### 1.3 Batasan Masalah

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

1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus (*Rattus novergicus*) jantan strain Wistar dengan umur 8-12 minggu dan berat badan antara 150-200 gram sesuai dengan kelaikan etik no: 1065-KEP-UB dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya.
2. Tepung tapioka yang digunakan yaitu tepung tapioka Rose Brand.
3. Dosis pemberian indometasin yang diberikan satu kali selama penelitian per oral yaitu 15 mg/kg BB (Aulanni'am *et al*, 2012).
4. Dosis terapi tepung tapioka yaitu 0,9 mg/200g BB, 1,8 mg/200g BB, dan 3,6 mg/200g BB yang diberikan selama 14 hari dengan volume sesuai berat badan.
5. Variabel yang diamati yaitu histopatologi kolon dengan adanya kerusakan mukosa dan infiltrasi sel-sel radang yang diamati secara kualitatif dengan menggunakan mikroskop *Olympus BX51* dan aktivitas protease diukur dengan metode spektrofotometri.
6. Analisa hasil perubahan kadar aktivitas enzim protease kolon dihitung menggunakan Analisa Ragam ANOVA dan uji lanjutan *Tukey* atau BNJ (Beda Nyata Jujur)  $\alpha < 0,05$  sedangkan analisa data histopatologi dari kolon dilakukan secara kualitatif dalam bentuk deskriptif.

#### 1.4 Tujuan Penelitian

1. Mengkaji efek terapeutik tepung tapioka terhadap penurunan aktivitas protease dari kolon tikus (*Rattus norvegicus*) IBD hasil induksi indometasin.
2. Mengkaji pengaruh terapi tepung tapioka dalam memperbaiki kerusakan histopatologi kolon tikus (*Rattus norvegicus*) IBD hasil induksi indometasin.

#### 1.5 Manfaat Penelitian

Melalui penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang kemampuan tepung tapioka dalam menekan *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) pada kolon tikus (*Rattus norvegicus*) hasil induksi indometasin, sehingga nantinya tepung tapioka dapat digunakan sebagai pengobatan alternatif inflamasi pada saluran pencernaan.

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tikus (*Rattus novergicus*)

Tikus (*Rattus novergicus*) memiliki ciri-ciri rambut berwarna putih dan mata merah. Keunggulan tikus sebagai hewan coba yaitu pemeliharaan dan penanganan yang mudah, kemampuan reproduksi tinggi, masa kebuntingan singkat, dan cocok untuk berbagai penelitian. Rata-rata umur tikus yaitu 4 sampai 5 tahun. Berat badan tikus jantan dewasa bekisar antara 267 sampai 500 gram dan betina 225 sampai 325 gram. Tikus memasuki usia dewasa pada umur 40-60 hari. Masa bunting tikus selama 23 hari dan disapih pada umur 21 hari (Armitage, 2004). *Rattus novergicus* adalah hewan coba paling populer pada penelitian yang berkaitan dengan pencernaan (Sirois, 2005).

Taksonomi tikus (Rukmanasari, 2010) :

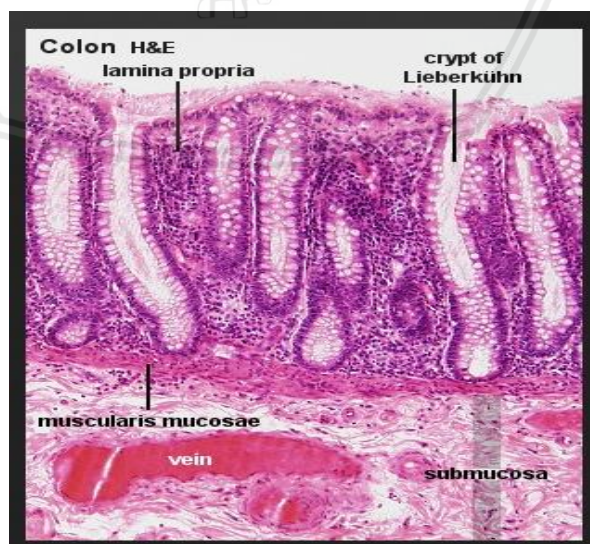
Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Ordo	: Rodentia
Subordo	: Odontoceti
Familia	: Muridae
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus novergicus</i>

*Rattus novergicus* memiliki 3 galur yaitu *Sparague Dawley*, *Wistar*, dan *Long Evans*. Galur *Sparague Dawley* memiliki tubuh yang ramping, kepala

kecil, telinga tebal dan pendek dengan rambut halus, serta ukuran ekor yang lebih panjang daripada badan. Galur *Wistar* memiliki kepala besar dan ekor yang pendek. Galur *Long Evans* memiliki ukuran tubuh yang lebih kecil serta rambut pada kepala dan bagian tubuh depan berwarna hitam (Sirois, 2005). Sedangkan pada penelitian ini menggunakan *Rattus novergicus* galur *Wistar*.

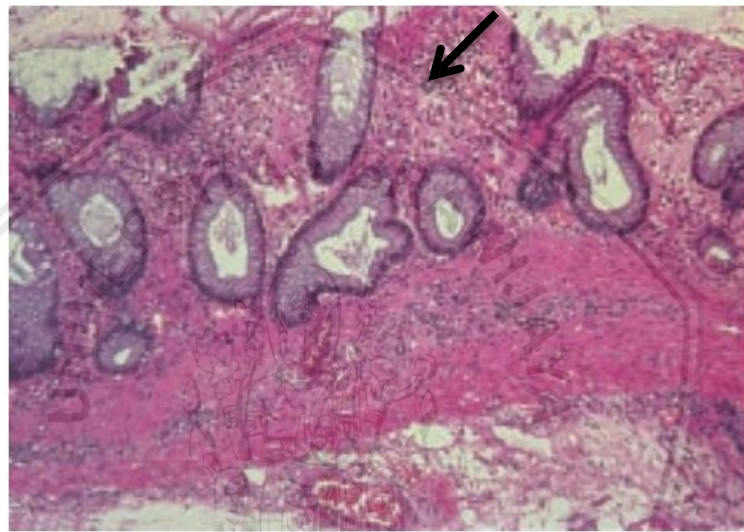
## 2.2 Histopatologi Usus (Kolon)

Kolon yaitu bagian dari usus besar yang berperan dalam penyerapan air, garam, dan asam lemak rantai pendek yang dihasilkan oleh bakteri (Klurfeld, 1999). Gambaran histologi kolon ditemui adanya kriptaliberkuhn lebih panjang dan lebih lurus pada tunika mukosa dibandingkan di usus halus. Epitel kolon berbentuk silinder dan mempunyai banyak sel goblet, tunika muskularis mukosa kolon tersusun atas lapisan sirkular disebelah dalam dan lapisan longitudinal disebelah luar (Gambar 2.1).



**Gambar 2.1** Histologi kolon normal (HE, 100x) (Mark, 2013)

Jika dilihat dari histopatologi akan terlihat adanya kerusakan pada lapisan mukosa, hilangnya sel goblet dan infiltrasi sel radang karena jaringan kolon yang mengalami inflamasi seperti pada Gambar 2.2 (Geboes, 2003). Bentuk mukosa berubah tampak tidak teratur jika dibandingkan dengan kondisi normal (Dellmann and Brown, 1993).



**Gambar 2.2** Histopatologi kolon yang mengalami inflamasi (kerusakan mukosa pada bagian yang ditunjuk ▼) (HE, 100x) (Geboes, 2003).

### 2.3 *Inflammatory Bowel Disease (IBD)*

*Inflammatory Bowel Disease (IBD)* adalah suatu kondisi inflamasi kronik yang disebabkan oleh kegagalan regulasi sistem imun, kerentanan genetic, dan rangsangan flora normal di saluran cerna. IBD dapat disebabkan oleh adanya infeksi pada saluran pencernaan karena adanya pemicu seperti bakteri dan virus (Achkar, 2000). Penggunaan *non steroidal anti-inflammatory drugs* (NSAIDs) juga dapat menyebabkan IBD

dengan cara menghambat kerja dari enzim siklooksigenase (COX). Penghambatan COX menyebabkan penghambatan pembentukan prostaglandin (PGE<sub>2</sub>) sehingga sekresi mucus berkurang. Produksi mucus yang menurun dapat menyebabkan hilangnya barrier mukosa kolon. Hal ini dapat menyebabkan mudahnya invasi bakteri patogen pada permukaan kolon (Kaser *et al.*, 2010).

Terdapat dua mekanisme patogenesis *Inflammatory Bowel Disease* yang mungkin terjadi. Patogenesis diawali dengan *antigen-presenting cell* (APCs) mengenali adanya antigen luminal pada mukosa usus sehingga menyebabkan respon efektor. Sebagian dari respon efektor yaitu over produksi sel T yang menyebabkan inflamasi dari pembentukan sitokin induktif seperti IL-2, IFN- $\gamma$ . Reseptor integrin dan kemokin akan meningkat setelah terstimulasi dan menyebabkan peningkatan spesifik yang tidak terbatas pada sisi reseptor yang terus menerus akan menyebabkan inflamasi.

Respon imun tubuh diawali dengan limfosit T sitotoksik (CD8<sup>+</sup>) atau sel T helper CD4<sup>+</sup> pada lumen usus mengenali antigen (Neuman, 2004). Aktivasi sel T helper akan menghasilkan sitokin yang berperan pada epitel usus secara langsung serta akan mengaktifkan makrofag untuk melepaskan mediator inflamasi dalam jumlah besar seperti sitokin *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan *nitric oxide* (NO). Pelepasan mediator inflamasi akan menyebabkan inflamasi terus menerus, sehingga dapat menyebabkan kerusakan jaringan usus atau nekrosis (Loroux *et al.*, 2001). Produksi ROS

yang berlebihan pada saat inflamasi akan menyebabkan kerusakan asam nukleat, protein, dan lemak serta pada akhirnya akan menyebabkan kerusakan jaringan dan memperparah inflamasi pada usus (Pan and Ho, 2010).

Diare adalah hasil defekasi yang tidak berbentuk atau dalam konsistensi cair dengan frekuensi yang meningkat. Berdasarkan durasi diare dibagi menjadi tiga yaitu diare akut (berlangsung <2 minggu, diare persisten berlangsung antara 2-4 minggu, dan diare kronis berlangsung >4 minggu. Sedangkan berdasarkan mekanisme patofisiologi diare terbagi menjadi diare cair, diare inflamasi, dan diare berlemak (Wiryani dan I Dewa, 2007).

Secara etiologi, diare akut dapat disebabkan oleh infeksi, intoksikasi (poisoning), alergi, reaksi obat-obatan, dan juga faktor psikis. Diare akut infeksi diklasifikasikan secara klinis dan patofisiologis menjadi diare non-inflamasi dan diare inflamasi. Diare inflamasi disebabkan invasi bakteri dan sitotoksin di kolon yang disertai lendir dan darah. Gejala klinis yang sering terjadi adalah adanya keluhan abdomen seperti mulas sampai nyeri seperti kolik, mual, muntah, demam, tenesmus, serta gejala dehidrasi. Pada pemeriksaan tinja rutin secara makroskopis ditemukan lendir dan/atau darah, dan secara mikroskopis ditemukan sel leukosit polimorfonuklear. Pada diare non-inflamasi, diare disebabkan oleh enterotoksin yang mengakibatkan diare cair dengan volume yang besar tanpa lendir dan darah. Gejala dehidrasi cepat timbul, terutama pada kasus yang tidak

mendapat cairan pengganti. Pada pemeriksaan tinja secara rutin tidak ditemukan leukosit (Zein, 2004).

Menurut Danese dan Fiocchi (2006), gejala klinis pada umumnya yaitu diare, nyeri pada bagian abdomen, dan penurunan berat badan. Mekanisme terjadinya diare terbagi menjadi empat jenis yaitu diare osmotik, diare sekretorik, diare eksudatif dan infeksi, serta diare yang dikaitkan dengan pengacauan motilitas. Diare osmotik terjadi bila ada bahan yang tidak dapat diserap meningkatkan osmolaritas dalam lumen yang menarik air dari plasma sehingga terjadi diare. Contohnya adalah malabsorpsi karbohidrat akibat defisiensi laktase atau akibat garam magnesium.

Diare sekretorik terjadi bila ada gangguan transport elektrolit, baik absorpsi yang berkurang ataupun sekresi yang meningkat. Hal ini dapat terjadi akibat toksin yang dikeluarkan bakteri, misalnya toksin kolera atau pengaruh garam empedu, ALRP, atau laksatif non-osmotik. Beberapa hormon intestinal seperti *gastrin vasoactive intestinal polypeptide* (VIP) juga dapat menyebabkan diare sekretorik. Diare eksudatif dan inflamasi akan mengakibatkan kerusakan mukosa, baik usus halus maupun usus besar. Inflamasi dan eksudasi dapat terjadi akibat infeksi bakteri atau bersifat non-infeksi seperti gluten sensitive enteropathy, inflammatory bowel disease (IBD) atau akibat radiasi (Bowen, 2006).

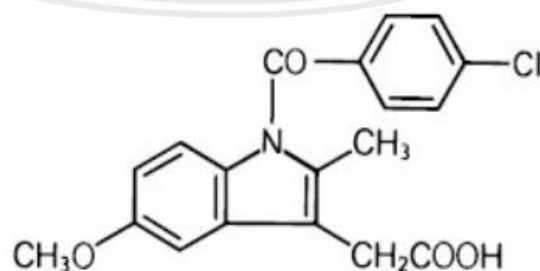
Diare cair disebabkan karena peningkatan sekresi air dan elektrolit. Diare inflamasi disebabkan karena inflamasi yang terjadi pada intestinum akibat kehilangan sel epitel dan kerusakan *tight junction* (pembatas



membran mukosa). Secara makroskopis, diare inflamasi terdapat lendir dan darah (Fediani, 2011). Diare berlemak disebabkan karena pertumbuhan bakteri yang berlebih pada usus halus. Selain itu, gejala lain yang ditimbulkan yaitu melena. Melena merupakan feses kehitaman yang diakibatkan karena pendarahan pada saluran cerna bagian atas (esophagus, lambung, dan duodenum). Pendarahan pada saluran cerna atas dapat dipengaruhi oleh pemberian obat NSAID seperti indometasin (Syarifuddin *et al.*, 2017).

#### 2.4 Indometasin

Indometasin (1-p-chlorobenzoyl-5-methoxy-2-methylindole-3-acetic acid) termasuk salah satu *Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs* (NSAIDs) yang umumnya digunakan sebagai analgesik dan anti-inflamasi (**Gambar 2.3**). Namun indometasin memiliki efek samping yang dapat menyebabkan inflamasi pada saluran pencernaan manusia atau hewan jika diberikan secara berlebihan (Bures *et al.*, 2011). Dosis aman indometasin pada tikus yaitu 2,72 mg/kg BB (Jain *et al.*, 2002).



**Gambar 2.3** Struktur indometasin (Merck and Co., Inc, 2005)

Indometasin secara cepat dan hampir sempurna terserap di usus setelah pemberian per oral. Indometasin menghambat aktivitas enzim COX-1 dan

COX-2. Penghambatan COX-1 akan mengurangi prostaglandin sehingga mengurangi sekresi mukus yang melindungi mukosa. Berkurangnya sekresi mukus akan mengakibatkan gangguan keseimbangan mikroflora dan hilangnya barrier mukosa kolon sehingga memudahkan infeksi bakteri endogen dan eksogen sehingga terjadi inflamasi, peningkatan ROS, aktivitas neutrofil, dan pelepasan protease. Sedangkan fungsi COX-2 akan menurunkan PGG<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub>, dan tromboksan A<sub>2</sub> sebagai agen inflamasi sehingga dapat mengurangi inflamasi dan rasa sakit pada penderita rheumatoid arthritis (Kumar dkk, 2007).

Penelitian ini menggunakan tikus (*Rattus norvegicus*) yang merupakan hewan coba yang paling sering digunakan untuk penelitian yang berkaitan dengan sistem pencernaan (Hofstetter *et al.*, 2005). Dosis pemberian indometasin agar dapat menghasilkan kolon yang mengalami IBD akut adalah 15 mg/kg BB yang diberikan secara per oral dan diinkubasi selama 24 jam (Aulanni'am *et al.*, 2012). Namun dosis juga dapat dijadikan dua kali pemberian selama dua hari berurut-turut yaitu sebanyak 7,5 mg/kg BB yang dilarutkan dalam alkohol 100% dan kemudian diencerkan dengan 5% larutan natrium bikarbonat yang diberikan secara subkutan (Randhawa *et al.*, 2011). Inflamasi kolon bisa diamati pada peningkatan aktivitas protease serta gambaran histopatologi kerusakan lapisan mukosa dan infiltrasi sel radang (Geboes, 2003).

## 2.5 Aktivitas Protease

Enzim protease adalah suatu enzim yang berperan penting dalam pencernaan sebagai penyederhana molekul protein dengan menghidrolisa ikatan peptida protein. Protease menghidrolisa ikatan peptida protein untuk dipecah menjadi oligopeptida dan asam amino. Enzim protease berperan untuk membersihkan jaringan luka yang mengalami nekrosis, membunuh bakteri pada jaringan yang mengalami inflamasi (Weiss, 1989) serta berperan dalam dalam metabolisme dan proses regulasi sel hewan, tumbuhan, mikroorganisme serta fungsi fisiologis sistem imun dan inflamasi (Naiola dan Widyastuti, 2007). Protease intraseluler yang berperan dalam fungsi fisiologis lainnya yaitu pencernaan, maturasi hormon, perakitan virus, respon imun, fertilisasi, koagulasi darah, fibrinolisis, kontrol tekanan darah, sporulasi, germinasi dan pathogenesis. Protease juga diimplikasikan dalam peran regulasi ekspresi gen, perbaikan DNA, serta sintesis DNA (Rao *et al.*, 1998). Enzim protease yang terlibat yang berperan pada kerusakan jaringan adalah protease serin (elastase neutrophil). Protease ini tersimpan didalam neutrophil yang berfungsi sebagai pertahanan anti mikroba dengan mekanisme fagositosis mikroorganisme didalam fagolisosom neutrofil (Segal, 2005).

Inflamasi merupakan reaksi lokal dari suatu jaringan terhadap zat toksik yang memerlukan peran mediator dan sistem imun. Enzim protease secara normal terdapat dalam jaringan tubuh yang berperan dalam pertahanan tubuh sebagai pemecahan protein asing yang masuk kedalam tubuh,

memperbaiki sel yang mengalami kerusakan, dan membunuh bakteri pada jaringan yang mengalami inflamasi. Peningkatan jumlah protease pada jaringan yang mengalami inflamasi dapat menyebabkan aktivitas protease meningkat dan tidak terkendali serta menyebabkan kerusakan pada sel (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010). Peningkatan jumlah protease dalam jaringan yang mengalami inflamasi dapat menyebabkan aktivasi protease tidak terkendali dan merusak faktor pertumbuhan dan reseptor, mencegah angiogenesis serta memecah granulasi yang mengakibatkan kerusakan jaringan (Eming dkk., 2007).

Mekanisme kerja pelepasan protease pada jaringan dimulai dengan adanya rangsang dari produk bakteri, cedera fisik, toksin maupun obat-obatan yang memicu aktivasi makrofag yang dilakukan oleh ROS. Peningkatan ROS akan menyebabkan pegaktifan NF-kB dan fosforilasi inhibitor NF-kB (IkB), sehingga NF-kB berpindah ke nucleus dan mengekspresikan TNF- $\alpha$ . Aktivasi makrofag dapat merangsang terbentuknya sitokin yang dihasilkan selama terjadi respon radang dan imun seperti IL-1 dan TNF $\alpha$ . TNF $\alpha$  menyebabkan agregasi (perpindahan) dan aktivasi neutrofil serta pelepasan enzim protease dan berpengaruh pada kerusakan jaringan (Kumar dkk, 2007). Inflamasi yang terjadi akibat induksi indometasin yang akan berdampak pada peningkatan ROS yaitu radikal hidroksil, hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), dan radikal nitrit oksida (NO) (Basivireddy *et al.*, 2002). Dalam proses inflamasi, neutrofil yang berperan

dalam menghancurkan mikroorganisme dan merusak jaringan sel maupun inang (Weiss, 1989).

## 2.6 Tepung Tapioka

Tepung tapioka merupakan suatu jenis bahan pangan yang dibuat dari ubi kayu. Bahan pangan tersebut merupakan pati yang diekstrak dengan air dari umbi singkong (ketela pohon), kemudian disaring, cairan hasil saringan kemudian diendapkan. Bagian yang mengendap tersebut selanjutnya dikeringkan dan digiling hingga diperoleh butiran-butiran pati halus berwarna putih, yang disebut tapioka (Luthana, 2008). Tapioka memiliki sifat-sifat yang serupa dengan sagu, sehingga kegunaan keduanya dapat dipertukarkan. Tepung ini sering digunakan untuk membuat makanan, bahan perekat, dan banyak makanan tradisional yang menggunakan tapioka sebagai bahan bakunya. Tapioka adalah nama yang diberikan untuk produk olahan dari akar ubi kayu (cassava).

