

**PENGARUH PEMBERIAN SINGLE DOSE
INDOMETASIN DENGAN PERBEDAAN
WAKTU TERHADAP EKSPRESI TNF α
DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI
KOLON TIKUS PUTIH
(*Rattus norvegicus*)**

SKRIPSI

Oleh :

SIRAPEGI OCKHTACIA WINURAI LATIP DUWIRI

125130106111001



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

**PENGARUH PEMBERIAN SINGLE DOSE
INDOMETASIN DENGAN PERBEDAAN
WAKTU TERHADAP EKSPRESI TNF α
DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI
KOLON TIKUS PUTIH
(*Rattus norvegicus*)**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :

SIRAPEGI OCKHTACIA WINURAI LATIP DUWIRI

125130106111001



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

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Pengaruh Pemberian Single Dose Indometasin Dengan Perbedaan Waktu
Terhadap Ekspresi TNF α Dan Gambaran Histopatologi Kolon Tikus Putih
(*Rattus norvegicus*)**

Oleh:

**SIRAPEGI OCKHTACIA WINURAI LATIP DUWIRI
12513010611001**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
Pada Tanggal 23 Juli 2019
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

drh. Dyah Ayu OAP., M.Biotech
NIP. 198410262008122004

drh. Fajar Shodiq Permata M.Biotech.
NIP. 198705012015041001

Mengetahui
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Dr. Ir. Sudarminto S. Yuwono M.App.Sc.
NIP. 196312161988031002

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini :

Nama : Sirapegi Ockhtacia Winurai Latip Duwiri

NIM : 125130106111001

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

Pengaruh Pemberian Single Dose Indometasin Dengan Perbedaan Waktu Terhadap Ekspresi TNF- α Dan Gambaran Histopatologi Kolon Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*)

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 termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 25 Juli 2019
Yang Menyatakan,

Sirapegi Ockhtacia Winurai Latip Duwiri
NIM. 125130106111001

Pengaruh Pemberian Single Dose Indometasin dengan Perbedaan Waktu Terhadap Ekspresi TNF α dan Gambaran Histopatologi Kolon Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

ABSTRAK

Inflammatory Bowel Disease (IBD) adalah spektrum dari kondisi radang idiopatik kronis yang menyebabkan gejala-gejala gastrointestinal yang signifikan termasuk diare, sakit perut, pendarahan, anemia dan penurunan berat badan. Dalam percobaan eksperimental, Indometasin sering digunakan sebagai inisiator IBD pada hewan coba. Indometasin bekerja dengan menghambat cyclooxygenase 1 (COX-1) yang berperan dalam pembentukan prostaglandin pada saluran cerna. Indometasin menghasilkan metabolit imunokuinon yang sangat reaktif yang menyebabkan stress oksidatif yang mengikis mukosa gaster dan menyebabkan pelepasan epitel, erosi, ulserasi sampai pendarahan pada gaster. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui hasil dari pemberian indometasin dengan perbedaan waktu terhadap ekspresi TNF α dan gambaran histopatologi organ kolon tikus putih. Penelitian ini menggunakan tikus putih berumur 8 minggu dengan berat 150 gram sebanyak 20 ekor, yang dibagi menjadi empat kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif, perlakuan 1, perlakuan 2, dan perlakuan 3. Dosis Indometasin sebanyak 3 mg/kg BB dengan sonde oral selama 33 jam, 48 jam, dan 57 jam. Metode penelitian menggunakan *Postest Only Control Design* dengan Rancangan Acak Lengkap. Ekspresi TNF α diukur dengan *Imunohistokimia* (IHK) dan gambaran histologi kolon dengan pewarnaan *Hematoksilin Eosin* (HE). Analisa data ekspresi TNF α menggunakan One Way ANOVA ($\alpha=0,005$) serta gambaran histologi kolon secara deskriptif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada pemberian Indometasin dengan perbedaan waktu secara signifikan ($p<0,05$) meningkatkan ekspresi TNF α dan memperparah kerusakan jaringan kolon, berupa nekrosis dan inflamasi berdasarkan gambaran histopatologi sesuai dengan peningkatan variasi waktu pemberian indometasin. Kesimpulan pemberian single dose Indometasin meningkatkan ekspresi TNF α dan memperparah kerusakan jaringan kolon berdasarkan lamanya waktu pengamatan.

Kata kunci : Indometasin, TNF α , histopatologi kolon

**Effect of Indomethacin Single Dose with Different Times on TNF α
Expression and Colon Histopathology of Rat (*Rattus norvegicus*)**

ABSTRACT

Inflammatory Bowel Disease (IBD) is a spectrum of chronic idiopathic inflammatory conditions that cause significant gastrointestinal symptoms including diarrhea, abdominal pain, bleeding, anemia and weight loss. In experimental experiments, Indomethacin is often used as an initiator of IBD in experimental animals. Indomethacin works by inhibiting cyclooxygenase 1 (COX-1) which plays a role in the formation of prostaglandins in the gastrointestinal tract. Indomethacin produces highly reactive immunocinone metabolites which cause oxidative stress that erodes the gastric mucosa and causes epithelial release, erosion, ulceration and gastric bleeding. The purposes of this study were to determine the results of indomethacin administration with time differences in TNF α expression and histopathology of white Rat's colon. This study used 8 weeks old white rats weighed 150 grams as many as 20 rats, which were divided into four groups, namely negative control group, treatment 1, treatment 2, and treatment 3. Indomethacin dose of 3 mg / kg Body Weight with oral sonde for 33 hours, 48 hours and 57 hours. The method of research uses *Postest Only Control Design* with Completely Randomized Design. TNF α expression was measured by immunohistochemistry (IHC) and histology of colon with hematoxylin eosin (HE) staining. Data analysis of TNF α expression using One Way ANOVA ($\alpha = 0.005$) and descriptive histology of colon. The results showed that the administration of Indomethacin with a significant time difference ($p < 0.05$) increased the expression of TNF α and made more severe of colon's tissue damage, show with necrosis and Inflammation base on histopathological features in accordance with increased variation of the time of indometasin administration. The conclusion were that administration of single dose Indometachin with increased administration time could increased the expression of TNF α and the damage to colon tissue according elevation of observation time.

Keywords: Indomethacin, TNF α , colon histopathology

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan yang Maha Esa atas berkat dan anugerahNya kepada penulis sehingga penulis dapat menyusun skripsi ini dengan judul “Pengaruh Pemberian Single Dose Indometasin Dengan Perbedaan Waktu Terhadap Ekspresi TNF α Dan Gambaran Histopatologi Kolon Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)” ini dapat terselesaikan.

Skripsi ini disusun berdasarkan literatur yang penulis peroleh dari berbagai referensi. Ucapan terimakasih penulis sampaikan kepada :

1. Allah Bapa, Allah Putra, dan Allah Roh Kudus, Tri tunggal yang esa, karena atas tuntunan dan berkatNya penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
2. drh. Dyah Ayu OAP., M.Biotech selaku dosen pembimbing I atas segala bantuan, kesempatan, nasehat, bimbingan dan arahan yang diberikan kepada penulis.
3. drh. Fajar Shodiq Permata M.Biotech selaku dosen pembimbing II atas segala bantuan, kesempatan, nasehat, bimbingan dan arahan yang diberikan kepada penulis.
4. drh. Rahadi Swastomo, M.Biomed selaku dosen penguji I atas segala bantuan, kesempatan, nasihat, bimbingan dan arahan yang diberikan kepada penulis.
5. drh. M. Arfan Lesmana M.Sc. selaku dosen penguji II atas segala bantuan, kesempatan, nasihat, bimbingan dan arahan yang diberikan kepada penulis.
6. Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc Selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
7. drh. Dyah Ayu OAP., M.Biotech selaku dosen pembimbing akademik yang selalu memberikan dukungan dan nasihat kepada penulis.
8. Orangtua Bapak Yohanis Latip dan Ibu Emma Duwiri, Kakak tercinta Rocky Latip, Febbe Wanma, Novi Sasarari yang selalu memberi kasih sayang, dorongan, dukungan, dan doa untuk menyelesaikan studi penulis

serta perhatiannya akan kebutuhan penulis baik secara moril maupun materi.

9. Seluruh dosen dan civitas akademika yang telah membimbing, memberikan ilmu dan mewadahi penulis selama menjalankan studi di Program Studi Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
10. Tim Penelitian ku tercinta, Thekla, Adhe, dan Novi yang saling support satu sama lain.
11. Pacarku Billi Wambukomo, yang dengan setia menemani dan menerima muntahan kegalauan ku di detik-detik terakhir penulisan ini.
12. Support systemku kakak Ella Worabay, Nur Army, Grace Pay, Gracelia Marey, Kinanti Moar, Juliana Warijo, Renny Wayoi, yang selalu mendukung dan dengan setia mendengarkan keluh kesahku.

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

Malang, 02 Agustus 2019

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI.....	ii
LEMBAR PERNYATAAN.....	iii
ABSTRAK.....	iv
ABSTRACT.....	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG.....	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Batasan Masalah.....	2
1.4 Tujuan Penelitian.....	3
1.5 Manfaat Penelitian.....	3
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Inflammatory Bowel Disease.....	5
2.2 Obat Anti Inflamasi Non Steroid.....	6
2.3 Indometasin.....	7
2.3.1 Uraian Umum Indometasin.....	8
2.3.2 Farmakologi Indometasin.....	9
2.4 Imunohistokimia.....	11
2.5 Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α).....	12
2.6 Kolon Tikus.....	13



2.6.1 Struktur Anatomi Kolon Tikus Putih	14
2.6.2 Struktur Histologi Kolon Tikus Putih.....	14
2.7 Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>).....	15
2.7.1 Taksonomi Tikus Putih.....	16
2.7.2 Tikus Putih Galur Wistar.....	16

BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

PENELITIAN.....	18
3.1 Kerangka konsep.....	18
3.2 Hipotesis Penelitian.....	21

BAB 4. METODE PENELITIAN.....

4.1 Tempat Dan Waktu Penelitian.....	22
4.2 Alat Dan Bahan.....	22
4.2.1 Alat Penelitian.....	22
4.2.2 Bahan Penelitian.....	23
4.2.3 Hewan Coba.....	23
4.3 Rancangan Penelitian.....	23
4.3.1 Pengulangan.....	24
4.4 Variabel Penelitian.....	25
4.5 Tahapan Penelitian.....	25
4.5.1 Persiapan Hewan Coba.....	25
4.5.2 Pemberian Indometasin.....	25
4.5.3 Pengambilan Kolon Untuk Pembuatan Preparat Histopatologi.....	26
4.5.4 Pembuatan Histopatologi Kolon dengan pewarnaan HE.....	28
4.5.5 Pembuatan Preparat Imunohistokimia TNF- α	28
4.6 Analisis Data.....	29
4.7 Diagram Alur Penelitian.....	31



BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	32
5.1 Pengaruh Pemberian Single Dose Indometasin Dengan Perbedaan Waktu Terhadap Ekspresi TNF- α Kolon Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>).....	32
5.2 Pengaruh Pemberian Single Dose Indometasin Dengan Perbedaan Waktu Terhadap Gambaran Histopatologi Kolon Tikus Putih Kolon Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>).....	36
BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN.....	46
6.1 Kesimpulan.....	46
6.2 Saran.....	46
DAFTAR PUSTAKA.....	47
LAMPIRAN.....	52

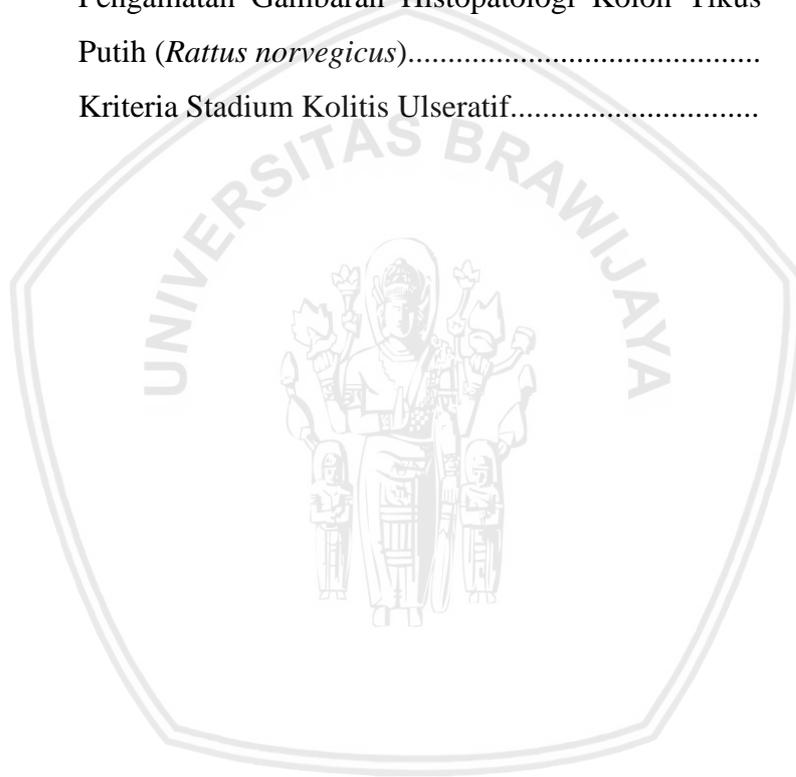


DAFTAR GAMBAR

GAMBAR		Halaman
2.1	Klasifikasi Obat NSAID.....	7
2.2	Rumus Bangun Indometachin.....	8
2.3	Struktur Anatomi Kolon Tikus.....	14
2.4	Struktur Histologi Kolon Tikus.....	15
2.5	Tikus Putih Galur Wistar.....	17
3.1	Kerangka Konsep.....	18
5.1	Ekspresi TNF- α jaringan kolon dengan pewarnaan Immunohistokimia perbesaran 400x.....	33
5.2	Gambaran Histologi Kolon Tikus Putih Kelompok Kontrol Negatif (Tanpa Perlakuan).....	38
5.3	Gambaran Histopatologi Kolon Tikus Putih Perbesaran 400x.....	39

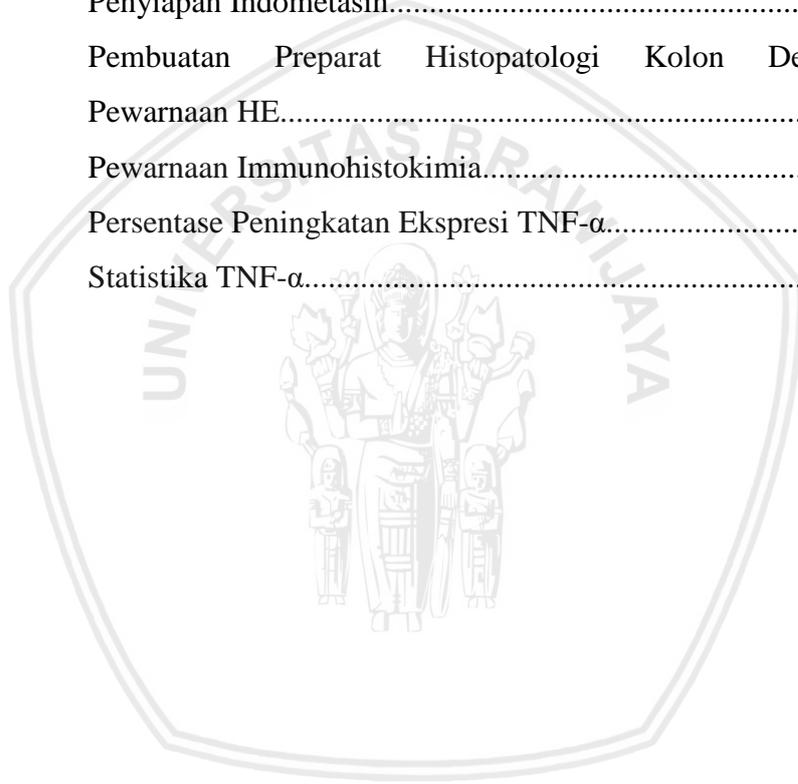
DAFTAR TABEL

TABEL		Halaman
4.1	Kelompok Perlakuan.....	24
5.1	Pengaruh pemberian Single Dose Indometasin Dengan Perbedaan Waktu Terhadap Ekspresi TNF- α Kolon Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>).....	34
5.2	Pengamatan Gambaran Histopatologi Kolon Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>).....	38
5.3	Kriteria Stadium Kolitis Ulseratif.....	44



DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN		Halaman
1	Surat Laik Etik.....	53
2	Tabel konversi dosis hewan percobaan dengan manusia (Laurence, 1964) dalam Hakim (2002).....	54
3	Perhitungan Konversi Dosis.....	55
4	Penyiapan Indometasin.....	56
5	Pembuatan Preparat Histopatologi Kolon Dengan Pewarnaan HE.....	57
6	Pewarnaan Immunohistokimia.....	58
7	Persentase Peningkatan Ekspresi TNF- α	59
8	Statistika TNF- α	60



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

Simbol/Singkatan	Keterangan
IBD	: <i>Inflammatory Bowel Disease</i>
ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i>
RAL	: Rancangan Acak Lengkap
BNJ	: Beda Nyata Jujur
Mg	: Miligram
Kg	: Kilogram
BB	: Berat Badan
Cm	: Centimeter
°C	: Derajat celcius
P0	: Kontrol Negatif
P1	: Perlakuan 1
P2	: Perlakuan 2
P3	: Perlakuan 3
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
TNF α	: Tumor Necrosis Factor α
OAINS	: Obat anti-inflamasi nonsteroid
COX	: Cyclooxygenase

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Inflammatory bowel disease (IBD) merupakan penyakit idiopatik, yang diperkirakan melibatkan reaksi imun dalam tubuh terhadap saluran pencernaan. Dua tipe mayor daripada penyakit ini adalah Ulcerative Colitis (UC) dan Crohn Disease (CD). Seperti namanya, Ulseratif Colitis terbatas pada kolon, sedangkan Crohn Disease mencakup semua segmen daripada traktus gastrointestinal dari mulut sampai anus (Danastri, dkk 2011)

Etiologi Inflammatory Bowel Disease tidak diketahui, meskipun keduanya dianggap muncul dari respon imun yang terganggu terhadap usus individu dengan predisposisi genetik. Karakteristik respon inflamasinya berbeda, pada CD biasanya menyebabkan inflamasi transmural dan kadang-kadang terkait dengan granuloma, sedangkan di UC biasanya inflamasi terbatas pada mukosa dan submukosa (Danastri, dkk 2011). IBD menyebabkan gejala-gejala gastrointestinal yang signifikan termasuk diare, sakit perut, pendarahan, anemia dan penurunan berat badan. (Chougule, dkk. 2018).

Dalam percobaan eksperimental, Indometasin biasa digunakan sebagai inisiator IBD pada hewan coba. Indometasin merupakan salah satu obat antiinflamasi nonsteroid derivat indol-asam asetat yang dikenalkan pada tahun 1963. Indometasin merupakan salah satu obat yang sering diresepkan dan dianggap sebagai first line therapy untuk arthritis dan digunakan secara luas pada kasus trauma, nyeri pasca pembedahan dan nyeri-nyeri lain. Indometasin

mempunyai efek terhadap saluran cerna meliputi nyeri abdomen, diare, perdarahan saluran cerna, dan pankreatitis (Suprijono, 2011).

Penelitian Inflammatory Bowel Disease sebelumnya telah terbukti bahwa Indometasin dapat digunakan sebagai induktor Inflammatory Bowel Disease pada hewan coba, namun belum terdapat kejelasan tentang waktu terbentuknya ulkus tersebut dari saat indometasin di induksikan. Karena itu dirasakan perlu untuk melakukan penelitian tentang “pengaruh pemberian single dose indometasin dengan perbedaan waktu pada ekspresi TNF- α dan gambaran histopatologi pada organ kolon tikus putih (*Rattus norvegicus*).”

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas maka permasalahan yang ingin diketahui pada penelitian ini adalah :

1. Bagaimanakah efek pemberian Indometasin pada gambaran histopatologi kolon tikus putih pada berbagai variasi waktu pemberian?
2. Bagaimanakah efek pemberian Indometasin pada ekspresi TNF- α kolon tikus putih pada berbagai variasi waktu pemberian?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, maka penelitian ini dibatasi pada :

1. Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Winstar umur 8 – 12 minggu, berjenis kelamin jantan dengan berat badan 150 gram.
2. Hewan coba diinduksikan Indometasin sebanyak 3 mg dengan menggunakan sonde lambung.

3. Hewan coba di pelihara selama waktu tunggu masing-masing kelompok perlakuan, yaitu 33 jam, 48 jam, dan 57 jam setelah penginduksian.
4. Variabel yang diamati pada penelitian ini adalah ekspresi TNF- α dengan metode immunohistokimia dan gambaran histopatologi kolon tikus putih berupa kerusakan jaringan kolon dengan pewarnaan Hematoksin Eosin (HE).
5. Analisa hasil ekspresi TNF- α diamati secara kuantitatif yang dianalisa dengan menggunakan *software ImmunoRatio*, data dianalisa dengan menggunakan *one way ANOVA* dengan *software IBM SPSS Statistic 22* dengan signifikasi $\alpha < 0,05$. Histopatologi kolon tikus dianalisa secara deskriptif pada semua perubahan patologi yang tampak dengan melihat struktural dari jaringan kolon.

1.4 Tujuan Penelitian

Penelitian ini memiliki beberapa tujuan yang ingin dicapai yaitu :

1. Mengetahui efek dari pemberian Indometasin pada ekspresi TNF- α kolon tikus putih pada berbagai variasi waktu pemberian.
2. Mengetahui hasil efek dari pemberian Indometasin pada gambaran histopatologi kolon tikus putih pada berbagai variasi waktu pemberian.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan, kemampuan, dan keterampilan peneliti dalam hal efek pemberian Indometasin pada ekspresi TNF- α dan histopatologi kolon tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan berbagai variasi waktu pemberian. Peneliti juga berharap, melalui penelitian ini pembaca umum dapat mendapatkan wawasan dan pengetahuan tentang efek pemberian

Indometasin pada ekspresi TNF- α dan histopatologi kolon tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan berbagai variasi waktu pemberian.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Inflammatory Bowel Disease (IBD)

Inflammatory bowel disease (IBD) merupakan penyakit idiopatik, yang diperkirakan melibatkan reaksi imun dalam tubuh terhadap saluran pencernaan. Dua tipe mayor daripada penyakit ini adalah Ulcerative Colitis (UC) dan Crohn Disease (CD). Seperti namanya, Ulseratif Colitis terbatas pada kolon, sedangkan Crohn Disease mencakup semua segmen daripada traktus gastrointestinal dari mulut sampai anus (Danastri, dkk, 2011)

Etiologi Inflammatory Bowel Disease tidak diketahui, meskipun keduanya dianggap muncul dari respon imun yang terganggu terhadap usus individu dengan predisposisi genetik. Karakteristik respon inflamasinya berbeda, pada CD biasanya menyebabkan inflamasi transmural dan kadang-kadang terkait dengan granuloma, sedangkan di UC biasanya inflamasi terbatas pada mukosa dan submukosa (Danastri, dkk 2011). IBD menyebabkan gejala-gejala gastrointestinal yang signifikan termasuk diare, sakit perut, pendarahan, anemia dan penurunan berat badan. (Chougule, dkk 2018).

Dalam percobaan eksperimental, Indometasin biasa digunakan sebagai inisiator IBD pada hewan coba. Indometasin merupakan salah satu obat antiinflamasi nonsteroid derivat indol-asam asetat yang dikenalkan pada tahun 1963. Indometasin merupakan salah satu obat yang sering diresepkan dan dianggap sebagai first line therapy untuk arthritis dan digunakan secara luas pada kasus trauma, nyeri pasca pembedahan dan nyeri-nyeri lain. Indometasin

mempunyai efek terhadap saluran cerna meliputi nyeri abdomen, diare, perdarahan saluran cerna, dan pankreatitis (Suprijono, 2011)

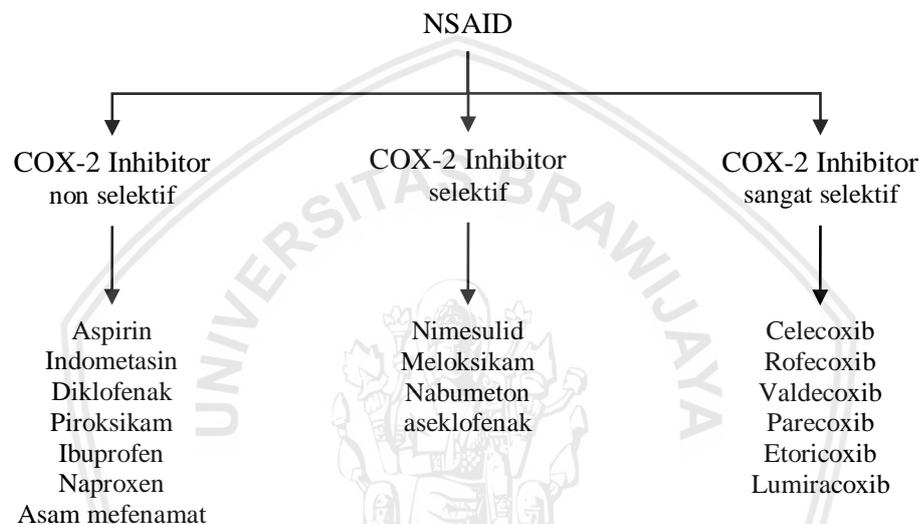
2.2 Obat Anti Inflamasi Non steroid

Pengobatan pasien dengan antiinflamasi mempunyai 2 tujuan utama : Pertama meringankan rasa nyeri yang sering kali merupakan gejala awal yang terlihat dan keluhan utama pasien dan kedua, memperlambat atau membatasi proses perusakan pada jaringan. Pengurangan inflamasi dengan obat-obatan antiinflamasi non steroid seringkali berakibat rasa nyeri mereda selama periode yang bermakna (Katzung, 2001).

Obat anti-inflamasi berdasarkan mekanisme kerjanya secara umum dibagi dalam 2 (dua) golongan yaitu golongan steroid dan golongan non steroid. Obat antiinflamasi golongan steroid memiliki daya anti-inflamasi kuat yang mekanismenya terutama menghambat pelepasan prostaglandin dari sel-sel sumbernya, sedangkan obat antiinflamasi golongan non steroid (NSAID) bekerja melalui mekanisme lain seperti inhibisi siklooksigenase yang berperan dalam biosintesis prostaglandin (Derle, 2006)

Obat antiinflamasi golongan non steroid (NSAID) memiliki aktivitas sebagai antiinflamasi, analgetik dan antipiretik (Derle, 2006). NSAID berperan sebagai antiinflamasi dengan satu atau beberapa mekanisme diantaranya yaitu dengan inhibisi metabolisme asam arakidonat, inhibisi siklooksigenase (COX) atau inhibisi sintesis prostaglandin, inhibisi lipooksigenase, inhibisi sitokin, pelepasan hormon steroid, stabilisasi membran lisosom, dalam pelepasan fosforilasi oksidatif (Kohli, 2005). Hampir semua NSAID menghambat sintesis prostaglandin dengan inhibisi COX-1 dan COX-2 (Derle, 2006). Didasarkan pada

selektifitasnya terhadap COX, NSAID dapat diklasifikasikan menjadi beberapa golongan yaitu non selektif COX inhibitor, meliputi aspirin, indometasin, diklofenak, piroksikam, ibuprofen, naproxen, dan asam mefenamat; selektif COX-2 inhibitor meliputi nimesolid, meloksikam, nabumeton, dan aseklofenak; sangat selektif COX-2 inhibitor meliputi celecoxib, rofecoxib, valdecoxib, parecoxib, etoricoxib dan lumiracoxib (Derle, 2006)



Gambar 2.1 Klasifikasi obat NSAID (Derle, 2006)

2.3 Indometasin

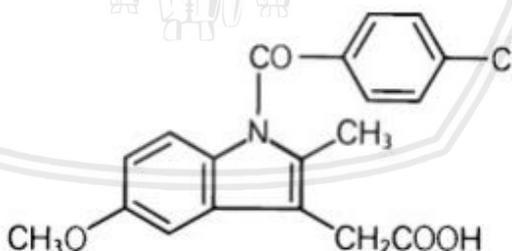
Obat anti-inflamasi nonsteroid (OAINS) merupakan obat yang sering digunakan pada pengobatan penyakit, karena dapat menghilangkan/mengurangi tanda dan gejala radang. Salah satu OAINS adalah indometasin yang sering diresepkan untuk serangan akut artritis gout. Indometasin bekerja dengan menghambat enzim siklooksigenase yang mengkonversi asam arakidonat menjadi prostaglandin. Indometasin menghambat COX-1 dan COX-2, tetapi lebih efektif terhadap penghambatan COX-1. Penghambatan terhadap COX-2 dapat menghilangkan tanda dan gejala radang, sedangkan penghambatan terhadap COX-1 dapat mengiritasi sehingga bisa mengikis mukosa gaster. Pengikisan dari

mukosa gaster, dapat menyebabkan terjadinya pelepasan epitel, erosi, ulserasi sampai perdarahan pada gaster yang merupakan manifestasi awal dari ulkus peptikum. Mekanisme penghambatan terhadap COX-1 inilah yang menyebabkan kerusakan pada mukosa gaster (Laguna dkk, 2016).

Indometasin (IndoH), rumus molekul $C_{19}H_{16}ClNO_4$ dan nama kimia 2-[1-(4-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methylindol-3-yl] asam asetat (Skema 1), anggota dari keluarga asam arilalkanoat, adalah antiinflamasi nonsteroid obat dengan aktivitas analgesik, antipiretik, dan antiinflamasi (Laguna dkk, 2016).

Indometasin merupakan salah satu obat yang sering diresepkan dan dianggap sebagai first line therapy untuk arthritis dan digunakan secara luas pada kasus trauma, nyeri pasca pembedahan dan nyeri-nyeri lain. Indometasin mempunyai efek terhadap saluran cerna meliputi nyeri abdomen, diare, perdarahan saluran cerna, dan pankreatitis (Suprijono, 2011).

