

**PENGARUH PEMBERIAN SENYAWA KLORIN  
(Ca(ClO)<sub>2</sub>) BERLEBIH TERHADAP PROFIL  
PROTEIN DAN HISTOPATOLOGI  
JEJENUM PADA TIKUS PUTIH  
(*Rattus norvegicus*)**

**SKRIPSI**

**Oleh:**

**YOHANA NOVITA KRISTIANI**

**155130100111024**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN**

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2019**

**PENGARUH PEMBERIAN SENYAWA KLORIN  
(Ca(ClO)<sub>2</sub>) BERLEBIH TERHADAP PROFIL  
PROTEIN DAN HISTOPATOLOGI  
JEJENUM PADA TIKUS PUTIH  
(*Rattus norvegicus*)**

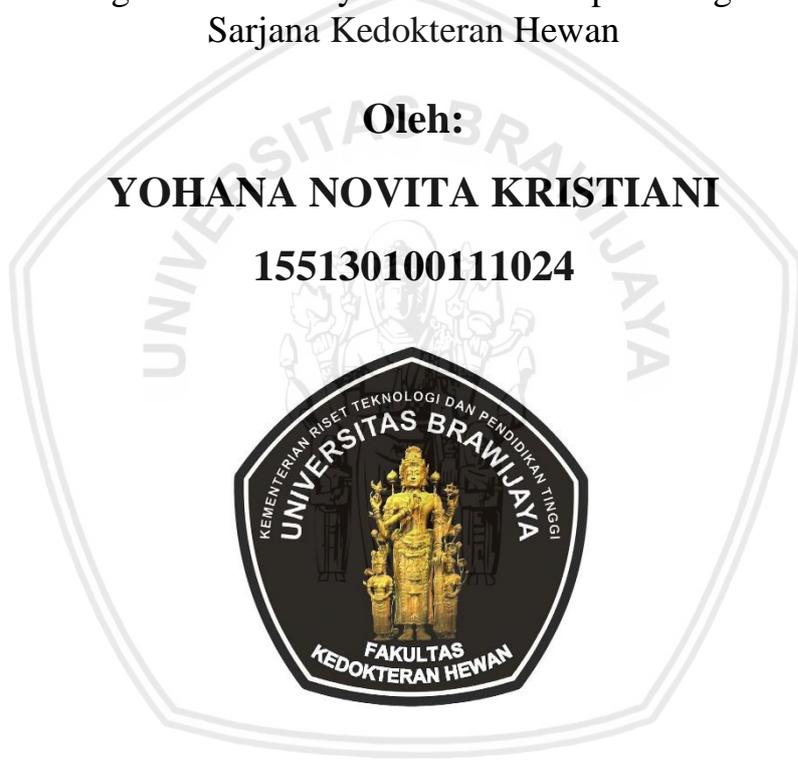
**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

**YOHANA NOVITA KRISTIANI**

**155130100111024**



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



**LEMBAR PENGESAHAN****PENGARUH PEMBERIAN SENYAWA KLORIN (Ca(ClO)<sub>2</sub>)  
BERLEBIH TERHADAP PROFIL PROTEIN DAN  
HISTOPATOLOGI JEJENUM PADA TIKUS PUTIH  
(*Rattus novergicus*)**

Oleh:

**YOHANA NOVITA KRISTIANI  
155130100111024**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
pada tanggal 11 April 2019  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

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

**drh. Ajeng Erika PH, M.Si**  
NIP.19890516 201504 2 001

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya

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

## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Yohana Novita Kristiani

NIM : 155130100111024

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulis skripsi berjudul :

Pengaruh Pemberian Senyawa Klorin ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) Berlebih Terhadap Profil Protein dan Histopatologi Jejunum pada 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 yang tercantum 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, 11 April 2019  
Yang menyatakan,

Yohana Novita Kristiani  
NIM. 155130100111024

## **Pengaruh Pemberian Senyawa Klorin ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) Berlebih Terhadap Profil Protein dan Histopatologi Jejunum pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)**

### **Abstrak**

Senyawa Klorin ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) banyak digunakan sebagai bahan desinfektan dalam air untuk berbagai keperluan termasuk di bidang veteriner melalui klorinasi air. Desinfektan ini bekerja dengan baik untuk membunuh bakteri, fungi dan virus. Namun desinfektan ini juga dapat menimbulkan efek negatif terhadap kesehatan jika dikonsumsi dalam jumlah yang berlebihan. Kemampuan oksidasi senyawa klorin sangat kuat, dalam air klorin dapat diubah menjadi asam hipoklorit ( $\text{HClO}$ ) yang dapat menembus sel dan bereaksi dengan protein sitoplasmik yang dapat merusak struktur sel. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian senyawa klorin berlebih terhadap profil protein dan histopatologi jejunum pada tikus putih (*Rattus norvegicus*). Pada penelitian ini digunakan 20 ekor hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*). Hewan coba dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif (diberi air minum biasa), dan kelompok perlakuan (tikus diberi larutan klorin dengan konsentrasi klorin dalam air (P1) 50 ppm ; (P2) 100 ppm ; (P3) 150 ppm ; (P4) 200 ppm). Pemberian larutan klorin dilakukan selama 7 hari sebanyak 1 ml setiap harinya. Hasil profil protein dan hasil pengamatan histopatologi jejunum dianalisa secara deskriptif. Profil protein pada jejunum mengalami perubahan setelah diberi paparan senyawa klorin. Ditemukan protein 43 kDa, 75 kDa, dan 60 kDa yaitu protein yang banyak diekspresikan pada jaringan yang mengalami inflamasi. Gambaran histopatologi jejunum menunjukkan adanya perubahan pada bagian vili usus ditandai dengan adanya erosi pada lapisan epitel dan ruptur pada vili serta diikuti adanya infiltrasi sel radang pada lapisan mukosa. Penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian senyawa klorin berlebih dapat mempengaruhi perubahan profil protein dan histopatologi jejunum.

**Kata kunci:** histopatologi, jejunum, profil protein, senyawa klorin.

## Effect of Chlorine Compound ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) Excess on Protein Profiles and Jejunum Histopathology in White Rat (*Rattus norvegicus*)

### Abstract

Chlorine Compound is widely used as a disinfectant in water for various purpose including in the veterinary field such as chlorination of water. This disinfectant works well to kill bacteria, fungi and viruses. But this disinfectant can also have negative effects on health if consumed in excessive amounts. The oxidation ability of chlorine compound is very strong, in water chlorine can be converted into hypochlorous acid which can penetrate cells and react with cytoplasmic proteins leading to damage cell structure. This study aimed to determine the effect of excess chlorine compound on the protein profiles and histopathology of jejunum in white rats (*Rattus norvegicus*). In this study 20 animals were tested white rats (*Rattus norvegicus*). The experimental animals were divided into 5 groups, namely the negative control group (received regular drinking water), and the treatment group (rats were receive chlorine solution with chlorine concentration in water (P1) 50 ppm; (P2) 100 ppm; (P3) 150 ppm; (P4) 200 ppm). The rat received 1 ml of chlorine solution per day for 7 days. The results of protein profiles and histopathology of jejunum were analyzed descriptively. Protein profiles in jejunum changed after exposure to chlorine compounds. Proteins 43 kDa, 75 kDa, and 60 kDa were found, those were widely expressed proteins in inflamation. The histopathological picture of the lesion shows changes in the intestinal villi marked by erosion of the epithelial lining and rupture in the villi and followed by inflammation of the cell infiltration in the lining mucosa. The conclusion is that the administration of excess chlorine compounds can affect changes in protein profile and histopathology of jejunum.

**Keywords:** chlorine compound, histopathology, jejunum, protein profiles.

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan yang Maha Esa atas rahmat dan anugerah-Nya karena penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pengaruh Pemberian Senyawa Klorin ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) Berlebih Terhadap Profil Protein dan Gambaran Histopatologi Organ Jejunum pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)”. Tersusunnya skripsi ini tak lepas dari bantuan berbagai pihak, baik secara materi maupun dorongan semangat. Pada kesempatan kali ini, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr.Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya (FKH UB).
2. Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc., selaku dosen pembimbing I yang telah membantu penulis dalam mengarahkan dan memberi bimbingan, kesabaran, fasilitas, dan waktu yang telah diberikan serta dukungan kepada penulis dalam penyusunan skripsi ini.
3. drh. Ajeng Erika P.H., M.Si., selaku dosen pembimbing II yang telah membantu penulis dalam mengarahkan dan memberi bimbingan, kesabaran, fasilitas, dan waktu yang telah diberikan serta dukungan kepada penulis dalam penyusunan skripsi ini.
4. drh. Ani Setianingrum, M.Sc., dan drh. Galuh Chandra Agustina, M.Si., sebagai dosen penguji yang telah memberikan kritik dan saran untuk perbaikan penulisan skripsi ini.

5. drh. Rahadi Swastomo, M.Biomed., sebagai dosen pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan akademik dan dukungan kepada penulis selama masa perkuliahan.
6. Seluruh civitas (dosen dan karyawan) FKH UB yang telah membantu memfasilitasi dalam penulisan skripsi ini.
7. Sahabat Klorin Berlebih penulis, Dinda Tri Cleopatra, Kirana Sita Pinasti, dan Anwarifan yang telah bersedia berbagi keluh kesah dan berjuang bersama dalam mengerjakan penelitian dan penulisan skripsi ini.
8. Keluarga penulis yang selalu memberi kasih sayang, dorongan, dukungan untuk menyelesaikan skripsi, serta perhatian akan kebutuhan saya baik secara moril maupun materi.
9. Rekan-rekan PMK Veteriner yang memberikan doa dan semangat dalam mengerjakan skripsi ini.
10. Sahabat penulis, Mitra Arta, Olfivessen, Clara Widya, Anastasia Meilly, Aulia Rahma, SW, Yoel Kristanto, KTB JFC, konsel DOTS, dan rekan MPP VET yang telah memberikan motivasi, semangat, dan dukungan doa untuk mengerjakan skripsi ini.

Akhir kata penulis berharap kiranya Tuhan Yang Maha Esa akan memberkati dan melimpahkan berkat atas semua kebaikan yang telah diberikan kepada penulis. Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna sehingga diharapkan dapat memperoleh masukan dari berbagai pihak

Malang, 11 April 2019

Penulis

## DAFTAR ISI

## Halaman

<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	iii
<b>LEMBAR PERNYATAAN</b> .....	iv
<b>ABSTRAK</b> .....	v
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	vii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	ix
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xi
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xiii
<b>DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG</b> .....	xiv
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Rumusan Masalah .....	4
1.3. Batasan Masalah .....	4
1.4. Tujuan .....	5
1.5. Manfaat .....	5
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	6
2.1. Klorin .....	6
2.1.1. Bahaya Paparan Klorin Berlebih .....	7
2.1.2. Mekanisme Toksisitas .....	8
2.2. Jejenum .....	10
2.3. Profil Protein .....	13
2.4. Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) .....	14
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN</b> .....	16
3.1. Kerangka Kopsseptual .....	16
3.2. Hipotesis Penelitian .....	18
<b>BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN</b> .....	19
4.1. Waktu dan Tempat Penelitian .....	19
4.2. Populasi dan Sampel .....	19
4.3. Pembagian Kelompok Tikus .....	19
4.4. Aklimatisasi .....	20
4.5. Rancangan Penelitian .....	20
4.6. Penetapan Jumlah Perlakuan dan Ulangan .....	21
4.7. Variabel Penelitian .....	22
4.8. Alat dan Bahan .....	22
4.9. Prosedur Penelitian .....	23
4.10. Analisis Data .....	30



<b>BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	31
5.1. Pengaruh Pemberian Senyawa Klorin ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) Berlebih Terhadap Profil Protein Jejunum .....	31
5.2. Pengaruh Pemberian Senyawa Klorin ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) Berlebih Terhadap Histopatologi Jejunum.....	36
<b>BAB 6 PENUTUP</b> .....	42
6.1. Kesimpulan.....	42
6.2. Saran.....	42
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	43
<b>LAMPIRAN</b> .....	48



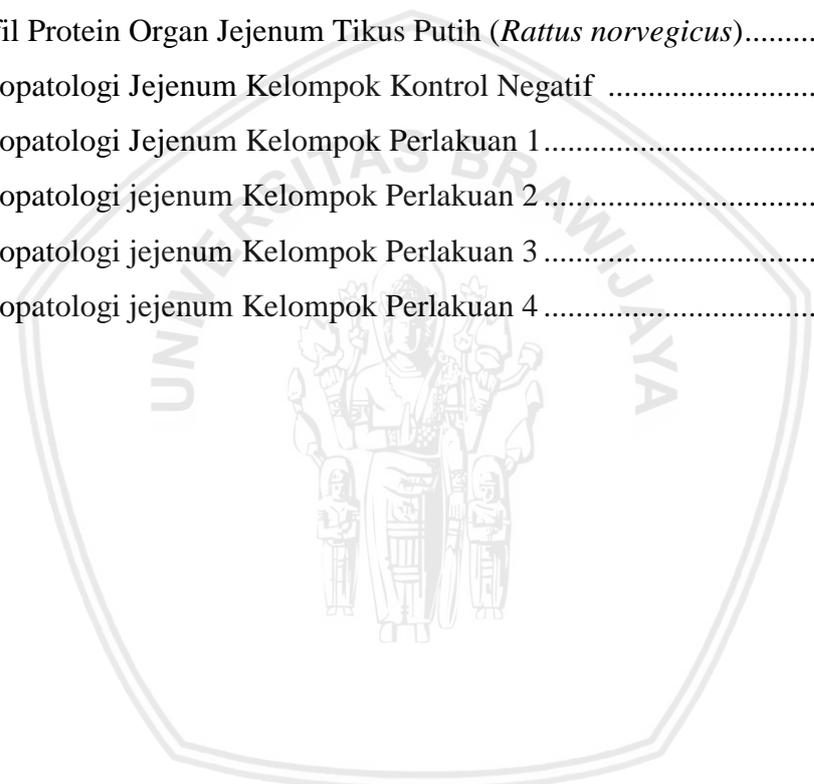
## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1. Rancangan Kelompok Penelitian .....	21
5.1. Profil Protein Jejunum Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) Normal dan yang Diberi Senyawa Klorin ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) Berdasarkan Massa Molekul ( $M_r$ ) Protein Hasil SDS-PAGE .....	33