Analisis terhadap akar ubi kayu yang khas mengidentifikasi kadar air 70%, pati 24%, serat 2%, protein 1% serta komponen lain (mineral, lemak, gula) 3%. Tahapan proses yang digunakan untuk menghasilkan pati tapioka dalam industri adalah pencucian, pengupasan, pamarutan, ekstraksi, penyaringan halus, separasi, pembasahan, dan pengering. Kualitas tapioka sangat ditentukan oleh beberapa faktor, yaitu:

- a. Warna tepung; tepung tapioka yang baik berwarna putih.
- b. Kandungan air; tepung harus dijemur sampai kering benar sehingga kandungan airnya rendah.

- c. Banyaknya serat dan kotoran; usahakan agar banyaknya serat dan kayu yang digunakan harus yang umurnya kurang dari 1 tahun karena serat dan zat kayunya masih sedikit dan zat patinya masih banyak.
- d. Tingkat kekentalan; daya rekat tapioka tetap tinggi.

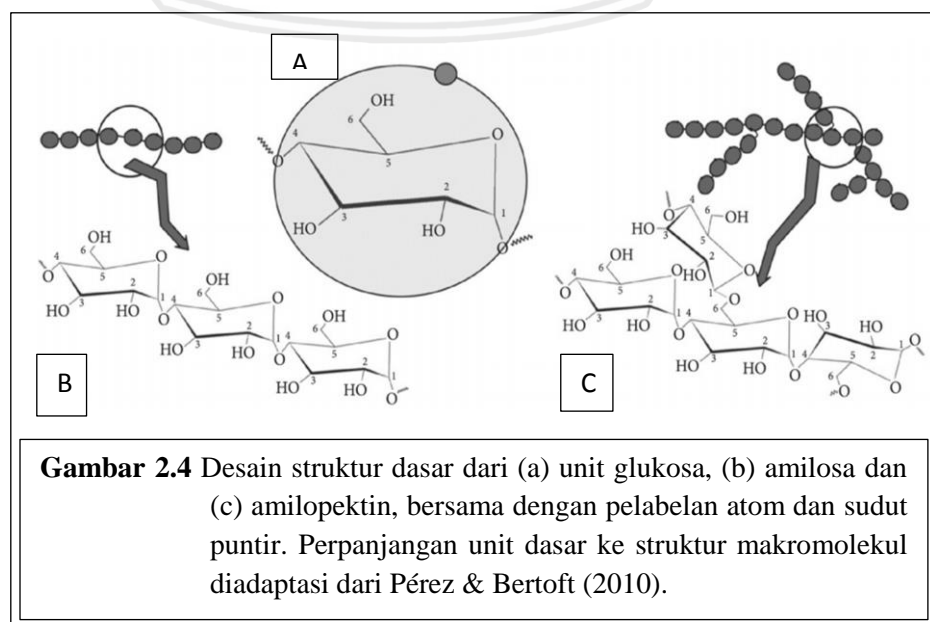
Tepung tapioka umumnya berbentuk butiran pati yang banyak terdapat dalam sel umbi singkong (Astawan, 2009). Isi yang dapat dicerna (DS) dan pati resisten (RS) di pati singkong komersial lebih tinggi daripada yang ditemukan oleh Walter *et al.* (2005) untuk tepung jagung. Pembentukan RS juga dipengaruhi oleh kadar air. Nilai maksimum dalam hasil RS ditemukan ketika rasio pati: air 1: 3,5 diterapkan. Ketika konsentrasi amilase meningkat, hasil RS meningkat. Air dalam jumlah minimal diperlukan untuk plastisisasi lingkungan dan untuk dimasukkan ke dalam struktur kristal (Eerlingen and Delcour, 1995).

## 2.7 Resistant Starch

### 2.7.1 Struktur Pati

Pati tersusun atas homopolimer glukosa dengan ikatan  $\alpha$  glikosidik. Sifat pati tergantung dari panjang rantai C-nya serta rantai molekul yang bercabang atau lurus. Pati dibentuk oleh dua jenis polimer yaitu amilopektin dan amilosa yang bisa dipisahkan dengan air panas. Amilopektin adalah fraksi tidak larut dan mempunyai struktur

bercabang dengan ikatan glikosidik  $\alpha$ -(1,6)-D-glukosa. Amilosa merupakan fraksi terlarut dan mempunyai struktur lurus dengan ikatan rantai linier dari  $\alpha$ -(1,4)-D-glukosa (Winarno, 2002). Amilosa memiliki derajat polimerisasi 6000 dengan berat molekul  $10^5$  g/mol. Rantainya dapat dengan mudah membentuk rantai heliks tunggal atau ganda. Sedangkan amilopektin memiliki derajat polimerisasi rata-rata 2 juta dengan berat molekul  $10^7$  hingga  $10^9$  g/mol. Panjang rantai terdiri dari 20-25 unit glukosa antar tiap percabangan (Sajilata *et al.*, 2006). Distribusi polimodal rantai  $\alpha$ -glukan dengan ukuran berbeda dan pengelompokan titik cabang dalam molekul amilopektin memungkinkan pembentukan rantai heliks ganda. Amilosa dan amilopektin dapat diatur dalam struktur semikristalin yang membentuk matriks butiran pati dengan bahan amorf (amilosa) bergantian dan kristal (amilopektin), yang dikenal sebagai cincin pertumbuhan pada pati tanaman superior (Jenkins *et al.*, 1993). Unit struktural pati, amilosa dan amilopektin, diperlihatkan dalam **Gambar 2.4**.



Tiga jenis pati, ditetapkan sebagai tipe A, tipe B, dan tipe C, telah diidentifikasi berdasarkan pola difraksi sinar-X. Ini sebagian tergantung pada panjang rantai yang membentuk kisi amylopectin, kepadatan pengemasan di dalam butiran, dan keberadaan air (Gillard, 1987). Meskipun tipe A dan tipe B adalah modifikasi kristal nyata, tipe C adalah bentuk campuran. Fitur penting dari jenis pati adalah sebagai berikut.

1. Tipe A

Struktur tipe A memiliki amilopektin dengan panjang rantai 23 hingga 29 unit glukosa. Ikatan hidrogen antara hidroksil kelompok rantai molekul amilopektin menghasilkan pembentukan struktur heliks ganda luar. Di antara misel ini, rantai linier bagian amilosa dikemas oleh membentuk ikatan hidrogen dengan rantai linear luar amilopektin. Pola ini sangat umum pada sereal.

2. Tipe B

Struktur tipe B terdiri dari amilopektin dengan panjang rantai dari 30 hingga 44 molekul glukosa dengan pola menyebar didalam air. Ini adalah pola biasa pati dalam kentang mentah dan pisang.

3. Tipe C

Struktur tipe C terdiri dari amilopektin rantai panjangnya 26 hingga 29 molekul glukosa, kombinasi jenis A dan tipe B, yang merupakan khas dari kacang polong dan kacang. Sebuah bentuk tambahan, disebut tipe V, terjadi pada butiran yang bengkak.



Menurut Putra (2010) pati adalah bentuk utama karbohidrat yang dikonsumsi merupakan polisakarida yang terbentuk dari sejumlah molekul glukosa yang berikatan bersama dan membentuk karbohidrat kompleks. Umumnya pati dapat diurai oleh enzim pencernaan dalam usus halus menjadi molekul glukosa yang diserap ke dalam darah dan digunakan untuk menghasilkan energi.

Pati dihidrolisa di dalam saluran pencernaan oleh amilase yang disekresikan ke dalam saluran pencernaan. Cairan air liur dan pankreas mengandung  $\alpha$ -amilase yang mampu menghidrolisa ikatan  $\alpha$ -(1,4) amilopektin menghasilkan D-glukosa, sejumlah kecil maltose dan suatu inti yang tahan hidrolisa (limit dekstrin). Limit dekstrin tidak dihidrolisa lebih jauh oleh  $\alpha$ -amilase (tidak dapat memecah ikatan  $\alpha$ -(1,6) namun enzim  $\alpha$ -(1,6)-glukosidase yang berperan dalam pemecahan ikatan ini. Aktivitas gabungan dari  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -(1,6)-glukosidase dapat menguraikan amilopektin secara sempurna menjadi glukosa dan sejumlah kecil maltosa (Lehninger, 1993).

Pati dapat dibedakan berdasarkan daya cernanya oleh enzim amilase. Klasifikasi pati berdasarkan daya cernanya terdiri atas tiga, yaitu pati yang dicerna dengan cepat (*rapidly digestible starch*), pati yang dicerna dengan lambat (*slowly digestible starch*), dan pati resisten (*resistant starch*) (Sajilata *et al.*, 2006).

### 1. Pati yang cepat dicerna (RDS)

RDS terutama terdiri dari amorf dan pati yang terdispersi ditemukan dalam jumlah tinggi dalam makanan bertepung yang dimasak oleh panas lembab, seperti roti dan kentang. Ini diukur secara kimia sebagai pati, yang dikonversi menjadi glukosa konstituen molekul dalam 20 menit pencernaan enzim (Berry, 1986).

### 2. Pati yang dicerna secara lambat (SDS)

Seperti RDS, SDS diharapkan sepenuhnya dicerna di usus kecil, tetapi karena satu dan lain hal, ia dicerna lebih lambat. Kategori ini terdiri dari secara fisik tidak dapat diakses pati amorf dan pati mentah dengan struktur kristal tipe A dan tipe C, seperti sereal dan pati tipe B, baik dalam bentuk butiran atau bentuk retrograded dalam makanan yang dimasak. Ini diukur secara kimia sebagai pati dikonversi menjadi glukosa setelah lebih dari 100 menit pencernaan enzim (Berry, 1986).

### 3. Resistant starch (RS)

Istilah "pati resisten" pertama kali diciptakan oleh Englyst dkk (1982), untuk menggambarkan sebagian kecil dari pati yang resisten terhadap hidrolisis oleh amilase lengkap dan pengobatan pullulanase in vitro. RS adalah pati yang tidak terhidrolisis setelah 120 menit inkubasi. Namun, karena pati mencapai usus besar mungkin kurang lebih difermentasi oleh mikroflora usus, RS

sekarang didefinisikan sebagai fraksi dari pati makanan, yang lolos pencernaan di usus kecil. Ini diukur secara kimia sebagai perbedaan antara Total Starch (TS) yang diperoleh dari sampel yang dihomogenisasi dan diolah secara kimia serta jumlah RDS dan SDS, dihasilkan dari makanan yang tidak dihomogenisasi sampel dengan pencernaan enzim (Berry, 1986).

$$RS = TS - (RDS + SDS)$$

### 2.7.2 *Resistant Starch (Pati Resisten)*

Pati resisten adalah jumlah keseluruhan pati dan produk degradasi pati yang tidak dapat diserap dalam saluran cerna (usus halus) dan langsung menuju usus besar (kolon). Pati resisten tidak dapat diserap dalam tubuh disebabkan karena beberapa faktor. Pati secara fisik memiliki ketahanan terhadap enzim saluran pencernaan, granula pati memiliki struktur yang bersusun (molekul kompak) sehingga mencegah enzim pencernaan untuk mendegradasi (Putra, 2010). Butiran pati terganggu oleh pemanasan berlebihan air dalam proses yang dikenal sebagai gelatinisasi, yang membuat molekul sepenuhnya dapat diakses oleh enzim pencernaan. Proses pemasakan yang terhidrasi adalah persiapan khas makanan bertepung untuk konsumsi agar pati cepat dicerna (Haralampu, 2000). Namun, jika gel pati ini maka didinginkan, mereka membentuk kristal pati yang tahan terhadap enzim pencernaan. Pati terpilih yang telah dimodifikasi secara kimia oleh eterisasi,

esterisasi atau ikatan silang tidak bisa dipecah oleh enzim pencernaan (Putra, 2010).

Selain faktor struktural yang disebutkan di atas dimana struktur kimia pati dapat mempengaruhi jumlah pati resisten, faktor-faktor lain intrinsik untuk makanan bertepung dapat mempengaruhi aktivitas  $\alpha$ -amilase dan karenanya pemecahan pati. Ini termasuk pembentukan kompleks amilosa-lipid, yang adanya inhibitor  $\alpha$ -amilase asli dan juga non-pati polisakarida, yang semuanya dapat secara langsung mempengaruhi aktivitas  $\alpha$ -amilase. Aditif ekstrinsik misalnya fosfor, bisa juga mengikat pati, membuatnya lebih atau kurang rentan terhadap degradasi. Selain itu, faktor fisiologis dapat mempengaruhi jumlah RS pada sebuah makanan. Peningkatan mengunyah mengurangi ukuran partikel (lebih kecil partikel menjadi lebih mudah dicerna dalam usus), sedangkan variasi intraindividual dalam waktu transit dan faktor biologis juga mempengaruhi daya cerna pati (Nugent, 2005)

Pati resisten telah diklasifikasikan menjadi empat tipe umum yaitu pati resisten tipe 1 – tipe 4. Tipe 1 yaitu pati yang secara fisik terperangkap diantara dinding sel bahan pangan, tipe 2 yaitu granula pati yang secara alami tahan terhadap enzim pencernaan, tipe 3 yaitu pati retrogradasi yang dihasilkan melalui proses pengolahan makanan dan tipe 4 yaitu pati yang dimodifikasi secara kimia (Onyango *et al.*, 2006; Okoniewska and Witwer, 2007).

Pati resisten tipe 1 dan 2 merupakan residu dari bentuk pati, yang dicerna dengan sangat lambat dan tidak lengkap di usus kecil. Pati resisten tipe 1 adalah istilah yang diberikan di mana pati secara fisik tidak dapat diakses oleh pencernaan, misalnya karena adanya dinding sel utuh dalam biji-bijian, biji atau umbi (Hernández *et al.*, 2008). Pati resisten tipe 1 stabil terhadap panas di sebagian besar operasi memasak normal, yang memungkinkan penggunaannya sebagai bahan dalam berbagai macam makanan konvensional (Sajilata *et al.*, 2006).

Pati resisten tipe 2 adalah butiran pati asli, mentah, seperti kentang mentah atau pati pisang, yang kristalinitasnya membuatnya sangat rentan terhadap hidrolisis (Hernández *et al.*, 2008). Pati resisten tipe 2 menjelaskan butiran pati asli yang dilindungi dari pencernaan oleh konformasi atau struktur granula pati. Struktur kompak ini membatasi aksesibilitas enzim pencernaan, berbagai amilase, dan bertanggung jawab atas sifat tahan pati resisten tipe 2 seperti, ungelatinized starch. Dalam makanannya, pati mentah dikonsumsi dalam makanan seperti pisang (Sajilata *et al.*, 2006). Jenis pati resisten tipe 2 tertentu adalah unik karena tetap mempertahankannya struktur dan ketahanan bahkan selama pemrosesan dan persiapan banyak makanan (Wepner *et al.*, 1999).

Pati resisten tipe 3 mengacu pada bahan turunan pati non-granular yang tahan terhadap pencernaan dan umumnya terbentuk selama retrogradasi butiran pati (Wepner *et al.*, 1999). Pati resisten tipe 3

adalah pati bertingkat retro, yang dapat dibentuk dalam makanan yang dimasak yang disimpan pada suhu rendah atau suhu kamar (Hernández *et al.*, 2008). Oleh karena itu sebagian besar makanan yang lembab mengandung beberapa pati resisten tipe 3 (Sajilata *et al.*, 2006). Pati resisten tipe 3 karena memiliki stabilitas termal, hal ini memungkinkannya stabil di sebagian besar operasi memasak normal, dan memungkinkan penggunaannya sebagai bahan dalam berbagai macam makanan konvensional (Haralampu, 2000). Pemrosesan makanan, yang melibatkan panas dan kelembaban, dalam banyak kasus menghancurkan pati resisten tipe 1 dan pati resisten tipe 2 tetapi dapat membentuk pati resisten tipe 3 (Faraj *et al.*, 2004). Pati resisten tipe 3 telah menunjukkan kapasitas penahanan air yang lebih tinggi daripada pati granular (Sanz *et al.*, 2008b).

Pati resisten tipe 4 merupakan tambahan dari ketiga jenis utama dan pati tersebut telah dimodifikasi secara kimia dan didefinisikan mirip dengan oligosakarida resisten dan polydextrose (Wepner *et al.*, 1999). Pati resisten tipe 4 menggambarkan sekelompok pati yang telah secara kimia dimodifikasi dan termasuk pati yang telah diesterifikasi, diesterifikasi atau terikat silang dengan bahan kimia sedemikian rupa untuk mengurangi daya cerna mereka. Pati resisten tipe 4 dapat dibagi lagi menjadi empat subkategori sesuai dengan kelarutannya dalam air dan metode eksperimental yang dengannya mereka dapat dianalisis (Nugent, 2005). Pati resisten tipe 4 dapat diproduksi dengan modifikasi

kimia, seperti konversi, substitusi, atau ikatan silang, yang dapat mencegah pencernaannya dengan menghalangi akses enzim dan membentuk hubungan atipikal (Kim *et al.*, 2008; Sajilata *et al.*, 2006).

Pati resisten tidak dapat dicerna oleh enzim pencernaan dan tahan terhadap asam lambung sehingga dapat mencapai usus besar untuk difermentasi oleh bakteri probiotik (Sajilata *et al.*, 2006; Zaragoza *et al.*, 2010). Sejumlah besar pati yang tidak dapat dicerna (RS) masuk ke dalam usus besar dan merupakan substrat yang penting bagi mikroflora kolon. Pati resisten secara selektif menstimulasi pertumbuhan atau aktivitas bakteri anaerobik menguntungkan seperti *Bifidobacteria* dan *Lactobacillus* (Okoniewska and Witwer, 2007). Hasil fermentasi bakteri memiliki peran penting sebagai mukoprotektan, dapat digunakan sebagai sumber energi untuk pembentukan sel epitel usus dan menstimulasi sekresi mucin. Inflamasi kronik yang terjadi pada *inflammatory bowel disease* (IBD), termasuk kolitis, mempunyai korelasi dengan peningkatan resiko kanker kolorektal (American Cancer Society, 2014).

Pati resisten secara cepat difermentasi dalam sekum dan kolon proksimal dan menghasilkan asam lemak rantai pendek (Short Chain Fatty Acids, SCFA), khususnya asam butirat berfungsi mengurangi gejala klinis yang timbul pada pasien IBD tipe ulcerative colitis dan tingginya kadar asam butirat pada kolon dapat mencegah kanker kolon. Asam butirat juga dapat menurunkan jumlah asam empedu sekunder,

memperbaiki saluran pencernaan dan meningkatkan penyerapan mikronutrien (magnesium dan kalsium) dalam kolon, menurut (Putra, 2010). Asam lemak ini juga menurunkan pH kolon, menghambat pertumbuhan bakteri patogen, dan memulihkan keseimbangan usus dari ketidakseimbangan yang disebabkan oleh bakteri patogen (Okoniewska and Witwer, 2007). Menurut Willemsen *et al* (2003), SCFA menambah rasio sekresi PGE1/PGE2 yang dihasilkan dari miofibroblas subepitelial yang mendukung peran asam lemak ini sebagai mukoprotektan dengan adanya penambahan ekspresi mucin pada epitel. Hal ini sangat relevan dengan ditemukannya absorpsi SCFA oleh epitel pada aliran darah. Oleh karena itu SCFA, khususnya asam butirat, mempunyai potensi untuk pencegahan inflamasi kronik pada kolon (Bassaganya-Riera *et al.*, 2011). Menurut Putra (2010) konsentrasi SCFA bergantung pada jenis polisakarida dan dipengaruhi daerah di kolon, konsentrasi tertinggi dapat dideteksi pada daerah yang paling dekat dengan usus halus (70-140 mm).

### 2.7.3 Mukoprotektan

Jaringan mucin adalah agregat fibrillar viskoelastik yang terbentuk melalui asosiasi-diri yang kompleks dari rantai-rantai glukoprotein biopolimerik yang membentuk suatu perisai pelindung yang pelumas dan terhidrasi di sepanjang daerah epitel dalam tubuh. Melalui sifat struktural, kimia dan penghalang, pelapis fungsional ini memainkan peran penting dalam menjaga kesehatan manusia. Ketika pelapisan ini



hilang, membuat epitel sangat rentan terhadap patogen (misalnya, peradangan usus karena kehilangan lendir gastrointestinal) (Authimoolam and Dziubla, 2016).

Mucus adalah glikoprotein yang disekresikan oleh sel goblet epitel, dan sel lendir ada di kelenjar submukosa. Secara umum, mucus mengandung struktur polipeptida yang terutama terdiri dari serin, alanin, prolin, glisin dan treonin dan rantai samping oligosakarida yang menghiasi struktur peptida, yang secara kovalen dicangkokkan melalui hubungan O-glikosidik. Mucus memiliki struktur seperti sikat botol. Berat molekul tinggi melalui ikatan disulfida (Rogers, 1994; Authimoolam and Dziubla, 2016).