2.3.1 Uraian Umum Indometasin



Gambar 2.2 Rumus Bangun Indometasin (FDA, 2009)

Indometasin adalah turunan indol anti-inflamasi non-steroid dengan nama kimia 1-(4-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1H-indole-3-acetic acid. ndomethacin praktis tidak larut dalam air dan sedikit larut dalam

alkohol. Ini memiliki pKa 4,5 dan stabil di media netral atau sedikit asam dan terurai dalam alkali yang kuat. Suspensi memiliki pH 4,0-5,0 (FDA,2009).

2.3.2 Farmakologi Indometasin

Indometasin merupakan derivat indol-asam asetat. Obat ini sudah dikenal sejak 1963 untuk pengobatan arthritis reumatoid dan sejenisnya. Walaupun obat ini efektif tetapi karena toksik maka penggunaan obat ini dibatasi (Wilmana dan Gan, 2007). Indometasin mempunyai sifat antiradang yang menonjol dan sifat analgesik-antipiretik yang mirip dengan turunan salisilat. Efek antiradang indometasin terlihat jelas pada pasien arthritis reumatoid dan arthritis tipe lain, termasuk pirai akut (Robbert dan Morrow,2008). Indometasin merupakan salah satu obat NSAIDs (Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs) derivat indolisetat. Mekanisme kerja dari indometasin adalah sebagai penghambat COX non-selektif yang poten sehingga dapat menerunkan pembentukan prekursor prostaglandin (Katzung, 2010).

Mekanisme kerjanya sebagai anti inflamasi, bila membran sel mengalami kerusakan oleh suatu rangsangan kimiawi, fisik, atau mekanis, maka enzim fosfolipase diaktifkan untuk mengubah fosfolipida menjadi asam arachidonat. Asam lemak poli-tak jenuh ini kemudian untuk sebagian diubah oleh enzim cyclo-oksigenase menjadi endoperoksida dan seterusnya menjadi prostaglandin. Cyclo-oksigenase terdiri dari dua iso-enzim, yaitu COX-1 (tromboxan dan prostacyclin) dan COX-2 (prostaglandin). Kebanyakan COX-1 terdapat di jaringan, antara lain di pelat-pelat darah, ginjal dan saluran cerna. COX-2 dalam keadaan normal tidak terdapat di jaringan tetapi dibentuk selama

proses peradangan oleh sel-sel radang. Penghambatan COX-2 inilah yang memberikan efek anti radang dari obat NSID. NSID yang ideal hanya menghambat COX-2 (peradangan) dan tidak menghambat COX-1 (perlindungan mukosa lambung) (Tan dan Raharja, 2008).

Mengikuti dosis oral tunggal Kapsul INDOCIN 25 mg atau 50 mg, indometasin mudah diserap, mencapai konsentrasi plasma puncak masing-masing sekitar 1 dan 2 mcg / mL, sekitar 2 jam. Kapsul yang diberikan secara oral INDOCIN sebenarnya 100% *bioavailable*, dengan 90% dosis diserap dalam waktu 4 jam. Dosis tunggal 50 mg INDOCIN Suspension Oral ditemukan setara dengan 50 mg kapsul INDOCIN ketika masing-masing diberikan dengan makanan (FDA, 2009)

Indometasin dihilangkan melalui ekskresi ginjal, metabolisme, dan ekskresi bilier. Indometasin mengalami sirkulasi enterohepatik yang cukup besar. Waktu paruh rata-rata indometasin diperkirakan sekitar 4,5 jam. Dengan rejimen terapi khas 25 atau 50 mg t.i.d., konsentrasi plasma stabil dari indometasin adalah rata-rata 1,4 kali lipat dari yang mengikuti dosis pertama. Indometasin ada dalam plasma sebagai obat induk dan metabolit desmethyl, desbenzoyl, dan desmethyl-desbenzoyl, semuanya dalam bentuk tak terkonjugasi. Sekitar 60% dari dosis oral diambil dalam urin sebagai obat dan metabolit (26% sebagai indometasin dan glukuronidanya), dan 33% diperoleh dalam tinja (1,5% sebagai indometasin). Sekitar 99% indometasin terikat dengan protein dalam plasma selama kisaran yang diharapkan dari konsentrasi plasma terapeutik. Indometasin telah ditemukan melintasi *blood-brain barrier* dan plasenta (FDA, 2009)

Efek samping indometasin tergantung dosis dan insidennya cukup tinggi. Pada dosis terapi, sepertiga pasien menghentikan pengobatan karena efek samping. Efek samping saluran cerna berupa nyeri abdomen, diare, dan pendarahan lambung. Indometasin bersifat nonselektif sehingga jika digunakan dalam jangka lama dilaporkan dapat menyebabkan agranulositosis, anemia aplastik dan trombositopenia (Wilmana dan Gan, 2007).

Indometasin tidak boleh digunakan pada wanita hamil dan ibu menyusui. Indometasin juga dikontradiksikan pada individu yang mengalami penyakit ginjal atau lesi ulser pada lambung atau usus (Robbert dan Morrow, 2007). Penggunaannya kini dianjurkan hanya bila AINS lain kurang berhasil misalnya pada arthitis pirai akut dan osteorritis tungkai. Dosis Indometasin yang lazim ialah 2-4 kali 25 mg sehari. Untuk mengurangi gejala reumatik di malam hari, indometasin diberikan 50-100 mg sebelum tidur (Wilmana dan Gan, 2007).

Anjuran dosis Indometasin pada umumnya adalah 25 mg (5 mL). Jika dosis ini dapat ditoleransi dengan baik, maka dosis dapat ditingkatkan sebesar 25 mg (5 mL) atau 50 mg (10 mL) jika gejala terus berlanjut, maka dosis dapat ditingkatkan hingga tercapai respon yang memuaskan atau hingga mencapai total dosis harian maksimal, 150- 200 mg (30 - 40 mL) (FDA, 2009).

2.4 Imunohistokimia

Metode imunohistokimia dulunya diperkenalkan dalam mempelajari reaksi imun organisme. Kepentingan imunohistokimia sangat besar karena pada kenyataannya, kita dapat menentukan asal sel dari hormon tertentu. Spesifitas metode seluruhnya tergantung pada, apakah antigen yang digunakan dapat dipisahkan tanpa kontaminasi zat lainnya. Karena itu penting kontrol metode ini

yang terdiri atas pemeriksaan kemurnian antigen. Metode imunohistokimia berdasarkan pada penggunaan suatu antibodi yang spesifik yang dilabel dengan ikatan kimia pada suatu zat yang dapat dilihat, tanpa label itu mempengaruhi kemampuan antibodi untuk membentuk suatu kompleks dengan antigen yang bersangkutan (Samson, 2014).

Imunohistokimia (IHK) adalah teknik yang digunakan untuk mengidentifikasi lokasi dan distribusi antigen target dalam sel atau jaringan oleh pewarnaan dengan antibodi spesifik. Antibodi terkonjugasi ke baik label neon atau enzimatik. Di bawah mikroskop itu lokasi label mendekati posisi target antigen. Dibandingkan dengan teknik molekuler dan seluler lainnya, IHK mampu memvisualisasikan distribusi dan lokalisasi protein yang diekspresikan secara berbeda di dalam sel dan dalam konteks jaringan yang tepat. Saat ini IHK adalah alat rutin dan penting dalam diagnostik dan laboratorium penelitian, dan digunakan dalam berbagai aplikasi dari studi kehidupan manusia. Imunohistokimia dilakukan dengan mengeksploitasi prinsip bahwa antibodi mengikat secara khusus pada antigen dalam jaringan biologis, misalnya di rahang, gonad atau hati. Interaksi antigen-antibodi dapat divisualisasikan oleh spidol termasuk pewarna fluorescent, reaksi warna enzim-substrat, elemen radioaktif atau koloid emas (Zang dkk, 2017).

2.5 Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α)

Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) merupakan sitokin utama pada respon inflamasi akut terhadap bakteri gram negatif dan mikroba lainnya. Infeksi yang berat dapat memicu produksi TNF dalam jumlah besar yang menimbulkan reaksisistemik. TNF disebut TNF- α atas dasar historis dan untuk membedakannya

dari TNF- β atau limfositokin. Sumber utama TNF- α ialah fagosit mononuklear dan sel T yang diaktifkan antigen, sel NK, dan sel mast. Lipopolisakarida merupakan rangsangan poten terhadap makrofag untuk menyekresi TNF. IFN- γ yang diproduksi sel T dan sel NK juga merangsang makrofag antara lain meningkatkan sintesis TNF (Ivander, 2015)

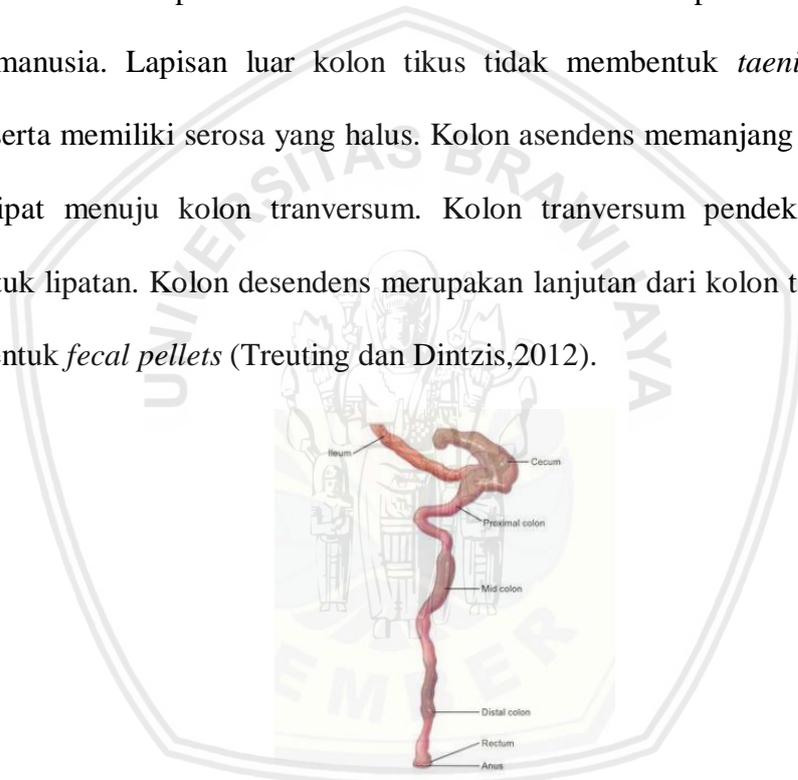
TNF- α mempunyai beberapa fungsi dalam proses inflamasi, yaitu dapat meningkatkan peran pro trombotik dan merangsang molekul adhesi dari sel leukosit serta menginduksi sel endotel, berperan dalam mengatur aktivitas makrofag dan respon imun dalam jaringan dengan merangsang faktor pertumbuhan sitokin lain, berfungsi sebagai regulator dari hematopoetik serta komitogen untuk sel T dan sel B serta aktivitas sel neutrofil dan makrofag. TNF- α juga memiliki fungsi tambahan yang menguntungkan termasuk peranannya dalam respon imun terhadap bakteri, virus, jamur, dan invasi parasit (Ivander, 2015).

2.6 Kolon Tikus

Kolon merupakan struktur yang membentuk sebagian besar usus besar, berbentuk tabung muskular berongga yang memanjang dari sekum sampai rektum. Kolon berfungsi untuk penyerapan air dan elektrolit hingga 90%, mengubah cairan kimus menjadi semi padat yang disebut feses. Bakteri yang terdapat pada kolon berfungsi mencerna selulosa sehingga menghasilkan nutrisi bagi tubuh, menghasilkan vitamin K dan gas yang menyebabkan bau pada feses (Sherwood, 2013).

2.6.1 Struktur Anatomi Kolon Tikus Putih

Struktur anatomi usus besar tikus tersusun atas sekum, kolon ascendens (proksimal), kolon transversum (tengah), kolon distal (desendens) dan rektum. Panjang sekum sampai rektum pada tikus sekitar 14 cm. Tikus memiliki sekum yang besar, berbentuk kantong lebar seperti huruf J dan berfungsi untuk fermentasi sisa makanan oleh bakteri, menghasilkan asam lemak, memproduksi vitamin K dan beberapa vitamin B. Struktur anatomi kolon pada tikus berbeda dengan manusia. Lapisan luar kolon tikus tidak membentuk *taenia coli* dan *haustra* serta memiliki serosa yang halus. Kolon ascendens memanjang dari sekum dan melipat menuju kolon transversum. Kolon transversum pendek dan tidak membentuk lipatan. Kolon desendens merupakan lanjutan dari kolon transversum dan terbentuk *fecal pellets* (Treuting dan Dintzis, 2012).

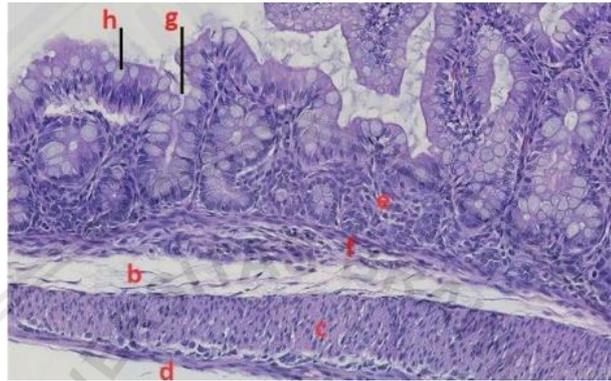


Gambar 2.3 Struktur Anatomi Kolon Tikus (Treuting dan Dintzis, 2012)

2.6.2 Struktur Histologi Kolon Tikus Putih

Struktur histologi kolon tikus sama dengan manusia yaitu terdiri atas empat lapisan yakni mukosa, submukosa, muskularis dan serosa. Lapisan mukosa terdiri atas sel epitel, lamina propria dan muskularis mukosa. Pada lapisan mukosa tidak terdapat vili, tersusun atas epitel kolumnar dan memiliki kriptas Lieberkuhn yang terletak lebih dalam serta memiliki sel goblet yang lebih banyak daripada usus

halus. Pada lamina propria terdapat banyak sel limfoid dan nodul limfoid yang tersebar sampai ke submukosa. Lapisan submukosa pada tikus lebih tipis dari pada manusia. Lapisan muskularis terdiri atas serabut otot longitudinal dan sirkular. Lapisan serosa merupakan lapisan intraperitoneal kolon yang terdiri atas pembuluh darah dan jaringan adiposa (Treuting dan Dintzis, 2012).



Gambar 2.4 Struktur histologi kolon tikus (Parker dan Picut, 2016)
 (a) mukosa; (b) submukosa; (c) muskularis; (d) serosa; (e) Lamina propria;
 (f) muskularis mukosa; (g) kript Lieberkhun; (f) sel goblet

2.7 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) atau yang dikenal sebagai Norway rat merupakan hewan percobaan yang sering digunakan pada penelitian biomedis, pengujian, dan pendidikan. Hal ini dikarenakan genetik yang terkarakteristik dengan baik, galur yang bervariasi dan tersedia dalam jumlah banyak. Tikus dan mencit untuk kepentingan penelitian atau laboratorium merupakan jenis albino yang kehilangan pigmen melaninnya, sifat tersebut menurun pada anak-anaknya (Barnett dan Anthony, 2002).

Tikus putih merupakan hewan pengerat dan seringkali dijadikan sebagai hewan percobaan karena kelengkapan organ tubuh, kebutuhan nutrisi, metabolisme biokimianya, sistem reproduksi, sistem pernafasan, 11 sistem peredaran darah dan ekskresinya menyerupai manusia (Simanjuntak, 2013).