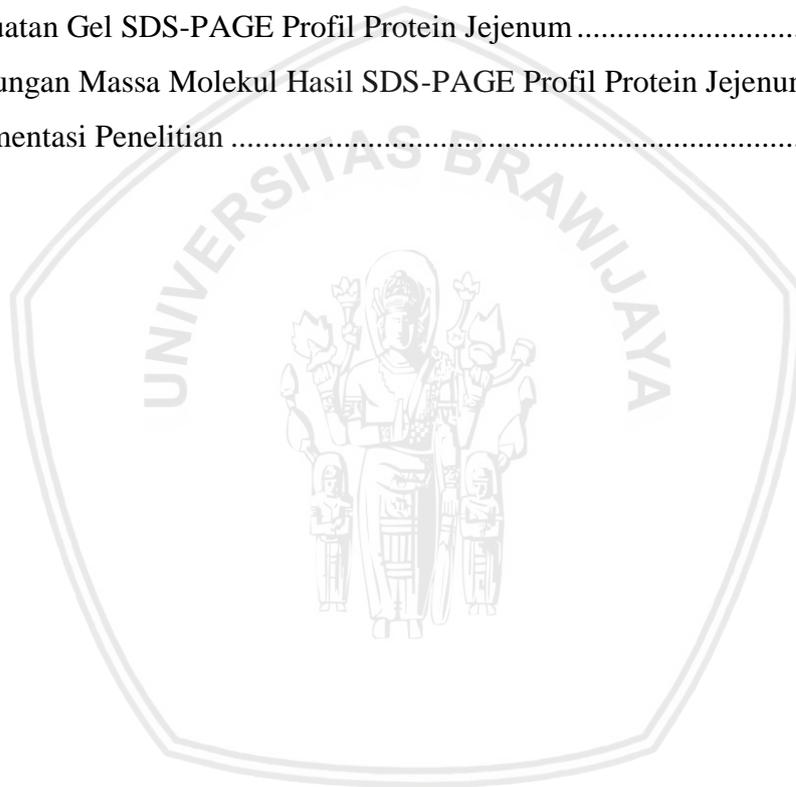
## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar</b>	<b>Halaman</b>
2.1. Histologi Jejunum.....	11
2.2. Perubahan Histologi Jejunum Akibat Intoksikasi .....	12
2.3. Tikus Putih ( <i>Rattus novergicus</i> ) strain <i>Wistar</i> .....	15
3.1. Kerangka Konsep Penelitian .....	16
5.1. Profil Protein Organ Jejunum Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ).....	32
5.2. Histopatologi Jejunum Kelompok Kontrol Negatif .....	37
5.3. Histopatologi Jejunum Kelompok Perlakuan 1 .....	37
5.4. Histopatologi jejunum Kelompok Perlakuan 2 .....	38
5.5. Histopatologi jejunum Kelompok Perlakuan 3 .....	38
5.6. Histopatologi jejunum Kelompok Perlakuan 4 .....	39



## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran</b>	<b>Halaman</b>
1. Keterangan Laik Etik .....	48
2. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian .....	49
3. Perhitungan Senyawa Klorin (Ca(ClO) <sub>2</sub> ) Granular.....	50
4. Pembuatan Preparat Histopatologi Jejenum.....	51
5. Pembuatan Gel SDS-PAGE Profil Protein Jejenum .....	52
6. Perhitungan Massa Molekul Hasil SDS-PAGE Profil Protein Jejenum .....	54
7. Dokumentasi Penelitian .....	55



**DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG**

%	: Persen
°C	: Derajat celcius
Ca(ClO) <sub>2</sub>	: Kalsium hipoklorit
CH <sub>3</sub> COOH	: Asam asetat
Cl	: Klorin
DDT	: difenil trikloroetana
H <sup>+</sup>	: Hidrogen
H <sub>2</sub> O	: Air/aquades
HClO	: Asam hipoklorit
HE	: <i>Hematoxyline Eosin</i>
L	: Liter
mg	: Milligram
ml	: Milliliter
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	: Natrium tiosulfat
NaCl	: Natrium klorida
NE	: Neutrophil elastase
PBS	: <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PFA	: Paraformaldehid
PLTN	: Pembangkit Listrik Tenaga Nuklir
PLTU	: Pembangkit Listrik Tenaga Uap
ppm	: part per million
PR3	: Proteinase 3
PVC	: <i>Poly vinyl chloride</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
RPA	: Rumah Potong Ayam
RPH	: Rumah Potong Hewan
SDS-PAGE	: <i>Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electroforesis</i>

## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Air merupakan bahan alam yang dibutuhkan oleh seluruh makhluk hidup mulai dari manusia, hewan, hingga tumbuhan. Kualitas air yang digunakan dalam kehidupan sehari-hari sangat berpengaruh terhadap kualitas kesehatan suatu makhluk hidup. Di bidang veteriner, air sangat dibutuhkan bagi peternakan untuk minum ternak dan keperluan membersihkan kandang, di rumah potong hewan (RPH) dan rumah potong ayam (RPA) air digunakan untuk berbagai keperluan misal mencuci karkas yang merupakan bahan pangan asal hewan dan membersihkan sisa-sisa darah sesudah pemotongan. Di dalam tubuh, air sebagai salah satu zat gizi makro mempunyai fungsi dalam berbagai proses. Air dibutuhkan dalam proses metabolisme, pengangkutan dan sirkulasi zat gizi, pengendalian suhu tubuh, kontraksi otot, transmisi impuls saraf, keseimbangan elektrolit, serta sebagai media eliminasi sisa metabolisme (Santoso dkk., 2011).

Air sebelum digunakan untuk berbagai keperluan, terlebih dahulu air diberi perlakuan untuk menjaga kualitas air terutama dari bahaya biologi maupun bahaya kimia. Dalam air terdapat berbagai kandungan yang dapat ikut larut di dalamnya. Dalam air dapat terkandung mikroorganisme seperti *E.coli* yang disebabkan oleh pencemaran, garam mineral, oksigen, zat kimia lain seperti florin, nitrat, arsen, brom, timah, kadmium, dan uranium. Beberapa kandungan tersebut diperbolehkan ada dalam air namun dalam jumlah yang

terbatas sesuai standar yang telah ditetapkan berdasarkan baku mutu air (Santoso dkk., 2011).

Klorin ( $\text{Cl}_2$ ) merupakan salah satu unsur yang ada di bumi dan jarang dijumpai dalam bentuk bebas. Pada umumnya klorin dijumpai dalam bentuk terikat dengan unsur atau senyawa lain membentuk garam natrium klorida ( $\text{NaCl}$ ) atau dalam bentuk ion klorida di air laut (Hasan, 2006). Klorin juga banyak digunakan sebagai bahan desinfektan untuk air berupa kalsium hipoklorit ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) atau lebih dikenal sebagai kaporit. Sebelum air digunakan untuk berbagai keperluan, umumnya air diberi perlakuan dengan menambahkan senyawa klorin sebagai desinfektan dalam proses klorinasi air. Desinfektan ini bekerja dengan baik untuk membunuh bakteri, fungi, dan virus. Namun desinfektan ini dapat meninggalkan sisa residu klorin yang dapat menimbulkan efek negatif terhadap kesehatan jika dikonsumsi dalam jumlah yang berlebihan, selain dapat menimbulkan bau dan rasa yang tidak enak pada air (Herawati dan Yuntarso, 2017). Menurut Permenkes 492/MENKES/PER/IV/2010, kandungan residu klorin maksimum yang diperbolehkan ada di dalam air minum adalah 5 mg/L. Pada air minum residu klorin biasanya ditemukan dalam jumlah 0,2-0,3 mg/L atau kurang dari 0,5 mg/L (Ermawati dan Aji, 2018). *Food and Drug Administration* (FDA) Amerika Serikat (1992), menetapkan standar kandungan klorin yang diperbolehkan ada dalam bahan pangan tidak lebih dari 45 ppm.

Menurut Purwaningsih dan Supriyanto (2017), klorin sangat toksik dan menyebabkan iritasi pada membran mukosa saluran pencernaan, disamping

sangat reaktif dan merupakan oksidator yang sangat kuat, klorin dalam tubuh juga dapat mengganggu kesehatan, dalam jangka pendek klorin dapat menyebabkan penyakit maag dan iritasi lokal pada saluran usus. Sedangkan dalam jangka panjang secara akumulatif akan menyebabkan penyakit kanker hati dan ginjal. Pada penelitian yang telah dilakukan oleh French, *et al.* (1998) mengenai potensi imunotoksisitas klorin dalam air minum pada mencit disimpulkan bahwa konsumsi residu klorin sampai 30 ppm selama 2 minggu tidak menimbulkan pengaruh yang signifikan terhadap respon imun. Penelitian yang dilakukan Rohmah dan Sulistiyorini (2017), menunjukkan bahwa pekerja mengalami keluhan kesehatan gastrointestinal ringan setelah mengkonsumsi udang yang direndam dalam air yang ditambahkan klorin sebanyak 864,5 ppm per blok tambak dan menghasilkan residu klorin pada masing-masing udang sebanyak 1,5 ppm.

Klorin yang masuk ke dalam tubuh melalui saluran pencernaan, akan melewati bagian usus tidak terkecuali jejunum, sehingga dapat menyebabkan iritasi pada membran mukosa dikarenakan sifat klorin yang sangat oksidatif. Sifat oksidatif klorin tersebut juga memicu pengeluaran enzim protease yang merupakan enzim proteolitik, memiliki fungsi mengkatalisis pemutusan ikatan peptida pada protein (Hardiany, 2013). Berdasarkan latar belakang diatas, maka penulis melakukan penelitian tentang pengaruh pemberian senyawa klorin ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) berlebih terhadap profil protein dan gambaran histopatologi jejunum pada tikus putih (*Rattus norvegicus*).

## 1.2. Rumusan masalah

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

- 1) Apakah pemberian senyawa klorin ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) berlebih dapat mempengaruhi profil protein jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*)?
- 2) Apakah pemberian senyawa klorin ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) berlebih dapat mempengaruhi histopatologi jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*)?

## 1.3. Batasan Masalah

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

- 1) Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan, strain Wistar, umur 8-10 minggu dengan berat 150-200 gram. Hewan coba yang digunakan sudah mendapat kode laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya (KEP UB) No: 1028-KEP-UB (**Lampiran 1**).
- 2) Senyawa klorin yang diberikan berupa *calcium hypochlorite granular* ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) 95% dengan konsentrasi 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, dan 200 ppm, dipapar sebanyak 1 ml selama 7 hari diberikan melalui sonde lambung.
- 3) Variabel yang diamati dari penelitian ini adalah profil protein jejunum menggunakan metode elektroforesis dan histopatologi organ jejunum pada tunika mukosa (vili) dengan pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE).

#### 1.4. Tujuan

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, tujuan dari penelitian ini adalah:

- 1) Mengetahui pengaruh pemberian senyawa klorin ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) berlebih terhadap profil protein jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*).
- 2) Mengetahui pengaruh pemberian senyawa klorin ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) berlebih terhadap histopatologi jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*).

#### 1.5. Manfaat

Penelitian ini bermanfaat untuk memberikan informasi kepada masyarakat tentang pengaruh pemberian senyawa klorin ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) dan sebagai tindakan pencegahan untuk berbagai penyakit yang ditimbulkan oleh penggunaan senyawa klorin ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) yang berlebih.

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Klorin

Klor (berasal dari bahasa Yunani Chloros, yang berarti “hijau pucat”), adalah unsur kimia dengan nomor atom 17 dan simbol Cl termasuk dalam golongan halogen. Klorin merupakan unsur kedua dari golongan halogen, terletak pada halogen VII A periode III. Sifat kimia klorin sangat ditentukan oleh konfigurasi elektron pada kulit terluar. Keadaan ini membuat klor tidak stabil dan sangat reaktif. Hal ini disebabkan oleh struktur elektron gas mulia. Disamping itu, klorin juga bersifat sebagai oksidator. Seperti oksigen, klorin juga membantu reaksi pembakaran dengan menghasilkan panas cahaya. Dalam air laut maupun sungai, klorin akan terhidrolisa membentuk asam hipoklorit (HClO) yang merupakan suatu oksidator. Klorin adalah bahan kimia yang sering digunakan sebagai pembunuh kuman (Rosita dkk., 2016).

Menurut Achmad Hasan (2006) Untuk pemanfaatan, klorin digunakan dalam berbagai bidang: (1) Bidang kesehatan, klorin digunakan sebagai disinfektan pada pengolahan air minum. Klorin yang digunakan adalah gas klor ( $\text{Cl}_2$ ) atau kalsium hipoklorit [ $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ ]. Selain itu, klorin juga digunakan sebagai bahan obat-obatan yang dikombinasikan dengan senyawa lain; (2) Bidang Industri tekstil, pulp, dan kertas, klorin digunakan sebagai pemutih dan penghalus serta menguatkan permukaan kertas; (3) Bidang pertanian, pestisida dari kelompok organoklorin merupakan pestisida yang mengandung klorin, yaitu Dikloro Difenil Trikloroetana (DDT), metoksikhlor, aldrin, dan dieldrin. Dikloro Difenil Trikloroetana (DDT) merupakan pestisida yang pertama kali

dihasilkan; (4) Industri kimia dan industri lain, klorin digunakan pada produk yang berbahan dasar plastik, seperti Poly Vinyl Chloride (PVC), pelarut (*solvent*), *dry cleaning*, dan berbagai produk lain yang sering dijumpai dalam kehidupan sehari-hari, seperti lem, semen dan pembungkus; (5) Bidang pembangkit listrik, Pembangkit Listrik Tenaga Uap (PLTU) dan Pembangkit Listrik Tenaga Nuklir (PLTN), klorin digunakan pada sistem pendingin (*cooling system*) yang berfungsi sebagai pengontrol *biological fouling*. Untuk PLTU yang menggunakan air sungai maupun air tanah sebagai pendingin, sering dilengkapi dengan unit klorinasi (*chlorination plant*).

#### **2.1.1. Bahaya Paparan Senyawa Klorin Berlebih**

Paparan senyawa klorin berlebih, dalam bentuk gas maupun cairan dapat mengakibatkan luka permanen bahkan kematian. Secara umum luka permanen terjadi disebabkan oleh asap gas klorin. Klorin sangat potensial untuk menyebabkan penyakit di kerongkongan, hidung, dan *tract respiratory* (saluran kerongkongan dekat paru-paru). Klorin juga sangat membahayakan sistem pernafasan jika terhirup. Dalam bentuk gas, klor dapat merusak membran mucus, sedangkan dalam wujud cair dapat menghancurkan kulit (Chandra, 2006).

Zat klorin akan bereaksi dengan air membentuk asam hipoklorus yang diketahui dapat merusak sel-sel dalam tubuh, khususnya apabila dikonsumsi secara terus menerus atau berlebihan. Zat klorin yang berlebih dapat menggerus usus dan lambung (korosit) Dalam jangka panjang mengkonsumsi air atau bahan makanan yang mengandung klorin akan

mengakibatkan penyakit kanker hati dan ginjal (Chandra, 2006). Saat klor ( $\text{Cl}_2$ ) ditambahkan pada air maka akan terjadi dua reaksi, yaitu reaksi hidrolisis dan ionisasi (Fuadi, 2012).

a). Hidrolisis



Pada suhu air normal, reaksi tersebut telah selesai secara lengkap hanya dalam beberapa detik saja. Pada larutan encer, dimana pH sedikit lebih besar dari 4 keseimbangan akan berjalan ke kanan, karena itu hanya sedikit sekali  $\text{Cl}_2$  yang berada dalam larutan.

b). Ionisasi



Asam hipoklorit dapat terionisasi menjadi ion hidrogen dan ion hipoklorit, reaksi yang terjadi merupakan reaksi bolak-balik, karena itu derajat disosiasinya tergantung pada pH dan suhu. Asam hipoklorit merupakan asam lemah yang sukar terdisosiasi pada pH sekitar 6 atau lebih rendah. Klor yang terdapat dalam air sebagai asam hipoklorit dan ion hipoklorit yang diartikan sebagai *free available chlorine* atau dikenal dengan sebutan klor tersedia bebas.