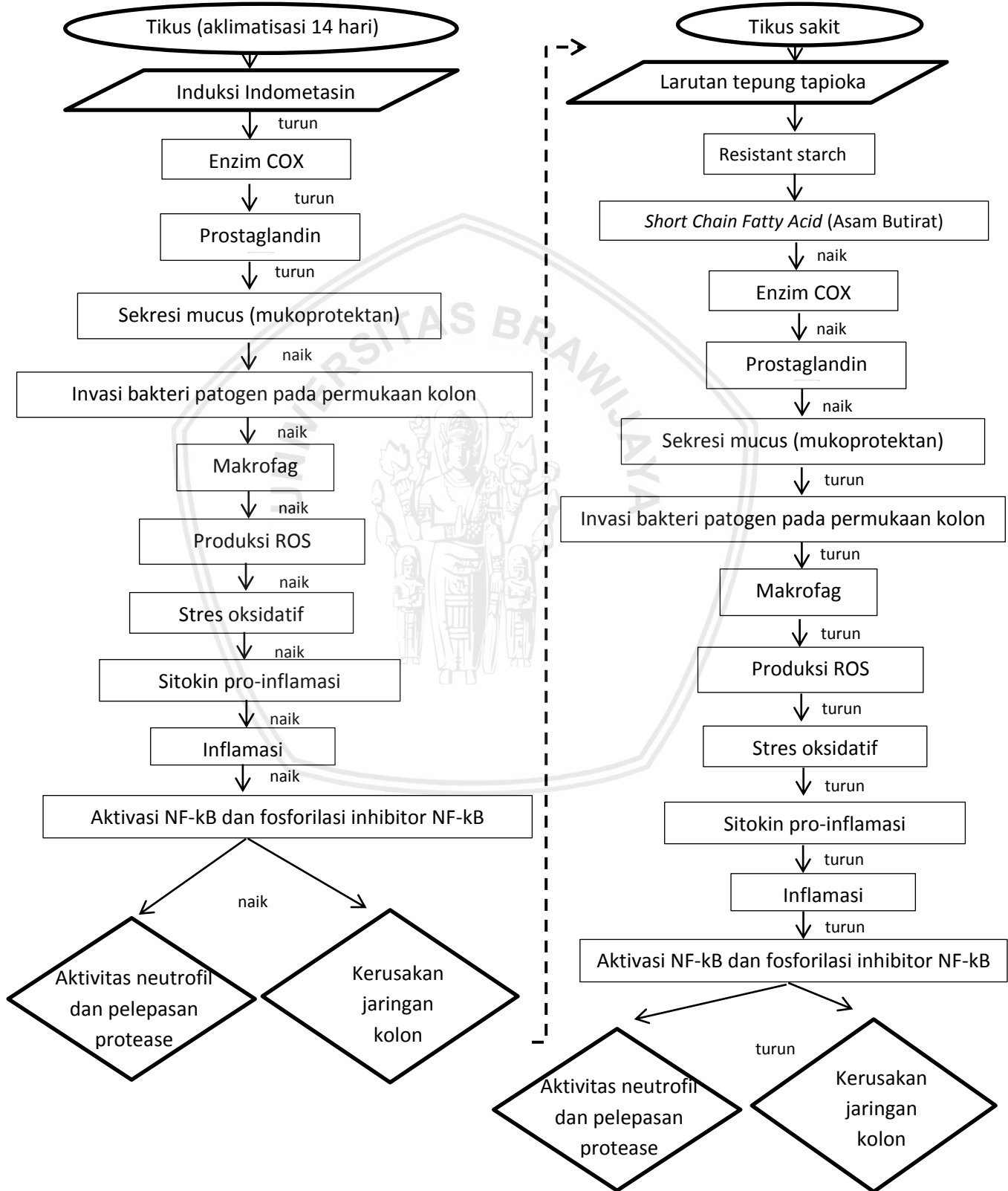
Dipengaruhi oleh kondisi lingkungan regional, organisasi struktural jaringan mucus alami dapat berbeda secara regional dan temporal di seluruh tubuh. Jaringan mucus dapat divisualisasikan sebagai *multilayers mucin glycoproteins*. Pada saluran pernafasan atau saluran cerna, jaringannya mengandung dua zona berbeda: lapisan luar yang longgar melekat dengan volume bebas yang diperluas yang rentan terhadap pengangkatan yang mudah, di mana mikrobiota terutama ada, dan lapisan dalam yang lebih padat, lebih utuh, dan mukosa. Ketebalan jaringan mukosa bervariasi sesuai dengan lokasi dan peran fisiologisnya, sangat bergantung pada kedekatan dengan kelenjar sekretorik dan faktor fisik lainnya, seperti pernafasan, pengunyahan dan menelan. Dalam saluran pencernaan, ketebalan jaringan mucus

dapat sangat bervariasi, berkisar antara 50 dan 450  $\mu\text{m}$ , sementara lapisan yang lebih tipis telah dideskripsikan untuk permukaan mukosa pernapasan (Authimoolam, 2016).

Bertentangan dengan keyakinan sebelumnya, penghalang epitel usus bukan penghalang fisik statis tetapi berinteraksi lebih kuat dengan mikrobiota usus dan sel-sel sistem kekebalan tubuh. Komunikasi yang intens antara sel-sel epitel, sel-sel kekebalan dan mikrobioma akan membentuk respon imun spesifik terhadap antigen, menyeimbangkan fungsi toleransi dan efektor (Takiishi *et al.*, 2017). Hambatan mukosa terdiri dari sel epitel terpolarisasi dengan permukaan apikal dan basolateral yang berbeda dipisahkan oleh persimpangan ketat dan bertindak baik sebagai penghalang fisik dan imunologi untuk patogen yang masuk. Persimpangan ketat adalah komponen yang paling penting untuk pembangunan penghalang konstitutif sel epitel, dan mereka mengatur permeabilitas penghalang dengan menyekat erat sambungan sel-sel. Protein-protein persimpangan yang ketat termasuk claudin, occludin, molekul adhesi junctional, dan perancah protein zonula occludens. Di antara protein tersebut, claudin adalah komponen utama dari persimpangan yang ketat dan bertanggung jawab untuk penghalang dan polaritas sel epitel (Yuksel and Turkeli, 2017).

**BAB III KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN**

**3.1 Kerangka Konseptual Penelitian**



## Keterangan

○ : variable kontrol

◇ : Variabel bebas (terapi dan induksi)

□ : Variabel tergantung (parameter yang diamati)

-&gt; : Mekanisme terapi

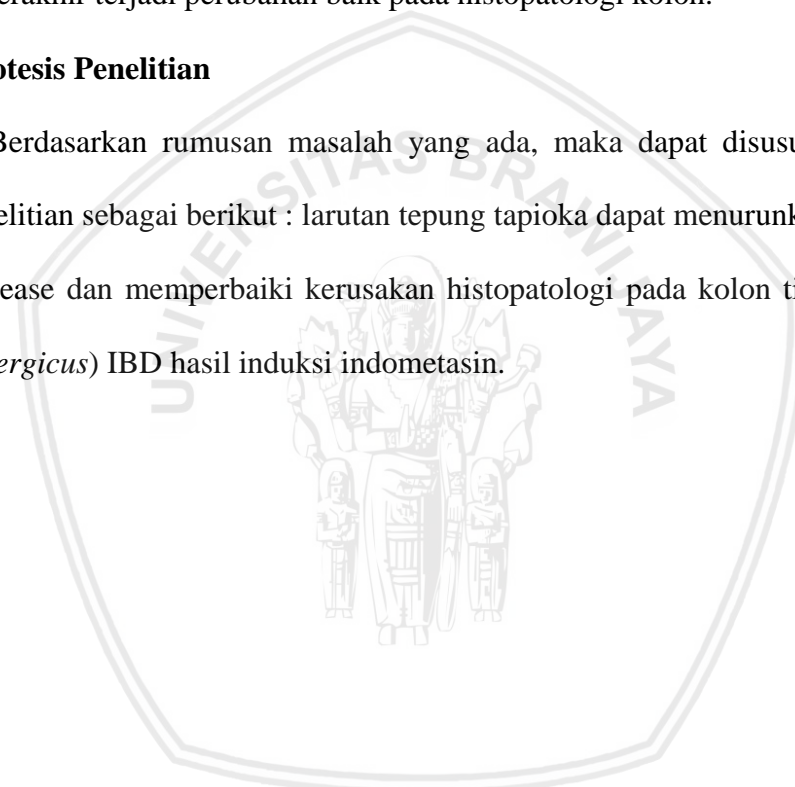
Indometasin secara cepat dan hampir sempurna terserap di usus setelah pemberian per oral. Indometasin menghambat aktivitas enzim COX-1. Penghambatan COX-1 akan mengurangi prostaglandin sehingga mengurangi sekresi mukus yang melindungi mukosa usus. Berkurangnya sekresi mukus akan mengakibatkan gangguan keseimbangan mikroflora dan hilangnya barrier mukosa kolon sehingga memudahkan infeksi bakteri endogen dan eksogen yang memicu aktivasi makrofag sehingga terjadi peningkatan ROS. Produksi ROS yang berlebihan dalam sel akan menaikkan stress oksidatif dan mengaktivasi NF-kB serta fosforilasi inhibitor NF-kB. NF-kB akan mengekspresikan sitokin pro inflamasi (TNF $\alpha$ ) di nukleus. Produksi TNF $\alpha$  yang melebihi batas akan menyebabkan inflamasi sehingga memicu agregasi dan aktivasi neutrofil serta pelepasan enzim protease dan menyebabkan kerusakan pada jaringan kolon. Kerusakan tersebut memberikan pengaruh buruk pada histopatologi kolon.

Larutan tepung tapioka mengandung *resistant starch* atau pati resisten yang tidak tercerna sampai ke dalam kolon. Pati tersebut akan di fermentasi oleh bifidobakterium dalam kolon dan akan meningkatkan produksi asam lemak rantai pendek, khususnya asam butirat. Asam butirat akan menstimulasi produksi prostaglandin sehingga sekresi mucin meningkat yang berfungsi sebagai peningkatan mukoprotektan pada kolon.

Keberadaan mucin dapat menghambat invasi bakteri sehingga terjadi penurunan aktivasi makrofag yang secara otomatis menurunkan produksi ROS. Penurunan produksi ROS menyebabkan penurunan stress oksidatif dan NF-kB, fosforilasi inhibitor NF-kB, dan TNF $\alpha$  berkurang sehingga tidak terjadi aktivasi neutrofil serta pelepasan enzim protease. Pada fase terakhir terjadi perubahan baik pada histopatologi kolon.

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang ada, maka dapat disusun hipotesis penelitian sebagai berikut : larutan tepung tapioka dapat menurunkan aktivitas protease dan memperbaiki kerusakan histopatologi pada kolon tikus (*Rattus norvegicus*) IBD hasil induksi indometasin.



## BAB IV METODOLOGI PENELITIAN

### 4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari 2019 – Maret 2019 di Laboratorium Fisiologi Hewan Universitas Islam Negeri Malang, Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, dan Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang.

### 4.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian menggunakan hewan coba tikus (*Rattus novergicus*) jantan strain *Wistar* berumur 8-12 minggu. Berat badan tikus antara 150-200 gram. Hewan coba diaklimatisasi selama empat belas hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium dan menaikkan berat badan. Estimasi jumlah sampel dihitung berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008) :

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

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan : t = jumlah kelompok

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan diatas, maka perlakuan sejumlah 5 kelompok maka minimal dilakukan 4 kali ulangan, maka diperlukan 20 ekor tikus.

### 4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap. Hewan coba dibagi menjadi lima kelompok perlakuan yaitu kelompok kontrol negatif, kontrol positif, P1 (dosis 0,9 mg/ 200 g BB), P2 (dosis 1,8 mg/ 200 g BB), P3 (dosis 3,6 mg/ 200 g BB).

Tabel Rancangan kelompok penelitian

Variabel yang diamati	Ulangan				
	1	2	3	4	5
Aktivitas protease dan histopatologi kolon					
Kontrol negatif					
Kontrol positif					
P1 (terapi tepung tapioka dosis 0,9 mg/ 200 g BB)					
P2 (terapi tepung tapioka dosis 1,8 mg/ 200 g BB)					
P3 (terapi tepung tapioka dosis 3,6 mg/ 200 g BB)					

### 4.4 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini sebagai berikut :

Variabel bebas : induksi indometasin dan terapi larutan tepung tapioka.

Variabel tergantung : Aktivitas protease dan gambaran histopatologi kolon.

Variabel kendali : Umur, berat badan, jenis kelamin dan strain  
*Wistar*, pakan dan minum.

#### 4.5 Materi Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus novergicus*), minyak jagung, suspensi tepung tapioka, indometasin, aquades, larutan PBS-Tween, Tris-HCl, pasir kuarsa, larutan PSMF, PBS-Azida, Formaldehyde, *ethanol absolute*, NaCl, KCl, PFA 4%, etanol 70%, etanol 80%, etanol 90%, etanol 95%, NaCl fisiologis 0,95%, larutan tirosin, kasein, buffer fosfat, *Tri Chloro Acetic Acid* (TCA), HCl 1 N, parafin, xylol, dan pewarna jaringan *Hematoxyline Eosine*.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain bak pemelihara hewan coba, tabung reaksi, rak tabung reaksi, saringan, seperangkat alat bedah, autoclave, gelas ukur 100 mL, labu ukur (10 mL, 50 mL, dan 100 mL), pipet tetes, spuit pengaduk kaca, mortar, tabung eppendorf, timbangan digital, mikropipet (10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 200  $\mu$ L dan 1000  $\mu$ L), waterbath, lemari pendingin, seperangkat alat sentrifugasi, vortex, blue tip, yellow tip, pH meter digital, glove, pisau, *object glass*, *cover glass*, mikroskop *Olympus BX51*, dan spektrofotometer.

#### 4.6 Tahapan Penelitian

##### 4.6.1 Persiapan Hewan Coba

Tikus dibagi dalam 5 kelompok perlakuan dan masing-masing kelompok perlakuan terdiri dari 4 tikus. Kelompok perlakuan terdiri dari kelompok kontrol negatif, kontrol positif, terapi 0,9 mg/ 200 g BB,



terapi 1,8 mg/ 200 g BB, dan terapi 3,6 mg/ 200 g BB. Sebelum dilakukan perlakuan, tikus diadaptasikan dengan lingkungan selama 14 hari. Pakan dan minum diberikan secara *ad libitum*. Pakan yang diberikan berupa konsentrat dengan komposisi air maksimal 12%, protein kasar minimal 16%, lemak kasar 3-7%, serat kasar maksimal 8%, abu maksimal 10%, kalsium, 0,9-1,2%, dan fosfor 0,6-1%. Kandang tikus berukuran 17,5 x 23,75 x 17,5 cm dengan suhu optimum ruangan 22-24°C dan kelembapan udara 50-60% serta ventilasi yang cukup (AOAC, 2005).

#### 4.6.2 Induksi Indometasin

Persiapan tikus sebagai hewan coba model IBD yang diinduksi indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB. Berat rata-rata tikus yang digunakan  $\pm 200$  gram, sehingga diperlukan 3 mg indometasin untuk setiap tikus. Dalam pembuatan larutan stok indometasin 45 gram, dibutuhkan 4 ml minyak jagung sebagai pelarutnya. Perhitungan larutan yang diperlukan untuk pemberian per oral sebagai berikut :

$$\text{Indometasin} \quad : 15 \text{ mg/kgBB} \times 0,2 \text{ kg} = 3 \text{ mg/tikus}$$

$$\text{Minyak jagung} \quad : \frac{3}{45} \text{ mg} \times 4 \text{ ml} = 0,27 \text{ ml/tikus}$$

#### 4.6.3 Terapi Pemberian Tepung Tapioka

Pemberian tepung tapioka sebagai terapi IBD dilakukan selama 14 hari dengan dosis kelompok P1 0,9 mg/ 200 gBB, kelompok P2 1,8 mg/ 200 g BB, kelompok P3 3,6 mg/ 200 g BB secara per oral menggunakan sonde (Sukron, 2016).

#### 4.6.4 Cara Pembuatan Preparat Histopatologi

##### 4.6.4.1 Pembuatan Preparat Histopatologi Organ Kolon

Pengambilan organ kolon pada hewan coba dilakukan pada hari ke – 30 setelah semua perlakuan telah dilakukan. Langkah yang pertama dilakukan yaitu dislokasi hewan coba pada bagian leher, kemudian diletakkan pada papan bedah dan tikus diposisikan rebah dorsal. Alat bedah yang dibutuhkan yaitu scalpel, gunting dan pinset. Pembedahan dilakukan pada bagian abdomen tikus, kemudian diambil bagian kolon, diisolasi dan dipotong. Organ kolon dibilas dengan NaCl – fisiologis 0,9% dingin. Kemudian organ kolon dibagi menjadi dua bagian dan dimasukkan dalam larutan *Phosphate Buffer Saline-azida* (PBS-azida) pH 7,4 dan larutan *paraformaldehid* 4% (PFA). Proses pembuatan preparat histologi terdiri dari fiksasi, dehidrasi, penjernihan, infiltrasi parafin, embedding, sectioning, penempelan dan pewarnaan (Junquiera and Carneiro, 2007). Fiksasi bertujuan untuk mencegah kerusakan jaringan, menghentikan proses metabolisme dan mengawetkan komponen histologis. Proses dehidrasi bertujuan untuk mengeluarkan air dari dalam jaringan dengan menggunakan larutan etanol secara bertingkat dari konsentrasi 70%, 80%, 90%, dan 95% selama 10 sampai 30 menit. Proses dehidrasi berjalan dalam kondisi teragitasi pada suhu 4°C. Sedangkan proses infiltrasi menggunakan perbandingan larutan etanol absolut dan *propylene*

*oxide* secara bertingkat serta hanya menggunakan larutan *propylene* murni. Infiltrasi dilakukan dalam kondisi teragitasi pada suhu ruang selama 30 menit pada setiap tahapan. Penjernihan bertujuan untuk menggantikan tempat etanol dalam jaringan. Reagen yang digunakan yaitu *xylol*. Jaringan dipindahkan dari alcohol absolut III ke larutan penjernih (*xylol*). Penjernihan dilakukan dala *xylol* I dan *xylol* II masing-masing selama 1 jam, serta *xylol* III selama 30 menit pada suhu kamar dan 30 menit pada inkubator. Infiltrasi parafin bertujuan untuk menggantikan tempat dehidran dalam jaringan dan bahan penjernih dengan parafin cair. Jaringan dimasukkan kedalam parafin cair I, parafin cair II, dan parafin cair III (masing-masing selama 1 jam didalam oven). *Embedding* dilakukan dengan cetakan yang didalamnya berisi paraffin cair. Blok parafin yang sudah membeku dipasang pada mikrotom dan diatur agar posisinya sejajar dengan posisi pisau. Blok parafin dipotong dengan ketebalan 4 $\mu$ m. Pada awal pemotongan dilakukan *trimming* karena jaringan yang terpotong masih belum sempurna. Sediaan disimpan dalam inkubator dengan suhu 37°C selama semalam lalu siap diwarnai dengan pewarnaan HE (Wati dkk., 2013).

#### **4.6.4.2 Pewarnaan *Hematoksilin – Eosin***

Pewarnaan *Hematoksislin – Eosin* dilakukan dengan menggunakan zat pewarna hematoksilin untuk memberi warna biru

pada inti sel (basofilik) serta eosin yang merupakan *counterstaining hematoksin* yang digunakan untuk memulas sitoplasma sel dan jaringan penyambung dan memberikan warna merah muda. Proses awal yaitu deparafinisasi dengan menggunakan *xylol* lalu dilanjutkan dengan proses rehidrasi dengan menggunakan alkohol absolut (I, II, III), alkohol 95%, 90%, 80%, dan 70% secara berurutan masing-masing selama 5 menit. Sediaan dicuci dengan air mengalir selama 15 menit dan dilanjutkan dengan aquades selama 5 menit. Sediaan diwarnai menggunakan pewarna *Hematoksin* selama 10 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 30 menit dan aquades selama 5 menit. Setelah sediaan diwarnai, dilakukan dehidrasi dengan alkohol 70%, 80%, 90%, 95% masing-masing selama beberapa detik dan dilanjutkan dengan alkohol 100% I, II, dan III masing-masing 2 menit. Langkah yang selanjutnya dilakukan yaitu proses *clearing* dengan *xylol* I, II, III selama 3 menit dan ditutup dengan *cover glass* (Jusuf, 2009).

Preparat organ kolon diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya *Olympus BX51*. Bagian yang diamati yaitu perubahan pada mukosa yang meliputi diskusasi epitel, kerusakan vili, pelebaran lamina propria, sel goblet dan adanya infiltrasi sel radang pada kolon yang mengalami IBD dan perbaikan histopatologi kolon hasil terapi tepung tapioka.