2.7.1 Taksonomi Tikus Putih

Adapun menurut (Simanjuntak, 2013) klasifikasinya sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Subfilum	: Vertebrata
Kelas	: Muridae
Sub kelas	: Theria
Ordo	: Rodensia
Subordo	: Sciurognathi
Famili	: Muridae
Subfamili	: Murinae
Genus	: Rattus
Spesiess	: <i>Rattus norvegicus</i>

2.7.2 Tikus Putih Galur Wistar

Tikus putih galur Wistar merupakan salah satu galur tikus paling populer yang digunakan untuk penelitian laboratorium yaitu sebagai model dalam penelitian biomedik (Kanti, 2016). Tikus Wistar (albino) dikembangkan pertama kali di Wistar Institute Philadelphia pada tahun 1906 dengan nama katalog WISTARAT® (Wistar Instute, 2016). Karakteristik tikus Wistar adalah kepala tikus yang lebar, telinga panjang dan memiliki panjang ekor yang kurang dari panjang tubuhnya. Tikus Wistar lebih aktif (agresif) dari pada jenis lain (Kanti, 2016).

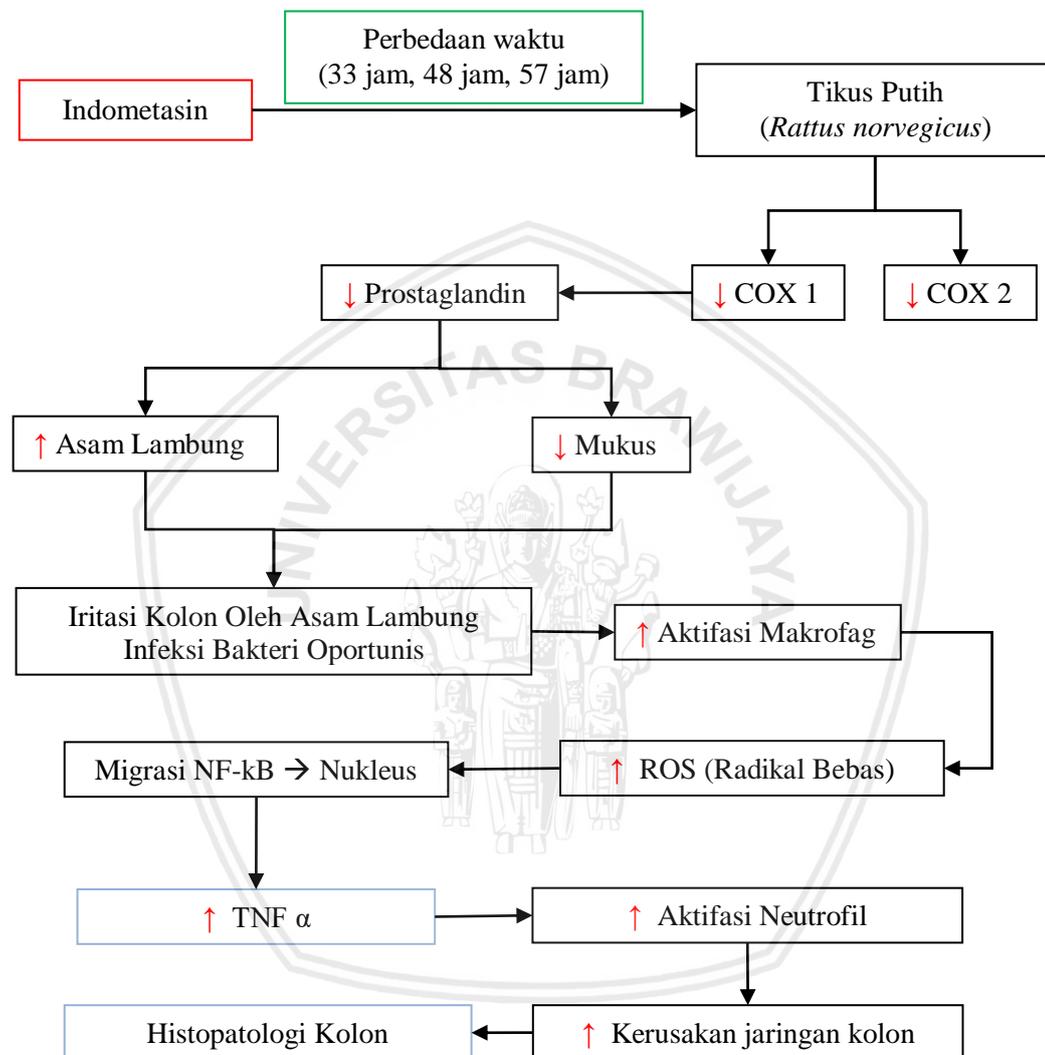


Gambar 2.5 Tikus Putih Galur Wistar (Kanti, 2016)



BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep

Keterangan :



: Variabel yang diamati



: Menstimulasi



: Efek pemberian induksi indometasin

Obat anti-inflamasi nonsteroid (OAINS) merupakan obat yang sering digunakan pada pengobatan penyakit, karena dapat menghilangkan/mengurangi tanda dan gejala radang. Salah satu OAINS adalah indometasin yang sering diresepkan untuk serangan akut artritis gout. Indometasin bekerja dengan menghambat enzim siklooksigenase yang mengkonversi asam arakidonat menjadi prostaglandin. Indometasin menghambat COX-1 dan COX-2, tetapi lebih efektif terhadap penghambatan COX-1. Penghambatan terhadap COX-2 dapat menghilangkan tanda dan gejala radang, sedangkan penghambatan terhadap COX-1 dapat mengiritasi sehingga bisa mengikis mukosa gaster. Pengikisan dari mukosa gaster, dapat menyebabkan terjadinya pelepasan epitel, erosi, ulserasi sampai perdarahan pada gaster yang merupakan manifestasi awal dari ulkus peptikum. Mekanisme penghambatan terhadap COX-1 inilah yang menyebabkan kerusakan pada mukosa gaster (Laguna dkk, 2016).

Indometasin diinduksi pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) secara per oral dengan menggunakan sonde lambung sebanyak 3 mg dan dengan perbedaan variasi waktu pemberian.

Mekanisme kerjanya Indometasin sebagai anti inflamasi, bila membran sel mengalami kerusakan oleh suatu rangsangan kimiawi, fisik, atau mekanis, maka enzim fosfolipase diaktifkan untuk mengubah fosfolipida menjadi asam arachidonat. Asam lemak poli tak jenuh ini kemudian untuk sebagian diubah oleh enzim cyclo-oksigenase menjadi endoperoksida dan seterusnya menjadi prostaglandin. Cyclo-oksigenase terdiri dari dua iso-enzim, yaitu COX-1 (tromboxan dan prostacyclin) dan COX-2 (prostaglandin). Kebanyakan COX-1 terdapat di jaringan, antara lain di pelat-pelat darah, ginjal dan saluran cerna.

COX-2 dalam keadaan normal tidak terdapat di jaringan tetapi dibentuk selama proses peradangan oleh sel-sel radang (Tan dan Raharja, 2008). Efek penghambatan COX 1 pada saluran cerna inilah yang mengakibatkan terjadinya inflamasi pada saluran cerna. Induksi Indometasin pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) akan menghambat enzim siklooksigenase 1 (COX 1) pada saluran pencernaan yang berperan merubah asam arakidonat menjadi prostaglandin pada usus. Penghambat COX 1 akan menyebabkan produksi prostaglandin di dalam usus menurun dimana prostaglandin berperan menghambat sekresi asam lambung dan merangsang sekresi mukus (Katzung, 2010).

Penurunan produksi prostaglandin akan menyebabkan penurunan produksi mukus sebagai barrier mukosa usus sehingga akan mempermudah terjadinya iritasi dan infeksi bakteri. Adanya infeksi bakteri mengakibatkan terjadinya aktivasi makrofag dimana menyebabkan terjadinya peningkatan aktivitas dan produksi dari *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) di dalam sel. *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) yang berupa O_2 akan menyebabkan fosforilasi oksidatif pada NF- κ B sehingga menyebabkan terjadinya pemutusan ikatan NF- κ B dengan I κ B yang akan menyebabkan perpindahan NF- κ B dari sitoplasma ke inti sel (nukleus). Perpindahan NF- κ B dari sitoplasma ke nukleus akan menginduksi transkripsi dan translasi sitokin pro inflamasi yang berupa TNF- α . peningkatan produksi TNF- α akan mengakibatkan agregasi dan aktivasi neutrofil sehingga menyebabkan terjadinya inflamasi dan kerusakan jaringan pada kolon (Katzung, 2010).

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah ada, maka hipotesis penelitian yang dapat diajukan adalah :

1. Pemberian indometasin dengan variasi perbedaan waktu dapat memberi efek terhadap peningkatan unsur TNF- α pada tikus putih (*Rattus norvegicus*).
2. Pemberian indometasin dengan perbedaan waktu terhadap gambaran histopatologi organ kolon tikus putih (*Rattus norvegicus*).



BAB 4. METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April hingga July 2019. Pelaksanaan penelitian dilakukandi beberapa laboratorium, diantaranya sebagai berikut:

- a. Pemeliharaan hewan coba dan pemberian perlakuan di lakukan di Laboratorium Fisiologi Hewan Universitas Islam Negeri (UIN) Malang.
- b. Pemberian Indometasin, *euthanasia*, pengambilan sampel kolon dilakukan di Laboratorium Histologi FKH UB.
- c. Pembuatan preparat Histopatologi Kolon, pemotongan blok parafin preparat kolon untuk immunohistokimia, pewarnaan HE, dan pewarnaan immunohistokimia dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi FK UB.
- d. Pengamatan preparat immunohistokimia dilakukan di laboratorium Histologi FKH UB.

4.2 Alat dan Bahan

4.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang tikus untuk tempat pemeliharaan berupa kandang dari bahan plastik beserta penutup dari kawat jala dengan ukuran 37 x 30 cm untuk masing-masing 20 ekor tikus. Tempat pakan, tempat minum, spuit, nampan sebagai wadah tikus, kamera, mikroskop. Peralatan yang digunakan untuk insisi dan pembuatan sediaan histopatologi meliputi, gunting bedah, skapel,

pinset, object glass, cover glass, papan seksi sebagai alas pada saat pembedahan, pot kecil sebagai tempat penyimpanan organ.

4.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah sediaan indometasin 3 mg, pakan berbentuk pelet, sekam sebagai alas kandang, formalin 10%

4.2.3 Hewan coba

Penelitian ini menggunakan hewan coba sebanyak 20 ekor tikus (*Rattus norvegicus*) galur wistar berumur 8-12 minggu. Tikus dengan umur tersebut merupakan tikus dewasa muda yang mempunyai keadaan fisiologis optimum. Tikus yang digunakan mempunyai berat badan 150 gram untuk perlakuan. Tikus yang dipilih adalah tikus yang sehat dengan ciri-ciri bulu bersih bercahaya, mata jernih bersinar, tingkah laku normal dan berat badan bertambah selama adaptasi.

4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental dengan dilakukan pengacakan terhadap 20 ekor tikus yang terbagi dalam empat perlakuan ($t=4$) dan tiap perlakuan terdapat lima pengulangan ($n=4$). Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) karena hanya ada satu sumber keragaman yakni perlakuan yang dibeda-bedakan di samping pengaruh acak (kusriningrum, 2008). Pengacakan terhadap 20 ekor tikus dan variabel yang diamati yaitu gambaran histopatologi kolon dan ekspresi TNF- α . Kelompok perlakuan dapat dilihat pada **tabel 4.1**.

Tabel 4.1 Kelompok Perlakuan

Kelompok	Perlakuan
P0 Kontrol Negatif	Tikus hanya diberi pakan berupa pelet dan air minum secara <i>ad libitum</i>
P1 3 mg Indometasin selama 33 jam	Tikus diberi 3 mg Indometasin, pemeliharaan dilanjutkan hingga 33 jam setelah pemberian Indometasin.
P2 3 mg Indometasin selama 48 jam	Tikus diberi 3 mg Indometasin, pemeliharaan dilanjutkan hingga 48 jam setelah pemberian Indometasin.
P3 3 mg Indometasin selama 57 jam	Tikus diberi 3 mg Indometasin, pemeliharaan dilanjutkan hingga 57 jam setelah pemberian Indometasin.

4.3.1 Pengulangan

Berdasarkan rancangan penelitian yang menggunakan 4 kelompok perlakuan, maka jumlah ulangan untuk masing-masing kelompok perlakuan adalah sebagai berikut (Kusriningrum, 2008):

$$\begin{aligned}
 p(n-1) &\geq 15 \\
 4(n-1) &\geq 15 \\
 n-1 &\geq 15/4 \\
 n &\geq 3,75 + 1 \\
 n &\geq 4,75
 \end{aligned}$$

keterangan :

t = Jumlah perlakuan

n = Jumlah ulangan

Berdasarkan perhitungan diatas, maka untuk 4 kelompok hewan coba diperlukan jumlah pengulangan 5 kali dalam setiap kelompok sehingga dibutuhkan 20 ekor hewan coba.

4.4 Variabel Penelitian

Variabel penelitian ini terdiri dari:

Variabel Bebas : Dosis Pemberian Indometasin

Variabel Tergantung: Ekspresi TNF- α dan gambaran histopatologi kolon

Variabel Kontrol : Tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar, berat 150 gram, pakan, dan minum

4.5 Tahapan Penelitian

4.5.1 Persiapan Hewan Coba

Tikus (*Rattus norvegicus*) 20 ekor dibagi secara acak kemudian dimasukan kedalam kandang selama satu minggu diadaptasikan dalam kandang plastik beserta tutup kawat ram dengan hanya memberi pakan berupa pellet dan minum secara *ad libitum* agar dapat menyesuaikan diri terhadap kondisi lingkungan yang baru. Pakan dan minum diberikan secukupnya pagi dan sore hari selain itu kandang harus diusahakan dalam keadaan bersih.

4.5.2 Pemberian Indometasin

Sehari setelah proses adaptasi, ke-20 ekor tikus sehat dibagi secara acak menjadi 4 kelompok perlakuan p0 dengan masing-masing lima pengulangan. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) di induksi secara per oral dengan dosis 20 mg/Kg BB. Tikus putih yang digunakan mempunyai berat badan 150 gram. Dosis pemberian Indometasin diberikan peroral pada kelompok perlakuan satu (P1), perlakuan dua (P2), dan kelompok perlakuan tiga (P3) sedangkan kelompok kontrol negatif (P0) tidak diberikan indometasin. Perbedaan waktu P1, P2, dan P3 masing-masing adalah 33 jam, 48 jam, dan 57 jam.

Dosis indometasin yang digunakan adalah 20 mg/kg berat badan tikus. Indometasin dilarutkan dalam minyak jagung steril yang berfungsi sebagai vehicle (Ninik, Aulanni'am, Chanif, 2012). Perhitungan dosis indometasin yang diberikan secara per oral adalah sebagai berikut :

Kebutuhan indometasin :

$$20 \text{ mg/kg BB} \times 0,15 \text{ Kg} = 3 \text{ mg/tikus}$$

Berat rata-rata tikus adalah 150 g, sehingga diperlukan 3 mg indometasin. Sebanyak 3 mg indometasin dilarutkan dengan 200 μ l minyak jagung. Selanjutnya 200 μ l larutan indometasin diberikan dengan cara disonde (dimasukkan secara oral).