### 2.1.2. Mekanisme Toksisitas

Efek toksik senyawa klorin yang terutama adalah sifat korosifnya. Kemampuan oksidasi klorin sangat kuat, dimana di dalam air klorin akan melepaskan oksigen dan hidrogen klorida membentuk asam hipoklorit ( $\text{HClO}$ ) yang menyebabkan kerusakan jaringan. Asam hipoklorit ( $\text{HClO}$ )

dapat menembus sel dan bereaksi dengan protein sitoplasmik yang dapat merusak struktur sel (U.S Department of Health And Human Services, 2007).

Kerusakan jaringan menimbulkan inflamasi yang disebabkan adanya peningkatan jumlah sel darah putih (leukositosis), terutama neutrofil yang merupakan sel imun pertama yang hadir pada daerah inflamasi. Menurut Heutinck, *et al* (2010), butiran neutrofil mengandung tiga protease serin: neutrophil elastase (NE), Cat-G dan proteinase 3 (PR3), yang memiliki baik aktivitas intra maupun ekstraseluler. *Neutrophil elastase* (NE) juga dihasilkan oleh sel radang lain seperti monosit, *mast* sel, dan eosinofil yang juga berperan dalam proses inflamasi.

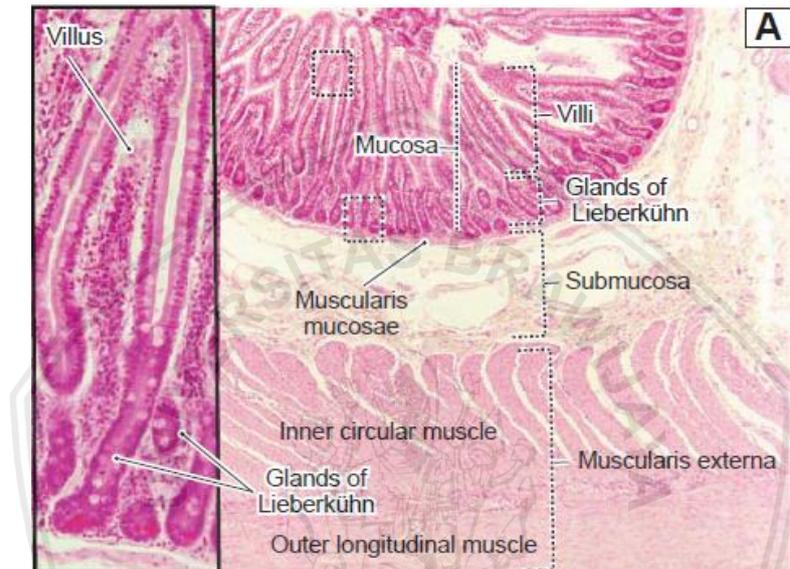
Selain dari sel radang, protease juga dihasilkan oleh sel-sel penyusun pada jejunum. Sifat oksidatif dan suasana asam yang ditimbulkan oleh asam hipoklorit (HClO) memicu pengaktifan enzim protease yang ada pada lisosom sehingga terjadi pemutusan rantai protein melalui hidrolisis ikatan peptide oleh enzim protease. Protease adalah enzim yang mengkatalisis pemecahan protein melalui hidrolisis ikatan peptida. Selain itu protease berperan pada perkembangan yaitu pada perakitan kolagen dari prokolagen, serta berperan pada proliferasi sel yaitu kontrol proteolitik oleh siklin, degradasi serta berperan pada kematian sel yang terprogram (apoptosis) (Hardiany, 2013).

## 2.2. Jejunum

Jejunum adalah segmen bagian tengah dari usus halus yang ditemukan di antara duodenum dan ileum. Sebagian besar nutrisi yang ada dalam makanan diserap oleh jejunum sebelum diteruskan ke ileum untuk penyerapan lebih lanjut. Jejunum merupakan kelanjutan dari usus kecil setelah duodenum. Jejunum dimulai pada fleksura duodeno jejunal, dimana usus halus berubah tajam ke arah anterior. Dari fleksura duodeno jejunal, jejunum memiliki alur berkelok-kelok di rongga abdomen sebelum melanjutkan sebagai ileum. Sementara jejunum tidak memiliki ciri anatomis yang khusus untuk membedakan dari ileum (Taylor, 2018).

Secara histologi, jejunum terdiri dari empat lapisan jaringan yang berbeda yang bekerja bersama untuk memberikan fungsi organ (**Gambar 2.1**). Lapisan terdalam, yaitu tunika mukosa, mengelilingi lumen berlubang. Tunika mukosa tersusun dari lipatan jaringan epitel silindris selapis untuk penyerapan nutrisi. Banyak sel goblet di mukosa menghasilkan lendir untuk melindungi dinding usus dan melumasi bolus makanan yang melewati jejunum. Lapisan setelah mukosa adalah tunika submukosa yang mendukung lapisan jaringan lain. Banyak pembuluh darah dan saraf melewati submukosa untuk memberikan oksigen, nutrisi, dan sinyal saraf ke jaringan jejunum. Tunika muskularis adalah lapisan selanjutnya dari jejunum yang mengelilingi submukosa dan berisi jaringan otot polos. Kontraksi otot polos di tunika muskularis memungkinkan makanan untuk dicampur dan didorong melalui jejunum. Tunika serosa membentuk lapisan terluar jejunum dan berfungsi sebagai kulit

usus. Tunika serosa tersusun dari jaringan epitel skuamosa sederhana dan mengeluarkan cairan licin yang tipis yang dikenal sebagai cairan serosa. Cairan serosa melumasi bagian luar jejunum dan melindungi dari gesekan antara organ-organ rongga perut (Hestinah dkk., 2014).

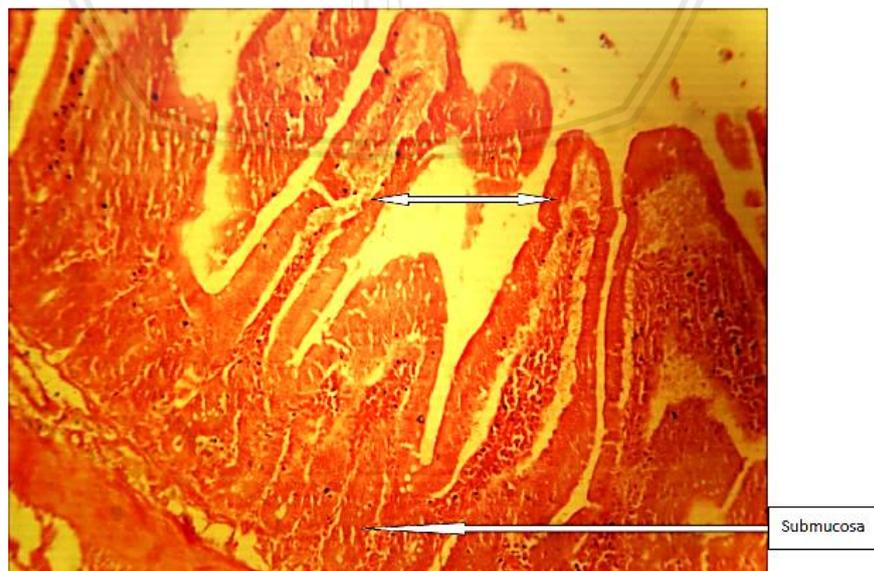


**Gambar 2.1** Histologi Jejunum (Cui, 2011)

Menurut Taylor (2018), kerja fisiologi dari jejunum, yaitu ketika makanan yang dicerna sebagian, atau dikenal dengan istilah *chyme*, memasuki jejunum dari duodenum. Saat *chyme* memasuki jejunum, kemudian *chyme* tercampur oleh gerakan peristaltik dari kontraksi otot polos lokal di dinding jejunum. Dinding jejunum dilipat berkali-kali untuk meningkatkan luas permukaan dari jejunum dan memungkinkan untuk penyerapan nutrisi. Setiap sel epitel pada permukaan jejunum mengandung lipatan mikroskopis membran sel yang disebut mikrovilli yang membuat kantong kecil dan meningkatkan kontak antara sel dan *chyme*. Seluruh dinding jejunum juga dilipat ke dalam tonjolan mirip jari mikroskopis yang dikenal sebagai villi yang membentuk kantong

yang lebih besar dan semakin meningkatkan luas permukaan jejunum. Pada tingkat makroskopik, permukaan bagian dalam jejunum mengandung banyak kerutan jaringan yang dikenal sebagai lipatan melingkar, yang menciptakan lebih banyak kantong untuk *chyme*, kemudian meningkatkan luas permukaan yang tersedia untuk penyerapan. Dengan demikian, seluruh struktur jejunum dioptimalkan untuk penyerapan nutrisi dari *chyme*. Pada saat *chyme* telah melewati jejunum dan memasuki ileum, sekitar 90% dari semua nutrisi yang tersedia telah diserap ke dalam tubuh.

Kerusakan yang terjadi pada jejunum akibat adanya intoksikasi yaitu terjadi pada lapisan mukosa terutama pada vili usus. Menurut Buraimoh (2012), perubahan histologi yang terjadi akibat adanya paparan *aluminium chloride*, menunjukkan adanya ruptur pada vili, degenerasi mukosa dan villi silinder tinggi (panah ganda) dengan beberapa sel piala dan proliferasi limfosit (bercak hitam) (Gambar 2.2).



**Gambar 2.2.** Perubahan Histologi Jejunum Akibat Intoksikasi (Buraimoh, 2012)

### 2.3. Profil Protein

Protein berasal dari bahasa Yunani “proteios” yang berarti pertama atau utama. Protein merupakan makromolekul yang menyusun lebih dari separuh bagian dari sel tubuh, membentuk jaringan, kemudian membentuk suatu organ. Protein menentukan ukuran dan struktur sel, komponen utama dari sistem komunikasi antar sel, serta sebagai katalis berbagai reaksi biokimia di dalam sel. Molekul protein mempunyai gugus amino ( $-NH_2$ ) dan gugus karboksilat ( $-COOH$ ) pada ujung-ujung rantai. Hal ini menyebabkan protein mempunyai banyak muatan (polielektrolit) dan bersifat amfoter, yaitu dapat bereaksi dengan asam dan basa. Secara umum, protein sangat peka terhadap pengaruh-pengaruh fisik dan zat kimia, sehingga mudah mengalami perubahan bentuk. Perubahan atau modifikasi pada struktur molekul protein disebut denaturasi. (Fatchiyah dkk., 2011).

Protein memegang peranan penting dalam hampir semua proses biologi. Protein merupakan komponen utama sel hewan atau manusia. Untuk dapat melakukan fungsi biologis, protein melipat ke dalam satu atau lebih konformasi spasial yang spesifik, didorong oleh sejumlah interaksi non-kovalen, seperti ikatan hidrogen, interaksi ionik, gaya Van der Waals, dan sistem kemasan hidrofobik. Struktur tiga dimensi protein sangat diperlukan untuk memahami fungsi protein pada tingkat molekul. Protein dapat dibedakan berdasarkan struktur, berat, dan juga ukuran (Rosana, 2016).

Protein yang terdapat pada jejenum juga memiliki banyak fungsi diantaranya membentuk struktur jejenum itu sendiri, menjadi bahan utama

dalam berbagai reaksi enzimatik, dan juga berbagai reaksi pertahanan pada organ tersebut. Untuk mengetahui berbagai protein dapat dibedakan protein berdasarkan berat molekul dengan menggunakan metode elektroforesis. Elektroforesis adalah suatu cara analisis kimiawi yang didasarkan pada pergerakan molekul-molekul protein bermuatan didalam medan listrik (titik isoelektrik). Pergerakan molekul dalam medan listrik dipengaruhi oleh bentuk, ukuran, besar muatan, dan sifat kimia dari molekul. Pemisahan dilakukan berdasarkan perbedaan ukuran berat molekul dan muatan listrik yang dikandung oleh makro-molekul tersebut. Apabila arus listrik dialirkan pada suatu medium penyangga yang telah berisi protein plasma, maka komponen-komponen protein tersebut akan mulai bermigrasi. Media penunjang yang biasa dipakai adalah gel agarose, gel pati, gel poliakrilamida, dan kertas selulose poliasetat (Pratiwi, 2001).

#### 2.4. Tikus Putih

Hewan coba yang dapat digunakan dalam suatu penelitian, yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*). Ciri-ciri morfologi tikus putih (*Rattus norvegicus*) (**Gambar 2.2**), antara lain memiliki hidung tumpul, panjang badan 18-25 cm, kepala dan badan lebih pendek dari ekor, serta telinga relatif kecil dan tidak lebih dari 20-23 mm. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) memiliki waktu hidup 2,5 tahun sampai 3,5 tahun, denyut jantung 330-480 kali per-menit, frekuensi respirasi 85 kali per-menit dan memasuki masa dewasa pada usia 40-60 hari. Tikus putih (*Rattus norvegicus*)

memiliki beberapa strain dari hasil perkembangbiakan dan persilangan, yaitu *Wistar*, *Sprague*, *Dawley*, *Madison*, *Wicaoustin*, dan *Long Evans* (Armitage, 2004).