## 4.6.5 Pengukuran Aktivitas Enzim Protease

### 4.6.5.1 Isolasi Protein Kolon

Proses diawali dengan penimbangan organ kolon sebanyak 0,5 gram lalu dipotong kecil-kecil dan ditambah sedikit pasir kuarsa lalu digerus dengan mortar dingin yang diletakkan diatas balok es. Setelah itu, homogenate ditambahkan larutan PBS-Tween : PSMF (9:1) sebanyak 1 mL dan dipindahkan kedalam tabung *effendorf* steril. Kemudian disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 6000 rpm dan disonikasi selama 10 menit dengan sonikator. Supernatan diambil dan ditambah etanol absolut dingin dengan perbandinga 1:1 dan dibiarkan selama semalam hingga terbentuk endapan. Setelah itu disentrifugasi kembali selama 15 menit dengan kecepatan 10.000 rpm, dibuang supernatan dan dikeringkan sampai bau etanol hilang. Kemudian endapan ditambah larutan 0,02 M Tris – HCl pH 6,5 dingin dengan perbandingan volume 1:1 (Walter, 1984).

### 4.6.5.2 Pembuatan Kuva Baku Tirosin

Langkah awal dalam pembuatan kurva baku tirosin yaitu disiapkan labu uur dan masing-masing diisi larutan baku tirosin 20 ppm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mL untuk kosentrasi 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 ppm. Selanjutnya ditambah aquades sampai tanda batas kemudian tabung ditutup dengan alumuium foil lalu dikocok. Selanjutnya diukur absorbansinya pada masing-masing

konsentrasi larutan baku pada panjang gelombang maksimum. Blanko yang digunakan yaitu aquades.

#### 4.6.5.3 Pengukuran Aktivitas Protease

Langkah awal yang harus dilakukan yaitu mencampurkan kasein 500 ppm sebanyak 200  $\mu$ L, 300  $\mu$ L larutan buffer fosfat pH 7 dan 100  $\mu$ L enzim protease lalu diamkan 60 menit pada suhu 37°C diatas incubator. Kemudian ditambahkan 400  $\mu$ L larutan TCA 4% didiamkan selama 30 menit pada suhu 27°C (suhu kamar). Selanjutnya disentrifus dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil 300  $\mu$ L dan diencerkan 5 kali volume sampel dengan buffer fosfat lalu diukur nilai absorbansinya pada  $\lambda$  maks tirosin sebesar 275 nm. Blanko yang digunakan dibuat dengan prosedur yang sama dengan penentuan aktivitas , tetapi untuk perlakuan penambahan TCA dilakukan secepatnya setelah penambahan larutan enzim. Pengukuran enzim protease dilakukan berdasarkan metode walter (1984) dengan rumus :

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{[\text{Tirosin}]}{\text{Mr Tirosin}} \times \frac{v}{pxq} \times fp$$

Dimana : v = volume total sampel (mL)

q = waktu inkubasi (mL)

fp = faktor pengenceran

p = jumlah enzim (mL)

#### 4.7 Analisa Data

Parameter yang digunakan pada penelitian ini yaitu perubahan kadar aktivitas enzim protease yang dianalisis menggunakan Analisa Ragam ANOVA dan uji lanjutan *Tukey* atau BNJ (Beda Nyata Jujur)  $\alpha < 0,05$  untuk mengetahui dan menganalisa perbedaan antar kelompok perlakuan. Analisa data histopatologi dilakukan secara kualitatif dalam bentuk deskriptif (Kusumaningrum, 2008).



## BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

*Inflammatory Bowel Disease* merupakan penyakit pada saluran pencernaan yang masih belum diketahui pasti penyebabnya. Faktor genetik, gangguan sistem imun, faktor eksogen, dan peranan flora normal adalah etiopatogenesis yang mempengaruhi IBD. Gejala klinis yang ditampakkan dari *Ulcerative colitis* (UC) dan *Crohn's disease* (CD) sangat bervariasi dan sulit dibedakan. Gejala klinis yang tampak selama penelitian yaitu diare, nyeri pada bagian abdomen, dan penurunan berat badan (Danese and Fiocchi, 2006).

Indometasin dapat diinduksikan pada hewan model IBD via subkutan dengan dua kali pemberian selama dua hari berturut-turut dengan dosis 7,5 mg/kg BB (Randhawa *et al.*, 2014). Sedangkan dosis yang dipakai pada induksi pada hewan model IBD pada penelitian ini adalah 15 mg/kg BB (Aulanni'am *et al.*, 2012). Dosis yang lebih tinggi digunakan pada induksi secara per oral untuk mencapai konsentrasi plasma setelah pemberian oral (Husni, 2017).

Volume pemberian indometasin diberikan dalam jumlah yang sama pada semua berat badan yaitu pada rata-rata berat badan 200 g dalam setiap kelompok perlakuan (kontrol positif, kelompok terapi 1, kelompok terapi 2, dan kelompok terapi 3) yaitu sebanyak 0,27 ml, yang seharusnya induksi diberikan dalam volume yang berbeda sesuai dengan berat badan per individu tikus (Aslam, 2003). Hal ini berdampak pada kematian tikus pada kelompok kontrol positif pada hari ke-3, ke-4, ke-6 dan ke-7 setelah induksi karena kondisi yang semakin menurun dan tidak bisa bertahan hingga hari terakhir perlakuan tanpa ada terapi.



Pemberian dosis indometasin berlebihan selain dapat menyebabkan inflamasi pada saluran pencernaan seperti menurut Bures *et al.* (2011), ternyata juga dapat menyebabkan efek yang serius yaitu kematian pada kurun waktu satu minggu. Sedangkan pada kelompok terapi 1, 2, dan 3 menunjukkan peningkatan perubahan kondisi fisik menjadi lebih baik setelah diberikan terapi tepung tapioka. Perubahan yang terjadi yaitu hilangnya nyeri pada bagian abdomen, konsistensi feses yang mendekati kondisi normal, serta berat badan yang meningkat (hampir sama dengan berat badan sebelum diinduksi indometasin).

Dilakukan nekropsi tikus yang mati pada hari ke-3, ke-4, ke-6 dan ke-7 setelah induksi. Hal ini dilakukan untuk melihat kondisi saluran pencernaan pada tikus yang mati secara spontan tanpa dilakukan dislokasi leher. Saluran pencernaan (intestine) tampak menghitam dan dilatasi lambung yang diperkirakan disebabkan dari proses autolisis (**Gambar 5.1**). Dari hasil pengamatan, disimpulkan bahwa perlu dilakukan induksi ulang pada kelompok kontrol positif yang baru sebanyak jumlah awal yaitu sebanyak 4 tikus dan dilakukan dislokasi leher setelah 24 jam sesuai dengan literatur. Hal ini dilakukan sebagai antisipasi hasil uji protease dan pemeriksaan histopatologi yang bias.



**Gambar 5.1** Gambaran saluran pencernaan tikus yang mati secara spontan



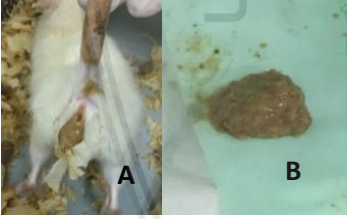


### 5.1 Pengaruh Terapi Tepung Tapioka Terhadap Feses Tikus (*Rattus norvegicus*)

Feses yang terlihat pada kelompok kontrol positif (K+) memiliki feses dengan warna kehitaman (melena) dan konsistensi yang lembek dan hampir mendekati cair. Hal ini disebabkan karena pendarahan pada lambung dan duodenum akibat pemberian indometasin. Diketahui bahwa 30% gangguan saluran pencernaan akibat pengonsumsi NSAID yang dapat mengganggu proses absorpsi mukosa, merusak mukosa dan menyebabkan cedera pada usus (Ponijan, 2011).

Kelompok terapi 1 (P1) menunjukkan konsistensi feses yang cair, namun sudah menunjukkan perubahan warna menjadi kecoklatan. Konsistensi feses yang cair dapat disebabkan sebagai mekanisme pertahanan tubuh dari kondisi inflamasi pada saluran pencernaan dengan adanya peningkatan sekresi air dan elektrolit (Fediani, 2011). Sedangkan kelompok terapi 2 (P2) dan kelompok terapi 3 (P3) memiliki tampilan feses yang hampir menyerupai feses normal pada kelompok kontrol negatif (K-) setelah terapi pada hari ke 27. Hal ini dikarenakan fungsi pati resisten pada tepung tapioka yang berfungsi sebagai *mucoprotectant*. Pati resisten tidak dapat dicerna oleh enzim pencernaan dan tahan terhadap asam lambung sehingga dapat mencapai usus besar untuk difermentasi oleh bakteri probiotik (Sajilata *et al.*, 2006; Zaragoza *et al.*, 2010). Sejumlah besar pati yang tidak dapat dicerna (RS) masuk ke dalam usus besar dan merupakan substrat yang penting bagi mikroflora kolon. Pati resisten secara selektif menstimulasi pertumbuhan atau aktivitas bakteri

anaerobik menguntungkan seperti *Bifidobacteria* dan *Lactobacillus* (Okoniewska and Witwer, 2007). Tampilan feses masing-masing kelompok perlakuan disajikan pada **Tabel 5.1**

**Tabel 5.1** Tampilan Feses Hewan Coba

Gambar	Keterangan
	Kelompok Kontrol Negatif - Feses normal - Warna coklat tua - Konsistensi tidak lembek atau tidak keras
	Kelompok Kontrol Positif - Feses tidak normal - Warna hitam - Konsistensi lembek
	Kelompok Terapi 1 (P1) - Feses tidak normal - Warna coklat muda - Konsistensi cair
	Kelompok Terapi 2 (P2) - Feses normal - Warna coklat tua - Konsistensi tidak lembek atau tidak keras
	Kelompok Terapi 3 (P3) - Feses normal - Warna coklat tua - Konsistensi tidak lembek atau tidak keras

Pati resisten secara cepat difermentasi dalam sekum dan kolon proksimal dan menghasilkan asam lemak rantai pendek (Short Chain Fatty Acids,

SCFA), khususnya asam butirat, menurunkan amoniak yang bersifat toksik melalui fermentasi pada kolon proksimal (Govers *et al.*, 1999), menurunkan jumlah asam empedu sekunder, memperbaiki saluran pencernaan dan meningkatkan penyerapan mikronutrien (magnesium dan kalsium) dalam kolon (Putra, 2010).

Asam butirat berperan penting dalam kesehatan kolon, antara lain mengatur transport cairan trans-epitelial, memperbaiki inflamasi dan stres oksidatif di mukosa kolon, memperkuat pertahanan epitel kolon, serta mengatur pertumbuhan dan diferensiasi sel. Asam lemak ini juga menurunkan pH kolon, menghambat pertumbuhan bakteri patogen, dan memulihkan keseimbangan usus dari ketidakseimbangan yang disebabkan oleh bakteri patogen (Okoniewska and Witwer, 2007). Oleh karena itu SCFA, khususnya asam butirat, mempunyai potensi untuk pencegahan inflamasi kronik pada kolon (Bassaganya-Riera *et al.*, 2011). SCFA menambah rasio sekresi PGE1/PGE2 sehingga dapat mengurangi infeksi bakteri endogen dan eksogen penyebab inflamasi, peningkatan produksi ROS, aktivitas neutrofil, dan pelepasan protease (Kumar dkk, 2007; Willemsen *et al.*, 2003).

## **5.2 Pengaruh Terapi Tepung Tapioka Terhadap Aktivitas Protease pada**

### **Kolon Tikus (*Rattus norvegicus*) IBD Hasil Induksi Indometasin**

Hasil uji aktivitas protease isolasi organ kolon tikus *Rattus norvegicus* dilakukan untuk mengetahui tingkat keparahan suatu inflamasi hasil induksi indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB dan efek perbaikan yang timbul setelah diberikan terapi tepung tapioka. Protease yaitu enzim yang dapat

menghidrolisis ikatan peptida pada protein. Fungsi enzim protease dalam tubuh yaitu berperan dalam pemecahan protein asing yang masuk dalam tubuh dan perkembangan sel (perakitan kolagen dari prokolagen, proliferasi sel yaitu kontrol proteolitik pada kematian sel yang terprogram) (Chapman, 1997).

Aktivitas protease akan meningkat dari kondisi normal pada saat inflamasi terjadi. Unit aktivitas protease dari organ kolon *Rattus norvegicus* didefinisikan sebagai banyaknya unit tirosin ( $\mu\text{mol}$ ) yang dihasilkan dari hidrolisis ikatan peptida pada kasein oleh protease hasil isolasi dari organ kolon *Rattus norvegicus* pada kondisi optimum yaitu suhu  $37^{\circ}\text{C}$ , pH 6,5 dan waktu inkubasi 60 menit (Ranuh, 2008). Hasil pengukuran aktivitas protease kolon tikus (*Rattus norvegicus*) tertera pada **Tabel 5.2**.

**Tabel 5.2** Aktivitas protease kolon tikus terapi tepung tapioka

Perlakuan	Rata-rata Aktivitas Protease ( $\mu\text{mol}$ tirosin/g enzim menit) $\pm\text{SD}$	Peningkatan Aktivitas Protease terhadap Kontrol Negatif	Penurunan Aktivitas Protease terhadap Kontrol Positif
K (-)	$0,95 \pm 0,053^{\text{a}}$	-	-
K (+)	$3,73 \pm 0,168^{\text{e}}$	292,63 %	-
P1	$2,53 \pm 0,102^{\text{d}}$	-	32,17 %
P2	$2,31 \pm 0,029^{\text{c}}$	-	38,07 %
P3	$1,24 \pm 0,036^{\text{b}}$	-	66,76%

Keterangan : Notasi a,b,c,d,e menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan dengan nilai  $p < 0,05$

Dari hasil pengujian aktivitas protease pada **Tabel 5.2**, dapat diketahui bahwa kelompok terapi 1 (P1), kelompok terapi 2 (P2), dan kelompok terapi 3 (P3) menunjukkan perubahan yang signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Namun penurunan nilai aktivitas protease pada P1,

P2, dan P3 belum mengembalikan nilai aktivitas protease seperti kelompok kontrol negatif ( $P \leq 0,05$ ). Nilai aktivitas protease pada kelompok kontrol negatif (K-) dari data pada tabel di atas digunakan sebagai standar untuk menentukan adanya perubahan nilai aktivitas protease yang terjadi akibat perlakuan. Protease tetap dihasilkan pada kelompok kontrol negatif karena secara normal diproduksi oleh tubuh. Protease dihasilkan oleh neutrofil (sel imun) pada lamina propria di lapisan mukosa kolon, menurut King (2009) dalam (Anggarini, 2011).

Kelompok tikus yang diinduksi indometasin dosis 15 mg/kg BB mengalami peningkatan nilai aktivitas protease yaitu  $3,73 \pm 0,17 \mu\text{mol/g}$  enzim menit dari kelompok kontrol negatif dengan aktivitas protease  $0,95 \pm 0,05 \mu\text{mol/g}$  enzim menit. Hasil uji statistic (*One Way ANOVA*) menggunakan SPSS 22 *for windows* nilai *p-value* ( $p < 0,05$ ) yang dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) menunjukkan adanya perbedaan yang nyata pada kelima kelompok perlakuan. Perhitungan uji statistik secara lengkap dapat dilihat pada **Lampiran 11**.

Nilai aktivitas protease pada kelompok tikus yang diinduksi indometasin dosis 15 mg/kg BB yaitu  $3,73 \pm 0,168 \mu\text{mol/g}$  enzim menit meningkat sebesar 292,63 % dari kondisi normal. Meningkatnya nilai aktivitas protease mengindikasikan bahwa terjadi inflamasi pada kolon kelompok tikus tersebut. Hal ini sesuai dengan penelitian Bures *et al.*, (2011) bahwa indometasin dosis 15 mg/kg BB dapat menyebabkan *Inflammmatory Bowel Disease* akut pada kolon karena merupakan salah satu jenis *Non Steroidal*

*Anti-Inflammatory Drugs* (NSAIDs) yang mempunyai mekanisme kerja menghambat kerja siklooksigenase (COX) yang berfungsi sebagai enzim yang mensintesis prostaglandin endogen. Penurunan produksi prostaglandin menyebabkan berkurangnya perlindungan terhadap *barrier* mukosa kolon, sehingga memudahkan invasi bakteri patogen.

Induksi idometasin dengan dosis 15 mg/kg BB dapat mengaktifkan makrofag yang berperan dalam respon imun dari mukosa kolon yang dikenali sebagai antigen luminal. Indometasin akan memicu peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang berupa radikal hidroksil (OH), hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), dan radikal nitrit oksida (NO). Senyawa tersebut memiliki elektron bebas yang tidak berpasangan dan bersifat reaktif dalam tubuh. Radikal bebas dalam tubuh pada kondisi normal akan diseimbangkan oleh antioksidan endogen tubuh yaitu *Superoxide Dismutase* (SOD). Jumlah radikal bebas yang berlebih dalam tubuh menyebabkan ketidakseimbangan dengan antioksidan endogen dan menyebabkan terjadinya stress oksidatif. Terjadinya stress oksidatif menyebabkan elektron yang bebas berusaha untuk menyeimbangkan dengan cara menyerang atom hidrogen pada makromolekul dalam jaringan seperti lemak, protein dan karbohidrat. Hilangnya atom hidrogen tersebut dapat menyebabkan ketidakseimbangan sel sehingga zat-zat disekitar sel bisa keluar masuk dan membuat kerusakan pada jaringan. Adanya kerusakan jaringan menyebabkan aktivasi neutrophil dan melepaskan enzim protease (Praptiwi, 2006).

Produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang berlebih juga dapat mengaktifkan NF-kB yang merupakan faktor transkripsi yang mengatur ekspresi sel sitokin pro-inflamator seperti TNF- $\alpha$ , IL 4, IL 12, dan IL 13. Adanya TNF- $\alpha$  yang berlebih dalam sel akan menyebabkan inflamasi dan meningkatkan aktivasi neutrophil. IL 4 dan IL 13 akan mengaktifkan sel B sehingga akan memproduksi IgE untuk mengaktifkan sel mast. Sel mast dan neutrofil yang teraktivasi akan menghasilkan protease sebagai respon terhadap adanya inflamasi (Zhang *et al.*, 2005, Campbell *et al.*, 2006). Oleh karena itu, pengukuran nilai aktivitas protease bisa digunakan sebagai indikator tingkat keparahan suatu inflamasi, semakin tinggi nilai aktivitas protease maka semakin parah keadaan inflamasinya.

Enzim protease berperan dalam perbaikan sel yang mengalami kerusakan dan membunuh bakteri pada jaringan yang mengalami inflamasi. Namun peningkatan jumlah protease pada jaringan yang mengalami inflamasi dapat menyebabkan aktivitas protease berlebih dan tidak terkendali, sehingga menyebabkan kerusakan sel. Jenis protease yang terlibat dalam kerusakan jaringan yaitu protease serin (elastase neutrofil). (Baratawidjaja, 2010). Neutrofil adalah suatu sel yang berperan pada proses inflamasi, yang fungsinya sebagai penghancur mikroorganisme dan dapat merusak sel maupun jaringan (Weiss, 1989).

Kelompok terapi P1 (0,9 mg/200 g BB), P2 (1,8 mg/ 200 g BB), dan P3 (3,6 mg/200 g BB) mampu menurunkan kadar protease yang menunjukkan adanya perbedaan yang nyata dengan notasi d pada kelompok P1, notasi c



pada kelompok P2 dan notasi b pada kelompok P3 (**Lampiran 11**). Hasil pemberian terapi tepung tapioka kelompok terapi P1(0,9 mg/200 g BB) menunjukkan kadar aktivitas protease yang menurun sebesar 32,17 % ( $2,53 \pm 0,102 \mu\text{mol/g}$  enzim menit), 38,07 % ( $2,31 \pm 0,029 \mu\text{mol/g}$  enzim menit) pada kelompok terapi P2 (1,8 mg/ 200 g BB), dan 66,76% ( $1,24 \pm 0,036 \mu\text{mol/g}$  enzim menit) dari kelompok P3 (3,6 mg/200 g BB) (**Tabel 5.2**).

Kelompok terapi 3 menunjukkan angka penurunan aktivitas protease yang paling signifikan dibandingkan dengan angka penurunan pada kelompok terapi lainnya. Penurunan kadar protease pada kelompok terapi menunjukkan adanya perbaikan inflamasi setelah pemberian terapi tepung tapioka. Penurunan aktivitas protease dikarenakan dalam larutan tepung tapioka mengandung pati resisten yang akan difermentasi oleh bakteri dalam tubuh menjadi asam lemak rantai pendek (Short Chain Fatty Acid) seperti asam format, asam asetat, asam propionate, asam valerat, dan asam butirrat. Salah satu produk SCFA yaitu asam butirrat berfungsi sebagai mukoprotektan dengan mekanisme stimulasi produksi prostaglandin oleh sehingga terjadi peningkatan produksi mukus pada lumen usus sehingga mampu melindungi lapisan lumen dari invasi bakteri patogen yang dapat memperparah kondisi inflamasi. Peningkatan produksi prostaglandin juga mampu menghambat sekresi sitokin pro-inflamasi menurut Dooper *et al* (2002). Pencegahan proses inflamasi dengan SCFA dapat mengurangi produksi ROS sehingga mampu menekan aktivitas protease yang berlebih pada kolon. Oleh karena

itu SCFA, khususnya asam butirat, mempunyai potensi untuk pencegahan inflamasi kronik pada kolon (Bassaganya-Riera *et al.*, 2011).