4.5.3 Pengambilan Kolon Untuk Pembuatan Preparat Histopatologi

Pengambilan kolon dilakukan sesuai dengan waktu tunggu masing-masing perlakuan. Pada kelompok perlakuan 1 (P1) eutanasi dan pengambilan kolon dilakukan 33 jam setelah pemberian indometasin, pada kelompok perlakuan 2 (P2) eutanasi dan pengambilan kolon dilakukan 48 jam setelah pemberian Indometasin, dan kelompok perlakuan 3 (P3) eutanasi dan pengambilan kolon dilakukan 57 jam sejak pemberian indometasin, sedangkan pada kelompok kontrol negatif (P0), eutanasi dilakukan bersamaan dengan kelompok perlakuan 3 (P3) yaitu 57 jam sejak kelompok perlakuan 1, 2, dan 3 (P1, P2, dan P3) diberikan indometasin.

Pengambilan organ diawali dengan menganastesi tikus menggunakan cara dislokasi pada antara *os. Cervicalis I dan II*. Tikus diletakan pada posisi terlentang pada papan seksi, nekropsi dilakukan tepat pada linea alba dengan

membuka kulit dan fascia. Setelah rongga abdomen terbuka dilakukan pengambilan organ kolon dan dimasukkan kedalam larutan formalin 10%.

Selanjutnya dilakukan proses dehidrasi pada kolon dengan menggunakan etanol secara bertingkat dari konsentrasi 70% selama 24 jam, etanol 80% selama 2 jam, serta etanol 90%, 95%, dan absolut selama 20 menit. Proses dehidrasi berjalan dalam kondisi teragitasi dan pada suhu 4⁰C setelah itu jaringan dimasukkan kedalam xylol I selama 20 menit dan xylol II selama 30 menit. Selanjutnya *embedding* dilakukan dalam parafin cair yang ditempatkan dalam inkubator bersuhu 58-60⁰C. Jaringan dimasukkan dalam parafin cair hingga memadat. *Blocking* merupakan suatu proses pembuatan blok preparat agar dapat dipotong dengan mikrotom. Proses ini menggunakan cetakan dari plastik (*histoplate*) dan piringan logam. *Histoplate* diletakan diatas piringan logam dan sedikit cairan parafin dituang kedalam cetakan tersebut. Jaringan kemudian dimasukkan dengan cepat menggunakan pinset yang telah dipanaskan dan posisi jaringan diatur di dalam cetakan. Parafin cair dituang kembali hingga menutupi seluruh cetakan tersebut.

Setelah membeku cetakan diletakan dalam penjepit mikrotom dan dipotong dengan ketebalan $\pm 5\mu\text{m}$. Jaringan dipotong untuk merapihkan bagian yang tidak terpotong secara sempurna pada awal pemotongan. Untuk menempelkan jaringan pada *object glass*, *object glass* yang telah di-*coated* dengan cara dimasukkan kedalam waterbath dan digerakan kearah object yang juga di masukan kedalam waterbath.

Preparat ini kemudian diwarnai dengan pewarna *hematoxylin eosin* (HE) untuk pengamatan histopatologinya dan sebagian lainnya dibuat untuk pengamatan ekspresi TNF- α dengan metode *immunohistokimia*.

4.5.4 Pembuatan Histopatologi Kolon dengan Pewarnaan HE

Pewarnaan HE menggunakan zat pewarna *hematoxylin*. Zat pewarna *hematoxylin* berfungsi untuk memberi warna biru pada inti sel (basofilik). *Eosin* merupakan counterstaining hematoxylin, digunakan untuk memulas sitoplasma sel dan jaringan penyambung dan memberikan warna merah muda. Pewarnaan HE diawali dengan proses deparafinasi dengan menggunakan xylol lalu dilanjutkan dengan proses rehidrasi dengan menggunakan alkohol absolut I, II, III masing-masing 5 menit, alkohol 95%, 90%, 80%, dan 70% secara berurutan masing-masing selama 5 menit. Sediaan dicuci dengan air mengalir selama 15 menit dan dilanjutkan dengan aquadest selama 5 menit. Setelah itu, diwarnai dengan pewarnaan *hematoxylin* selama 10 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 30 menit dilanjutkan dengan aquadest selama 5 menit. Sediaan diwarnai dengan pewarnaan Eosin selama 5 menit dan dibilas menggunakan air selama 30 menit dilanjutkan dehidrasi dengan alkohol 70%, 80%, 90%, dan 95% masing-masing selama 5 menit, setelah itu dilakukan proses clearing dengan xylol I, II, III selama 3 menit. Terakhir dilakukan mounting menggunakan entellan serta ditutup menggunakan cover glass (Talley *et. al.*, 2011).

4.5.5 Pembuatan Preparat Imunohistokimia (TNF- α)

Proses pembuatan preparat Imunohistokimia diawali dengan proses diparafinisasi dengan cara slide yang sudah ditemplei potongan jaringan

biopsi dari blok parafin direndam ke dalam *xylol I*, *xylol II* dan *xylol III* masing-masing 10 menit, dilanjutkan proses rehidrasi dengan menggunakan etanol absolut I dan II lalu alkohol 70% masing-masing 10 menit, lalu dicuci menggunakan aquades sebanyak 3 kali masing-masing direndam selama 5 menit. Kemudian ditetesi H₂O₂ 3% selama 40 menit, lalu dicuci dengan PBS selama 3 kali 5 menit. Setelah itu direndam kedalam 5% dimasukkan ke dalam kulkas 4⁰C selama 24 jam dan dicuci dalam PBS selama 3 kali dalam 5 menit. Preparat kemudian di reaksikan dengan antibodi primer (*anti rat TNF-α*) selama 24 jam dengan suhu 4⁰C dan dilakukan pencucian kembali dengan antibodi PBS pH 7,4 selama 3 kali 5 menit. Berikutnya direaksikan dengan antibodi sekunder berlabel biotin (*Anti rabbit igG*) berlabel biotin selama 1 jam pada suhu ruang. Selanjutnya dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali 5 menit dan ditetesi substansi enzim *Diamano Benzedine* (DAB) selama 10 menit, dicuci kembali dengan PBS sebanyak 3 kali 5 menit. Selanjutnya dilakukan proses *counterstaining* menggunakan pewarna *mayer hemotoxylen* selama 3 menit, dicuci dengan air pH 8.0 dan dikeringkan. Dilakukan *mounting* dengan *entellan* dan ditutup dengan menggunakan *cover glass* (Setiabudi, 2005). Pengamatan dilakukan dengan perbesaran mikroskop 400x dengan lima dibidang pandang pengamatan. Hasil pengamatan ekspresi TNF-α akan memberikan warna kecoklatan pada sitoplasma sel endotel dan sel radang berupa makrofag (Junquera dan Carneiro, 2007)

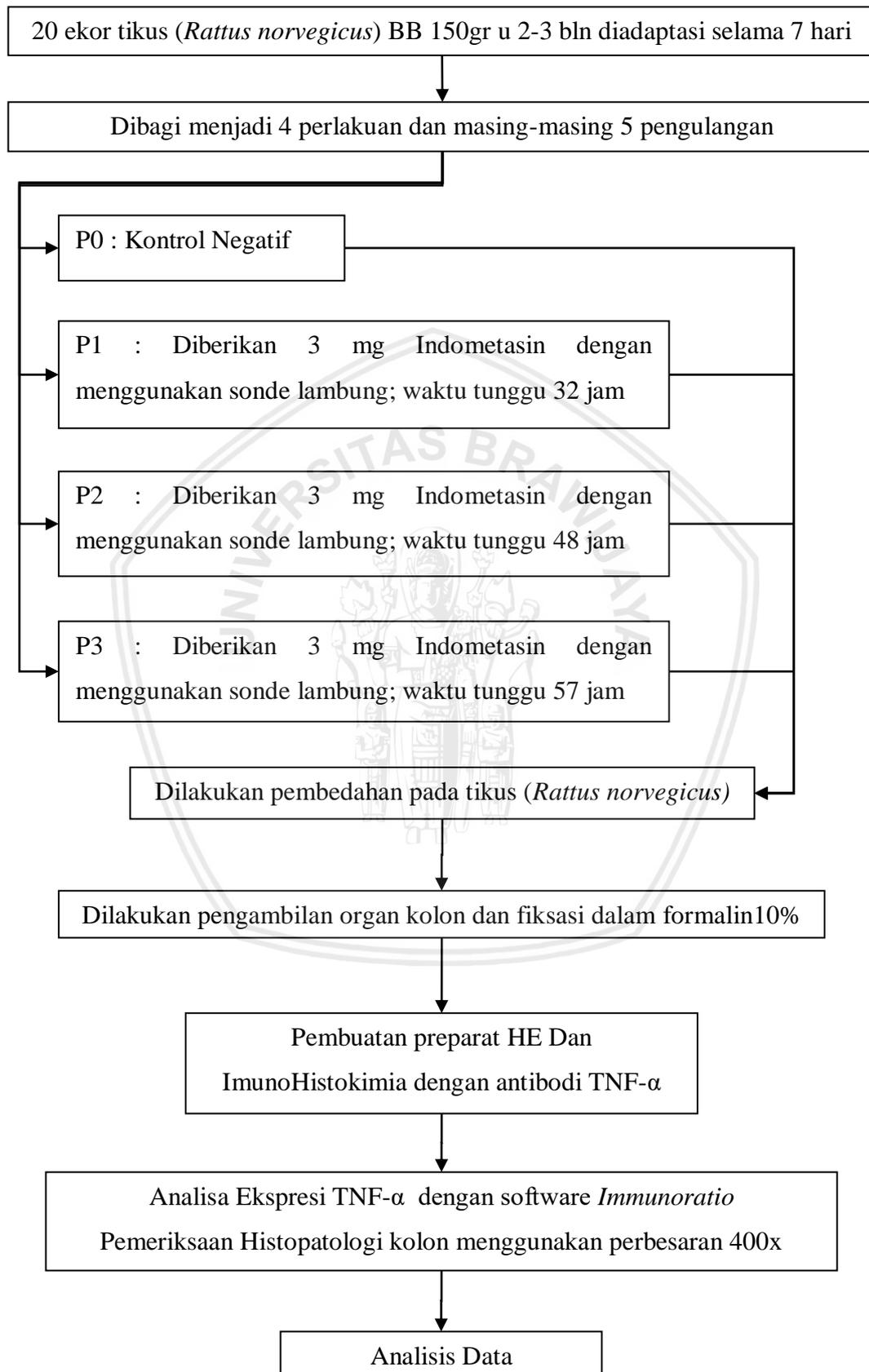
4.6 Analisis Data

Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekspresi TNF-α dan perubahan gambaran histopatologi pada organ kolon tikus putih (*Rattus*

norvegicus). Ekspresi TNF- α dianalisa secara kuantitatif menggunakan uji *Imunohistokimia* (IHK), sedangkan perubahan struktur histopatologi kolon dianalisa secara deskriptif. Data kualitatif yang telah diperoleh dianalisis menggunakan program komputer *SPSS version 22 for windows* dengan analisis ragam ANOVA serta dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) $\alpha = 5\%$.



4.7 Diagram Alur Penelitian



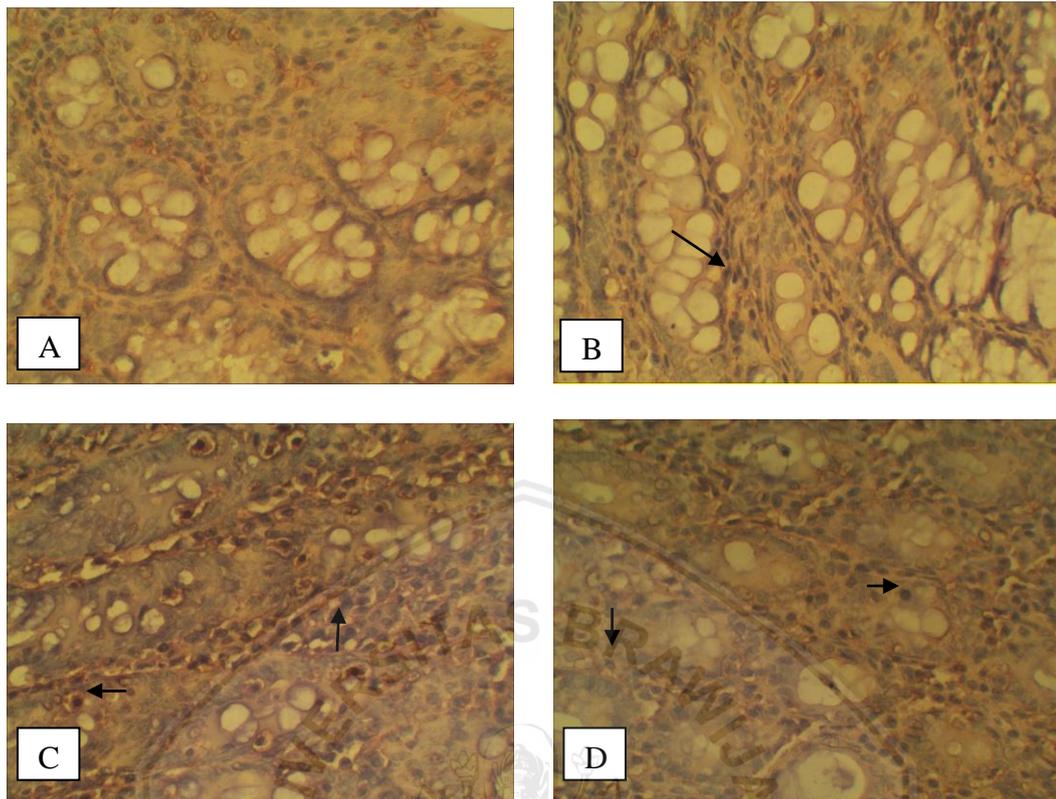
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Pemberian Single Dose Indometasin Dengan Perbedaan Waktu Terhadap Ekspresi TNF- α Kolon Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Penelitian ini dilakukan untuk mengamati peningkatan ekspresi TNF- α dan gambaran Histopatologi kolon tikus putih yang diberikan single dose Indometasin. TNF- α diamati dengan menggunakan metode immunohistokimia. Ekspresi TNF- α ditandai dengan adanya warna kecoklatan pada inti sel yang muncul sebagai akibat adanya reaksi antara antigen dan antibodi. TNF- α merupakan sitokin proinflamasi yang diaktivasi oleh makrofag. Kerusakan jaringan memicu proses inflamasi sebagai salah satu proses penyembuhan.

Ekspresi TNF- α dengan metode *immunohistokimia* akan memunculkan warna kecoklatan. Ekspresi TNF- α tersebar pada jaringan ikat dan pembuluh darah yang ditunjukkan dengan panah warna hitam. Pada semua kelompok perlakuan terlihat adanya ekspresi TNF- α warna kecoklatan yang timbul dihasilkan dari adanya ikatan antara antigen (TNF- α) dalam jaringan kolon dengan antibodi *anti rat* TNF- α selanjutnya dilabeli oleh antibodi sekunder (*anti Rabbit IgG*) kemudian ditambahkan SA-HRP dan substratnya DAB (Setiabudi, 2005).

