

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

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

THEKLA DAMO KENDOM

125130107111037



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

HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI

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

Oleh :

**THEKLA DAMO KENDOM
125130107111037**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal Malang, 23 Juli 2019
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Dosen Pembimbing I

Dosen Pembimbing II

drh. Dyah Ayu O.A.P., M.Biotech
NIP. 19841026 200812 2 004

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

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

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

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini :

Nama : Thekla Damo Kendom
NIM : 12513010711037
Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan
Penulis Skripsi berjudul : **Pengaruh Pemberian Single Dose Indometasin Dengan Perbedaan Waktu Terhadap Ekspresi TNF- α dan Gambaran Histopatologi Organ Jejunum 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 termaksud 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, 31 Juli 2019

Yang menyatakan

(Thekla Damo Kendom)
12513010711037

Pengaruh Pemberian Single Dose Indometasin dengan Perbedaan Waktu Terhadap Ekspresi Tnf-Alfa Dan Gambaran Histopatologi Jejunum Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

ABSTRAK

Inflammatory Bowel Disease merupakan penyakit inflamasi yang menyerang saluran pencernaan. Indometasin merupakan salah satu obat antiinflamasi nonsteroid derivat indol-asam asetat yang menyebabkan terjadinya *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) di saluran pencernaan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hasil dari Pemberian Indometasin Dengan Perbedaan Waktu Terhadap Ekspresi TNF- α dan Gambaran Histopatologi Organ Jejunum Tikus Putih. Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan 20 ekor tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) Strain *Wistar* Jantan umur 8 minggu dengan berat 150-200 Gram. Dibagi menjadi 3 kelompok dengan 5 ulangan, yaitu P1, P2, dan P3 dengan dosis Indometasin sebanyak 3 mg/kg BB selama 33 jam, 48 jam dan 57 jam. Hasil ekspresi TNF- α dengan metode imunohistokimia berupa data kuantitatif dengan analisa menggunakan statistik *One Way ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) $\alpha < 0,05\%$. Gambaran histopatologi dengan pewarnaan *Hematoksin Eosin* diinterpretasikan secara deskriptif. Hasil penelitian menunjukkan rata-rata ekspresi TNF- α tidak berbeda signifikan ($p \geq 0,05$) antar kelompok perlakuan, pada kelompok perlakuan 1 yaitu $0,88 \pm 0,10\%$, kelompok perlakuan 2 yaitu $0,84 \pm 0,10\%$ dan kelompok perlakuan 3 yaitu $0,98 \pm 0,44\%$. Gambaran histopatologi jejunum pada P1, P2 dan P3 menunjukkan inflamasi pada tunika mukosa yang terlihat adanya sel radang, dan nekrosis vili. Kerusakan jaringan pada kelompok perlakuan 3 dengan waktu tunggu 57 jam lebih parah dibandingkan dengan kelompok perlakuan 1 dan 2. Kesimpulan induksi indometasin dosis tunggal dengan perbedaan waktu tunggu dapat menginduksi kerusakan jejunum dan ekspresi TNF- α .

Kata kunci : *Inflammatory Bowel Disease* (IBD), Indometasin, TNF- α , histopatologi jejunum.

**The Effect of Administration Indometacin Single Dose with Different Times
on TNF-Alpha Histopathological Description of Jejenum Rats
(*Rattus norvegicus*)**

ABSTRACT

Inflammatory Bowel Disease is an inflammatory disease that attacks the digestive tract. Indomethacin is one of the non-steroidal indole-acetic acid anti-inflammatory drugs that causes Inflammatory Bowel Disease (IBD) in tractus gastrointestinal. This study aimed to determine the results of the administration of Indomethacin with differences in the time of TNF- α expression and histopathological features of rat's jejenum. This study used a completely randomized design with 20 male rats (*Rattus norvegicus*) Wistar strain aged 8 weeks with a weight of 150-200 grams. Rats were divided into 3 groups with 5 replications, namely P1, P2, and P3 with a dose of Indomethacin as much as 3 mg / kg BB for 33 hours, 48 hours and 57 hours. The results of TNF- α expression with immunohistochemical methods were analyzed as quantitative data using One Way ANOVA statistics and continued with Post Hoc test (BNJ) a $<0.05\%$. Histopathological jejenum description with Hematoxylin Eosin staining was interpreted descriptively. The results showed that the average expression of TNF- α in group P1 $0,88 \pm 0,10\%$, P2 $0,84 \pm 0,10\%$ P3 $0,98 \pm 0,44\%$. The results of the study of histopathological of jejenum tissue of P1, P2 and P3 showed inflammation in tunica mucosa with inflammation cell, and villi necrosis. The tissue damage of the treatment group 3 with a waiting time of 57 hours was more severe compared than the treatment group 1 and 2. Conclusion with the different waiting time of single dose indomethacin could damage the jejunum tissue and induced TNF alpha expression.