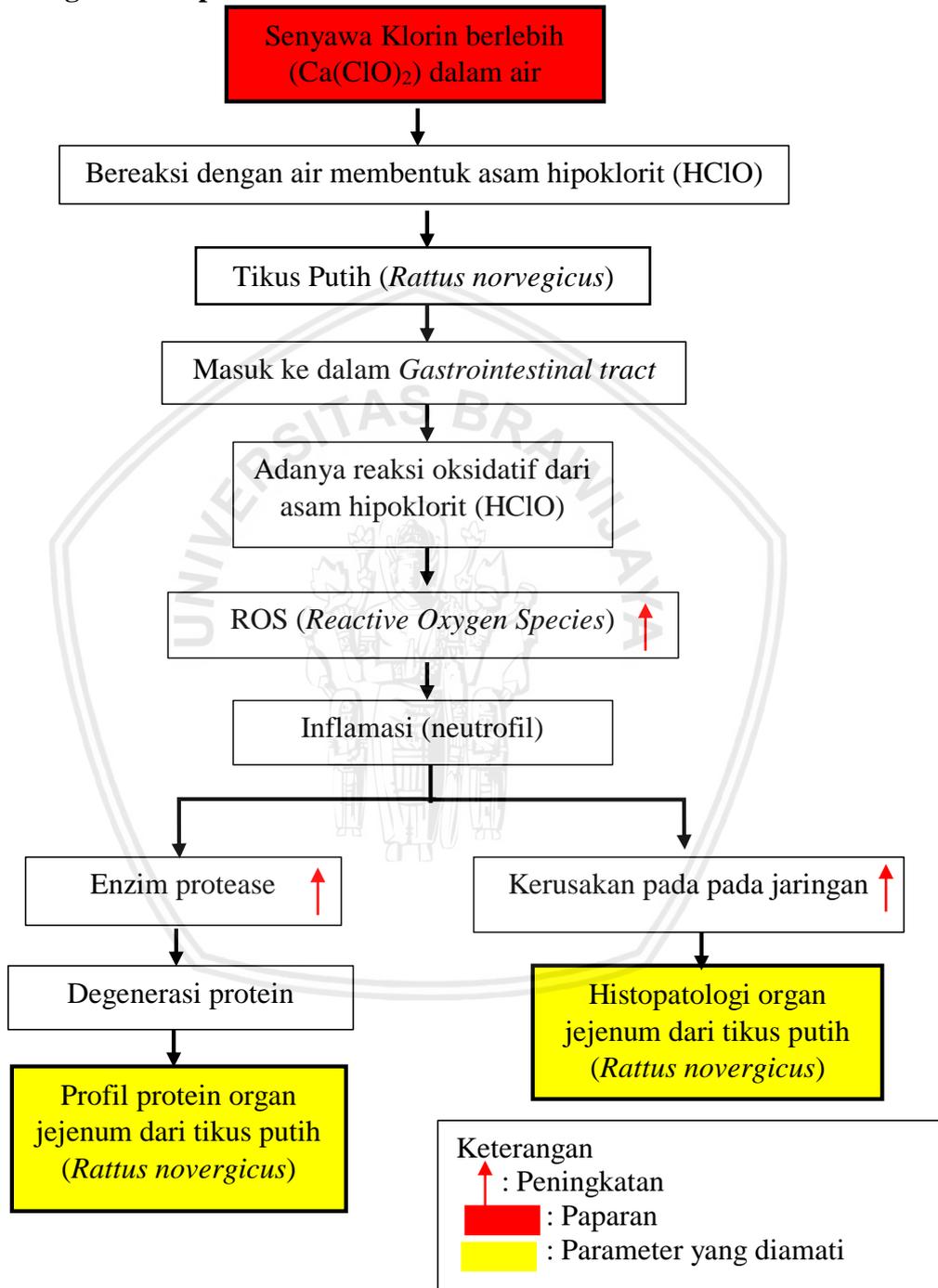


**Gambar 2.3.** Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) strain *Wistar* (Krinke, 2000)

Menurut Krinke (2000), tikus yang digunakan sebagai hewan coba dalam penelitian adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain *Wistar* yang memiliki klasifikasi sebagai berikut: termasuk ke dalam Kingdom Animalia, Kelas Mammalia, Ordo Rodentia, Famili Muridae, Genus *Rattus*, Spesies *Rattus norvegicus*.

## BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

### 3.1. Kerangka Konseptual



Gambar 3.1. Kerangka konsep penelitian

Hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) diinduksi dengan larutan senyawa klorin ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) dalam air. Kelompok tikus pertama sebagai kontrol negatif, tanpa paparan larutan klorin. Kelompok kedua adalah kelompok tikus putih (*Rattus norvegicus*) diberi paparan larutan klorin 50 ppm dalam waktu 7 hari. Kelompok ketiga adalah kelompok tikus putih (*Rattus norvegicus*) diberi paparan larutan klorin 100 ppm dalam waktu 7 hari. Kelompok keempat adalah kelompok tikus putih (*Rattus norvegicus*) diberi paparan larutan klorin 150 ppm dalam waktu 7 hari. Kelompok kelima adalah kelompok tikus putih (*Rattus norvegicus*) diberi paparan larutan klorin 200 ppm dalam waktu 7 hari. Paparan larutan klorin dilakukan dengan cara sonde lambung.

Dalam air klorin akan membentuk asam hipoklorit ( $\text{HClO}$ ) melalui reaksi hidrolisis lalu masuk ke dalam *gastrointestinal track*, dan terabsorpsi di usus halus. Asam hipoklorit ( $\text{HClO}$ ) dapat masuk ke dalam sel dan berinteraksi (reaksi oksidasi) dengan protein *sitopasmik* dan menghasilkan produk samping berupa senyawa yang mengandung molekul oksigen yang kelebihan suatu elektron atau dikenal dengan sebutan ROS (*Reactive Oxygen Species*). *Reactive Oxygen Species* yang dapat dihasilkan diantaranya adalah superoksida ( $\text{O}_2^-$ ) dan hidroxil ( $\text{OH}^\cdot$ ). Selain dapat berinteraksi dengan protein sitoplasmik, asam hipoklorit ( $\text{HClO}$ ) juga bersifat korosif dan asam sehingga dapat merusak jaringan pada organ jejunum seperti terjadinya kerusakan struktur berupa erosi dan ruptur vili pada jaringan jejunum sehingga menyebabkan perubahan jaringan yang dapat diamati melalui histopatologi jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*).

Reaktifitas dari ROS memiliki potensi merusak dinding membran, asam nukleat dari materi genetik nukleus sel, dan merusak protein-protein intraseluler. Hal tersebut dapat memicu terjadinya inflamasi sebagai respon tubuh terhadap adanya kerusakan oleh paparan senyawa klorin pada jaringan terutama di jejunum. Adanya inflamasi ditandai dengan meningkatnya jumlah sel darah putih (leukositosis) terutama neutrofil yaitu merupakan sel imun nonspesifik yang hadir pada daerah inflamasi. Butiran neutrofil mengandung tiga protease serin: *neutrophil elastase (NE)*, *Cat-G* dan *proteinase 3 (PR3)*, yang memiliki aktivitas intraseluler maupun ekstraseluler yang berperan dalam melawan agen infeksi, apoptosis dan remodeling jaringan. Adanya potensial oksidasi, dan suasana asam oleh asam hipoklorit ( $\text{HClO}$ ) juga memicu aktifnya enzim protease pada jaringan jejunum yang terdapat di dalam lisosom. Protease adalah enzim yang mengkatalisis pemecahan protein melalui hidrolisis ikatan peptida. Pemecahan protein oleh protease mengakibatkan terjadinya degenerasi protein sehingga dapat merubah profil protein jejunum tikus putih (*Rattus novergicus*).

### 3.2. Hipotesis penelitian

Berdasarkan kerangka konsep penelitian diatas, maka hipotesis yang dapat diajukan adalah sebagai berikut :

- a. Pemberian senyawa klorin ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) berlebih dapat menimbulkan perubahan profil protein jejunum pada tikus putih (*Rattus novergicus*).
- b. Pemberian senyawa klorin berlebih ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) dapat menimbulkan perubahan histopatologi jejunum pada tikus putih (*Rattus novergicus*).

## BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

### 4.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Perlakuan penelitian dilakukan di Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya, pembuatan parameter dilakukan di Laboratorium Faal/Fisiologi FK Universitas Brawijaya dan Laboratorium Patologi Anatomi FK Universitas Brawijaya, pengamatan histopatologi jejunum dilakukan di Laboratorium Histologi FKH UB. Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari-Februari 2019.

### 4.2. Populasi dan Sampel

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan, strain *Wistar*, berumur 8-10 minggu, dan berat badan rata-rata 150-200 gram.

### 4.3. Pembagian Kelompok Tikus

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang digunakan sebanyak 20 ekor, dimana terbagi menjadi 5 kelompok perlakuan dan masing-masing perlakuan terdiri dari 4 ekor. Pembagian kelompok sebagai berikut:

1. Kelompok pertama sebagai kontrol negatif. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) tanpa paparan senyawa klorin ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) berlebih.
2. Kelompok kedua adalah kelompok tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan paparan senyawa klorin ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) berlebih sebanyak 50 ppm dalam waktu 7 hari.

3. Kelompok ketiga adalah kelompok tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan paparan senyawa klorin ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) berlebih sebanyak 100 ppm dalam waktu 7 hari.
4. Kelompok keempat adalah kelompok tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan paparan senyawa klorin ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) berlebih sebanyak 150 ppm dalam waktu 7 hari.
5. Kelompok kelima adalah kelompok tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan paparan senyawa klorin ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) berlebih sebanyak 200 ppm dalam waktu 7 hari.

#### **4.4. Aklimatisasi**

Sebelum diberikan perlakuan, tikus putih (*Rattus norvegicus*) diaklimatisasi selama 1 minggu dengan cara ditempatkan pada sebuah kandang kelompok berupa bak plastik. Selama diaklimatisasi diberi makan berupa pellet dan air minum *at libitum*. Tujuan dilakukan aklimatisasi ini adalah untuk menyeragamkan cara hidup dan makanan hewan coba yang digunakan dalam penelitian.

#### **4.5. Rancangan Penelitian**

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan yang digunakan adalah rancangan eksperimental sederhana dengan membagi 5 kelompok perlakuan. Setiap kelompok perlakuan terdiri dari 4 ekor hewan coba. Kelompok 1 adalah kelompok yang tidak diberi perlakuan berupa

paparan senyawa klorin berlebih (kontrol negatif), hanya diberi makan berupa pellet dan air minum. Kelompok 2 adalah kelompok dengan paparan senyawa klorin ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) berlebih sebanyak 50 ppm dalam waktu 7 hari. Kelompok 3 adalah kelompok dengan paparan senyawa klorin ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) berlebih sebanyak 100 ppm dalam waktu 7 hari. Kelompok 4 adalah kelompok dengan paparan senyawa klorin ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) berlebih sebanyak 150 ppm dalam waktu 7 hari. Kelompok 5 adalah kelompok dengan paparan senyawa klorin ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) berlebih sebanyak 200 ppm dalam waktu 7 hari.

**Tabel 4.1.** Rancangan Kelompok Penelitian

Perlakuan	Ulangan			
	1	2	3	4
Kontrol negatif Tanpa diberi paparan senyawa klorin berlebih				
Perlakuan 1 Disonde senyawa klorin ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) dengan konsentrasi 50 ppm				
Perlakuan 2 Disonde senyawa klorin ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) dengan konsentrasi 100 ppm				
Perlakuan 3 Disonde senyawa klorin ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) dengan konsentrasi 150 ppm				
Perlakuan 4 Disonde senyawa klorin ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) dengan konsentrasi 200 ppm				

#### 4.6. Penetapan Jumlah Perlakuan dan Ulangan

Penelitian ini menggunakan hewan coba berupa tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain *Wistar* berumur 8-10 minggu dengan berat badan rata-rata 150-200 gram. Menurut Kusningrum (2008), estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus:

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

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan:

t = Jumlah kelompok perlakuan

n = Jumlah ulangan yang diberikan

Berdasarkan perhitungan diatas, maka untuk 5 macam kelompok perlakuan diperlukan ulangan minimal 4 kali dalam setiap kelompok dan hewan coba yang diperlukan sebanyak 20 ekor.

#### 4.7. Variabel Penelitian

Adapun variabel dalam penelitian ini adalah:

Variabel bebas : pemberian senyawa klorin dalam air

Variabel terikat : Profil protein dan histopatologi jejunum

Variabel kontrol : Tikus putih (*Rattus novergicus*) (jenis kelamin, strain, umur, berat badan), suhu, kelembapan kandang, pakan, dan air minum.

#### 4.8. Alat dan Bahan

##### 1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain: (a) kandang pemeliharaan dan perlakuan yang terbuat dari plastik *polyvinyl* dengan tutup jaring jaring dari bahan *stainless steel* sebanyak 5 buah; (b) peralatan untuk pembuatan prepat irisan histologi adalah bak paraffin, dissecting kit, kertas label, botol falcon, gelas objek, gelas penutup, oven, *rotary microtome*,

*staining* kit, *base molt*, *holder*, cawan.petri, *hot plate*, pipet tetes, dan mikroskop cahaya ; (c) alat untuk pemeriksaan profil protein adalah sentifuge dan *chamber* elektroforesis, mortar, dan mikropipet; (d) alat untuk pengukuran kadar klorin adalah tabung Erlenmeyer, pipet tetes, buret, dan statip.

## 2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: (a) hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*), pakan pellet tikus putih, dan air minum; (b) pembuatan larutan klorin digunakan klorin tablet dan akuades; (c) pengkoleksian organ digunakan *Phosphate Buffer Saline* (PBS), *formaline 10 %*, dan NaCl fisiologis 0,9 %; (d) pembuatan preparat histopatologi digunakan *xylol* bertingkat, alkohol bertingkat, blok parafin, pewarna HE, alkohol 70%, alkohol 90%, alkohol 95%; (d) pengecekan profil protein digunakan SDS-PAGE, buffer sulfat, dan *staining* gel *Coomassive Brilliant Blue R-25* 0,01%; (e) titrasi iodometri digunakan CH<sub>3</sub>COOH 98%, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0,0025 N, KI, dan indikator amilum.

## 4.9. Prosedur Penelitian

### 1. Pemberian Klorin Berlebih

Klorin yang diberikan berupa senyawa klorin (Ca(ClO)<sub>2</sub>) granular 95% yang akan dilarutkan dengan akuades. Jumlah klorin granular yang digunakan dihitung seperti pada **lampiran 1**, lalu diencerkan ke dalam 100 ml akuades, selanjutnya diukur dengan metode titrasi iodometri untuk mengetahui kadar klorin dalam larutan tersebut.

- a. Untuk membuat larutan dengan konsentrasi senyawa klorin 50 ppm dibuat dengan cara melarutkan senyawa klorin granular 95% sebanyak 0,0108 g ke dalam 100 ml akuades.
- b. Untuk membuat larutan dengan konsentrasi senyawa klorin 100 ppm dibuat dengan cara melarutkan klorin granular 95% sebanyak 0,0215 g ke dalam 100 ml akuades.
- c. Untuk membuat larutan dengan konsentrasi senyawa klorin 150 ppm dibuat dengan cara melarutkan klorin granular 95% sebanyak 0,0323 g ke dalam 100 ml akuades.
- d. Untuk membuat larutan dengan konsentrasi senyawa klorin 200 ppm dibuat dengan cara melarutkan klorin granular 90% sebanyak 0,0430 g ke dalam 100 ml akuades.

Setelah itu diukur kadar klorin bebas dalam air menggunakan metode titrasi iodometri, dengan cara: dimasukan sebanyak 150,0 mL sampel kedalam labu erlenmeyer 250 mL. Ditambahkan 3 mL  $\text{CH}_3\text{COOH}$  98% sampai pH berkisar 3–4. Tambahkan 0,5 gram KI ke dalam Erlenmeyer tertutup, homogenkan. Dititrasi dengan menggunakan larutan standar  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,0025 N sampai warna kuning jerami. Titrasi dihentikan kemudian ditambahkan 0,5 mL indikator amilum. Titrasi dilanjutkan kembali dengan larutan standar  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,0025 N sampai warna biru hilang (Rohayati dkk., 2016).

Paparan dilakukan per-oral menggunakan sonde lambung sesuai kelompok perlakuan masing-masing pada tikus putih (*Rattus norvegicus*)

sebanyak 1 ml supaya menyesuaikan kapasitas maksimal lambung tikus (5 ml), diberikan satu kali setiap hari selama tujuh hari. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) dipelihara dalam kandang kelompok yang diberi pakan pellet dan air minum *at libitum*.