Hasil ekspresi TNF- α diperoleh dari data kuantitatif dengan perhitungan rata-rata presentasi area dari 5 lapang pandang yang diamati dengan menggunakan mikroskop perbesaran 400x dan hasilnya kemudian dianalisa menggunakan software *immunoratio*. Hasil pengamatan ekspresi TNF- α dapat dilihat pada gambar 5.1.



Gambar 5.1 Ekspresi TNF- α jaringan kolon dengan pewarnaan immunohistokimia perbesaran 400x

Keterangan: (A) Kontrol Negatif (P0)
 (B) Indometasin dengan waktu tunggu 33 jam (P1)
 (C) Indometasin dengan waktu tunggu 48 jam (P2)
 (D) Indometasin dengan waktu tunggu 57 jam (P3)

Pada pemberian Indometasin 33 jam (P1) yang ditunjukkan **Gambar 5.1 A**, terlihat jelas penyebaran warna coklat cukup tinggi bila dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif, namun masih lebih rendah dibandingkan dengan pemberian Indometasin 48 jam dan 57 jam. Hal ini menunjukkan bahwa kolon mengalami inflamasi yang cukup signifikan dari pemberian Indometasin.

Kelompok P2 yang ditunjukkan **Gambar 5.1 B** terlihat bahwa intensitas penyebaran warna coklat lebih tinggi dibandingkan kelompok perlakuan satu (P1). Hal ini menunjukkan bahwa inflamasi yang terjadi pada kolon menjadi lebih

parah seiring dengan waktu tunggu Indometasin yang semakin lama, yaitu 48 jam, setelah induksi indometasin hingga pengambilan organ.

Sedangkan pada kelompok perlakuan tiga (P3), yang ditunjukkan oleh **Gambar 5.1 C** terlihat bahwa intensitas penyebaran warna coklat lebih tinggi dibandingkan P1 dan P2. Hal ini menunjukkan bahwa inflamasi yang terjadi pada kolon menjadi semakin parah seiring dengan waktu tunggu Indometasin yang semakin lama, yaitu 57 jam, setelah induksi indometasin hingga pengambilan organ.

Tabel 5.1 Pengaruh Pemberian Single Dose Indometasin Dengan Perbedaan Waktu Terhadap Ekspresi TNF- α Kolon Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Kelompok Perlakuan	Rata-Rata Ekspresi TNF- α % \pm SD	Ekspresi TNF- α % Peningkatan Terhadap Kontrol Negatif
Kontrol Negatif (P0)	0,514 \pm 0,06 ^a	-
33 Jam (P1)	1,76 \pm 0,48 ^b	242,41%
48 Jam (P2)	2,70 \pm 0,60 ^{b,c}	425,29%
57 Jam (P3)	5,24 \pm 2,91 ^c	919,42%

Keterangan: Perbedaan notasi a, b, c menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar perlakuan terhadap ekspresi TNF- α ($\alpha < 0,05$)

Analisis kualitatif ekspresi TNF- α dilakukan menggunakan program *immunoratio* dengan menghitung persentase area ekspresi TNF- α pada lima lapang pandang kemudian dilakukan analisis statistika (*One Way ANOVA*) menggunakan program SPSS ($p < 0,05$) dan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) (**Tabel 5.1, Lampiran 6**). Berdasarkan data **Tabel 5.1** ekspresi TNF- α pada kelompok kontrol negatif memiliki ekspresi terendah karena radikal bebas yang dihasilkan masih mampu ditangkap oleh antioksidan alami di dalam tubuh (Firda,2015)

Pemberian Single Dose Indometasin dengan perbedaan waktu pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) mempengaruhi ekspresi TNF- α secara signifikan ($p < 0,05$). Kelompok perlakuan 1 (33 jam) memiliki perbedaan yang signifikan dengan kelompok perlakuan 2 (48 jam) dan perlakuan 3 (57 jam). Perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan 1, kelompok perlakuan 2 dan kelompok perlakuan 3 menunjukkan bahwa perbedaan waktu tunggu pemberian single dose Indometasin dapat meningkatkan ekspresi TNF- α .

Pemberian single dose Indometasin dengan waktu tunggu 33 jam memiliki rata-rata ekspresi TNF- α sebesar $1,76 \pm 0,48$. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian single dose Indometasin dengan waktu tunggu 33 jam dapat meningkatkan ekspresi TNF- α .

Pada kelompok perlakuan 2, pemberian single dose Indometasin dengan waktu tunggu 48 jam memiliki rata-rata ekspresi TNF- α sebesar $2,70 \pm 0,60$ menunjukkan perbedaan yang signifikan $p < 0,05$ terhadap kelompok perlakuan 1. Hal ini ditandai dengan peningkatan ekspresi TNF- α .

Pada kelompok perlakuan 3, pemberian single dose Indometasin dengan waktu tunggu 57 jam memiliki rata-rata ekspresi TNF- α sebesar $5,24 \pm 2,91$ menunjukkan perbedaan yang signifikan $p < 0,05$ terhadap kelompok perlakuan 1 dan 2. Hal ini ditandai dengan peningkatan ekspresi TNF- α .

Peningkatan ekspresi TNF- α pada jaringan pada kelompok perlakuan 1, 2 dan 3 berhubungan dengan cara kerja Indometasin yang menghambat COX 1. Efek penghambatan COX 1 pada saluran cerna inilah yang mengakibatkan terjadinya inflamasi pada saluran cerna. Induksi Indometasin pada hewan coba

tikus putih (*Rattus norvegicus*) akan menghambat enzim siklooksigenase 1 (COX 1) pada saluran pencernaan yang berperan merubah asam arakidonat menjadi prostaglandin pada saluran cerna. Penghambat COX 1 akan menyebabkan produksi prostaglandin di dalam saluran cerna menurun dimana prostaglandin berperan menghambat sekresi asam lambung dan merangsang sekresi mukus (Katzung, 2010).

Penurunan produksi prostaglandin akan menyebabkan penurunan produksi mukus sebagai barrier mukosa saluran cerna sehingga akan mempermudah terjadinya iritasi dan infeksi bakteri. Adanya infeksi bakteri mengakibatkan terjadinya aktivasi makrofag dimana menyebabkan terjadinya peningkatan aktivitas dan produksi dari *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) di dalam sel. *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) yang berupa O_2 akan menyebabkan fosforilasi oksidatif pada NF- κ B sehingga menyebabkan terjadinya pemutusan ikatan NF- κ B dengan I κ B yang akan menyebabkan perpindahan NF- κ B dari sitoplasma ke inti sel (nukleus). Perpindahan NF- κ B dari sitoplasma ke nukleus akan menginduksi transkripsi dan translasi sitokin pro inflamasi yang berupa TNF- α . peningkatan produksi TNF- α akan mengakibatkan agregasi dan aktivasi neutrofil sehingga menyebabkan terjadinya inflamasi dan kerusakan jaringan pada kolon (Katzung, 2010).

5.2 Pengaruh Pemberian Single Dose Indometasin Dengan Perbedaan Waktu Terhadap Gambaran Histopatologi Kolon Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Kolon merupakan struktur yang membentuk sebagian besar usus besar, berbentuk tabung muskular berongga yang memanjang dari sekum sampai

rektum. Kolon berfungsi untuk penyerapan air dan elektrolit hingga 90%, mengubah cairan kimus menjadi semi padat yang disebut feses. Bakteri yang terdapat pada kolon berfungsi mencerna selulosa sehingga menghasilkan nutrisi bagi tubuh, menghasilkan vitamin K dan gas yang menyebabkan bau pada feses (Sherwood, 2013).

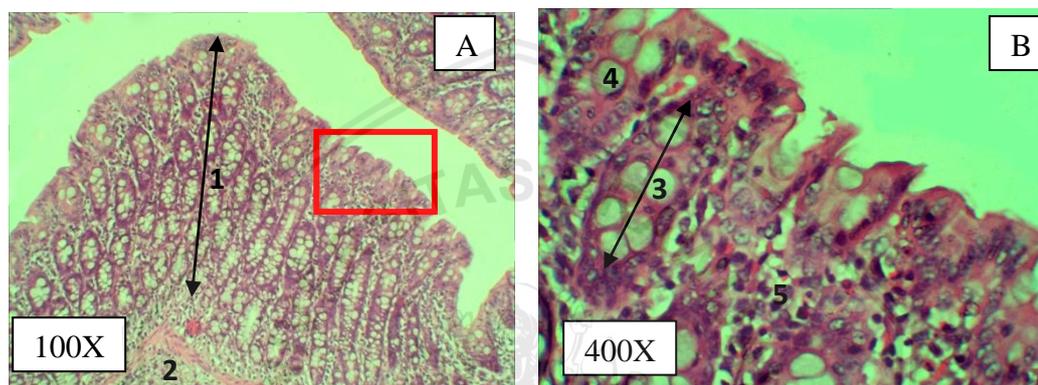
Struktur anatomi usus besar tikus tersusun atas sekum, kolon ascendens (proksimal), kolon transversum (tengah), kolon distal (desendens) dan rektum. Panjang sekum sampai rektum pada tikus sekitar 14 cm. Tikus memiliki sekum yang besar, berbentuk kantong lebar seperti huruf J dan berfungsi untuk fermentasi sisa makanan oleh bakteri, menghasilkan asam lemak, memproduksi vitamin K dan beberapa vitamin B. Struktur anatomi kolon pada tikus berbeda dengan manusia. Lapisan luar kolon tikus tidak membentuk *taenia coli* dan *haustra* serta memiliki serosa yang halus. Kolon ascendens memanjang dari sekum dan melipat menuju kolon transversum. Kolon transversum pendek dan tidak membentuk lipatan. Kolon desendens merupakan lanjutan dari kolon transversum dan terbentuk *fecal pellets* (Treuting dan Dintzis, 2012).

Pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE) pada preparat histopatologi kolon digunakan untuk mengetahui perubahan sel-sel pada jaringan kolon. Hematoksilin merupakan zat warna yang bersifat basa dan berfungsi untuk mewarnai sel yang bersifat asam, sedangkan eosin adalah zat warna yang bersifat asam dan berfungsi untuk mewarnai sel yang bersifat basa (Dayatri, 2009). Pengamatan preparat histopatologi ini dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x.

Tabel 5.2 Pengamatan Gambaran Histopatologi Kolon Tikus Putih

No.	Keterangan	P0	P1	P2	P3
1.	Sel Radang	Tidak ada	Ada (+)	Ada (++)	Ada (+++)
2.	Nekrosis	Tidak ada	Ada (+)	Ada (++)	Ada (+++)
3.	Sel Goblet	Ada (+++)	Ada (+++)	Ada (++)	Ada (+)

Keterangan : (+++) = Banyak, (++) = sedikit, (+) = Sangat Sedikit



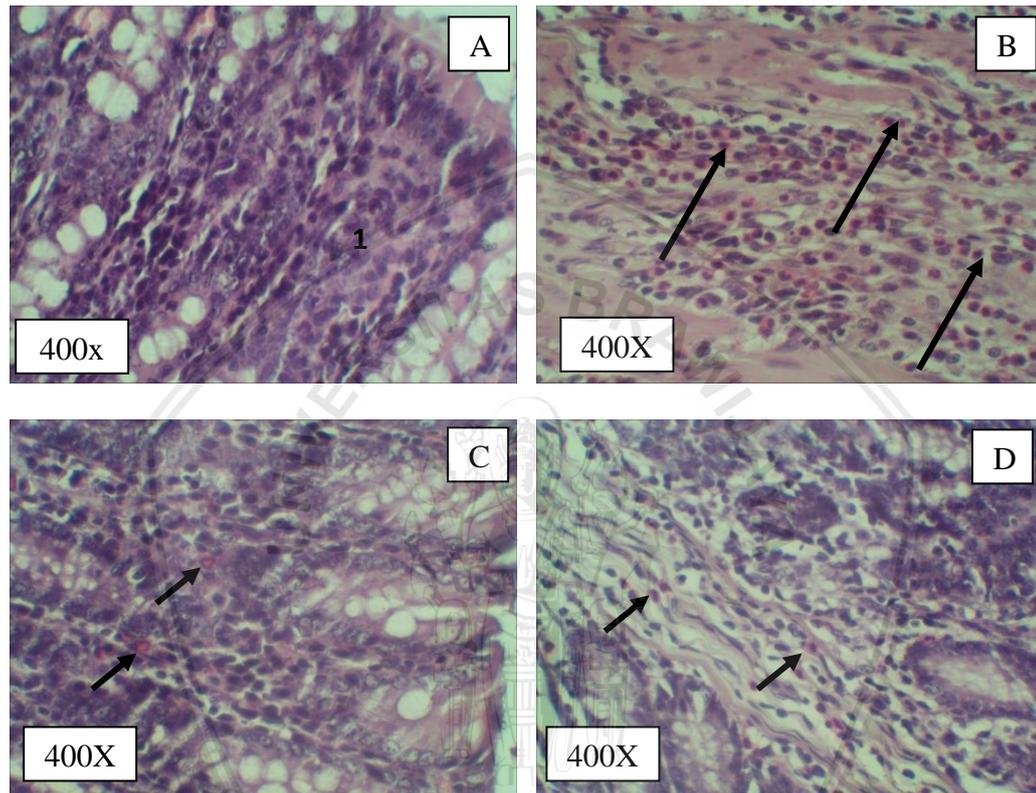
Gambar 5.2 Gambaran histologi kolon tikus putih kelompok kontrol negatif (Tanpa Perlakuan)

Keterangan : (A) Kolon pada kondisi normal, terdiri atas (1) Tunika mukosa, (2) Tunika Sub mukosa; (B) Tunika mukosa terdiri atas (3) Kelenjar Intestinal, (4) Sel Goblet, dan (5) Lamina Propria

Gambar histopatologi kolon tikus kelompok kontrol negatif (P0) yang terlihat pada **Gambar 5.4** terdiri dari 2 lapisan, yaitu tunika mukosa dan tunika submukosa. Pada tunika mukosa (**Gambar 5.4 B**) terlihat epitelium berupa epitel selapis silindris, kelenjar intestinal, sel goblet dan lamina propria.

Struktur histologi kolon tikus sama dengan manusia yaitu terdiri atas empat lapisan yakni mukosa, submukosa, muskularis dan serosa. Lapisan mukosa terdiri atas sel epitel, lamina propria dan muskularis mukosa. Pada lapisan mukosa tidak terdapat vili, tersusun atas epitel kolumnar dan memiliki kript Lieberkuhn yang terletak lebih dalam serta memiliki sel goblet yang lebih banyak daripada usus halus. Pada lamina propria terdapat banyak sel limfoid dan nodul limfoid

yang tersebar sampai ke submukosa. Lapisan submukosa pada tikus lebih tipis dari pada manusia. Lapisan muskularis terdiri atas serabut otot longitudinal dan sirkular. Lapisan serosa merupakan lapisan intraperitoneal kolon yang terdiri atas pembuluh darah dan jaringan adiposa (Treuting dan Dintzis, 2012).