### 5.3 Pengaruh Terapi Tepung Tapioka Terhadap Gambaran Histopatologi

#### Kolon Tikus (*Rattus norvegicus*) IBD Hasil Induksi Indometasin

*Intestinum crissum* atau usus besar terdiri atas sekum, kolon, rektum. Kolon bertanggung jawab dalam proses penyerapan air dan nutrisi. Secara mikroskopis kolon memiliki empat tunika (tunika mukosa, tunika submukosa, tunika muskularis, dan tunika serosa).

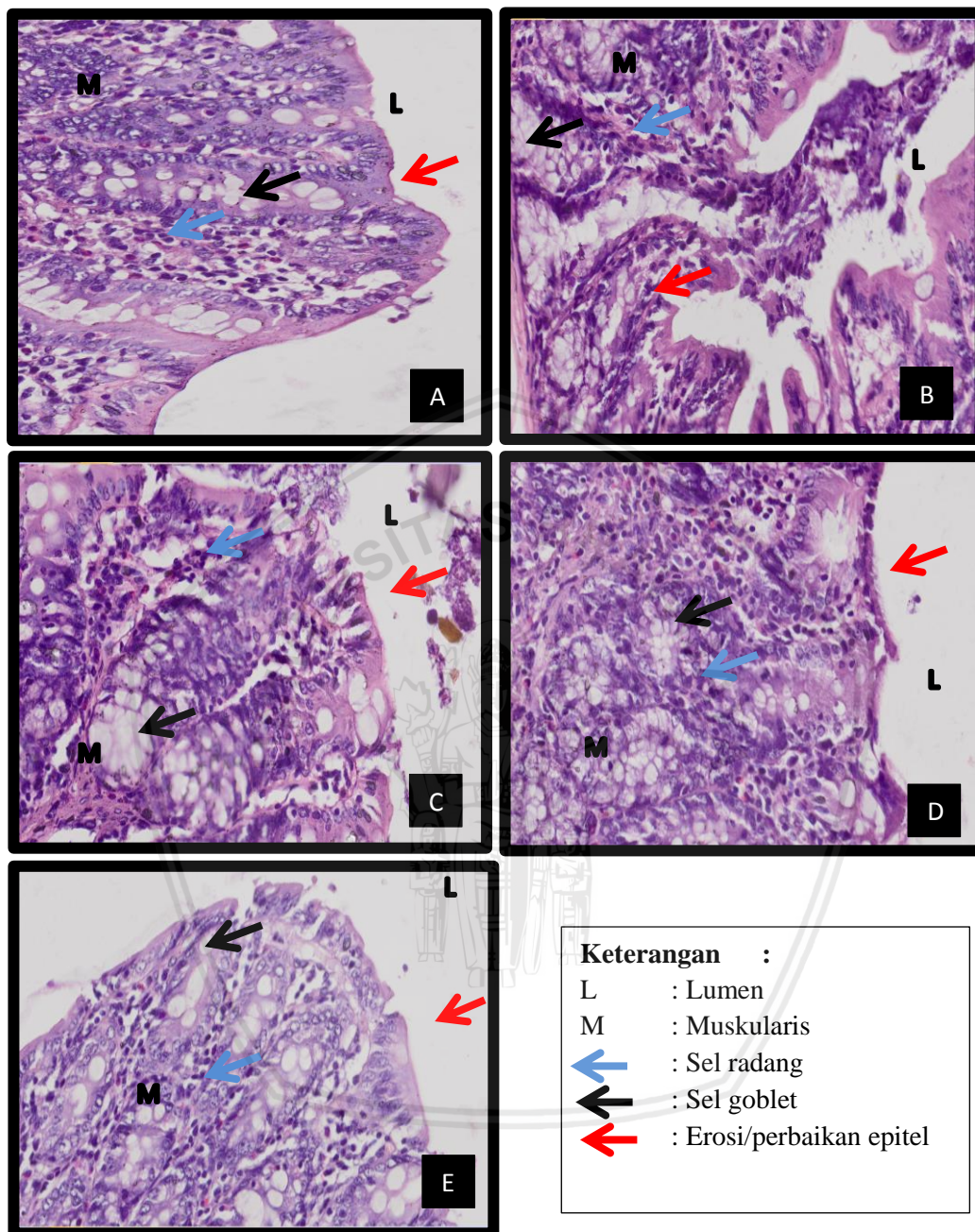
Tunika mukosa terdiri dari epitel selapis, kolumnar, kriptas dan lamina propria. Mukosa pada setiap region kolon (*proximal*, *mid* dan *distal*) memiliki karakteristik yang berbeda-beda. Pada mukosa *proximal* kolon, tampak longitudinal, mukosa *mid* kolon tampak datar, sedangkan mukosa *distal* kolon tampak longitudinal. Tidak ada vili pada tunika mukosa usus besar, namun terdapat kelenjar tubular yang dikenal dengan kriptas Lieberkuhn yang meluas hingga muskularis mukosa. Kriptas pada tunika mukosa dibatasi oleh banyak sel goblet yang berfungsi untuk sekresi mukus dan replikasi *stem cell* (Treuting *et al.*, 2018).

Lamina propria pada mukosa kolon mengandung kapiler-kapiler dan pembuluh limfatik (limfosit dan sel plasma). Selain itu, eosinofil, sel mast, dan makrofag normal berada pada lamina propria mukosa kolon, tetapi lebih sedikit dibandingkan dengan limfosit dan sel plasma. Tunika mukosa terdiri dari epitel selapis, kolumnar, kriptas dan lamina propria. Mukosa pada setiap region kolon (*proximal*, *mid* dan *distal*) memiliki karakteristik yang berbeda-

beda. Pada mukosa *proximal* kolon, tampak longitudinal, mukosa *mid* kolon tampak datar, sedangkan mukosa *distal* kolon tampak longitudinal. Tidak ada vili pada tunika mukosa usus besar, namun terdapat kelenjar tubular yang dikenal dengan kript a liberkuhn yang meluas hingga muskularis mukosa. Kript a pada tunika mukosa dibatasi oleh banyak sel goblet yang berfungsi untuk sekresi mukus dan replikasi *stem cell*). Lamina propria pada mukosa kolon mengandung kapiler-kapiler dan pembuluh limfatik (limfosit dan sel plasma). Selain itu, eosinophil, sel mast, dan makrofag normal berada pada lamina propria mukosa kolon, tetapi lebih sedikit dibandingkan dengan limfosit dan sel plasma (Treuting *et al.*, 2018). Disebelah luar tunika mukosa terdapat tunika muskularis eksterna dan tunika serosa.

Tunika submukosa terdiri dari jaringan ikat, pembuluh darah, dan saraf. Tunika muskularis terdiri dari otot polos sirkular pada lapisan dalam dan otot polos longitudinal pada lapisan luar. Lapisan tunika muskularis *distal* kolon rodensia lebih tebal dibandingkan dengan lapisan mukosa sekum. Tunika serosa terdiri dari epitel pipih selapis (mesotelium) dan jaringan ikat longgar (subserosa) (Parker and Picut, 2006).

Hasil pengamatan preparat *Hematoksin Eosin* kolon tikus dengan perbesaran 200x (Olympus Viewer for Imaging Application) pada masing-masing kelompok perlakuan dapat dilihat pada **Gambar 5.2**.



**Gambar 5.2** Gambaran histopatologi kolon tikus (*Rattus norvegicus*) dengan

pewarnaan HE (200x) (a) kelompok kontrol negatif, (b) kelompok kontrol positif, (c) kelompok terapi 1(P1), (d) kelompok terapi 2 (P2), (e) kelompok terapi 3 (P3)

Pada **Gambar 5.2 A** merupakan kontrol negatif dan dapat diamati bahwa pada lapisan mukosa tampak rapi dan teratur serta tidak mengalami erosi.

Gambar histologi ini yang dijadikan patokan adanya perubahan dan kerusakan yang terjadi pada kelompok perlakuan lain karena kelompok kontrol negatif merupakan kelompok tanpa perlakuan apapun.

Secara teori histopatologi kolon yang mengalami inflamasi dapat dilihat adanya edema di lamina propria yang disertai infiltrasi sel radang yang didominasi oleh neutrofil. Selain itu, ruang antar vili dan kriptas menjadi lebih lebar, adanya kerusakan pada lapisan mukosa, pembesaran pembuluh darah, hilangnya sel goblet dan adanya ulser (Geboes, 2003). Hasil histopatologi pada kelompok yang diinduksi indometasin (**Gambar 5.2 B**) terdapat kerusakan pada mukosa kolon sebagai indikasi terjadinya inflamasi yang ditandai dengan erosi epitel, pelebaran lamina propria, banyaknya infiltrasi sel radang dan hilangnya sel goblet (Geboes, 2003). Parameter histopatologi ini digunakan sebagai data pendukung hasil pengukuran aktivitas protease kolon yang meningkat. Kerusakan yang terjadi pada jaringan epitel dan lamina propria tampak tidak teratur pada gambaran histopatologi kolon tikus model *Inflammatory Bowel Disease* (**Gambar 5.2 B**) disebabkan karena induksi indometasin dosis 15 mg/kg BB (Lanas dan Scarpignato, 2006). Indometasin yang masuk ke dalam tubuh akan mengaktifkan makrofag, sel mast dan leukosit untuk pelepasan enzim protease dan radikal bebas yang mampu menyebabkan inflamasi dan kerusakan jaringan kolon (Baratawidjaja, 2010). Indometasin yang masuk ke dalam tubuh, akan menaktifkan sel T helper 2 (Th2) yang akan menghasilkan sitokin pro-inflamasi berupa TNF- $\alpha$ , IL 4, IL 13, yang akan menyebabkan inflamasi. Adanya inflamasi akan

menyebabkan terjadinya peningkatan vasodilatasi pembuluh darah yang akan menyebabkan semakin banyaknya sitokin pro-inflamasi masuk kedalam jaringan kolon yang mengakibatkan semakin banyak jumlah radikal bebas yang mampu merusak jaringan kolon (Baratawidjaja, 2010).

Pada **Gambar 5.2 B** terjadi infiltrasi sel radang. Menurut Mansjoer (2003), sel radang yang pertama kali keluar saat inflamasi yaitu neutrofil. Neutrofil berfungsi sebagai fagosit partikel-partikel kecil dan bertindak sebagai antimikroba. Neutrofil dapat melepaskan enzim protease yang berperan dalam penyembuhan luka, membersihkan jaringan luka yang mengalami nekrosis. Protease yang tersimpan dalam neutrofil adalah protease serin yang berfungsi menghancurkan mikroorganisme dalam sel radang tetapi juga dapat merusak sel maupun jaringan inang (Weiss, 1989). Mekanisme enzim protease merusak jaringan terjadi melalui 2 jalur yaitu melalui jalur respon langsung dan sel dendrit. Jalur pertama melalui respon langsung protease yang berikatan dengan reseptor *Protease Activated Reseptor* (PAR) dan jalur yang kedua melalui sel dendrit yang mengaktifkan sel helper 2 yang akan mengaktifkan sel B untuk memproduksi sel mast. Sel mast yang aktif mampu mengeluarkan enzim proteolitik yang dapat merusak jaringan mukosa kolon (Caughey, 2011). Menurut Jiethisia (2001), erosi pada mukosa kolon akan menyebabkan peningkatan permeabilitas epitel yang menyebabkan flora normal merusak mukosa sehingga terjadi respon inflamasi. Respon inflamasi tersebut dapat meningkatkan sitokin pro-inflamasi seperti TNF- $\alpha$ . Mukus pada saluran pencernaan yang berkurang akan menyebabkan

ketidakseimbangan flora normal dan barrier mukosa usus hilang (Ancoferiawan *et al.*, 2012).

Kelompok terapi 1 (P1) yang diinduksi indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB dan diberikan terapi tepung tapioka dosis 0,9 mg/ 200 g BB mulai terbentuk adanya lapisan epitel namun masih terlihat jelas erosi pada beberapa bagian dan masih terdapat infiltrasi sel radang sehingga belum terlihat adanya perubahan yang signifikan (**Gambar 5.2 C**). Kelompok terapi 2 (P2) yang diinduksi indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB dan diberikan terapi tepung tapioka dosis 1,8 mg/kg BB terlihat mengalami perbaikan yang cukup signifikan dengan terbentuknya epitel meskipun belum sempurna dan infiltrasi sel radang berkurang (**Gambar 5.2 D**). Kelompok terapi 3 (P3) yang diinduksi indometasin dosis 15 mg/kg BB dan diberikan terapi tepung tapioka dosis 3,6 mg/ 200 g BB terlihat mengalami perbaikan yang signifikan. Hal ini dapat terlihat dari **Gambar 5.2 E** dimana hasil histologi kolon mulai terbentuk sempurna dan infiltrasi sel radang yang sudah sangat berkurang. Kelompok terapi 3 (P3) adalah kelompok yang hasil terapinya paling mendekati kondisi kelompok kontrol negatif.

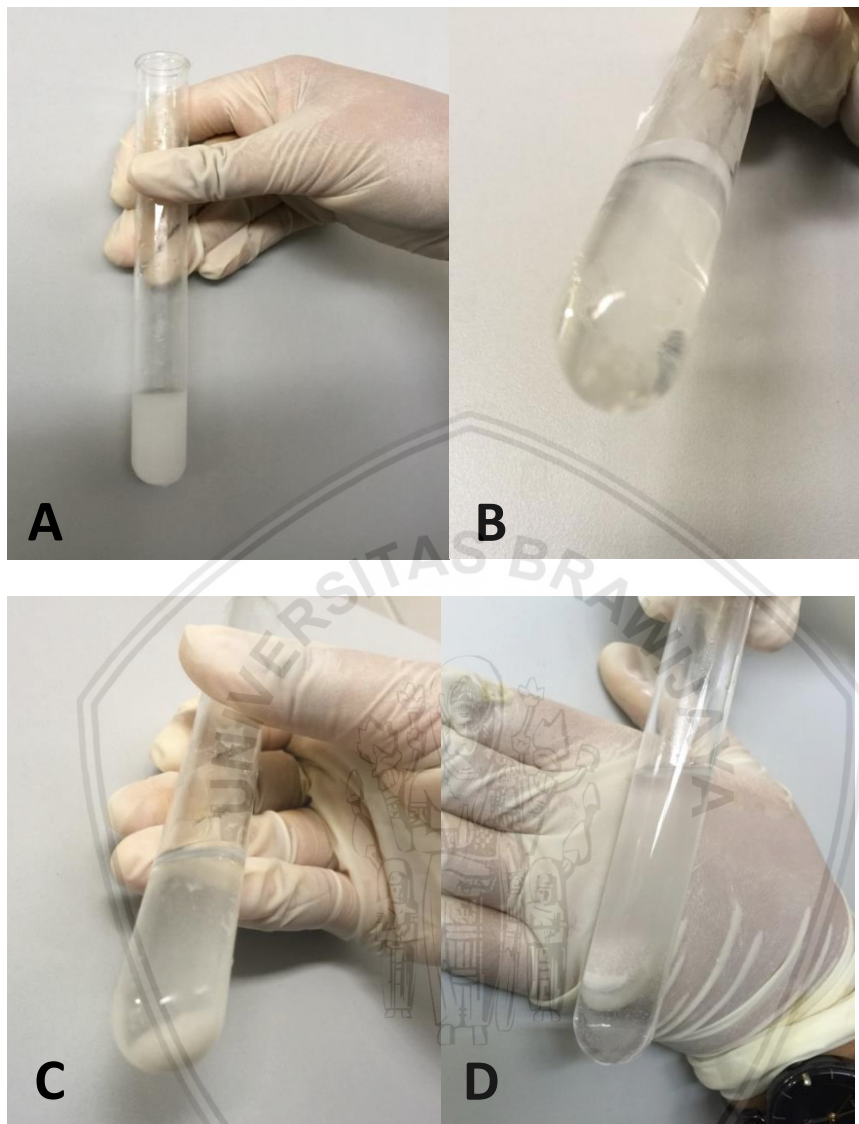
Perbaikan jaringan disebabkan karena kandungan pati resisten yang berfungsi sebagai *mucoprotectant* dengan cara difermentasi dalam kolon dan menghasilkan asam lemak rantai pendek (*Short Chain Fatty Acid*, SCFA) khususnya asam butirat. mengandung pati resisten yang akan difermentasi oleh bakteri dalam tubuh menjadi asam lemak rantai pendek (*Short Chain Fatty Acid*). SCFA (asam butirat) menstimulasi produksi prostaglandin,

sehingga terjadi peningkatan produksi mukus pada lumen usus sehingga mampu melindungi lapisan lumen dari invasi bakteri patogen yang dapat memperparah kondisi inflamasi. Penurunan invasi bakteri patogen juga dapat menurunkan produksi ROS serta stress oksidatif. Ketika stress oksidatif menurun akan mempengaruhi penurunan NF-kB dan fosforilasi inhibitor. Peningkatan produksi prostaglandin juga mampu menghambat sekresi sitokin pro-inflamasi menurut Dooper *et al* (2002). Penurunan respon inflamasi menyebabkan makrofag tidak teraktivasi sehingga sitokin pro inflamasi tidak dihasilkan. Tidak terjadi perpindahan dan aktivasi neutrofil serta pelepasan enzim protease yang akan merusak jaringan (Kumar dkk, 2007).

#### 5.4 Reaksi Asam dan Basa dengan Larutan Tepung Tapioka

Dalam penelitian ini menggunakan tepung tapioka sebanyak 0,07 gr yang dilarutkan dalam 100 ml air. Larutan tepung tapioka ini berwarna putih agak bening (**Gambar 5.3 A**), namun akan menunjukkan perubahan jika bercampur dengan cairan asam dan basa. Reaksi larutan tepung tapioka dengan cairan asam dan basa dilakukan untuk mengetahui efek yang terjadi setelah pencampuran kedua zat tersebut didalam tubuh dan dapat diuji diluar tubuh. Cairan asam yang digunakan yaitu HCl sedangkan cairan basa yang digunakan yaitu NaOH. Pada prinsipnya, reaksi asam-basa dengan larutan tepung tapioka menggunakan reaksi hidrolisa asam. Reaksi asam-basa dengan tepung tapioka dapat dilihat pada **Gambar 5.3**.





**Gambar 5.3** Larutan tepung tapioka dalam berbagai reaksi asam-basa; (a) larutan tepung tapioka, (b) larutan tepung tapioka-asam, (c) larutan tepung tapioka-basa, (d) larutan tepung tapioka-asam-basa

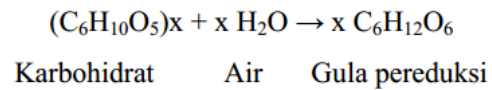
Hidrolisis asam merupakan proses pemasukan/penggantian atom  $H^+$  ke dalam gugus  $OH$  pada pati sehingga membentuk rantai yang cenderung lebih panjang dan dapat mengubah sifat-sifat psikokimia dan sifat rheologi dari pati (Pudjihastuti dan Siswo, 2011), dengan adanya distribusi gugus asetil yang menggantikan gugus  $OH$  melalui reaksi

asetilasi akan mengurangi kekuatan ikatan hidrogen di antara pati dan menyebabkan granula pati menjadi lebih mengembang (banyak menahan air), mudah larut dalam air (Adebowale dan Lawal, 2002 dalam Singh, 2004).

Hidrolisa dengan asam ini mula-mula diamati oleh Kirchoff dengan mengamati hidrolisa pati dengan adanya asam-asam mineral dan terjadi suatu transformasi bahan pati menjadi gula pereduksi. Pada umumnya asam-asam yang banyak digunakan antara lain asam klorida, asam sulfat, asam oksalat, dan asam benzenesulfonat. Dalam hal ini asam berfungsi sebagai katalisator yaitu untuk mempercepat terjadinya proses hidrolisa. Suasana asam akan mendegradasi dinding sel yang menyebabkan kerusakan struktur dan integritas granula pati sehingga menyebabkan granula pati menyerap air (Kurniawan, 2010).