## 2. Pengambilan Jejenum Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Pengambilan organ jejenum tikus putih (*Rattus norvegicus*) dilakukan pada hari ke-8. Prosedur pertama yang dilakukan untuk pengambilan jejenum adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) dieuthanasia dengan cara dislokasi pada bagian leher kemudian dilakukan pembedahan. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) diletakkan secara rebah ventral di papan bedah dan pembedahan dilakukan pada bagian abdomen. Diambil jejenum. Setelah jejenum terambil, dibilas dengan NaCl-fisiologis 0,9% dan dimasukkan dalam larutan PBS-azida pH 7,4 lalu dimasukkan ke dalam *icebox* untuk pemeriksaan profil pita protein dan sebagian jejenum dimasukan kedalam larutan formalin 10 % untuk pemeriksaan histopatologi.

## 3. Pembuatan Preparat Histopatologi dan pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE)

Pembuatan preparat dimulai dengan melakukan fiksasi yaitu merendam organ jejenum dalam formalin 10% selama 24 jam. Tujuan dilakukannya fiksasi adalah untuk mencegah kerusakan jaringan, menghentikan proses metabolisme, mengawetkan komponen sitologi dan histologi, dan mengeraskan materi yang lunak agar jaringan dapat diwarnai. Menurut

Junqueira (2005) proses pembuatan preparat histopatologi terdiri dari dehidrasi, *clearing*, *embedding*, *sectioning*, dan *mounting*.

Tahapan dehidrasi, dilakukan dengan cara yaitu, organ jejunum dimasukkan dalam alkohol 70%, 80%, 90% dan 95% masing-masing selama 5 menit. Dilanjutkan dengan *clearing*, yaitu jejunum dimasukkan dalam *xylol* I selama 1 jam, *xylol* II selama 30 menit, dan *xylol* III selama 30 menit. Selanjutnya dilakukan *embedding*, yaitu organ dimasukkan kedalam parafin cair dengan suhu 56°C selama 2 jam dan kemudian diambil dengan pinset dan dilanjutkan keparafin blok. *Sectioning*, yaitu proses pemotongan parafin blok di *microtome*. Ketebalan pemotongan adalah 5µm agar tembus cahaya saat dilakukan pemeriksaan dibawah mikroskop dan direndam pada *water bath* dengan suhu 40°C. Awal pemotongan dilakukan *trimming* karena jaringan yang terpotong masih belum sempurna. *Mounting*, yaitu penempelan blok parafin yang sudah dipotong ke *object glass*. Setelah ditempel, keringkan diatas *hot plate* 38-40°C sampai kering kemudian disimpan dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam lalu siap diwarnai dengan pewarnaan HE (Jusuf, 2009).

Proses selanjutnya yaitu pewarnaan preparat histopatologi dengan pewarnaan HE. Sebelum pewarnaan dilakukan *deparafinisasi*, yaitu melarutkan dan menghilangkan parafin yang terdapat pada jaringan. Preparat dimasukkan kedalam *xylol* bertingkat I, II, dan III masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya, *rehidrasi*, yaitu preparat dimasukkan kedalam alkohol bertingkat mulai dari alkohol 95%, 90%, 80%, dan 70% masing-

masing selama 5 menit, lalu direndam dalam akuades selama 5 menit. Dilakukan pewarnaan pertama, yaitu pewarnaan dengan menggunakan *hematoxyline* selama 10 menit. Tujuan dari pewarnaan ini adalah untuk memberikan warna biru pada inti sel. Kemudian dilakukan *differensiasi*, yaitu preparat dimasukkan dalam *Hydrochloric acid* (HCl) 0,6% selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir. Tujuan *differensiasi* adalah untuk menghilangkan warna biru yang pekat pada inti sel dan sitoplasma. Dilakukan *blueing*, yaitu preparat dimasukkan kedalam *Lithium carbonat* 0,5% selama 3 menit. Kemudian dicuci dengan air mengalir. Tujuan *blueing* adalah untuk memperjelas warna biru pada inti sel.

Pewarnaan kedua, yaitu preparat dimasukkan dalam *eosin* selama 3 menit. Tujuan dari pewarnaan ini adalah untuk memberikan warna merah muda pada sitoplasma. Tahapan yang dilakukan hampir sama seperti langkah pembuatan preparat awal yaitu *dehidrasi*, dimasukkan kedalam alkohol bertingkat mulai dari alkohol 70%, 80%, 90%, dan 95% masing-masing 5 menit. Dilakukan *clearing*, yaitu preparat dimasukkan dalam *xylol* I dan II selama 1 menit dan ditunggu sampai kering. Lalu dilakukan *mounting*, preparat diberi Entelan atau canada balsam dan ditutup dengan *cover glass*. Hal ini bertujuan untuk mengawetkan jaringan yang sudah diwarnai (Jusuf, 2009).

#### **4. Pengamatan Histopatologi**

Pengamatan histologi jejenum dilakukan secara kualitatif dengan menggunakan mikroskop cahaya *Olympus BX51* dengan perbesaran 100x

dan 400x. Pengamatan histopatologi jejunum yang di amati adalah tunika mukosa berupa epitel, vili, dan lamina propria. Pengamatan histopatologi berupa adanya nekrosis yang ditandai dengan bentuk sel yang tidak beraturan akibat pecahnya sitoplasma.

#### **5. Isolasi Protein Jejunum dan Penentuan Profil Protein dengan Teknik Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)**

Isolasi protein pada jejunum dilakukan dengan diambil organ jejunum sebanyak 0,5 gram kemudian dipotong kecil-kecil menggunakan gunting bedah mayo lalu ditambah larutan PBS-Tween : PSMF (9:1) sebanyak 1 ML, dan digerus dengan mortar. Selanjutnya dimasukkan ke dalam mikrotube dan disentrifuge selama 15 menit dengan kecepatan 6000 rpm. Kemudian supernatant diambil dan ditambah etanol absolut dengan perbandingan 1: 1. Dibiarkan selama satu malam sampai terbentuk endapan. Selanjutnya, disentrifuge kembali selama 15 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Diambil endapan dan dikeringkan dengan cara dianginkan sampai bau etanol hilang. Setelah bau etanol hilang, endapan tersebut ditambahkan larutan 0,02 M Tris-HCl pH 6,8 dengan perbandingan volume 1: 1 (Karitas, 2013).

Teknik SDS-PAGE adalah teknik yang digunakan untuk penentuan profil protein pada jejunum. Teknik ini diawali dengan persiapan gel dengan menyiapkan dua plat kaca dengan jarak plat yaitu 1 mm. Gel dibuat dengan dua lapis yaitu *stacking gel* (tempat sampel) dan *separating gel* (Pemisah protein). Stacking gel memiliki konsentrasi 4%, sedangkan *separating gel* memiliki konsentrasi 10%. Selanjutnya *separating gel* dimasukkan ke dalam *plate* dengan menggunakan mikropipet, lalu didiamkan selama 10-30 menit

hingga memadat. *Stacking gel* dituangkan diatas *separating gel*, dibuat sumur gel dengan bantuan sisir. Setelah kedua gel tersebut memadat sisir diangkat, dan *plate* dipasang pada alat elektroforesis (Utomo, 2017).

Injeksi protein dilakukan dengan menyiapkan ekstrak kasar protein sebanyak 150  $\mu\text{L}$ , ditambahkan larutan *Reducing Sample Buffer* (RBS)/ SDS sebanyak 150  $\mu\text{L}$ , dan dipanaskan pada pemanas air dengan temperature 100°C selama 3 menit. Sampel yang sudah dingin dimasukkan ke dalam sumuran gel. Protein standar marker juga dimasukkan ke dalam salah satu sumuran gel dan juga diberi pewarna *bromphenol blue*. Selanjutnya anoda dihubungkan dengan *reservoir* bawah dan katoda dihubungkan dengan *reservoir* atas. Kemudian dihubungkan dengan power supply untuk menghantarkan arus listrik sebesar 42 mA dengan tegangan 200 volt. Proses running dihentikan setelah warna biru mencapai ketinggian 0,5 cm dari batas bawah *plate* (Utomo, 2017).

*Staining* digunakan untuk mewarnai protein dan larutan *destaining* untuk menghilangkan warna pada gel dan memperjelas pita protein yang terbentuk. Gel (*staining gel*) diwarnai dengan larutan *staining* yang mengandung *Coomassive Brilliant Blue R-25* 0,01% yang dilarutkan dalam methanol asam asetat dan air dengan perbandingan tertentu. Gel direndam dalam pewarna, kemudian dibilas dengan asam asetat jenuh. Protein menjadi berwarna biru karena mengikat *Coomassie Brilliant Blue* (Wulansari dkk., 2015).

#### 4.10. Analisa Data

Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah pengamatan profil pita protein dan gambaran histopatologi dari organ jejunum. Pengamatan profil protein menggunakan teknik elektroforesis dan hasil pengamatan histopatologi jejunum dengan pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE), keduanya dianalisa secara deskriptif.



## BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1. Pengaruh Pemberian Senyawa Klorin ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) Berlebih Terhadap Profil Protein Jejunum

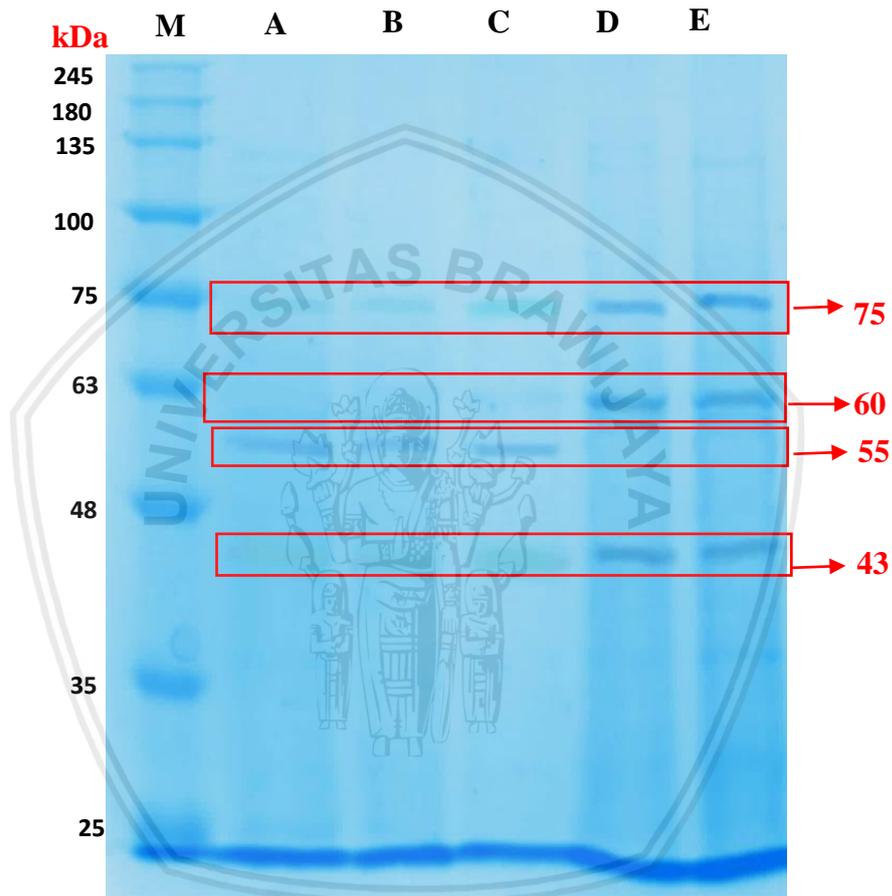
Pemberian senyawa klorin ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) dilakukan dengan cara sonde lambung selama 7 hari. Setelah diberi paparan didapati bahwa tikus pada kelompok perlakuan tersebut mengalami diare yang sedikit berair ditandai dari feses yang dikeluarkan memiliki konsistensi yang lebih cair dibanding feses yang dikeluarkan oleh kelompok tikus yang tidak diberi paparan senyawa klorin (**Lampiran 7**). Dari keadaan fisik dan tingkah laku tidak banyak terdapat perbedaan antara tikus yang diberi paparan dengan yang tidak diberi paparan senyawa klorin.

Hasil penelitian pemberian senyawa klorin ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) berlebih terhadap profil protein jejunum menggunakan elektroforesis dengan metode SDS-PAGE menunjukkan ada perubahan protein yang diekspresikan antara tikus kontrol negatif yang tidak diberi paparan senyawa klorin dengan tikus yang diberi paparan senyawa klorin dengan konsentrasi masing-masing 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, dan 200 ppm (**Gambar 5.1**). Penentuan massa molekul dilakukan dengan cara menghitung *Retardation factor* (Rf) atau *Mobilitas rate* menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Rf} = \frac{\text{Jarak pergerakan protein dari tempat awal (a)}}{\text{jarak pergerakan warna dari tempat awal (b)}}$$

Nilai Rf yang diperoleh digunakan sebagai sumbu X dan massa molekul ditempatkan sebagai sumbu Y sehingga diperoleh persamaan regresi linier

$Y = ax + b$ . Persamaan ini digunakan untuk menghitung massa molekul dari protein sampel. Massa molekul sampel dapat dilihat dengan menggunakan rumus  $M_r =$  Antilog  $M_r$  protein sampel (**Lampiran 6**)



**Gambar 5.1.** Profil Protein Organ Jejenum Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

**Keterangan:** M (marker); A (Kontrol -); B (paparan senyawa klorin 50 ppm); C (paparan senyawa klorin 100 ppm); D (paparan senyawa klorin 150 ppm); E (paparan senyawa klorin 200 ppm)

**Tabel 5.1.** Profil Protein Jejenum Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Seluruh Kelompok Perlakuan Berdasarkan Massa Molekul (Mr) Protein Hasil SDS-PAGE

Kelompok	Massa Molekul Profil Protein (kDa)			
	75	60	55	43
Kontrol (-)	√	-	√	√
Perlakuan 1 (50 ppm)	√	-	√	√
Perlakuan 2 (100 ppm)	√	-	√	√
Perlakuan 3 (150 ppm)	√√	√√	-	√√
Perlakuan 4 (200 ppm)	√√	√√	-	√√

Keterangan: — = tidak terekspresi, √ = terekspresi lebih sedikit, √√ = terekspresi lebih banyak.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada tikus yang tidak diberi paparan senyawa klorin mengekspresikan protein dengan massa molekul 75 kDa, 55 kDa, dan 43 kDa. Pada tikus yang diberi paparan senyawa klorin dengan konsentrasi 50 ppm dan 100 ppm mengekspresikan protein yang relatif sama dengan kelompok kontrol negatif. Sedangkan pada tikus yang diberi paparan senyawa klorin dengan konsentrasi 150 ppm dan 200 ppm mengekspresikan protein dengan massa molekul 75 kDa, 60 kDa, dan 43 kDa.