Gambar 5.3 Gambaran histopatologi kolon tikus perbesaran 400x
 Keterangan : **A.** Gambaran Histopatologi kolon tikus P1 (33 jam), Nekrosis pada Tunika Mukosa; **B.** Gambaran Histopatologi kolon tikus P1 (48 jam), Infiltrasi makrofag pada Tunika sub mukosa; **C. D.** Gambaran Histopatologi kolon tikus P1 (57 jam), Infiltrasi Makrofag pada tunika mukosa (**C.**) Infiltrasi makrofag pada Tunika submukosa (**D.**)

Gambaran histopatologi kelompok perlakuan 1 yaitu pemberian single dose Indometasin dengan waktu tunggu 33 jam (**Gambar 5.3 A.**) dapat dilihat tunika mukosa, tunika submukosa, tunika muskularis, dan tunika serosa kolon. Terlihat nekrosis karena adanya respon terhadap inflamasi akibat pemberian Indometasin.

Nekrosis merupakan salah satu pola dasar kematian sel. Nekrosis terjadi setelah suplai darah hilang atau setelah terpajan toksin dan ditandai dengan 12 pembengkakan sel, denaturasi protein dan kerusakan organel. Hal ini dapat menyebabkan disfungsi berat jaringan. Nekrosis adalah kematian sel dan kematian jaringan pada tubuh yang hidup. Nekrosis dapat dikenali karena sel atau jaringan menunjukkan perubahan-perubahan tertentu baik secara makroskopis maupun mikroskopis. Secara makroskopis jaringan nekrotik akan tampak keruh (opaque), tidak cerah lagi, berwarna putih abu-abu. Sedangkan secara mikroskopis, jaringan nekrotik seluruhnya berwarna kemerahan, tidak mengambil zat warna hematoksilin, sering pucat. Gambaran morfologik nekrosis merupakan hasil dari digesti enzimatik dan denaturasi protein yang terjadi secara bersamaan. Digesti enzimatik oleh enzim hidrolitik dapat berasal dari sel itu sendiri (autolisis) dapat juga berasal dari lisosom sel radang penginvansi (heterolisis) (Kumar; Cotran & Robbins, 2007).

Jumlah jaringan yang mengalami nekrosis masih sedikit jika dibandingkan dengan gambar histologi kolon kelompok kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa 33 jam setelah pemberian indometasin, tidak terjadi perubahan signifikan pada kolon hewan coba.

Gambaran histopatologi kelompok perlakuan 2 yaitu pemberian single dose Indometasin dengan waktu tunggu 48 jam (**Gambar 5.3 B.**) Terlihat peningkatan jumlah jaringan yang mengalami nekrosis (jika dibandingkan dengan gambaran histopatologi kelompok perlakuan 1, dan terlihat juga infiltrasi makrofag dalam jumlah yang cukup banyak pada tunika submuskularis kolon.

Gambaran histopatologi kelompok perlakuan 3 yaitu pemberian single dose Indometasin dengan waktu tunggu 57 jam (**Gambar 5.3 C.**) Terlihat makrofag dalam jumlah yang cukup banyak pada tunika mukosa dan tunika submuskularis kolon. Terlihat juga penurunan kelenjar intestinal dan juga sel goblet (bila dibandingkan dengan kelompok perlakuan 1, 2, dan 3).

Kematian sel yang terlihat pada gambaran histopatologi hewan coba kelompok perlakuan 1, 2 dan 3 menunjukkan tipe kematian sel atau nekrosis koagulatif. Hal ini dapat dilihat dari **Gambar 5.3 A, B, C** dimana terlihat kematian sel yang terlihat dengan berkurangnya kelenjar intestinal dan sel goblet namun struktur dari jaringan kolon itu sendiri tidak banyak berubah jika dibandingkan dengan gambaran histopatologi kelompok kontrol negatif. Daerah yang mengalami nekrosis terlihat lebih padat karena berkurangnya kelenjar intestinal dan sel goblet.

Nekrosis Koagulatif terjadi akibat hilangnya secara mendadak fungsi sel yang disebabkan oleh hambatan kerja sebagian besar enzim. Enzim sitoplasmik hidrolitik juga dihambat sehingga tidak terjadi penghancuran sel (sel autolisis minimal). Akibatnya struktur jaringan yang mati masih dipertahankan, terutama pada tahap awal (Sarjadi,2003). Terjadi pada nekrosis iskemik akibat putusnya perbekalan darah. Daerah yang terkena menjadi padat, pucat dikelilingi oleh hemoragik. Mikroskopik tampak inti-inti yang piknotik. Sesudah beberapa hari sisa-sisa inti menghilang, sitoplasma tampak berbutir, berwarna merah tua. Sampai beberapa minggu rangka sel masih dapat dilihat (Pringgutomo,2002).

Penurunan kelenjar intestinal merupakan hasil dari induksi Indometasin. Indometasin merupakan salah satu obat NSAIDs (Non-Steroidal Anti-Inflammatory

Drugs) derivat indolisetat. Mekanisme kerja dari indometasin adalah sebagai penghambat COX non-selektif yang poten sehingga dapat menerunkan pembentukan prekursor prostaglandin (Katzung, 2010).

Indometasin bekerja dengan menghambat COX 2 (prostaglandin) non selektif, namun Indometasin juga menghambat COX 1 (tromboxan dan prostacyclin) yang terdapat di jaringan, antara lain di pelat-pelat darah, ginjal dan saluran cerna. Efek penghambatan COX 1 pada saluran cerna inilah yang mengakibatkan terjadinya inflamasi pada saluran cerna. Induksi Indometasin pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) akan menghambat enzim siklooksigenase 1 (COX 1) pada saluran pencernaan yang berperan merubah asam arakidonat menjadi prostaglandin pada saluran cerna. Penghambat COX 1 akan menyebabkan produksi prostaglandin di dalam saluran cerna menurun dimana prostaglandin berperan menghambat sekresi asam lambung dan mestimulasi sekresi mukus. Penurunan produksi prostaglandin akan menyebabkan penurunan produksi mukus sebagai barrier mukosa saluran cerna sehingga akan memepmudah terjadinya iritasi dan infeksi bakteri (Katzung, 2010). Infeksi bakteri patogen dikenali oleh MHC kelas II bersama *Antigen Presenting Cell* (APCs) saluran pencernaan yaitu makrofag. Makrofag mengaktifkan sel T helper 1 (Th1) yang akan memproduksi sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α , IL-2 dan IFN- γ yang mampu menyebabkan terjadinya inflamasi pada kolon (Bratawidjaya,2010). Hambatan pada COX-1 juga menyebabkan peningkatan perlekatan leukosit PMN pada endotel vaskuler yang menyebabkan peningkatan ROS yang berakibat kerusakan mukosa kolon ditunjukkan oleh adanya erosi epitel dimana epitel yang pada kondisi normal tersusun rapih menjadi rusak dan tidak

beraturan. Jenis *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang paling berbahaya yakni radikal hidroksil karena senyawa ini memiliki reaktivitas paling tinggi. ROS merusak tiga senyawa penyusun integritas sel yaitu DNA dengan cara memutus cincin deoksiribosa, menyebabkan kerusakan basa, terjadi mutasi, kesalahan translasi dan menghambat sintesis protein, protein menyebabkan modifikasi gugus thiol, perubahan aktivitas asam enzim, perubahan transport ion; lipid, menyerang asam lemak tidak jenuh ganda atau *Poly Unsaturates Fatty Acid* (PUFA) dimana lipid tidak jenuh merupakan target rentan ROS karena mengandung banyak ikatan rangkap, menyebabkan metabolit reaktif dan meningkatkan permeabilitas membran. Kerusakan pada DNA, protein dan lipid akibat paparan ROS menyebabkan integritas sel terganggu sehingga memungkinkan terjadinya erosi epitel pada jaringan kolon (Firda,2015).

Berdasarkan gambaran histopatologi diatas, gambaran pada kelompok perlakuan 1, 2, dan 3 menunjukkan peningkatan nekrosis dan infiltrasi makrofag pada jaringan, jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (P0). Hal ini menunjukkan bahwa tingkat keparahan Inflamasi pada jaringan kolon semakin bertambah atau semakin parah seiring dengan bertambahnya waktu tunggu dari pemberian Indometasin (sejak Indometasin diberikan hingga organ di ambil).

Peningkatan derajat keparahan Inflamasi pada kolon ini dapat diakibatkan oleh proses ekskresi Indometasin oleh tubuh, dimana Indometasin dihilangkan melalui ekskresi ginjal, metabolisme, dan ekskresi bilier. Sekitar 60% dari dosis oral diambil dalam urin sebagai obat dan metabolit (26% sebagai indometasin dan glukuronidanya), dan 33% diperoleh dalam tinja (1,5% sebagai indometasin)

(FDA, 2009). Eksresi 33% Indometasin melalui feses ini mengakibatkan adanya konsentrasi Indometasin pada kolon yang mengakibatkan Inflamasi pada kolon.

Inflammatory Bowel Disease Pada kolon di kenal juga sebagai kolitis ulseratif. Kolitis ulseratif mempunyai 3 stadium berbeda yaitu stadium akut, stadium resolving dan stadium kronis. Berikut ini adalah tabel kriteria stadium kolitis ulseratif pada gambaran histopatologis kolon menurut Ariestine,2018, sekurang-kurangnya 2 kriteria harus dipenuhi untuk diagnosa kolitis ulserativa, perlu diingat bahwa seorang penderita dapat ditemukan gambaran dari ketiga stadium dalam satu sediaan.

Tabel 5.3 Kriteria Stadium Kolitis Ulseratif (Aristine, 2018)

	Akut	Resolving	Kronik-Penyembuhan
Vascular Congestion	++	+	-
Mucin Depletion	+	-	-
Cryptitis, Crypt abscess	++	+	-
Epithelial Lost and Ulcer	++	-	-
PMN, Eosinophil and mast cell	++	+	-
Luminal pus	++	-	-
Basal Plasma Cell	++	++	-
Epithelial regeneration	-	++	-
Expantion of mitotic active cell	-	++	-
Architectural distortion :			
➤ Atrophy	-	-	++
➤ Branching	-	-	++
➤ Crypt shortening	-	-	++
➤ Villous surface	-	-	++
Metaplasia pyloric	-	-	++
Metaplasia Paneth cell	-	-	++
Lymphoid Hiperplasia	-	-	++
Ephitelial Displacement	-	-	++
Increased mononucleus	-	-	++
Endocrine cell hiperplasia	-	-	++
Squamus metaplasia	-	-	++

Berdasarkan temuan gambaran histopatologi kolon hewan coba kelompok perlakuan 1, 2, dan 3 (**Gambar 5.3**), terlihat adanya *Mucin depletion* atau

pengurangan mukus yang terlihat dengan pengurangan sel goblet, dimana sel goblet merupakan penghasil mukus. Penurunan sel goblet ini merupakan efek dari penurunan produksi mukus. Temuan lainnya dari gambaran histopatologi kolon hewan coba kelompok perlakuan 1, 2, dan 3, adalah adanya *epithelial lost* dan ulser. Dari kedua temuan ini maka dapat dikatakan bahwa hewan coba kelompok perlakuan 1, 2, dan 3 mengalami Kolitis Ulseratif pada fase akut. Inflamasi akut adalah inflamasi yang terjadi segera setelah adanya rangsang iritan. Pada tahap ini terjadi pelepasan plasma dan komponen seluler darah ke dalam ruang-ruang jaringan ekstraseluler. Termasuk didalamnya granulosit neutrofil yang melakukan pelahapan (fagositosis) untuk membersihkan debris jaringan dan mikroba, Inflamasi akut akan terjadi secara cepat (menit—hari) (Widjayanto, 2005)

Status inflamasi akut pada jaringan kolon ini juga ditunjukkan oleh Tingginya infiltrasi makrofag pada jaringan. Makrofag merupakan sel fagosit mononuklear yang utama di jaringan dalam proses fagositosis terhadap mikroorganisme dan kompleks molekul asing lainnya. Makrofag merupakan sel yang tersebar luas di berbagai jaringan, merupakan fagosit, antigen processing dan antigen presenting cells (APC) serta merupakan sel yang menghasilkan berbagai macam mediator (IL-1, IL-2, TNF- α , ROS, dll). Makrofag yang teraktifasi akan memacu inflamasi akut dengan mengeluarkan mediator-mediator inflamasi. Akibat mediator-mediator yang dilepaskan ini maka terjadilah inflamasi lokal (Widjayanto, 2005).

Tingkat keparahan kerusakan kolon dinilai secara kualitatif dari gambaran histopatologi kolon, dengan menilai nekrosis yang terjadi pada jaringan. Pada **Gambar 5.3 A, B, C** terlihat bahwa terjadi peningkatan jaringan yang mengalami nekrosis seiring dengan bertambahnya variasi waktu waktu tunggu pemberian

DAFTAR PUSTAKA

- Adrien J. A. Unity., Dece E. Sahertian.2010.*Deteksi Kandungan Antioksidan Superoksida Dismutase (SOD) Pada Organ Ginjal Tikus (Rattus norvegicus) Dengan Pewarnaan Imunohistokimia*.Seminar Nasional Science.Universitas Pattimura Ambon
- Ariestine Dina Aprillia.2008.*Kolitis Ulsoratif Ditinjau Dari Aspek Etiologi, Klinik, dan Patogenesis*.Fakultas Kedokteran.Universitas Sumatra Utara.Medan
- Barnett S., Amthony.2002. *The story of Rats: Their Impact on Us and Our Impact on Them*.Crows Nest NSW:Allen&Unwin.
- Chougule, N., B. Sachin, A., N. And Kailasam, K.2018.*Phytochemical Investigation and Screening for Inflammatory Bowel Disease Activity of Ethanolic Extract of Kariyat*.Pharmacognosy Journal.10(1).Department of Centre for Research and Development, PRIST University.Vallam.Thanjavur.Tamil Nadu.India
- Danastri I gusti Ayu M., Ida Bagus Darma P., 2011.*Inflammatory Bowel Disease*.Difisi Bedah Digestif.SMF Ilmu Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Udayana.Rumah Sakit Umum Pusat Sanglah Denpasar.