Proses pembebasan granula pati ini akan menyebabkan perubahan karakteristik dari tepung yang dihasilkan berupa naiknya viskositas, kemampuan gelasi, daya rehidrasi, dan kemudahan melarut. Konsentrasi asam yang semakin besar maka akan semakin cepat reaksi hidrolisis asam pada pati. Hal ini berakibat semakin banyak pati khususnya amilosa dan amilopektin yang dipecah menjadi glukosa. Dimana semakin banyak glukosa terbentuk maka semakin banyak air yang dapat diikat. Semakin banyak air yang terikat oleh pati maka semakin banyak gel pati terbentuk sehingga viskositas naik seperti pada **Gambar 5.3 B** (Kurniawan,

2010). Reaksi yang terjadi pada hidrolisis pati adalah sebagai berikut (Yuniwati, dkk., 2011):



Menurut Kesselmans dkk (2004) dalam Pudjihastuti dan Siswo (2011) menjelaskan bahwa pH yang rendah mempunyai pengaruh pada penambahan gugus karbonil (C=O) dan gugus karboksil pati (C=O-O-H). Gugus karbonil sangat berpengaruh terhadap proses degradasi amilosa, semakin meningkatnya degradasi amilosa maka pasta yang terbentuk akan semakin sedikit dan akan terjadi pengendapan (**Gambar 5.3 C**). Larutan alkali encer, seperti halnya larutan asam, larutan alkali encer hanya bersifat sebagai katalisator saja. Sedangkan larutan alkali pekat yang diberikan dalam jumlah cukup hanya dengan tujuan untuk mengikat asam yang terbentuk (James G. Speight, 2002)

Sedangkan jika pati berada pada kondisi asam dan basa dalam 1 waktu, akan terbentuk sekat antara cairan putih dan bening pada tabung reaksi (**Gambar 5.3 D**). Tidak terlihat adanya gumpalan maupun endapan pada dasar tabung reaksi dikarenakan pH netral yang dibuat oleh kedua cairan tersebut. Hasil penelitian ini menyimpulkan bahwa depolimerisasi dari pati teroksidasi lebih optimal pada kondisi asam daripada kondisi basa (Parovuori *et al.*, 1995).

## 5.5 Sukralfat

Sukralfat adalah obat oral gastrointestinal pertama yang diindikasikan untuk mengobati duodenal ulcer aktif. Sukralfat juga digunakan untuk mengobati Gastroesophageal Reflux Disease (GERD) dan stress ulcer. Sukralfat adalah sucrose sulfate-aluminum complex atau disebut juga garam aluminium dari sukrose sulfat yang mengikat asam hydrochloric di dalam lambung dan bekerja seperti buffer asam dengan sifat sitoprotektif (Basuki, 2008).

Sukralfat adalah sitoprotektor atau mukoprotektor yang melindungi ulkus terhadap difusi asam, pepsin dan garam empedu (proteksi lokal). Sukralfat mempunyai efek sitoproteksi pada mukosa lambung melalui 2 mekanisme yang terpisah, yakni (a) melalui pembentukan prostaglandin endogen dan (b) efek langsung meningkatkan sekresi mukus (Setiawati, 1992).

Sukralfat menyembuhkan tukak dengan 3 cara, yaitu (1) membentuk kompleks kimiawi yang terikat pada pusat ulkus sehingga merupakan lapisan pelindung; (2) menghambat aksi asam pepsin dan garam empedu; dan (3) menghambat difusi asam lambung. Penelitian menunjukkan bahwa sukralfat dapat berada dalam jangka waktu lama dalam saluran cerna sehingga menghasilkan efek obat yang panjang. Cara kerja sukralfat adalah dengan membentuk selaput pelindung di dasar ulkus untuk mempercepat penyembuhan (Basuki, 2008).

Sukralfat adalah substansi yang bekerja lokal pada lingkungan asam ( $\text{pH} < 4$ ). Mekanisme kerjanya belum jelas, kemungkinan melalui pelapisan

permukaan ulkus dimana anion sukralfat berikatan dengan kutub positif molekul protein pada dasar ulkus. Sukralfat bereaksi dengan asam hidroklorik dalam lambung membentuk sebuah *cross-linked* yang memiliki konsistensi kental seperti bahan perekat yang mampu bereaksi sebagai buffer asam untuk waktu yang lama, yaitu 6-8 jam setelah dosis tunggal. Sukralfat mengikat protein (albumin dan fibrinogen) pada permukaan ulkus dengan stabil dan tidak dapat dipecahkan atau tahan terhadap hidrolisis pepsin. Perlindungan fisik atau kompleks itu bersifat melindungi permukaan ulkus dan mencegah kerusakan lebih lanjut oleh asam, pepsin dan empedu.

Mekanisme kerja sukralfat dengan terapi tepung tapioka memiliki perbedaan meskipun fungsinya sama yaitu sebagai mukoprotektan. Kedua terapi dapat bekerja secara optimal pada pH asam, terbukti dengan terjadinya penggumpalan tepung tapioka pada suasana basa dan penggumpalan sukralfat pada lambung. Sukralfat akan bereaksi dengan asam hidroklorik dalam lambung membentuk sebuah *cross-linked* yang memiliki konsistensi kental seperti bahan perekat yang mampu bereaksi sebagai buffer asam untuk waktu yang lama serta ada kemungkinan dapat menstimulasi peningkatan protaglandin E2 (Basuki, 2008). Sedangkan asam butirat yang dihasilkan dari fermentasi pati resisten akan langsung terserap oleh epitel (miofibroblas subepitelial dan sel epitel usus yang akan mendukung ekspresi enzim siklooksigenase 1 (COX-1) serta akan meningkatkan produksi prostaglandin (Willemsen *et al*, 2003).

## BAB VI PENUTUP

### 6.1 Kesimpulan

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :

1. Pemberian terapi tepung tapioka mampu menurunkan aktivitas protease kolon secara signifikan pada hewan coba tikus model *Inflammatory Bowel Disease* hasil induksi indometasin.
2. Pemberian terapi tepung tapioka mampu memperbaiki kerusakan histopatologi kolon secara signifikan pada hewan coba tikus model *Inflammatory Bowel Disease* hasil induksi indometasin.

### 6.2 Saran

Penelitian selanjutnya dilakukan penelitian mengenai :

1. Menguji kandungan *resistant starch* pada tepung tapioka
2. Meningkatkan dosis pemberian terapi tepung tapioka agar hasil bisa lebih mendekati kadar normal aktivitas protease
3. Pengukuran dosis maksimum pemberian terapi tepung tapioka sebagai terapi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Achkar, J. P. 2000. *Inflammatory Bowel Disease*. The American College of Gastroenterology. [www.acg.gi.or](http://www.acg.gi.or). [9 Februari 2019]
- American Cancer Society, 2014. Cancer facts and figures. <http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/cancerfactsfigures2014/index>. [9 Februari 2019]
- Ancoferiawan, R. Aulanni'am, dan Dyah K. W. 2012. *Studi Terapi Ekstrak Etanol Akar Seledri (Apium graveolens) Terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) dan Gambaran Histopatologi Ileum Tikus (Rattus norvegicus) Model Inflammatory Bowel Disease (IBD) Hasil Induksi Indometasin*. Universitas Brawijaya. Malang. <https://fkh.ub.ac.id/wp-content/uploads/2012/10/7.-Randi-Ancoferiawan.pdf>. [24 Januari 2019]
- Anggarini, Wahyu. 2011. *Pengaruh Pemberian Yogurt Sinbiotik Berbasis Probiotik Indigenus Terhadap Profil Histologi Dan Kandungan Immunoglobulin A (Iga) Usus Halus Tikus Percobaan*. [Skripsi]. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor. Bogor. <https://repository.ipb.ac.id/bitstream/handle/123456789/47502/F11wan.pdf?sequence=1>. [16 Maret 2019]
- Armitage, D. 2004. *Rattus novergicus*. Animal Diversity Web Online. At : [//animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/Rattus\\_novergicus/](http://animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/Rattus_novergicus/). [9 Februari 2019]
- Aslam, M., Chik K. T., Adji, P. 2003. *Farmasi Klinis (Clinical Pharmacology)*. PT Elex Media Komputindo. Jakarta.
- Association of Official Analytical Chemist (AOAC). 2005. *Official Methods of Analysis*. Washington, DC. [https://www.researchgate.net/publication/292783651\\_AOAC\\_2005](https://www.researchgate.net/publication/292783651_AOAC_2005). [2 Maret 2019]
- Astawan 2009. *Macam-Macam Jenis Tepung Terigu*. Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Diponegoro. Semarang.
- Aulanni'am., A. Roosdiana, and N.L. Rahmah. 2012. *The Potency of Sargassum Duplicatum Bory Extract on Inflammatory Bowel Disease Therapy in Rattus novergicus*. Journal of Life Sciences 6: 144-154. DOI: 10.13140/2.1.1481.7925. [1 Februari 2019]
- Authimoolam, S.P.; Dziubla, T.D. 2016. Biopolymeric mucin and synthetic polymer analogs: Their structure, function and role in biomedical

applications. *Polymers*, 8(3), 71. <https://doi.org/10.3390/polym8030071>. [25 Maret 2019]

Baratawidjaja, K.G dan Rengganis, I. 2010. *Imunologi Dasar*, Edisi IX. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran UI : Yogyakarta.

Basivireddy, J., M. Jacob, R. Prabhu, A. B. Pulimood, and K. A. Balasubramanian. 2002. *Indometachin-induced Free Radical Mediated Changes in The Intestinal Brush Border Membranes*. *Biochem. Pharmacol.* 65:683-695. DOI: [10.1016/S0006-2952\(02\)01616-7](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(02)01616-7). [17 April 2019]

Bassaganya-Riera, J, Diguardo, M., Viladomiu, M., de Horna, A., Sanchez., S., Einerhand, A. WC., Sanders, L. dan Hontecillas, R. 2011. *Soluble Fibers and Resistant Starch Ameliorate Disease Activity in Interleukin-10 Deficient Mice With Inflammatory Bowel Disease*. *The Journal of Nutrition*. 141 : 1318-1325. doi: 10.3945/jn.111.139022. [27 Maret 2019]

Basuki, Triono. 2008. *Efektifitas Sukralfat dalam Menghambat Gastritis Akibat Penggunaan Asam Asetil Salisilat pada Tikus Putih (Rattus norvegicus)*. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor. Bogor. <https://repository.ipb.ac.id/jspui/bitstream/123456789/3464/4/B08tba.pdf>. [22 Januari 2019]

Berry, CS. 1986. *Resistant Starch: Formation and Measurement of Starches that Survives Exhaustive Digestion with Amylolytic Enzymes During The Determination of Dietary Fiber*. Didalam: AA Saguilan, E-Flores-Huichocea, J Tovar, F Gracia-Suarez, F Gutierrez-Meraz, LA Bello-Perez. *Resistant Starch-rich Powders Prepared by Autoclaving of Native and Lintnerized Banana Starch: Partial Characterization*. *J Starch* 57:405-412. <https://doi.org/10.1002/star.200400386>. [29 April 2019]

Bowen R. 2006. *Pathophysiology of Diarrhea*. <http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/pathphys/digestion/smallgut/diarrhea.html>. [30 Mei 2019]

Bures, J. J. Pejchal, J. Kvetina, A. Tichy, S. Rejchrt, M. Kunes, and M. Kopacova. 2011. *Morphometric Analysis of The Porcine Gastrointestinal Tract in a 10-day High Dose Indomethacin Administration with or without Probiotic Bacteria Escherichia Coli Nissle 1917*. *Human and Experimental Toxicology* 30(12) 1955-1962. doi: 10.1177/0960327111403174. [14 Januari 2019]

Campbell K. J. and N. D. Perkins. 2006. *Regulation of NF-kappaB Function*. *Biochem Soc Symp.* 73:165-180. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16626297>. [9 Februari 2019].



- Chapman H. A, R. J. Riese, G. P. Shi. 1997. *Emerging Roles for Cysteine Protease in Human Biology*. *Annu Rev Physiol*. 1997;59:63-88. DOI:[10.1146/annurev.physiol.59.1.63](https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.59.1.63). [12 Februari 2019]
- Caughey, G. H. 2011. *Mast Cell Protease as Protective and Inflammatory Mediators*. Department of Medicine, University of California San Fransisco. USA. doi: [10.1007/978-1-4419-9533-9\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9533-9_12). [11 April 2019]
- Danese, S. and Fiocchi, C. 2006. *Etiopathogenesis of Inflammatory Bowel Disease*. *World J Gastroenterol*. 12(30): 4807-4812. DOI:[10.3748/wjg.v12.i30.4807](https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i30.4807). [10 Januari 2019]
- Dellmann, H.D. and E.M. Brown. 1993. *Buku Teks Histologi Veteriner, Edisi Ketiga*. UI. Press. Jakarta.
- Eerlingen, RC and Delcour, JA. *Formation, Analysis, Structure and Properties of Type 3 Enzyme Resistant Starch*. *Journal of Cereal Science* 22: 129-138. [https://doi.org/10.1016/0733-5210\(95\)90042-X](https://doi.org/10.1016/0733-5210(95)90042-X). [8 Mei 2019]
- Faraj A, Vasanthan T, Hoover R. 2004. *The effect of extrusion cooking on resistant starch formation in waxy and regular barley flours*. *Food Res Int*. 37(5):517-25. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2003.09.015>. [14 Februari 2019]
- Fediani, T. 2011. *Hubungan Tingkat Pengetahuan Ibu dengan Tindakan Ibu Terhadap Kejadian Diare pada Balita di Kelurahan Tanjung Sari*. Universitas Sumatra Utara. <http://repository.usu.ac.id/handle/123456789/31092>. [30 Januari 2019]
- Galliard T. 1998. *In starch: properties and potential*. Chichester, U.K.: John Wileyand Sons. <https://doi.org/10.1002/star.19870391023>. [27 Mei 2019]
- Geboes, K. 2003. *Histopathology of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis*. *J Clin Pathol* (18): 255-276. [https://www.researchgate.net/publication/242114322\\_Histopathology\\_of\\_Crohn's\\_disease\\_and\\_ulcerative\\_colitis](https://www.researchgate.net/publication/242114322_Histopathology_of_Crohn's_disease_and_ulcerative_colitis). [19 Januari 2019]
- Govers MJAP, Gannon NJ, Dunshea FR, Gibson PR, Muir JG. 1999. *Wheat Bran Affects The Site of Fermentation of Resistant Starch and Luminal Indexes elates to Colon Cancer Risk : A Study in Pigs*. *Gut* 45 : 840-847. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1727739/pdf/v045p00840.pdf>. [23 Januari 2019]

- Haralampu SG. 2000. *Resistant Starch-a review of the physical properties and biological impact of RS type 3*. Carbohydrate Polymer (41):285-292. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(99\)00147-2](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(99)00147-2). [13 Mei 2019]
- Hernández O, Emaldi U, Tovar J. 2008. *In vitro digestibility of edible films from various starch sources*. Carbohydrate Polymers. 71:648-655. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.07.016>. [14 April 2019]
- Hofstetter, J., Suckow, M. A., and Hickman D.L., 2005. *Morphophysiology* didalam : Suckow M.A., Weisbroth S.H., Franklin C.L., editor. *The Laboratory Rat*. Second edition. USA : Elsevier.
- Husni, Alicia IDP. 2017. *Teknik Meningkatkan Kelarutan Obat*. Artikel Tinjauan. Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran. Bandung. <https://doi.org/10.24198/jf.v15i4.14684.g7468>. [15 Februari 2019]
- Jain K. Naveen, Kulkarni K. S., and Singh Amarjit. 2002. *Acute Studies on Safety Index of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs in Rats*. Inflammopharmacology, Vol 9, No. 3, pp. 229-240. <https://doi.org/10.1163/156856001760209770>. [29 Mei 2019]
- Jenkins, P. J., Cameron, R. E., & Donald, A. M. 1993. *A universal feature in the structure of starch granules from different botanical sources*. Stärke, 45(12), 417-420. <http://dx.doi.org/10.1002/star.19930451202>. [30 Januari 2019]
- Jiesthisia, N. P. 2016. *Efek Sari Kukusan Brokoli (Brassica oleracea L var Italica) terhadap Derajat Diare Mencit Model Colitis-Associated Colorectal Cancer*. Universitas Marantha. Bandung. <https://id.123dok.com/document/y96rxnwy-efek-sari-kukusan-brokoli-brassica-oleracea-l-var-italica-terhadap-derajat-diare-mencit-model-colitis0associated-colorectal-cancer.html>. [18 Mei 2019]
- Ju, C. and J. P. Utrecht. 1998. *Oxidation of anMetabolitebof Indomethacine (Desmethyldeschlorobenzoylindomethacin) to Reactive Intermediates by Activated Neutrophils, Hypochlorous Acid, and The Myeloperoxidase System*. The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutic 26 (7):676-680. DOI:[10.1021/tx960190k](https://doi.org/10.1021/tx960190k). [25 Februari 2019]
- Junqueira LC, Carneiro J . 2007. *Histologi Dasar*. 10th ed. Jakarta: EGC.
- Jusuf, A. A.. 2009. *Histoteknik Dasar*. Bagian Histologi Fakultas Kedokteran.

- Kappelman, M., S.L. Rifas-Shiman, and K. Kleinman. 2007. *The Prevalence and Geographic Distribution of Crohn's disease and Ulserative Colitis in the United States*. Clin Gastrointestinal hepatol 5: 1424: 9. DOI:[10.1016/j.cgh.2007.07.012](https://doi.org/10.1016/j.cgh.2007.07.012). [6 Januari 2019]
- Kaser, A., S. Zeissig, and R. S. Blumberg. 2010. *Inflammatory Bowel Disease*. Annu. Rev. Immunol. 28:573-621. DOI:[10.1146/annurev-immunol-030409-101225](https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101225). [5 Mei 2019]
- Katharani, A., D. Werling, and K. Allenspach. 2011. *Canine Breeds at High Risk of Developing Inflammatory Bowel Disease in The South-Eastern UK*. Vet Rec; 169(24):635
- Kim MJ, Choi SJ, Shin SI, Sohn MR, Lee CJ, Kim Y, et al. 2008. *Resistant glutarate starch from adlay: Preparation and properties*. Carbohydrate Polymers. 74:787-796. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.04.043>. [28 April 2019]
- Klurfeld, D.M. 1999. *Nutritional Regulation of gastrointestinal Growth*. <http://www.bioscience.org>. [9 Februari 2019]
- Korpacka, M. K., K. Neubauer, and M. Matusiewicz. 2009. *Platelet-derived Growth Factor-bb Reflects Clinical, Inflammatory Bowel Disease*. Clinical Biochemistry. 42; 602-1609. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2009.08.002. [8 Januari 2019]
- Kumar, V., S.C. Ramzi, dan R. L. Stanley. 2007. *Robins Buku Ajar Patologi*. Volume 1. Edisi 7. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. Hal. 35-64.
- Kurniawan, Sandra. 2010. *Pengaruh Lama Fermentasi dan Konsentrasi Ca(OH)<sub>2</sub> untuk Perendaman terhadap Karakteristik Tepung Mocaf (Modified Cassava Flour) Varietas Singkong Pahit (Pandemir L-2)*. Skripsi. Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Universitas Sebelas Maret. Surakarta. <https://digilib.uns.ac.id/dokumen/download/13408/MjgwNjk=/Pengaruh-lama-fermentasi-dan-konsentrasi-CaOH2-untuk-perendaman-terhadap-karakteristik-tepung-mocaf-modified-cassava-flour-varietas-singkong-pahit-pandemir-l-2-abstrak.pdf>. [6 Februari 2019]
- Kusriningrum, 2008. *Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Lanas A. and C. Scarpignato. 2006. *Microbial Flora in NSAID-Induced Intestinal Damage : A Role for Antibiotics Digestion*;73(Suppl.1):136-150. DOI: [10.1159/000089789](https://doi.org/10.1159/000089789). [19 Februari 2019]

- Lehninger AL. 1993. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jilid 1. Thenawidjaja M, penerjemah; Jakarta : Erlangga. Terjemahan dari : *Principles of Biochemistry*.
- Loroux, F., S. Pavlick, R. E. Wolf and M. B. Grismam. 2001. *Dysregulation of Intestinal Mucosal Immunity : Implication in Inflammatory Bowel Disease*. *New Physiol Sci*. 16: 272-277. <https://doi.org/10.1152/physiologyonline.2001.16.6.272>. [8 Februari 2019]
- Luthana, Y. K. 2008. *Maltodekstrin*. <http://www.yongkikastanyaluthana.wordpress.com>. [9 Februari 2019]
- Mansjoer, S. 2003. *Mekanisme Kerja Obat Antiradang*. <http://www.library.usu.ac.id/download/fk/farmasi-soewarni.pdf>. [14 April 2019]
- Mark, H. A. 2013. *Embryology Gastrointestinal Tract – Colon Histology*. UNSW CRICOS Provider Code No. 00098G.
- Merck and Co., Inc. 2005. *Capsules, Oral Suspension, and Suppositories Indocin*. U.S. Food and Drug Administration. <https://www.fda.gov/media/111483/download>. [24 Juni 2019]
- Naiola, E. dan N. Widhyastuti. 2007. *Semi Purifikasi dan Karakterisasi Enzim Protease*. *Jurnal Penelitian Hayati*. 13 (51-56). DOI: [10.23869/bphjbr.13.1.20078](https://doi.org/10.23869/bphjbr.13.1.20078). [19 Mei 2019]
- Neuman, M. G. 2004. *Signaling for Inflammation and Repair in Inflammatory Bowel Disease*. *Romanian Journal of Gastroenterology*. 13(4) : 309-316. [https://www.researchgate.net/publication/8106960\\_Signaling\\_for\\_inflammation\\_and\\_repair\\_in\\_inflammatory\\_bowel\\_disease](https://www.researchgate.net/publication/8106960_Signaling_for_inflammation_and_repair_in_inflammatory_bowel_disease). [20 Februari 2019]
- Nugent AP. 2005. *Health properties of resistant starch*. *British Nutrition Foundation Bull*. 30:27-54. <https://doi.org/10.1111/j.1467-3010.2005.00481.x>. [17 Januari 2019]
- Okoniewska M and Witwer RS. 20007. *Natural Resistant Strach : An Overview of Helath Properties a Useful Replacement for Flour, Resistant Starch May Also Boost Insulin Sensitivity and Satiety*. *Nutritional Outlook*.
- Onyango C, Thomas B, Annette J, Thomas H, Harald R. 2006. *Influence of Incubation Temperature and Time on Resistant Starch Type III Formation From Autoclaved and Acid-Hydrolysed Cassava Starch*. *Carbohydrate Polymers* 66 : 494-499. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.04.002>. [19 Februari 2019]