Protein dengan massa molekul 43 kDa diduga merupakan HSP40 yang memiliki massa molekul 37-48 kDa (Yazid dkk., 2012). Sedangkan protein dengan massa molekul 75 kDa merupakan HSP70 yang memiliki massa molekul 66-79 kDa. Protein ini merupakan *stress or heat shock protein* yang mana dalam kondisi normal terdapat pada permukaan epitel saluran cerna sebagai sinyal induksi dari flora normal untuk pertahanan terhadap

mikroorganisme seperti bakteri, toksin, stress, dan inflamasi. Pada kondisi paparan dari senyawa klorin yang berlebih, HSP40 dan HSP70 berperan untuk menekan gen proinflamatori (Barbatis and Tsopanomichalou, 2009). HSP40 dan HSP70 muncul pada semua kelompok perlakuan, namun pada kelompok perlakuan 3 dan 4 yang diberi paparan senyawa klorin 150 ppm dan 200 ppm menunjukkan ekspresi yang lebih banyak ditandai ada warna yang lebih tebal dibandingkan pada kontrol negatif, perlakuan 1, dan perlakuan 2. Senyawa klorin yang terlarut dalam air akan membentuk asam hipoklorit (HClO), lalu masuk kedalam sel berinteraksi dengan protein sitoplasmik melalui reaksi oksidasi akan menghasilkan produk samping berupa senyawa yang mengandung molekul oksigen yang kelebihan suatu elektron atau dikenal dengan sebutan ROS. Reaktifitas dari ROS memiliki potensi merusak dinding membran, asam nukleat dari materi genetik nukleus sel, dan merusak protein-protein intraseluler sehingga akan membuat sel-sel epitel pada jejunum mengalami nekrosis. Sel-sel yang nekrosis membuat erosi pada mukosa jejunum dan menimbulkan inflamasi sehingga HSP70 dan HSP40 diekskresikan lebih banyak untuk menekan terjadinya inflamasi pada mukosa jejunum.

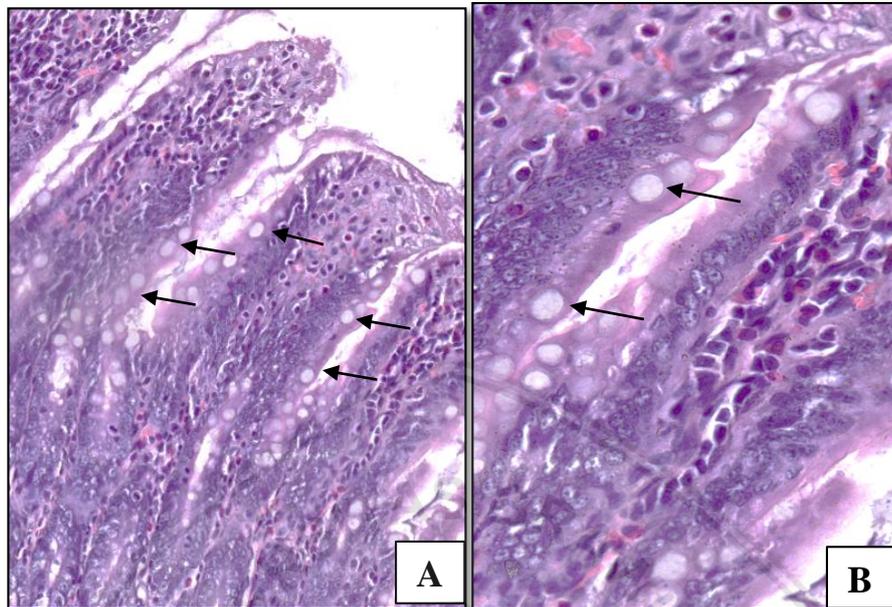
Protein dengan massa molekul 60 kDa merupakan jenis *Vasoactive Intestinal Polypeptide* (VIP) yang diekskresikan oleh sel-sel mukosa usus yang mengalami inflamasi. Protein ini diekspresikan banyak pada kelompok perlakuan 3 dan 4. *Vasoactive intestinal polypeptide* merupakan salah satu penanda terjadinya inflamasi pada jejunum. Protein VIP memiliki aksi

vasodilatasi (pelebaran pembuluh darah), memperbesar permeabilitas jaringan jejunum, sehingga protein ini menstimulasi sekresi cairan dan elektrolit dari jaringan jejunum yang memicu terjadi diare berair. Protein ini juga mengakibatkan peningkatan motilitas intestine, sehingga mengganggu proses penyerapan (Igarashi *et al.*, 2011).

Protein dengan massa molekul 55 kDa diduga adalah protein permukaan yang terdapat pada membran sel. Menurut Thureen *and* Hay (2006), protein dengan massa molekul 55 kDa adalah protein transmembran. Protein transmembran adalah protein yang terdapat pada membran sel lipid bilayer, protein transmembran berfungsi sebagai transport bahan-bahan dari dalam ke luar sel ataupun sebaliknya. Jika terjadi kerusakan pada protein transmembran, maka transportasi dari dalam ke luar sel atau sebaliknya akan terganggu dan membuat sel dalam keadaan yang tidak stabil sehingga memudahkan sel mengalami lisis atau nekrosis. Protein dengan massa molekul 55 kDa tidak ditemukan pada kelompok penelitian 3 dan 4, disebabkan adanya aktivitas enzim protease yang dihasilkan oleh sel-sel radang seperti neutrofil. Menurut Hardiany (2013), protease adalah enzim yang mengkatalisis pemecahan protein melalui hidrolisis ikatan peptida. Diduga pada perlakuan 3 dan 4, tidak diekspresikan protein dengan massa molekul 55 kDa yang merupakan protein transmembran dikarenakan terjadi pemutusan rantai protein akibat paparan senyawa klorin yang bersifat korosif terhadap jaringan.

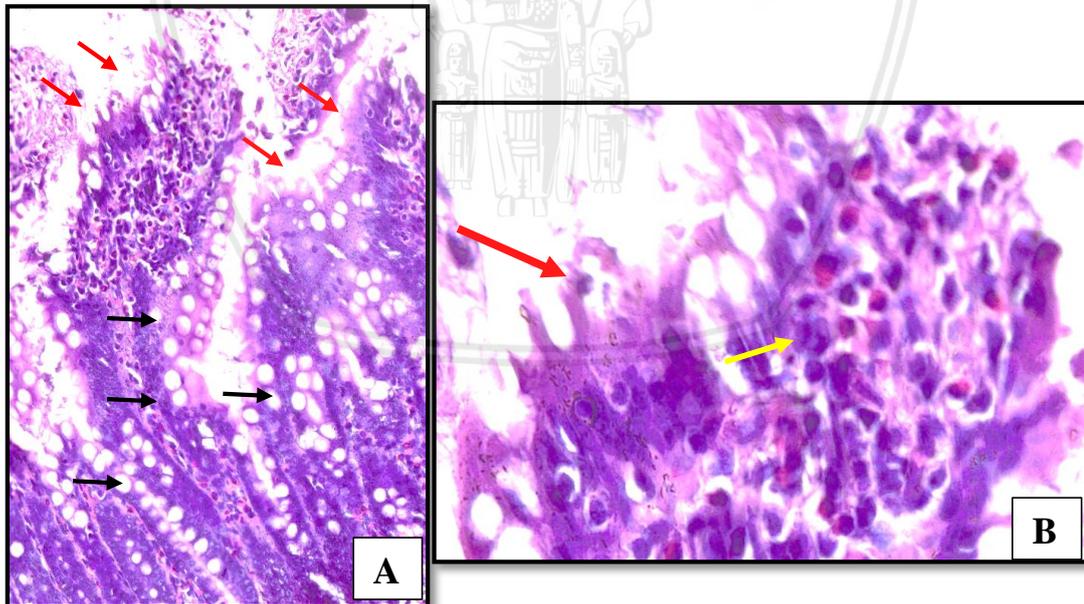
## 5.2. Pengaruh Pemberian Senyawa Klorin ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) Berlebih Terhadap Histopatologi Jejunum

Hasil penelitian pengaruh pemberian senyawa klorin ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) berlebih terhadap gambaran histopatologi jejunum dengan pewarnaan *hematoxyline-eosine* (HE) dianalisa secara deskriptif menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 4-400x dan discan dengan perbesaran maksimal 400x. Pengamatan hasil scan menggunakan software “Olyvia”. Bagian yang diamati, yakni kerusakan pada vili-vili jejunum. Gambaran histologi normal jejunum memiliki bentuk serta ukuran villi normal, terdapat susunan sel epitel kolumner dan sel goblet yang rapi pada tunika mukosa dan tidak ditemukan ada infiltrasi sel radang (**Gambar 5.2**). Menurut Hestinah dkk., (2014) jejunum normal memiliki mukosa dengan vili yang tersusun rapat, sel epitel kolumner, lapisan submukosa, lapisan muscular, dan lapisan serosa. Histologi jejunum pada kontrol negatif dapat dijadikan patokan ada perubahan dan kerusakan yang terjadi pada kelompok lain.



**Gambar 5.2.** Histopatologi Jejunum Kelompok Kontrol Negatif, (A) Perbesaran 100x, (B) Perbesaran 400x

**Keterangan:** → = sel goblet

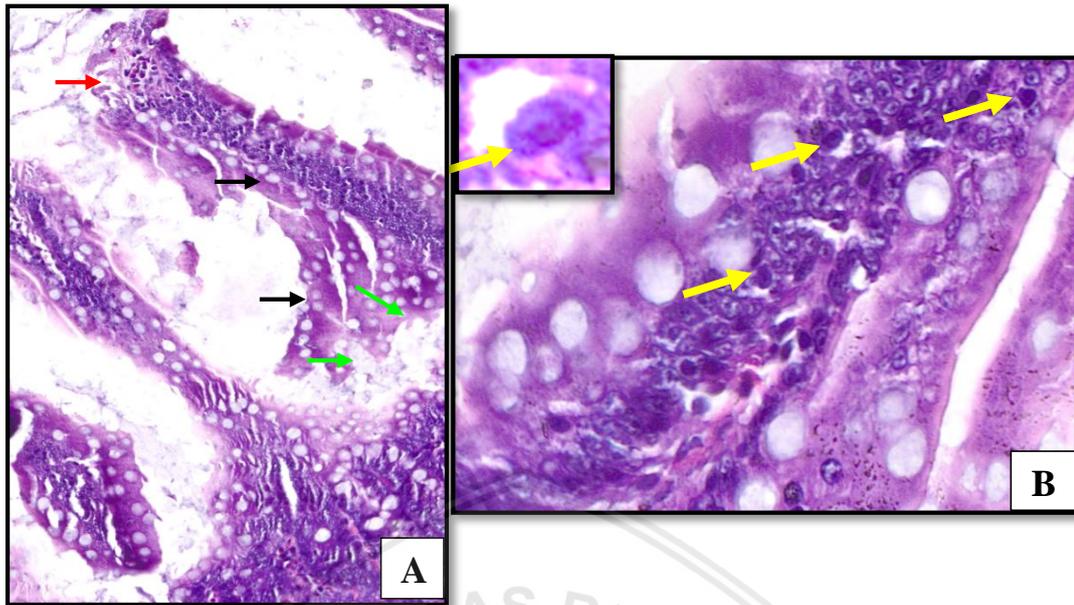


**Gambar 5.3.** Histopatologi Jejunum Kelompok Perlakuan 1 (Pemberian senyawa klorin 50 ppm), (A) Perbesaran 100x, (B) Perbesaran 400x

**Keterangan:** → = sel goblet

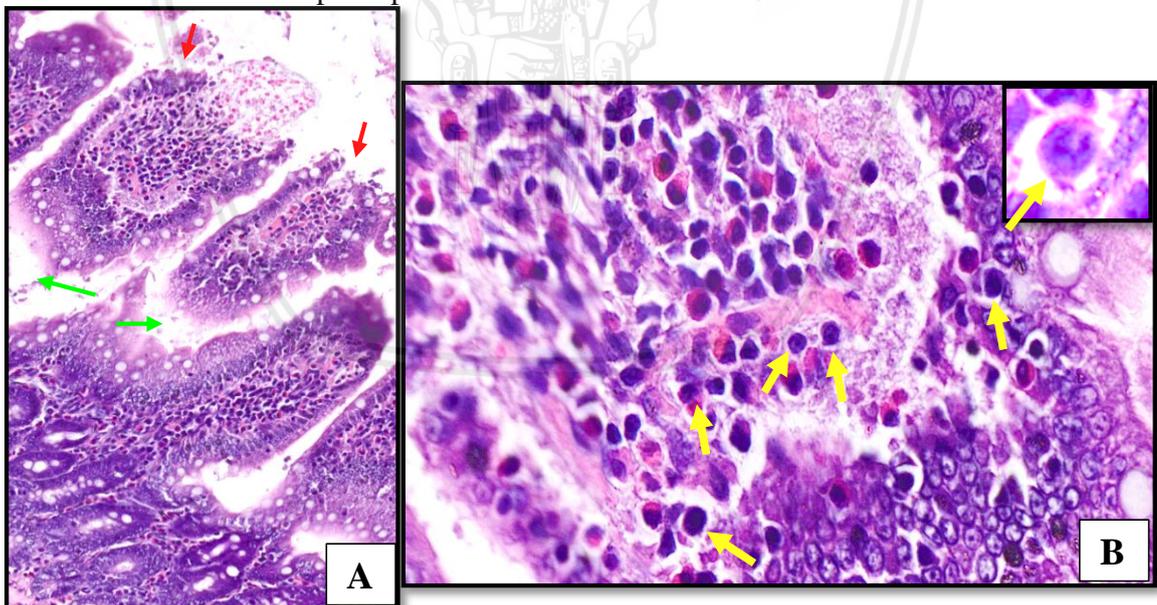
→ = infiltrasi sel radang neutrofil

→ = erosi epitel pada vili



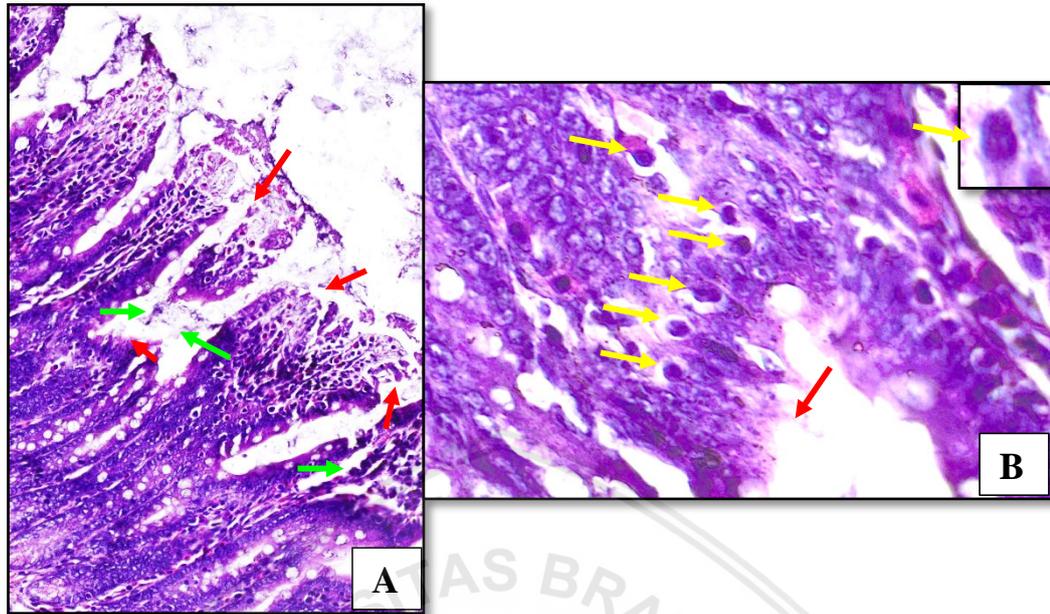
**Gambar 5.4.** Histopatologi Jejunum Kelompok Perlakuan 2 (Pemberian senyawa klorin 100 ppm), (A) Perbesaran 100x, (B) Perbesaran 400x

**Keterangan:** → = sel goblet  
 → = infiltrasi sel radang neutrofil  
 → = erosi epitel pada vili  
 → = ruptur pada vili



**Gambar 5.5.** Histopatologi Jejunum Kelompok Perlakuan 3 (Pemberian senyawa klorin 150 ppm), (A) Perbesaran 100x, (B) Perbesaran 400x

**Keterangan:** → = sel goblet  
 → = infiltrasi sel radang neutrofil  
 → = erosi epitel pada vili  
 → = ruptur pada vili



**Gambar 5.6.** Histopatologi Jejunum Kelompok Perlakuan 4 (Pemberian senyawa klorin 200 ppm), (A) Perbesaran 100x, (B) Perbesaran 400x

**Keterangan:** → = sel goblet  
 → = infiltrasi sel radang neutrofil  
 → = erosi epitel pada vili  
 → = ruptur pada vili

Histopatologi pada kelompok perlakuan satu yaitu diberi paparan senyawa klorin dengan konsentrasi 50 ppm (**Gambar 5.3**), menunjukkan ada kerusakan struktur pada bagian mukosa dimana terjadi erosi pada epitel kolumnar simpleks, sedikit infiltrasi sel radang berupa neutrofil, dan juga penambahan jumlah sel goblet. Gambaran histopatologi jejunum pada kelompok perlakuan dua, perlakuan tiga, dan perlakuan empat yang diberi paparan senyawa klorin dengan konsentrasi masing-masing 100 ppm, 150 ppm, dan 200 ppm (**Gambar 5.4, 5.5, 5.6**) menunjukkan ada kerusakan pada lapisan mukosa berupa erosi dan ruptur vili pada bagian tunika mukosa ditandai dengan sebageian vili lepas dari lamina basalis dan juga ditemukan ada infiltrasi sel radang berupa neutrofil.