- Dayatri U. A.2009.*Profil Sel Beta Pulau Langerhans Jaringan Pankreas Tikus Diabetes Mellitus Yang Diberi Virgin Coconut Oil (VCO)* [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan.Institut Pertanian Bogor
- Derle D. V., Gunjar, K.N., dan Sagar, B.S.H.2006.*Adverse Effect Associated with the Use of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs : An Overview*.Indian J. Pharmacol.68(4).209-414
- Edi Widjajanto.2005.*Peranan Makrofag Pada Proliferasi, Diferensiasi dan Apoptosis Pada Proses Hematopoisis (Penelitian Terhadap Limpa Janin Tikus Dan Aspirat Sumsum Tulang Manusia*.Jurnal Kedokteran Brawijaya.11(1).29-36
- Hakim L.2002.*Uji Farmakologi dan Toksikologi Obat Alam Pada Hewan Coba*.Prosiding Seminar Herbal Medicine.Universitas Muhamadiyah, Purwokerto.
- Ivander A. Supit.,Damajanty H. C. Pangemanan., Silvia R. Marunduh.2015.*Profil Tumor Necrosis Factor (TNF- α) berdasarkan indeks masa tubuh (IMT) Pada mahasiswa fakultas kedokteran UNSRAT Angkatan 2014*.Jurnal e-biomedik 3(2).640-643
- Junquiera, L. C., dan J, Carneiru.2007.*Histologi Dasar:Teks dan Atlas*.Ed 10.Jakarta;Penerbit Buku Kedokteran EGC
- Kanti R.F.,2016.*Profil tekanan darah normal tikus putih (Rattus norvegicus) Galur Wistar dan Sprague-Dawley* [Skripsi].Fakultas Kedokteran Hewan.Institut Pertanian Bogor.Bogor
- Katzung G. Betram.2010.*Farmakologi Dasar dan Klinik*. Jakarta:Penerbit buku kedokteran ECG.597-598

- Kumar, V., Cotran, R.S., dan Robbins S.L.2007.*Buku Ajar Patologi*.Edisi 7;ali Bahasa, Brahm U, Pendt;editor Bahasa Indonesia,Huriawati Hartanto, Nurwany Darmaniah, Nanda Wulandari.-ed.7-Jakarta: EGC.
- Kusriningrum, RS., 2008,*Buku Ajar Perancangan Percobaan*.Fakultas kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Dani Abadi, Surabaya
- Laguna. N., R. Luis, Reyes, Garcia, Rosario.2016.*Chemical Speciation of the System Cu(II)-Indometasin Ethanol and Water by UV-Vi5 Spectrophotometry*.Journal of Chemistry.Universitas Autonoma Metropolitana-Iztapalapa.Mexico
- Ninik A. S., Aulanni'am, Chanif M.2012. *Efek Terapi Ekstrak Air Daun Kedondong (Lannea coromandelica) terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) dan Aktivitas Protease pada Ileum Tikus Putih (Rattus norvegicus) Inflammatory Bowel Disease (IBD) Akibat Paparan Indometasin*.Veterinaria Medika.5(3).187-194.
- Parker G.A., dam C.A. Picut.2016.*Atlas of Histology of The Juvenil Rat*.London: British Library Cataloguing in Publication Data.
- Pringgoutomo, S., S. Himawan, A. Tjarta.2002.*Buku Ajar Patologi I*.Jakarta:Sagung seto
- Robbert L. Morrow, J.D.2008.*Senyawa Analgesik-Antipiretik dan Antiradang serta obat-obatan yang digunakan dalam penanganan pirai dalam buku goodman & Gilman Dasar Farmakologi Terapi*.vol.1 edisi 10. Jakarta: Penerbit buku kedokteran EGC.

- Samson, Efraim dan Adrien. Akiles Unitly. 2014. *Ekspresi Immunoglobulin A (IgA) Pada Usus Halus Tikus Putih (Rattus norvegicus)*. Jurusan Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Pattimura.
- Sarjadi. 2003. *Patologi Umum*. Semarang: Badan Penerbit Universitas Diponegoro.
- Setiabudi A. 2005. *Comparison of CD4+ T Cell Expression Between Levobupicain and Non Levobupicain Treated Tissue Surround Wound After Incision Pain. Immunohistochemistry Study On Wistar Rats* [Thesis]. Magister Ilmu Biomedik
- Sherwood Lauralee. 2013. *Introduction to Human Physiology 8th ed*. Buku Kedokteran EGC. Jakarta
- Simanjuntak LCH. 2013. *Histomorfologi tubulus seminiferus dan kelenjar prostat tikus (Rattus norvegicus) serta Konsentrasi Hormon Androgen Pasca Pemberian Ekstrak Purwoceng* [Tesis]. Bogor: Institut Pertanian Bogor
- Sirois M. 2005. *Laboratory Animal Medicine: Principles and Procedures*. United States of America: Mosby Inc.
- Suprijono A., Setyo T., Henri P. N., 2011. *Pengaruh Pemberian Madu Terhadap Gambaran Histopatologi Lambung Studi pada Tikus Putih Janan Galur Winstar yang diinduksi Indometasin*. Sains Medika. 3(1). 41-47
- Talley, D., Bancroft, JD., Stevens, A. 2011. *Theory and practice of histological techniques: fixation and fixatives*. 3rd Edition. New York: Churchill Livingstone.
- Tan H.T., Kirana Raharja. 2008. *Obat-obat penting Edisi 6*. Jakarta: Gramedia.

- Treuting P.M., dan S. M. Dintzis.2012.*Comparative Anatomy and Histology a Mouse and Human Atlas*.London:British Library Cataloguing in Publication Data
- Wilmana, P.F., dan Gan, S.G., 2007.*Analgesil-antipiratik Analgesik Antiinflamasi Nonsteriud dan Obat Gangguan Sendi Lainnya*.Dalam: Gan, S.G., Editor Farmakologi dan Terapi.Edisi 5.Jakarta: Gaya Baru.230-240.
- Wistar Institute.2019.*Our History Philadelphia: The Wistar Institute* [Internet].[diunduh 29 Mei 2019].Tersedia pada: <http://www.wistar.org>
- Firda Anjar Sari.2015.*Studi Pemberian Ekstrak Kerang Pisau Terhadap Penurunan Ekspresi Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) Dan Gambaran Histopatologi Kolon Pada Tikus Inflammatory Bowel Disease* [Skripsi].Program Studi Kedokteran Hewan.Program Kedokteran Hewan.Universitas Brawijaya
- Food and Drug Administration.2009.*Indocin Indometacin Oral Suspension* [Internet]. [diunduh 15 Juni 2019]. Tersedia pada : https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/018332s0321b1.pdf
- Zhang, Hui, Wen, Jizhou, Yan.2017.*Application of immunohistochemistry technique in hidrobiological studies*.Department of Biology.College of Fisheries and Life Sciences.Shanghai Ocean University.Shanghai.China



LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Laik Etik





**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARANCE"**

No: 1135-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 : PENGARUH PEMBERIAN SINGLE DOSE INDOMETASIN
DENGAN PERBEDAAN WAKTU TERHADAP EKSPRESI
TNF- α DAN GAMBARAN HITOPATOLOGI ORGAN
JEJUNUN TIKUS *Rattus norvegicus*

PENELITI : THEKLA DAMO KENDOM

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 2 Juli 2019
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya



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

Lampiran 2. Tabel konversi dosis hewan percobaan dengan manusia (Laurence, 1964) dalam Hakim (2002)

Dicari Diketa Hui	Men cit 20 g	Tikus 200 g	Marmut 400 g	Kelin ci 1,5 kg	Kucing 1,5 kg	Kera 4 kg	Anjing 12 kg	Manu sia 70 kg
Mencit 20 g	1,0	7,0	12,23	27,80	29,7	64,10	124,20	387,9
Tikus 200 g	0,14	1,0	1,74	3,9	4,20	9,20	17,80	56,0
Marmu 400 g	0,08	0,57	1,0	2,25	2,40	5,20	10,20	31,50
Kelinci 1,5 kg	0,04	0,25	0,44	1,0	1,08	2,40	4,50	14,20
Kucing 1,5 kg	0,03	0,23	0,41	0,92	1,0	2,20	4,10	13,0
Kera 4 kg	0,01 6	0,11	0,19	0,42	0,43	0,1	1,9	6,1
Anjing 12 kg	0,00 8	0,06	0,10	0,22	1,24	0,52	1,0	3,10
Manusia 70 kg	0,00 26	0,018	0,031	0,07	0,076	0,16	0,32	1,0

Lampiran 3. Perhitungan Konversi Dosis

Dosis Terapi indometasin orang dewasa = 20-25 mg

Konversi dosis Indometasin dari 70 kg BB Manusia ke tikus yaitu

$$0,018 \times (20-25 \text{ mg/kg BB}) = 0,36 - 0,45 \text{ mg/kg BB Tikus}$$

Batas Maksimum Harian Indometasin = 150-200 mg/hari

Konversi Dosis Maksimum Harian Indometasin dari 70 kg BB Manusia Ke tikus

yaitu :

$$0,018 \times (150 - 200 \text{ mg/kg BB}) = 2,7 - 3,6 \text{ mg/kg BB Tikus perhari}$$

Dosis Induksi *Inflammatory Bowel Disease* dengan Indometasin :

20 mg/kg BB Tikus (Ninik, Aulanni'am, Chanif, 2012)

Lampiran 4. Penyiapan Indometasin

Dosis indometasin yang digunakan adalah 20 mg/kg berat badan tikus. Indometasin dilarutkan dalam minyak jagung steril yang berfungsi sebagai vehicle (Ninik, Aulanni'am, Chanif, 2012). Perhitungan dosis indometasin yang diberikan secara per oral adalah sebagai berikut :

Kebutuhan indometasin :

$$20 \text{ mg/kg BB} \times 0,15 \text{ Kg} = 3 \text{ mg/tikus}$$

Berat rata-rata tikus adalah 150 g, sehingga diperlukan 3 mg indometasin. Sebanyak 3 mg indometasin dilarutkan dengan 200 μl minyak jagung. Selanjutnya 200 μl larutan indometasin diberikan dengan cara disonde (dimasukkan secara oral).

Pembuatan Stok Indometasin

Pembuatan stok indometasin yaitu indometasin yang telah dihitung dosisnya kemudian dilarutkan dengan minyak jagung steril. Dosis indometasin 3 mg/ekor dilarutkan dengan minyak jagung sebanyak 200 μL , sehingga kebutuhan minyak jagung untuk melarutkan indometasin untuk keseluruhan kandang adalah:

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

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

$$= 3 \text{ ml}$$

Lampiran 5. Pembuatan Preparat Histopatologi Kolon dengan Pewarnaan HE**Organ Kolon**

- Difiksasi dengan cara organ dimasukan kedalam formaldehid
- Dilakukan dehidrasi dengan alkohol bertingkat dari konsentrasi 70% 24 jam, etanol 80% 2 jam, etanol 90%, 95% dan etanol absolut 20 menit
- Dilakukan penjernihan dengan merendam jaringan dalam larutan xylol I selama 20 menit, xylol II selama 30 menit
- Diinfiltrasi dan *embeeding* yaitu dengan blok parafin pada inkubator bersuhu 56-58°C
- Dipotong blok parafin yang berisi organ dengan mikrotom dengan ketebalan 5µm dan disimpan dalam inkubator suhu 38-40°C selama 24 jam
- Dilakukan deparafinisasi dengan xylol I dan II dan di rehidrasi dengan etanol absolut 95%, 90%, 80%, 70% kemudian dicuci dengan air mengalir
- Dilakukan pewarnaan *Hematoxylin* 10 menit kemudian dicuci dengan air mengalir dan pewarnaan eosin 5 menit
- Didehisrasi dengan etanol absolut, alkohol 90%, 90%, 80%, dan 70%
- Dimounting dengan entellan dan diamati perubahan histopatologi organ kolon

Lampiran 6. Pewarnaan Immunohistokimia**Organ Kolon**

Dideparafinisasi dengan xylol I dan II kemudian direhidrasi dengan alkohol 100%, 95%, 90%, 80%, 70% dan disimpan di refrigator

dicuci dengan aquades 3x5 menit dan diblocking dengan peroxidase H₂O₂ selama 15 menit

Dicuci dengan PBS 3x5 menit dan diblocking dengan serum triton semalaman dengan suhu 4°C

Diuci dengan PBS 3 x 5 menit kemudian diberi antibodi primer TNF α dan di Inkubasi suhu 4°C semalam

Diicuci dengan PBS 3 x 5 menit dan diberi antibodi sekunder kemudian diinkubasi 60 menit kemudian dicuci kembali dengan PBS 3 x 5 menit

Ditambahkan SAHRP dan diinkubasi 40 menit kemudian dicuci kembali dengan PBS 3 x 5 menit

Ditambahkan Kromagen DAB (*diamino benzidine*) dan diinkubasi selama 40 menit kemudian dicuci dengan PBS selama 5 menit dilanjutkan dengan aquades 2 x 5 menit

Diberi pewarna Meyer 5 selama 5 menit dan mounting dengan entelan

diamati dibawah mikroskop

Lampiran 7. Presentase Peningkatan Ekspresi TNF- α

$$\text{Peningkatan Ekspresi TNF-}\alpha \text{ P1 (\%)} = \frac{\text{Rerataan P1} - \text{Rerataan Kontrol}}{\text{Rerataan kontrol}} \times 100\%$$

$$= \frac{1,76 - 0,514}{0,514} \times 100\%$$

$$= 242,41\%$$

$$\text{Peningkatan Ekspresi TNF-}\alpha \text{ P2 (\%)} = \frac{\text{Rerataan P2} - \text{Rerataan kontrol}}{\text{Rerataan P1}} \times 100\%$$

$$= \frac{2,7 - 0,514}{0,514} \times 100\%$$

$$= 425,29\%$$

$$\text{Peningkatan Ekspresi TNF-}\alpha \text{ P3 (\%)} = \frac{\text{Rerataan P3} - \text{Rerataan P2}}{\text{Rerataan P2}} \times 100\%$$

$$= \frac{5,24 - 0,514}{0,514} \times 100\%$$

$$= 919,45\%$$

Lampiran 8. Statistika TNF- α

Uji normalitas Data

Tests of Normality

Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
TNF_alfa_Kolon						
Kontrol Negatif	.205	5	.200*	.979	5	.929
33 jam	.182	5	.200*	.972	5	.887
48 jam	.227	5	.200*	.950	5	.737
57 jam	.298	5	.169	.817	5	.111

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Descriptives

TNF_alfa_Kolon

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol Negatif	5	.5140	.06656	.02977	.4314	.5966
33 jam	5	1.7600	.48229	.21568	1.1612	2.3588
48 jam	5	2.7040	.60554	.27081	1.9521	3.4559
57 jam	5	5.2480	2.91471	1.30350	1.6289	8.8671
Total	20	2.5565	2.25666	.50460	1.5004	3.6126

Descriptives

TNF_alfa_Kolon

	Minimum	Maximum
Kontrol Negatif	.43	.61
33 jam	1.18	2.48
48 jam	1.94	3.44
57 jam	2.62	8.74
Total	.43	8.74

Test of Homogeneity of Variances

TNF_alfa_Kolon

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
36.764	3	16	.000

ANOVA

TNF_alfa_Kolon

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	60.361	3	20.120	8.845	.001
Within Groups	36.397	16	2.275		
Total	96.758	19			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: TNF_alfa_Kolon
Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol Negatif	33 jam	-1.24600	.95390	.572	-3.9751	1.4831
	48 jam	-2.19000	.95390	.141	-4.9191	.5391
	57 jam	-4.73400*	.95390	.001	-7.4631	-2.0049
33 jam	Kontrol Negatif	1.24600	.95390	.572	-1.4831	3.9751
	48 jam	-.94400	.95390	.757	-3.6731	1.7851
	57 jam	-3.48800*	.95390	.010	-6.2171	-.7589
48 jam	Kontrol Negatif	2.19000	.95390	.141	-.5391	4.9191
	33 jam	.94400	.95390	.757	-1.7851	3.6731
	57 jam	-2.54400	.95390	.072	-5.2731	.1851
57 jam	Kontrol Negatif	4.73400*	.95390	.001	2.0049	7.4631
	33 jam	3.48800*	.95390	.010	.7589	6.2171
	48 jam	2.54400	.95390	.072	-.1851	5.2731

*. The mean difference is significant at the .05 level.

TNF_alfa_Kolon

Tukey HSD^a

Kelompok	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Kontrol Negatif	5	.5140	
33 jam	5	1.7600	
48 jam	5	2.7040	2.7040
57 jam	5		5.2480
Sig.		.141	.072

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.