- Pan, M. H, C. S. Lai, and C. T. Ho. 2010. *Anti Inflammatory Activity of Natural Dietary Flavonoid*. Food Funct 1: 15-31. DOI:[10.1039/c0fo00103a](https://doi.org/10.1039/c0fo00103a). [5 April 2019]
- Parker, G. A. and Catherine A. P. 2016. *Atlas of Histology of The Juvenile Rat*. Academic Press. United States.
- Parovuori, P., Hamunen, A., Forssell, P., Autio, K., and Poutanen, K. 1995. *Oxidation of Potato Starch by Hydrogen Peroxide*. Starch/Starke (43) : 19-23.
- Plumb, D. C. 2008. *Veterinary Drug Handbook 6<sup>th</sup> Edition*. Blackwell Publishing Professional. South State Avenue:83-937.
- Podolsky, D. K. 2002. *Inflammatory Bowel Disease*. N. ENgl. J. Med. 347(6): 417-429. DOI:[10.1056/NEJMra020831](https://doi.org/10.1056/NEJMra020831). [7 Mei 2019]
- Ponijan, A. P. 2011. *Proporsi Karakteristik Penyebab Perdarahan Saluran Cerna Bagian Atas Berdasarkan hasil Pemeriksaan Endoskopi di RSUP H. Adam Malik Medan*. Universitas Sumatra Utara. <http://repository.usu.ac.id/handle/123456789/58973>. [19 Januari 2019]
- Pudjihastuti, Isti dan Siswo, Sumardiono. 2011. *Pengembangan Proses Inovatif Kombinasi Reaksi Hidrolisis Asam dan Reaksi Photokimia UV untuk Produksi Pati Termodifikasi dari Tapioka*. Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia Kejuangan ISSN 1693 – 4393: 1 – 6. <http://eprints.undip.ac.id/25192/1/isti.pdf>. [5 Februari 2019]
- Putra, R. P. 2010. *Pati Resisten dan Sifat Fungsional Tepung Pisang Tanduk (Musa Paradisiaca Formatypica) yang Dimodifikasi Melalui Fermentasi Bakteri Asam Laktat dan Pemanasan Autoklaf [Thesis]*. Institut Pertanian Bogor, 1-134. <https://repository.ipb.ac.id/jspui/bitstream/123456789/41213/9/2010rpp.pdf>. [28 Januari 2019]
- Randhawa, P. K., Singh K., Singh N., and Jaggi S. Amteshwar. 2014. *A Review on Chemical-Induced Inflammatory Bowel Disease Models in Rodents*. Korean J Physiol Pharmacol Vol 18: 279–288. DOI : [10.4196/kjpp.2014.18.4.279](https://doi.org/10.4196/kjpp.2014.18.4.279). [25 Maret 2019]

- Ranuh, R., M. S. Subijanto., S. Ingrid., & Aulanni'am. 2008. *The Role of Probiotik Lactobacillus Plantarum IS 20506 on Occludin and Zo-1 of Intestinal Tight Junctions Rehabilitation*. Makalah Seminar Nasional Basic Science Universitas Brawijaya. Malang. <http://www.aensiweb.com/old/anas/2013/480-483.pdf>. [3 Januari 2019]
- Rao MB, Tanksale AM, Ghate MS and Deshpande VV. 1998. *Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases, Microbiology and Molecular Biology Rev, Sci Am.* 62 : 597-635. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC98927/>. [14 Januari 2019]
- Rogers, D.F. 1994. *Airway goblet cells: Responsive and adaptable front-line defenders.* Eur. Respir. J. 7,1690–1706. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7995400>. [5 Januari 2019]
- Rukmanasari, R. 2010. *Efek Ekstrak Kulit Terong Ungu (Solanum melongena L.) Terhadap Kadar LDL dan HDL Darah Tikus Putih*. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Sebelas Maret. <https://eprints.uns.ac.id/id/eprint/6468>. [15 Maret 2019]
- Sajilata MG, Singhal RS, Kulkarni PR. 2006. *Resistant starch –A review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* 5:1-17. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2006.tb00076.x>. [17 Januari 2019]
- Sanz T, Salvador A, Fiszman SM. 2008 b. *Evaluation of four types of resistant starch in muffin baking performance and relationship with batter rheology.* European Food Research & Technology. 227:813-819. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0791-9>. [23 Januari 2019]
- Saptono, H. 2014. *Terapi Perasan Buah Labu Siam (Sechium edule) terhadap Aktivitas Protease dan Gambaran Histopatologi Kolon Tikus Rattus norvegicus IBD (Inflammatory Bowel Disease) Hasil Induksi Indometasin*. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Segal, A. W.. 2005. *How Neutrophils Kill Microbes.* Annu. Rev. Immunol. 23:197-223. DOI:[10.1146/annurev.immunol.23.021704.115653](https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115653). [5 Mei 2019]
- Setiawati, Arini. 1992. *Farmakologi dan Penggunaan Terapi Obat-obat Sitoproteksi*. Cermin Dunia Kedokteran. No. 79. Hal: 29-35.

- Singh, J. S. L. K. N. 2004. *Effect of Acetylation on Some Properties of Corn and Potato Starches*. *Starch - Stärke* vol 56: 586-601. <https://doi.org/10.1002/star.200400293>. [18 Februari 2019]
- Sirois, M. 2005. *Laboratory Animal Medicine*. United of State America: Mosby. Inc. Hlm 87-115.
- Sukron, M. 2016. *Pengaruh Pemberian Sirup Tepung Kanji terhadap Integritas Epitel Mukosa Lambung*. Tesis. Universitas Islam Agung Semarang. <http://repository.unissula.ac.id/id/eprint/5050>. [19 Maret 2019]
- Syarifuddin, H dan Ruswawhandi M. 2017. *Insidensi Kholangitis Kronik sebagai Manifestasi Ekstra-intestinal Penderita IBD di RSPAD Gatot Soebroto Jakarta Pusat*. *Jurnal Profesi Medika* Volume 11 Nomor 1. <http://dx.doi.org/10.33533/jpm.v11i1.210>. [16 Februari 2019]
- Takiishi, T.; Fenero, C.I.M.; Câmara, N.O.S. 2017. *Intestinal Barrier and Gut Microbiota: Shaping Our Immune Responses Throughout Life*. *Tissue Barriers*, e1373208. doi: 10.1080/21688370.2017.1373208. [5 Januari 2019]
- Treuting, P. M., Suzanne M. D., and Kathleen S. M. 2018. *Comparative Anatomy and Histology a Mouse, Rat, and, Human Atlas Second Edition*. Academic Press. India.
- Walter H. E. 1984. *Proteinases : Method with Haemoglobin, Casein, and Azocoll as Substrate In. Bergmeyer. HU(ed)*. Methods of enzymatic analysis. VerlagChemie. Deerfield Beach Florid Basel. Germany.
- Walter, M., L. P. da Silva, and C.C. De Nardin. 2005. *Rice and Resistant Starch : Different Content Depending on Chosen Methodology*. *Journal of Food Composition and Analysis* 18:279-285, doi:10.1016/j.jfca.2004.09.007. [18 Maret 2019]
- Wati, I. P., Aulani'am dan C. Mahdi. 2013. *Aktivitas Protease dan Gambaran Histopatologi Ginjal Tikus Putih (Rattus novergicus) Pasca Induksi Cyclosporine-A*. *Kimia Student Journal*. 1(20) : 258. <http://kimia.studentjournal.ub.ac.id/index.php/jikub/article/view/175/45>. [19 Maret 2019]
- Weiss, S. J. 1989. *Tissue Destruction by Neutrophil*. *New Engl. J. med.* 320:365-375. DOI:[10.1056/NEJM198902093200606](https://doi.org/10.1056/NEJM198902093200606). [24 Mei 2019]
- Wepner B, Berghofer E, Miesenberger E, Tiefenbacher K. 1999. *Citrate starch: Application as resistant starch in different food systems*. *Starch*.

51(10):354-361.[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521379X\(199910\)51:10<354::AID-STAR354>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521379X(199910)51:10<354::AID-STAR354>3.0.CO;2-W). [19 April 2019]

Winarno, FG. 2002. *Kimia Pangan dan Gizi*. Gramedia. Jakarta.  
<http://library.um.ac.id>. [29 April 2019]

Wiryani, C., dan I Dewa N. W. 2007. *Pendekatan Diagnostik dan Terapi Diare Kronis*. Bagian Ilmu Penyakit Dalam 1 (8) : 66-78.  
<https://ojs.unud.ac.id/index.php/jim/article/view/3815>. [27 Mei 2019]

Yuksel, H. and Turkeli, A. 2017. *Airway epithelial barrier dysfunction in the pathogenesis and prognosis of respiratory tract diseases in childhood and adulthood*. Tissue Barriers, e1367458. doi: 10.1080/21688370.2017.1367458. [10 Januari 2019]


Zaragoza EF, Riquelme-navarrete MJ, Sanchez-Zapata E, Perez-Alvarez JA,. 2010. *Resistant Starch as Functional Ingredient : A Review*. Food Research International. 43(4) : 931-942/ <http://doi.org/fgpc2w>. [5 Januari 2019]

Zhang, H. Y. 2005. *Structure Activity Relationships and Rational Design Strategies for Radical Scavenging Antioxidants*. Computer Aided Drug Design. 1:257-27. DOI : [10.2174/1573409054367691](https://doi.org/10.2174/1573409054367691). [29 April 2019]

Zein U. 2004. *Diare Akut Infeksius pada Dewasa*. Fakultas Kedokteran, Universitas Sumatera Utara.  
<http://library.usu.ac.id/download/fk/penydalam-umar4.pdf>. [25 April 2019]



Lampiran 1. Sertifikat Laik Etik



**KOMISI ETIK PENELITIAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
"ETHICAL CLEARANCE"**

No: 1065-KEP-UB

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG  
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:**


**PENELITIAN BERJUDUL : EFEK PEMBERIAN TEPUNG TAPIOKA TERHADAP  
AKTIVITAS PROTEASE DAN GAMBARAN  
HISTOPATOLOGI KOLON TIKUS (*Rattus norvegicus*)  
IBD (INFLAMMATORY BOWEL DISEASE) HASIL  
INDUKSI INDOMETASIN**

**PENELITI : ZAHRANIA MARSHA AMIRA SULHERMAN**

**UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**DINYATAKAN : LAIK ETIK**

Malang, 14 Januari 2019  
Ketua Komisi Etik Penelitian  
Universitas Brawijaya



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

## Lampiran 2. Hasil Uji Aktivitas Protease Kolon Tikus



UNIVERSITAS BRAWIJAYA FAKULTAS MIPA  
JURUSAN KIMIA

Jl. Veteran, Malang 65145, Jawa Timur, Indonesia Telp : +62-341-575838, fax : +62-341-554403  
http://kimia.ub.ac.id, email : kimia@ub.ac.id

### LAPORAN HASIL ANALISIS

NO : H.13 / RT.5 / T.1 / R.0 / TT. 150803 / 2019

1. Data Konsumen
  - Nama : Zahrania Marsha Amira Sulherman
  - Instansi : Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya
  - Alamat : Jl. Puncak Dieng Malang
  - Telepon : 081333262889
  - Status : Mahasiswa-S1
  - Keperluan Analisis : Uji Kualitas
2. Sampling Dilakukan Oleh : Konsumen
3. Identifikasi Sampel
  - Nama Sampel : *Colon Tikus Putih*
  - Wujud : Padat
  - Warna : Putih Kecokelatan
  - Bau : Tidak Ada Bau
4. Prosedur Analisis : Dilakukan oleh Unit Analisis dan Pengukuran Jurusan Kimia FMIPA Universitas Brawijaya Malang
5. Penyampaian Laporan Hasil Analisis : Diambil Langsung
6. Tanggal Terima Sampel : 01 April 2019
7. Data Hasil Analisis :

No	Kode	Parameter	Hasil Analisis		Metode Analisis	
			Kadar	Satuan	Pereaksi	Metode
1	K1	Protease	0,88 ± 0,00	µmol tirosin/g enzim menit	TCA	Spektrofotometri
2	K2	Protease	2,29 ± 0,01	µmol tirosin/g enzim menit	TCA	Spektrofotometri
3	K3	Protease	0,95 ± 0,00	µmol tirosin/g enzim menit	TCA	Spektrofotometri
4	K4	Protease	2,49 ± 0,01	µmol tirosin/g enzim menit	TCA	Spektrofotometri
5	K5	Protease	1,19 ± 0,01	µmol tirosin/g enzim menit	TCA	Spektrofotometri
6	K6	Protease	2,56 ± 0,01	µmol tirosin/g enzim menit	TCA	Spektrofotometri
7	K7	Protease	0,94 ± 0,02	µmol tirosin/g enzim menit	TCA	Spektrofotometri
8	K8	Protease	1,01 ± 0,01	µmol tirosin/g enzim menit	TCA	Spektrofotometri
9	K9	Protease	3,94 ± 0,00	µmol tirosin/g enzim menit	TCA	Spektrofotometri
10	K10	Protease	1,24 ± 0,01	µmol tirosin/g enzim menit	TCA	Spektrofotometri
11	K11	Protease	2,42 ± 0,01	µmol tirosin/g enzim menit	TCA	Spektrofotometri
12	K12	Protease	1,23 ± 0,01	µmol tirosin/g enzim menit	TCA	Spektrofotometri
13	K13	Protease	2,66 ± 0,01	µmol tirosin/g enzim menit	TCA	Spektrofotometri
14	K14	Protease	2,33 ± 0,00	µmol tirosin/g enzim menit	TCA	Spektrofotometri
15	K15	Protease	3,72 ± 0,02	µmol tirosin/g enzim menit	TCA	Spektrofotometri

16	K16	Protease	2,34 ± 0,01	µmol tirosin/g enzim menit	TCA	Spektrofotometri
17	K17	Protease	2,28 ± 0,01	µmol tirosin/g enzim menit	TCA	Spektrofotometri
18	K18	Protease	3,53 ± 0,03	µmol tirosin/g enzim menit	TCA	Spektrofotometri
19	K19	Protease	1,28 ± 0,00	µmol tirosin/g enzim menit	TCA	Spektrofotometri
20	K20	Protease	3,73 ± 0,02	µmol tirosin/g enzim menit	TCA	Spektrofotometri

Catatan:

1. Hasil analisis ini adalah nilai rata-rata pengerjaan analisis secara duplo,
2. Hasil analisis ini hanya berlaku untuk sampel yang kami terima dengan kondisi sampel saat itu.



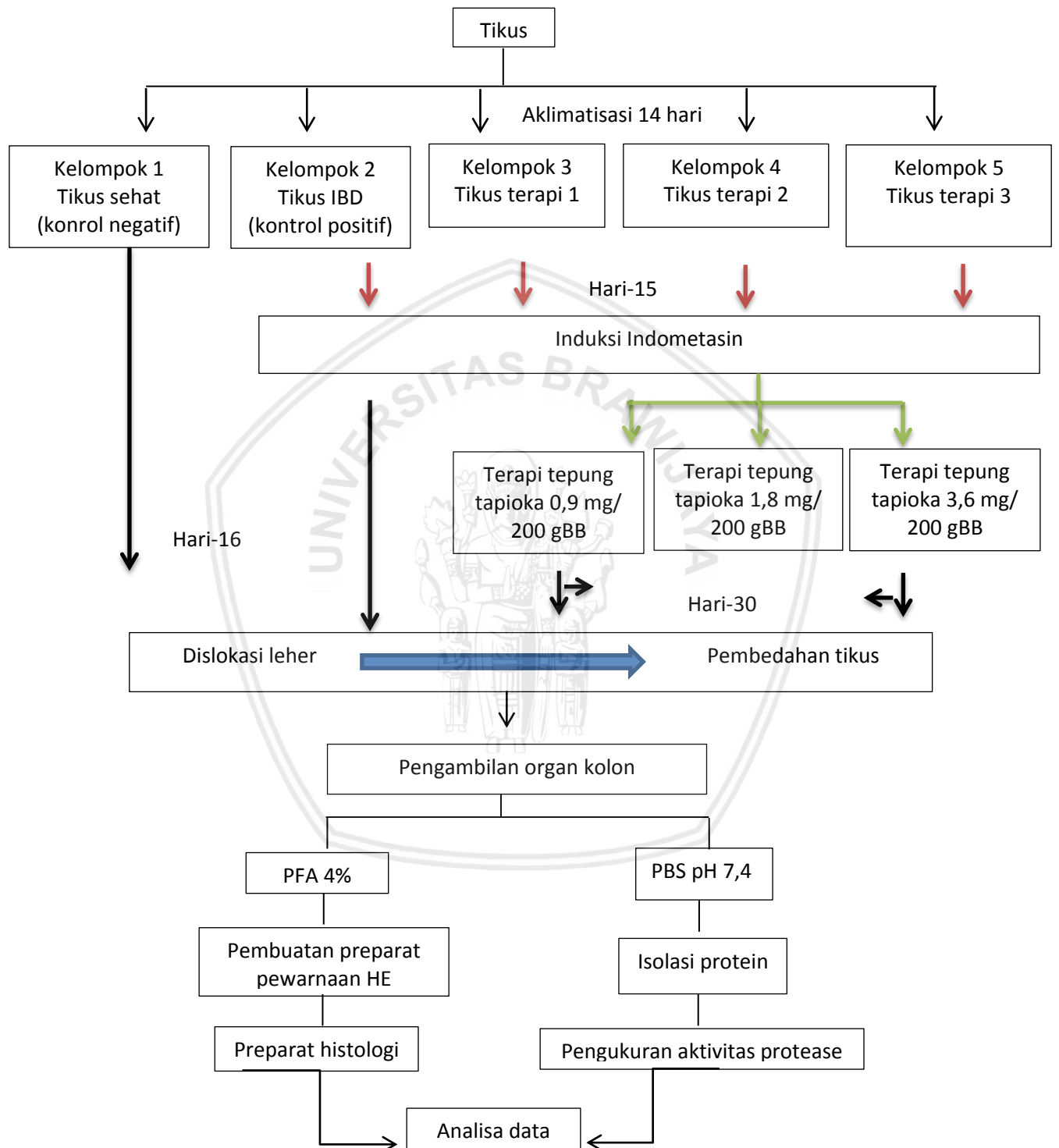
Masuri, S.Si., M.Si., Ph.D  
NIP. 19731020 200212 1 001

Malang, 06 Mei 2019

Ketua Unit Analisis dan Pengukuran,

Moh. Farid Rahman, S.Si., M.Si.  
NIP. 19700720 199702 1 001

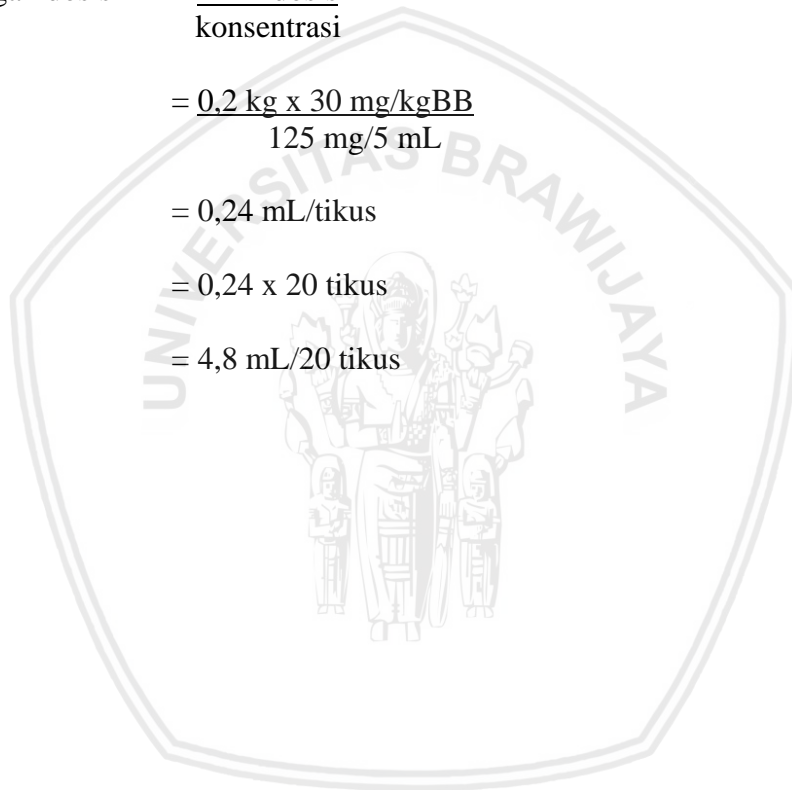
### Lampiran 3. Skema Penelitian



#### Lampiran 4. Perhitungan Dosis Obat Cacing

Dosis Pirantel Pamoat (Praziquantel) yang diberikan pada tikus dalam penelitian ini mengacu pada Plumb (2008), yaitu sebesar 30 mg/kgBB dengan pemberian secara per oral (PO). Obat cacing yang diberikan yaitu Combantrin (Pirantel Pamoat) 125 mg dalam 5 mL sebanyak 1 botol.