Menurut U.S Department of Health And Human Services (2007), efek toksik senyawa klorin yang terutama adalah sifat korosifnya. Kemampuan oksidasi dari klorin sangat kuat, dimana didalam air senyawa klorin akan melepaskan oksigen dan hidrogen klorida membentuk asam hipoklorit (HClO) yang menyebabkan kerusakan jaringan pada organ jejunum. Asam hipoklorit (HClO) dapat menembus sel epitel pada jejunum dan bereaksi dengan protein sitoplasmik yang dapat merusak struktur sel pada bagian mukosa jejunum. Hal tersebut menyebabkan terjadi erosi pada epitel kolumnar simpleks organ jejunum. Erosi pada epitel vili menyebabkan vili menjadi tergerus dikarenakan terjadi nekrosis pada beberapa sel epitel. Gambaran nekrosis berupa karyolisis, yaitu hilangnya gambaran basofilik dari nucleus karena mengalami degradasi oleh enzim endonuklease. Adanya kerusakan pada lapisan mukosa jejunum memicu ada proliferasi dari sel goblet. Diketahui bahwa sel goblet merupakan sel yang berada diantara epitel usus. Menurut Hestinah dkk (2014), Sel goblet adalah sel berbentuk seperti piala, tersebar diantara sel absorbtif. Sel goblet berfungsi untuk menghasilkan mukus untuk melindungi dan memfasilitasi pergerakan ingesta makanan yang tidak terabsorpsi dan kotoran kearah rectum dan anus.

Kerusakan pada mukosa jejunum juga diperparah oleh adanya peningkatan jumlah ROS yang merupakan produk hasil oksidasi dari asam hipoklorit bersama protein sitoplasmik sel. *Reactive Oxygen Species* yang meningkat dapat menyebabkan gangguan homeostasis atau stimulasi terhadap pertumbuhan, signaling, dan survival sel. *Reactive Oxygen Species* diproduksi oleh sel sebagai respon terhadap stressor. Berbagai stressor selain memicu produksi ROS, juga

memicu produksi antioksidan enzimatis seperti catalase (CAT), glutathione peroksidase (GSH), superoksida dismutase (SOD). Adanya asam hipoklorit (HClO) yang mengenai dinding mukosa pada jejunum bertindak sebagai stressor yang menyebabkan produksi ROS pada organ jejunum meningkat. Apabila produksi ROS melebihi kapasitas antioksidan yang ada, mengarahkan sel menuju *stress oxidative* dan mengalami nekrosis (Turan, 2010).

Kerusakan jaringan dapat memicu timbulnya inflamasi yang ditandai dengan ada infiltrasi sel radang berupa neutrofil ke dalam jaringan jejunum. Neutrofil merupakan sel imun pertama yang hadir pada daerah inflamasi. Neutrofil memiliki sitoplasma yang berisi granula-granula serta intisel yang biasanya bersegmen. Granul pada neutrofil berisi lisosom dan peroksidase yang berfungsi membunuh bakteri dengan cara fagositosis serta membersihkan debris pada jaringan nekrotik (Effendi, 2003).

## BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah disampaikan dapat diambil kesimpulan bahwa:

1. Pemberian senyawa klorin ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) dapat merubah profil protein jejenum yaitu protein dengan massa molekul 75 kDa dan 43 kDa diekspresikan lebih banyak sebagai *heat shock protein* dan diekspresikan protein dengan massa molekul 60 kDa yang merupakan protein penanda terjadinya inflamasi.
2. Pemberian senyawa klorin ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) berlebih pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) dapat menimbulkan perubahan pada histopatologi jejenum ditandai adanya kerusakan pada tunika mukosa terutama di bagian vili jejenum mengalami erosi, ruptur, dan juga ditemukan adanya sel radang.

### 6.2. Saran

Perlu dilakukan penelitian dengan waktu paparan senyawa klorin yang lebih lama untuk dapat mengetahui toksisitas senyawa klorin dalam bentuk kronis dan juga potensi adanya tindakan preventif terhadap pemberian senyawa klorin berlebih.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Armitage, D. 2004, *Rattus norvegicus*, Animal Diversity Web. <http://animaldiversity.ummz.umich.edu>. [Diakses pada tanggal 3 Oktober 2018].
- Barbatis, C., and Tsopanomichalou. 2009. *Heat Shock Protein in Inflammatory Bowel Disease*. Athens: Pathology Department, Hellenic Red Cross Hospital.
- Buraimoh, AA. 2012. Effects of Aluminium Chloride Exposure on the Histology of the Small intestine of Wistar Rats. *International Journal of Applied Science and Technology Vol. 2 No. 10*.
- Chandra, B. 2006. *Pengantar Kesehatan Lingkungan*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Cui, D. 2011. *Atlas of Histology with Functional and Clinical Correlations*. China: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business.
- Effendi, Z. 2003. *Peranan Leukosit Sebagai Antiinflamasi Alergik Dalam Tubuh*. Sumatra Utara: FK USU.
- Ermawati, R., dan Aji A.S. 2018. *Sistem Penyediaan Air Minum (Studi Kasus Kota Ambon)*. Magelang: UNIMMA PRESS.
- Fatchiyah., Arumingtyas. E.L., Widyarti. S., dan Rahayu. S.. 2011. *Biologi Molekular Prinsip Dasar Analisis*. Jakarta : Erlangga.
- Food and Drug Administration. 1992. *Containing and Codification of Documents of General Applicability and Future Effect*. Washington: US Government Printing Office.

- French, A.S., Carey B. C., Debbie L., Andrews, Wanda C., Wiliams, Marie M., Riddle, Robert W., and Luebke. 1998. Evaluation of The Potential Immunotoxicity of Chlorinated Drinking Water in Mice. *Toxicology 125 (1998): 53–58.*
- Fuadi, A. 2012. Pengaruh Residual Klorin Terhadap Kualitas Mikrobiologi Pada Jaringan Distribusi Air Bersih (Studi Kasus: Jaringan Distribusi Air Bersih IPA Cilandak). Depok: Fakultas Teknik UI.
- Hardiany, N.S. 2013. *Cathepsin dan Calpain: Enzim Pemecah Protein dalam Sel. Jurnal Biologi Molekuler vol.1, no.1.*
- Hasan, A. 2006. Dampak Penggunaan Klorin. *Jurnal Teknologi Lingkungan. PLTL-BPPT.7.(1): 90-96.*
- Hestianah, E.P., Anwar C., Kuncorojakti S., dan Yustinasari L.R. 2014. *Buku Ajar Histologi Veteriner.* Surabaya: FKH UNAIR.
- Herawati, D., dan Yuntarso A. 2017. Penentuan Dosis Kaporit Sebagai Desinfektan Dalam Menyisihkan Konsentrasi Ammonium pada Air Kolam Renang. *Jurnal Sain Health Vol. 1 No. 2.*
- Heutinck, K. M., Ineke J.M., Erik H., Jörg H., Ajda T., and Rowshani. 2010. Serine Proteases of The Human Immune System in Health and Disease. *Molecular Immunology 47 (2010) 1943–1955.*
- Igarashi, H., Nao F., Tetsuhide I., Taici N., Takamasa O., Kazuhito N., Koichi S., Robert, TJ Ryochi. 2011. Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) and VIP Receptors- Elucidation of Structure and Function for Therapeutik Applications. *International Journal of clinical medicine. 2, 500-508.*

- Junqueira, L. C., J. Carneiro. 2005. *Basic Histology Text & Atlas: Female Reproductive System. 11th ed.* United States of America: McGraw Hill.
- Jusuf, A. A. 2009. *Histoteknik Dasar*. Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Depok.
- Karitas, M. G., Fatchiyah, F. 2013. Profil Protein 30-60 kDa pada Yogurt Hasil Fermentasi Susu Kambing Peternakan Etawa dengan Kultur Tunggal. *Jurnal Biotropika, Edisi 1(2)*.
- Krinke, G. J. 2000. *The Laboratory Rat. San Diego*. CA: Academic Press. Hal :150-152.
- Permenkes. 2010. *Persyaratan Kualitas Air Minum*. 492/MENKES/PER/IV/2010.
- Pratiwi, R. 2001. Mengenal Metode Elektroforesis. *Oseana, Volume XXVI, Nomor 1, hal:25-31*.
- Purwaningsih, I., Dan Supriyanto. 2017. Pengaruh Jumlah Pencucian Beras Dengan Kadar Klorin. *Jurnal Laboratorium Khatulistiwa 1(1) Hlm. 89 – 93*.
- Rohayati, Euis S., Galih., dan Puji M.L. 2016. Pemeriksaan Kadar Klorin Pada Air Pdam Tirta Galuh Cabang Ciamis. *Jurnal Analis Kesehatan vol.3, no.2*.
- Rohmah, S., dan Sulistyorini L. 2017. Gambaran Konsumsi Udang Berklorin Terhadap Keluhan Kesehatan Gastrointestinal Pekerja Sub Kontrak Perusahaan X. *Jurnal Kesehatan Lingkungan Vol. 9, No. 1 hal.: 57–65*.
- Rosana, D. 2016. Modul 2: Struktur dan Fungsi Protein. [staff.uny.ac.id](http://staff.uny.ac.id). [Diakses pada 9 Oktober 2018].
- Rosita, D., Zaenap S., Krisno M.A., Dan Budiyono. 2016. Analisis Kandungan Klorin Pada Beras Yang Beredar Di Pasar Besar Kota Malang Sebagai

Sumber Belajar Biologi. *Jurnal Pendidikan Biologi Indonesia Vol. 2 No.1*  
*Hal: 88-93.*

Santoso, B.I., Hardiyansyah, Siregar P., Dan Pardede S.O. 2011. *Air Bagi Kesehatan*. Jakarta: Centra Communications

Taylor. 2018. Anatomy and Fisiology of Jejenum. [www.innerbody.com](http://www.innerbody.com). [Diakses pada 9 Oktober 2018].

Thureen, P., and Hay W. 2006. *Neonatal Nutrition and Metabolism second edition*. Cambridge: Cambridge Univercity Press.

Turan, B. 2010. Role of Antioxidants in Redox Regulation of Diabetic Cardiovascular Complications. *Current Pharmaceutical Biotechnology Ed.11, 819-836.*

Utomo, W.T., I Nyoman S., dan I Gusti A.A.S. 2017. Karakteristik Protein Plasma Sapi Bali. *Jurnal Veteriner 2 (18):232-238.*

Wulansari, R., Nurilmala M., dan Nurjanah. 2015. Deteksi Ikan Tuna Dan Produk Olahannya Berbasis Protein dan Dna *Barcoding*. *JPHPI 2015, Volume 18 Nomor 2 hal:119-127.*

Wu, B., Cui H., Peng X., Fang J., Zuo Z., Deng J., and Huang J. 2013. Dietary Nickel Chloride Induces Oxidative Intestinal Damage in Broilers. *International Journal of Environmental Research and Public Health 10, 2109-2119.*

Yazid, M., Bastianudin A., dan Sutresna G. 2012. *Analisis Profil Protein Sitoplasma Isolat Bakteri dari Limbah Uranium Cair Fasa Organik*.  
Prosiding Pertemuan dan Presentasi Ilmiah - Penelitian Dasar Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Nuklir 2012 Pusat Teknologi Akselerator dan Proses Bahan - BATAN



Lampiran 1. Keterangan Laik Etik



**KOMISI ETIK PENELITIAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
"ETHICAL CLEARANCE"**

No: 1028-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 KLORIN BERLEBIH  
TERHADAP AKTIVITAS PROTEASE DAN GAMBARAN  
HISTOPATOLOGI ORGAN GINJAL PADA TIKUS  
(*Rattus norvegicus*)