$$\begin{aligned}\text{Perhitungan dosis} &= \frac{\text{BB} \times \text{dosis}}{\text{konsentrasi}} \\ &= \frac{0,2 \text{ kg} \times 30 \text{ mg/kgBB}}{125 \text{ mg/5 mL}} \\ &= 0,24 \text{ mL/tikus} \\ &= 0,24 \times 20 \text{ tikus} \\ &= 4,8 \text{ mL/20 tikus}\end{aligned}$$



### Lampiran 5. Pembuatan Stok Indometasin

Dosis indometasin yang digunakan untuk induksi IBD yaitu 15 mg/kgBB. Indometasin sebanyak 45 mg dilarutkan dalam 4 ml minyak jagung. Perhitungan dosis yang digunakan untuk satu ekor tikus dengan berat badan 200 gram yaitu

- Kebutuhan indometasin =  $15 \text{ mg/kgBB} \times 0,2 \text{ kg} = 3 \text{ mg/tikus}$
- Stok indometasin yang diperlukan untuk 20 tikus yaitu  $20 \times 3 = 60 \text{ mg}$
- Pengenceran dengan minyak jagung (dalam 45 mg diencerkan 4 ml)  
$$= \frac{60 \text{ mg}}{45 \text{ ml}} \times 4 \text{ ml}$$
$$= 5,3 \text{ ml}$$
- Stok yang diperlukan untuk 20 ekor tikus yaitu 60 mg indometasin yang diencerkan dengan 5,3 ml minyak jagung
- Induksi indometasin per ekor yaitu sebanyak 0,27 ml

### Lampiran 6. Perhitungan Dosis dan Suspensi Tepung Tapioka

Berat badan tikus rata-rata	: 200 gram
Dosis kelompok 3	: 0,9 mg/ 200 gBB
Dosis kelompok 4	: 1,8 mg/ 200 gBB
Dosis kelompok 5	: 3,6 mg/ 200 gBB
Konsentrasi larutan	: 0,7 mg/ml

$$\text{Volume pemberian} = \frac{\text{BB} \times \text{dosis}}{\text{konsentrasi}}$$

**Tabel Volume Terapi**

Perlakuan	Kode	Berat Badan	Volume
Terapi 1	K04	165,5	1,06
	K06	160,1	1,03
	K11	170,3	1,09
	K13	167,3	1,08
Terapi 2	K02	153,7	1,98
	K14	151,5	1,95
	K16	169,1	2,17
	K19	154,7	1,99
Terapi 3	K01	174,7	4,50
	K03	160,6	4,13
	K07	172,3	4,43
	K08	173,5	4,46

## Lampiran 7. Pembuatan Larutan

### 7.1 PBS 500 ml pH 7,4

Ditimbang 0,1 g KCl ; 0,1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 4 g NaCl; 1,08 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O. Kemudian dilarutkan dalam aquades 400 ml dan HCl 37% sampai pH 7,4 dan ditanda bataskan dengan aquades hingga 500 ml.

### 7.2 Pembuatan PBS Azida

Diambil 200 ml larutan PBS pH 7,4 dalam gelas kimia 250 ml. Kemudian ditambah 8 tetes larutan azida 1 % (NaN<sub>3</sub>) dengan menggunakan pipet tetes dan dihomogenkan dengan magnetic stirrer.

### 7.3 Pembuatan NaCl-fis 0,9%

Ditimbang 9 g NaCl, kemudian dilarutkan dengan aquades steril hingga 1000 ml. Rumus NaCl-fis 0,9% =  $(0,9/100) \times 1000 \text{ ml} = 9 \text{ g}$

### 7.4 Pembuatan PFA (Paraformaldehid) 4%

Rumus :  $V1.M1 = V2.M2$

$$V1. 37\% = 1000 \text{ ml} \times 4\%$$

$$V1 = 108,1 \text{ ml}$$

Diawali dengan membuat larutan NaCl fisiologis 0,9% sebagai pelarutnya. Larutan PFA 4% dibuat dengan mengambil 108,1 ml formaldehid 37%, lalu dimasukkan kedalam labu ukur 1000 ml dan ditambahkan NaCl fisiologis sampai batas.

## Lampiran 8. Pembuatan Preparat Histologi

### 8.1 Pengambilan Sampel hingga *Embedding* Kolon

Tikus

- dibedah dan diambil organ kolon
- dimasukkan dalam PFA 4%
- dipindah dan direndam dalam etanol 70% selama 24 jam
- dimasukkan dalam etanol 80% selama 2 jam
- dimasukkan dalam etanol 90% selama 20 menit
- dimasukkan dalam etanol 95% selama 20 menit
- dimasukkan dalam etanol absolut selama 3x30 menit pada suhu ruang
- dimasukkan dalam larutan xylol I selama 60 menit pada suhu ruang
- dimasukkan dalam larutan xylol II selama 60 menit pada suhu 60-63°C
- dimasukkan dalam larutan xylol III selama 30 menit pada suhu ruang dan 30 menit pada suhu incubator
- dicelupkan dalam parafin cair selama 3x60 menit pada suhu 56-58°C

Kolon dalam blok parafin

### 8.2 Pembuatan Preparat

Kolon dalam blok parafin

- diiris berukuran 4µm
- didinginkan diatas air dingin
- dimasukkan dalam air hangat (suhu 37°C)



- ditempatkan diatas gelas objek
- disimpan dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam
- dideparafinisasi dalam xylol selama 5 menit
- dimasukkan dalam etanol absolut selama 5 menit
- dimasukkan dalam etanol 95% selama 5 menit
- dimasukkan dalam etanol 90% selama 5 menit
- dimasukkan dalam etanol 80% selama 5 menit
- dimasukkan dalam etanol 70% selama 5 menit
- dicuci air mengalir selama 15 menit
- direndam aquades steril selama 5 menit
- diwarnai hematoksilin selama 10 menit
- dicuci air mengalir selama 30 menit
- dibilas dan direndam dengan aquades selama 5 menit
- diwarnai dengan eosin selama 5 menit
- dicuci air mengalir selama 10 menit
- dicuci aquades selama 5 menit
- dimasukkan dalam etanol 70% selama 5 detik
- dimasukkan dalam etanol 80% selama 5 detik
- dimasukkan dalam etanol 90% selama 5 detik
- dimasukkan dalam etanol 95% selama 5 detik
- dimasukkan dalam etanol absolut 3x2 menit
- dimasukkan dalam larutan xylol 3x3 menit
- dikeringkan dengan angin dan

- *dimounting* dengan menggunakan entellan
- ditutup dengan *cover glass*

Preparat kolon



## Lampiran 9. Pengukuran Aktivitas Protease

### 9.1 Isolasi Protein Kolon

Organ (kolon)

- dipotong kecil
- ditambah larutan PBST-PSMF sebanyak 5x volume sampel
- ditambah pasir kuarsa
- dihaluskan dengan mortar dalam kondisi dingin
- dimasukkan homogenat dalam tabung aphon steril
- disonikasi selama 10 menit
- disentrifus selama 15 menit dengan kecepatan 6000 rpm
- diambil supernatant
- ditambah etanol absolut dingin dengan perbandingan 1:1
- dibiarkan selama 24 jam hingga terbentuk endapan
- disentrifus selama 15 menit dengan kecepatan 10.000 rpm
- dikeringkan di udara bebas
- ditambah buffer tris-HCl dengan 20 mM (1:1)

Ekstrak kasar protein

### 9.2 Pembuatan Larutan Kasein

0,025 g kasein

- dilarutkan dengan 25 ml aquades
- diaduk dengan pengaduk magnetic
- dipindahkan dalam labu ukur 50 ml

- diencerkan hingga tanda batas
- diencerkan dengan aquades sampai tanda batas

Stok larutan kasein 500 ppm

### 9.3 Pembuatan Stok Larutan Tirosin

0,025 g tirosin

- dilarutkan dengan 25ml aquades
- diaduk dengan pengaduk magnetic
- dipindahkan dalam labu ukur 50 ml
- diencerkan hingga tanda batas
- diencerkan dengan aquades sampai batas

Stok larutan tirosin 500 ppm

### 9.4 Pembuatan Larutan Baku Tirosin

4 ml Larutan baku tirosin 500 ppm

- dimasukkan dalam labu ukur 100 ml
- diencerkan dengan aquades sampai tanda batas
- didapatkan larutan baku tirosin 20 ppm
- dipipet berturut-turut 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 ml
- dimasukkan larutan dalam labu ukur 10 ml
- diencerkan dengan aquades sampai tanda batas

Larutan baku tirosin 2,4,6,8,10, 12, 14,16,18,20 ppm

### 9.5 Pembuatan Panjang Gelombang Maksimum Tirosin

Larutan baku tirosin 20 ppm

- diukur absorbansinya ( $\lambda$  maksimum tirosin)

Panjang gelombang maksimum

### 9.6 Pembuatan Larutan Blanko

Aquades steril

- dipipet 200 $\mu$ L dan dimasukkan dalam tabung reaksi
- ditambah 300 $\mu$ L larutan buffer fosfat pH 7
- ditambah 100  $\mu$ L ekstrak kasar protein
- diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit
- ditambah 400 $\mu$ L larutan TCA 4%
- didinginkan pada suhu ruang selama 30 menit
- disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 4000 rpm
- diambil supernatant 100  $\mu$ L
- ditambah buffer fosfat sebanyak 5 kali volume sampel
- diukur serapannya pada  $\lambda$  maksimum tirosin 275 nm

Hasil

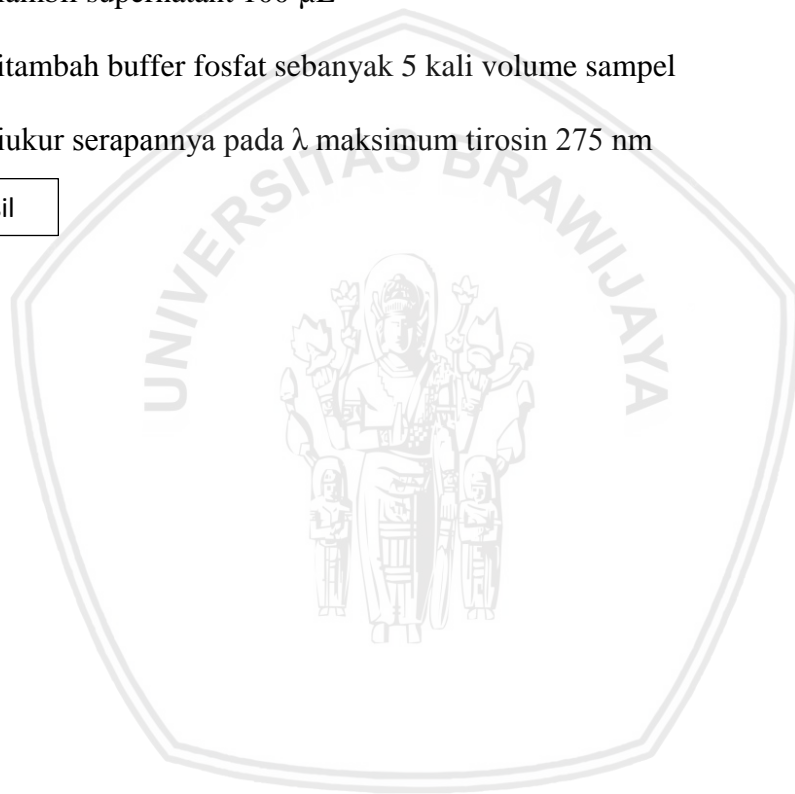
### 9.7 Pengukuran Aktivitas Protease

Larutan kasein 500 ppm

- dipipet 200 $\mu$ L dan dimasukkan dalam tabung reaksi
- ditambah 300 $\mu$ L larutan buffer fosfat pH 7

- ditambah 100  $\mu\text{L}$  ekstrak kasar protein
- diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 60 menit
- ditambah 400 $\mu\text{L}$  larutan TCA 4%
- didinginkan pada suhu ruang selama 30 menit
- disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 4000 rpm
- diambil supernatant 100  $\mu\text{L}$
- ditambah buffer fosfat sebanyak 5 kali volume sampel
- diukur serapannya pada  $\lambda$  maksimum tirosin 275 nm

Hasil



## Lampiran 10. Data Aktivitas Protease

Tabel Analisa

Perlakuan	Ulangan				Rata-rata Standar Deviasi	Peningkatan Aktivitas Protease terhadap Kontrol Negatif	Penurunan Aktivitas Protease terhadap Kontrol Positif
	I	II	III	IV			
K (-)	0,94	0,95	0,88	1,01	$0,95 \pm 0,05^a$	-	-
K (+)	3,73	3,53	3,94	3,72	$3,73 \pm 0,17^e$	292,63 %	-
P1	2,66	2,56	2,49	2,42	$2,53 \pm 0,10^d$	-	32,17 %
P2	2,34	2,28	2,33	2,29	$2,31 \pm 0,03^c$	-	38,07 %
P3	1,19	1,22	1,24	1,28	$1,24 \pm 0,04^b$	-	66,76%

Induksi indometasin 15 mg/kgBB dapat meningkatkan aktivitas protease kolo tikus (*Rattus norvegicus*) dan terapi tepung tapioka dapat menurunkan aktivitas protease. Persentase peningkatan dan penurunan dapat dihitung sebagai berikut:

- a. Perhitungan Persentase Peningkatan Aktivitas Protease Kelompok Kontrol Positif terhadap Kelompok Kontrol Negatif

- Kelompok Kontrol Positif  

$$= \frac{\text{Rataan KP} - \text{Rataan KN}}{\text{Rataan KN}} \times 100\%$$

$$= \frac{3,73 - 0,95}{0,95} \times 100\%$$

$$= 292,63 \%$$

- b. Perhitungan Presentase Penurunan Aktifitas Protease Kelompok Perlakuan terhadap Kelompok Kontrol Positif

- Kelompok 3 (P1) dosis 0,9 mg/200 gBB  

$$= \frac{\text{Rataan KP} - \text{Rataan P1}}{\text{Rataan KP}} \times 100 \%$$

$$= \frac{3,73 - 2,53}{3,73} \times 100\%$$

$$= 32,17\%$$

- Kelompok 4 (P2) dosis 1,8 mg/200 gBB  

$$= \frac{\text{Rataan KP} - \text{Rataan P2}}{\text{Rataan KP}} \times 100 \%$$

$$= \frac{3,73 - 2,31}{3,73} \times 100\%$$

$$= 38,07\%$$

- Kelompok 5 (P3) dosis 3,6 mg/200 gBB  
=  $\frac{\text{Rataan KP}-\text{Rataan P2}}{\text{Rataan KP}} \times 100 \%$   
=  $\frac{3,73-1,24}{3,73} \times 100\%$   
= 66,76%





## Lampiran 11. Penentuan Statistika Aktivitas Protease Kolon

### a. Hasil Deskriptif

#### Descriptives

kadar protease

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kn	4	.9450	.05323	.02661	.8603	1.0297	.88	1.01
Kp	4	3.7300	.16753	.08377	3.4634	3.9966	3.53	3.94
p1	4	2.5325	.10243	.05121	2.3695	2.6955	2.42	2.66
p2	4	2.3100	.02944	.01472	2.2632	2.3568	2.28	2.34
p3	4	1.2350	.03697	.01848	1.1762	1.2938	1.19	1.28
Total	20	2.1505	1.02498	.22919	1.6708	2.6302	.88	3.94

### b. Uji Normalitas (Saphiro-Wilk)

#### Tests of Normality

	kelompok perlakuan	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	Df	Sig.	Statistic	Df	Sig.
kadar protease	Kn	.213	4	.	.974	4	.869
	Kp	.250	4	.	.954	4	.742
	p1	.161	4	.	.991	4	.961
	p2	.252	4	.	.882	4	.348
	p3	.196	4	.	.984	4	.925

### a. Lilliefors Significance Correction

Pengujian normalitas menggunakan uji Shapiro-Wilk dan didapatkan *P-Value* sebesar 0,869 (kontrol negatif); 0,742 (kontrol positif); 0,961 (kelompok P1); 0,348 (kelompok P2); 0,925 (kelompok P3) yang menunjukkan angka diatas 0,05, maka  $H_0$  diterima. Sehingga dapat disimpulkan bahwa data yang digunakan tersebar dengan normal.

### c. Uji Homogenitas

#### Test of Homogeneity of Variances

kadar protease

Levene Statistic	df1	df2	Sig.

1.474	4	15	.259
-------	---	----	------

Uji homogenitas menggunakan Levene Statistic sebesar 1,474 dengan *P-Value* 0,259 > 0,05 maka  $H_0$  diterima, sehingga dapat disimpulkan bahwa data yang digunakan homogen.

d. ANOVA

**ANOVA**

kadar protease

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	19.830	4	4.958	568.201	.000
Within Groups	.131	15	.009		
Total	19.961	19			

Penelitian ini menggunakan 5 kelompok perlakuan yaitu kontrol negatif, kontrol positif, P1, P2, P3. Hasil uji ANOVA menunjukkan *P-Value* <0,05 dengan tingkat kepercayaan 95% sehingga didapatkan pengaruh nyata dengan lima kelompok perlakuan yang berbeda. Uji BNJ/Tukey dengan *Posthoc* dapat dilakukan karena hasil (Sig.) kurang dari 0,05.

e. Uji Tukey

**kadar protease**

Tukey HSD<sup>a</sup>

kelompok perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Kn	4	.9450				
p3	4		1.2350			
p2	4			2.3100		
p1	4				2.5325	
Kp	4					3.7300
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: kadar protease

Tukey HSD

(I) kelompok perlakuan	(J) kelompok perlakuan	Mean Differenc e (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kn	Kp	-2.78500*	.06605	.000	-2.9890	-2.5810
	p1	-1.58750*	.06605	.000	-1.7915	-1.3835
	p2	-1.36500*	.06605	.000	-1.5690	-1.1610
	p3	-.29000*	.06605	.004	-.4940	-.0860
Kp	Kn	2.78500*	.06605	.000	2.5810	2.9890
	p1	1.19750*	.06605	.000	.9935	1.4015
	p2	1.42000*	.06605	.000	1.2160	1.6240
	p3	2.49500*	.06605	.000	2.2910	2.6990
p1	Kn	1.58750*	.06605	.000	1.3835	1.7915
	Kp	-1.19750*	.06605	.000	-1.4015	-.9935
	p2	.22250*	.06605	.029	.0185	.4265
	p3	1.29750*	.06605	.000	1.0935	1.5015
p2	Kn	1.36500*	.06605	.000	1.1610	1.5690
	Kp	-1.42000*	.06605	.000	-1.6240	-1.2160
	p1	-.22250*	.06605	.029	-.4265	-.0185
	p3	1.07500*	.06605	.000	.8710	1.2790
p3	Kn	.29000*	.06605	.004	.0860	.4940
	Kp	-2.49500*	.06605	.000	-2.6990	-2.2910
	p1	-1.29750*	.06605	.000	-1.5015	-1.0935
	p2	-1.07500*	.06605	.000	-1.2790	-.8710

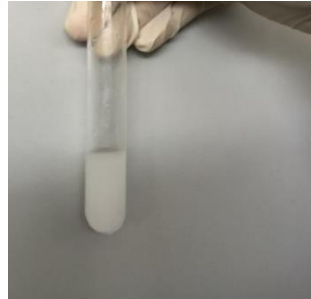
\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Uji *Tukey*/BNJ didapatkan nilai *P-Value* > 0,05 sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh nyata dalam setiap kelompok perlakuan.

## Lampiran 12. Foto Kegiatan



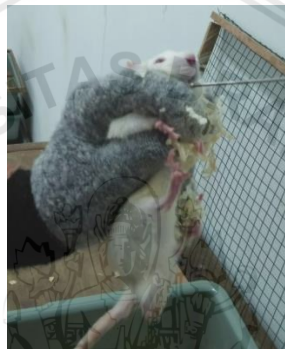
Kandang hewan coba



Larutan tepung tapioka



Pembuatan stok indometasin



Sonde tikus



Dislokasi cervicalis



Nekropsi



Preparasi organ



Pencucian organ