**PENELITI** : DINDA TRI CLEOPATRA

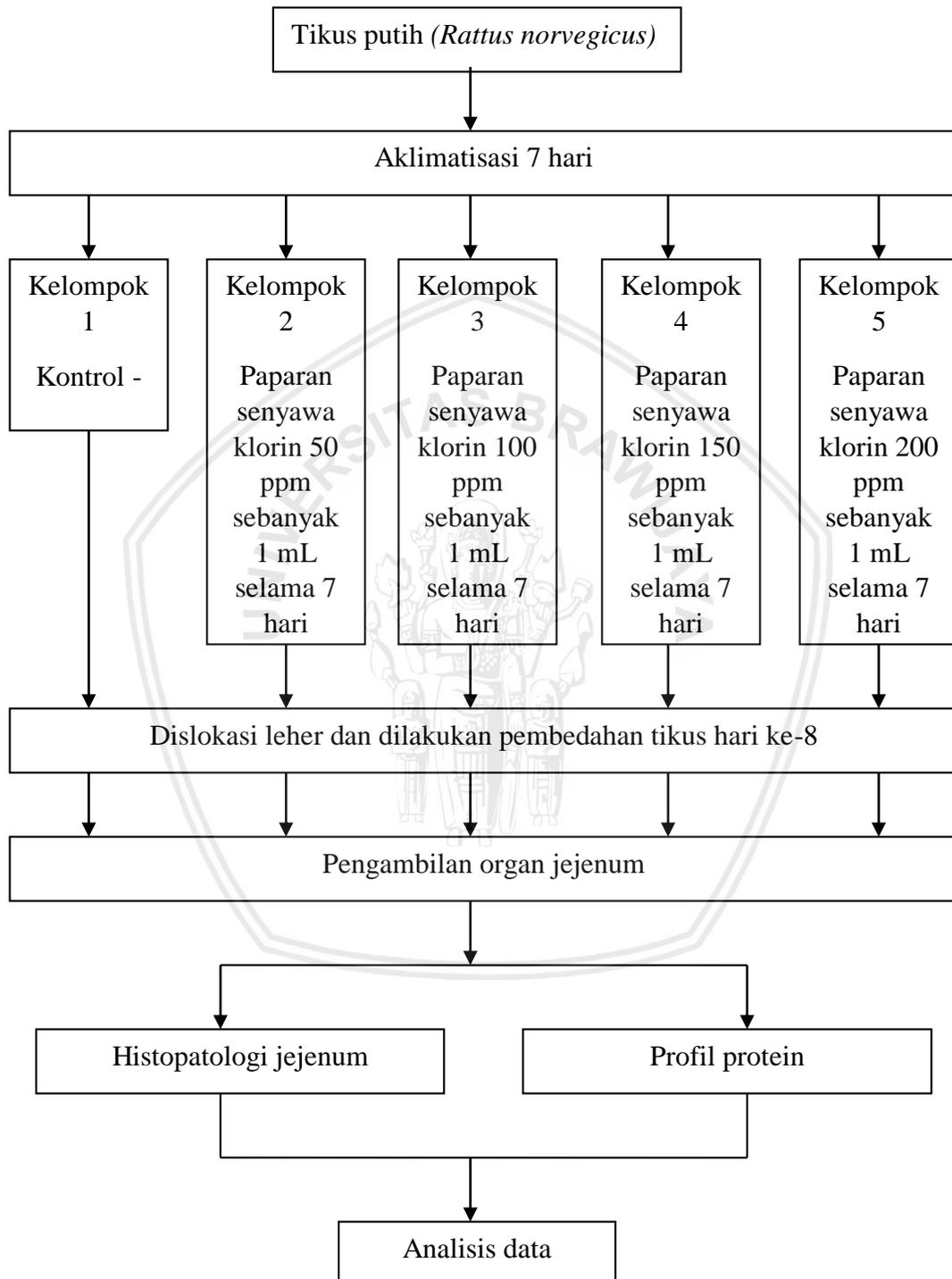
**UNIT/LEMBAGA/TEMPAT** : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

**DINYATAKAN** : LAIK ETIK

Malang, 25 Oktober 2018  
Ketua Komisi Etik Penelitian  
Universitas Brawijaya



Prof. Drh. Aulanni'am, DES.  
No. 19600903 198802 2 001

**Lampiran 2. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian**

**Lampiran 3.** Perhitungan Senyawa Klorin (Ca (ClO<sub>2</sub>)) Granular

Ca(ClO)<sub>2</sub> = 0,949 g/ 1 g senyawa

- Jumlah Cl<sub>2</sub> dalam 1 gram senyawa :

$$\frac{Cl_2}{Ca(ClO)_2} = \frac{71}{40 + (71 + 32)} = 0,49$$

$$0,49 \times 0,949 \text{ g} = 0,46501 \text{ g}$$

- Jumlah senyawa untuk membuat 50 ppm dalam 100 ml:

$$\frac{0,005 \text{ g}}{0,46501 \text{ g}} = 0,0108 \text{ g}$$

- Jumlah senyawa untuk membuat 100 ppm dalam 100 ml:

$$\frac{0,010 \text{ g}}{0,46501 \text{ g}} = 0,0215 \text{ g}$$

- Jumlah senyawa untuk membuat 150 ppm dalam 100 ml:

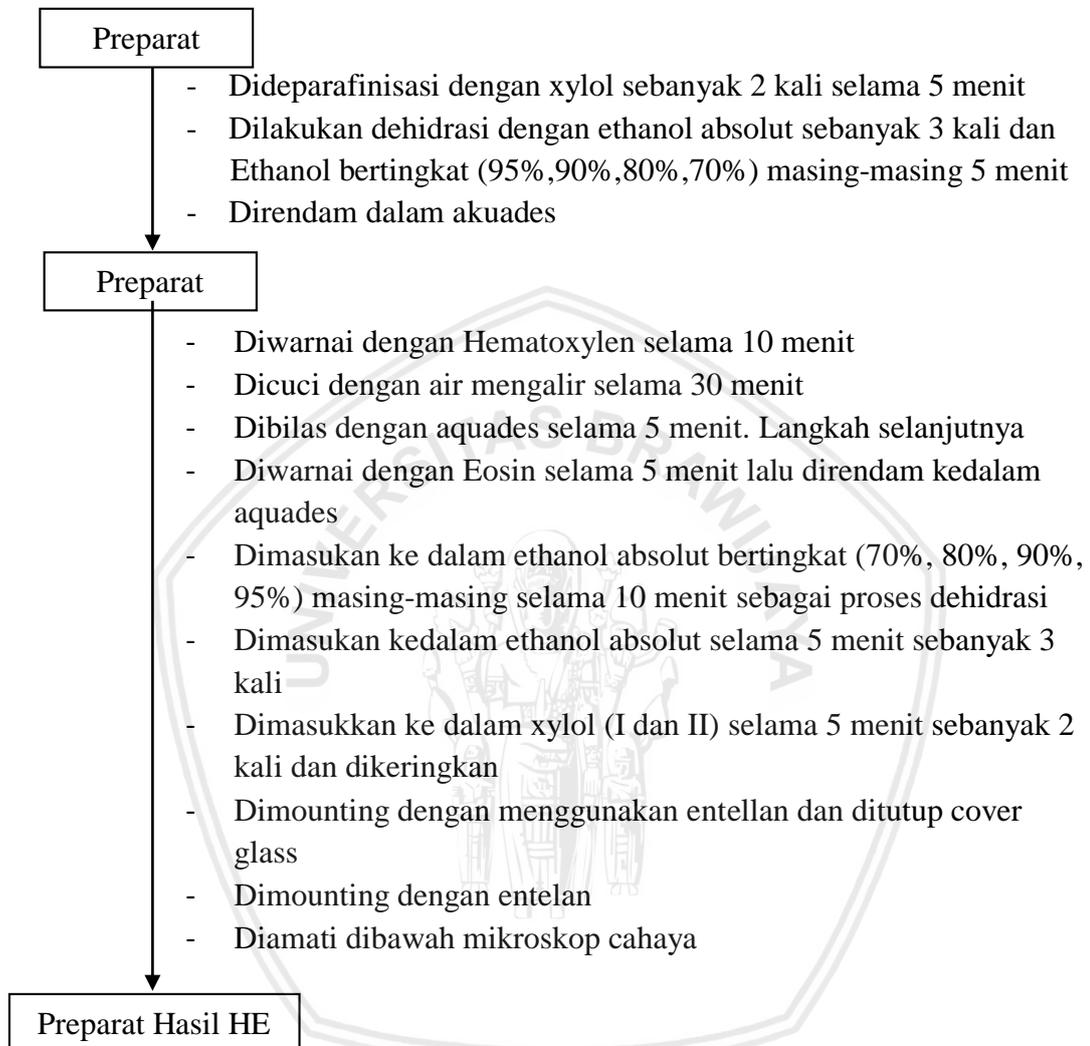
$$\frac{0,015 \text{ g}}{0,46501 \text{ g}} = 0,0323 \text{ g}$$

- Jumlah senyawa untuk membuat 200 ppm dalam 100 ml:

$$\frac{0,020 \text{ g}}{0,46501 \text{ g}} = 0,0430 \text{ g}$$

#### Lampiran 4. Pembuatan Preparat Histopatologi Jejunum

##### 3.1 Pewarnaan Hematoxylin-Eosin



### Lampiran 5. Pemeriksaan Profil Pita Protein Jejenum

Jejenum (1 gram)

- diekstrak protein dari jejenum dengan cara 0,5 gram sampel lalu ditambahkan PBS-Tween : PSMF (9:1) sebanyak 1 ml dan digerus dengan mortar lalu dimasukkan dalam microtube.
- disentrifuse dengan kecepatan 6.000 rpm, selama 15 menit dan diambil supernatannya.
- diambil dan ditambah etanol absolut dengan perbandingan 1: 1. dibiarkan selama satu malam sampai terbentuk endapan.
- disentrifuge kembali selama 15 menit dengan kecepatan 10.000 rpm.
- diambil endapan dan dikeringkan dengan cara dianginkan sampai bau etanol hilang. Setelah bau etanol hilang, endapan tersebut ditambahkan larutan 0,02 M Tris-HCl pH 6,8 dengan perbandingan volume 1: 1.
- disiapkan ekstrak kasar protein sebanyak 150  $\mu$ L, ditambahkan larutan RBS/SDS sebanyak 150  $\mu$ L, dan dipanaskan pada pemanas air dengan temperature 100°C selama 3 menit.
- dibuat gel dengan dua lapis yaitu *stacking gel* (tempat sampel) dan *separating gel* (Pemisah protein). *Stacking gel* memiliki konsentrasi 4%, sedangkan *separating gel* memiliki konsentrasi 10%
- dimasukkan *separating gel* ke dalam *plate* dengan menggunakan mikropipet, lalu didiamkan selama 10-30 menit hingga memadat.
- dituangkan *Stacking gel* diatas *separating gel*, dibuat sumur gel dengan bantuan sisir.
- diangkat sisir setelah gel memadat dan *plate* dipasang pada alat elektroforesis.
- Dimasukkan ekstrak protein dan juga marker dan *bromphenol blue* pada masing-masing sumuran lalu dilakukan proses running dengan arus listrik sebesar 42 mA dengan tegangan 200 volt. Proses running dihentikan setelah warna biru mencapai ketinggian 0,5 cm dari batas bawah *plate*
- direndam gel dalam pewarna *Coomassive Brilliant Blue R-25* 0,01%, kemudian dibilas dengan asam asetat jenuh
- dihitung berat molekul dengan kurva marker protein

Hasil

## Lampiran 6. Perhitungan Berat Molekul Hasil SDS-PAGE Profil Protein Jejenum

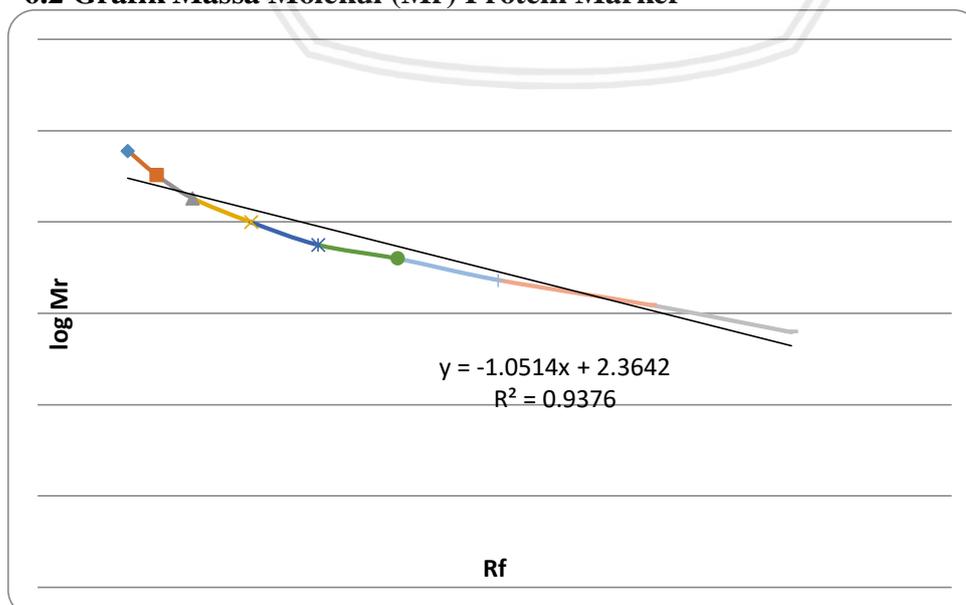
### 6.1 Tabel Harga Reterdation Factor (Rf) dan Massa Molekul (Mr) Protein Marker

Mr	Log Mr(y)	a	B	Rf (x)
245	2,389166	0,71	6	0,118333
180	2,255273	0,94	6	0,156667
135	2,130334	1,22	6	0,203333
100	2	1,68	6	0,28
75	1,875061	2,21	6	0,368333
63	1,799341	2,84	6	0,473333
48	1,681241	3,63	6	0,605
35	1,544068	4,83	6	0,805
25	1,39794	5,94	6	0,99

Keterangan :

- a = Jarak batas atas gel hingga pita (cm)
- b = Jarak batas atas gel hingga bawah gel (cm)
- Rf = Reterdation Factor
- Mr = Massa Molekul Marker
- Log Mr = Logaritma Massa Molekul Marker

### 6.2 Grafik Massa Molekul (Mr) Protein Marker



L.6.2. Kurva Standar Marker Protein

### 6.3 Tabel Harga Reterdation Factor (Rf) dan Massa Molekul (Mr) Protein Sampel

Sampel	a	b	Rf	Log Mr	Mr (kDa)
Kontrol negatif	1,95	6	0,325	1,876175	75,19
	2,34	6	0,39	1,77861	60,06
	2,49	6	0,415	1,741085	55,09
	2,92	6	0,487	1,633513	43,00
Perlakuan 1	1,95	6	0,325	1,876175	75,19
	2,34	6	0,39	1,77861	60,06
	2,49	6	0,415	1,741085	55,09
	2,92	6	0,487	1,633513	43,00
Perlakuan 2	1,95	6	0,325	1,876175	75,19
	2,34	6	0,39	1,77861	60,06
	2,49	6	0,415	1,741085	55,09
	2,92	6	0,487	1,633513	43,00
Perlakuan 3	1,95	6	0,325	1,876175	75,19
	2,34	6	0,39	1,77861	60,06
	2,49	6	0,415	1,741085	55,09
	2,92	6	0,487	1,633513	43,00
Perlakuan 4	1,95	6	0,325	1,876175	75,19
	2,34	6	0,39	1,77861	60,06
	2,49	6	0,415	1,741085	55,09
	2,92	6	0,487	1,633513	43,00

## Lampiran 7. Dokumentasi Penelitian

 <p>Kandang Kelompok Penelitian</p>	 <p>Penimbangan senyawa klorin</p>
 <p>Pembuatan larutan klorin sesuai konsentrasi masing-masing perlakuan</p>	 <p>Titrasi klorin</p>
 <p>Perlakuan paparan senyawa klorin dengan sonde lambung selama 7 hari</p>	 <p>Gejala Klinis berupa diare yang ditandai konsistensi feses yang cenderung lembek dan pucat</p>
 <p>Nekropsi pada hari ke-8 dengan metode dislokasi occipital</p>	 <p>Pengkoleksian organ</p>