Keywords : *Inflammatory Bowel Disease* (IBD), Indomethacin, TNF- α , Jejenum histopathology.

KATA PENGANTAR

Puji Syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena atas rahmat-Nya penulis dapat melaksanakan kegiatan laporan skripsi dengan lancar. Penulis sadar bahwa kegiatan ini tidak akan berhasil tanpa bantuan dari banyak pihak, maka dari itu penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. drh. Dyah Ayu Oktavianie Ardhiana Pratama., M. Biotech dan drh. Fajar Shodiq Permata., M.Biotech selaku dosen pembimbing tugas akhir ini atas segala bantuan, kesempatan, nasihat, bimbingan, dan arahan yang diberikan kepada penulis.
2. drh. M. Arfan Lesmana, M.Sc, selaku penguji I atas saran dan masukan yang diberikan.
3. drh. Rahadi Swastomo, M.Biomed., selaku dosen penguji II atas saran dan masukan yang diberikan.
4. Dr.Ir.Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan yang selalu memberikan dukungan demi kemajuan FKH UB.
5. Secara khusus penulis ingin mengucapkan beribu terimakasih kepada Ayah Marthinus Kendom, MP., Ibu Magdalena, adik-adik tercinta dan keluarga besar, atas doa, kasih sayang, semangat, serta dukungan dalam bentuk moril maupun materil kepada penulis selama menempuh pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang.
6. Teman seperjuangan dalam penelitian, Sirapegi Winurai Latip Duwiri, Dwi Novita Sari, dan Ade Nura Aulia yang saling support satu sama lain selama penulisan skripsi.
7. Sahabat rantau Jeane, Ani, feronika, Yulianti atas bantuan motivasi, kebersamaan, serta kekeluargaan di perantauan.
8. Seluruh dosen yang telah membimbing, memberikan ilmu dan memudahhi penulis selama menjalankan studi di FKH dan staf serta karyawan FKH yang telah membantu jalannya proses administrasi dalam membuat tugas akhir.

Penulis sangat menyadari bahwa skripsi ini masih banyak kekurangan. Oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan adanya saran maupun kritik yang sifatnya membangun atas tulisan ini. Penulis berharap skripsi ini dapat bermanfaat kiranya baik untuk penulis maupun pembaca.

Malang, 23 Juli 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	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah.....	3
1.4 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 <i>Inflammatory Bowel Disease</i> (IBD)	5
2.2 Indometasin	6
2.2.1 Struktur Kimia Indometasin.....	7
2.2.2 Farmakologi Indometasin	8
2.3 Imunohistokimia.....	8
2.4 TNF- α (<i>Tumor necrosis factor alpha</i>)	9
2.5 Jejunum.....	10
2.5.1 Anatomi Jejunum	10
2.5.2 Histologi Jejunum.....	11
2.6 Hewan Coba Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>).....	13



BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	15
3.1 Kerangka Konsep	15
3.2 Hipotesis Penelitian	17
BAB 4. METODOLOGI PELAKSANAAN KEGIATAN	18
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	18
4.2 Alat dan Bahan	18
4.2.1 Alat	18
4.2.2 Bahan	19
4.3 Rancangan Penelitian.....	19
4.4 Sampel Penelitian	20
4.5 Variabel Penelitian	21
4.6 Tahapan Penelitian	21
4.6.1 Persiapan Hewan Percobaan	21
4.6.2 Pemberian Indometasin	22
4.6.3 Pengambilan Organ Jejunum	22
4.6.4 Pembuatan Preparat Histopatologi Jejunum	23
4.6.5 Pembuatan Histopatologi Jejunum Menggunakan Pewarnaan Hematoxillin Eosin	24
4.6.6 Pembuatan Preparat Menggunakan Metode Imunohistokimia TNF- α).....	25
4.7 Analisa Data	26
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN.....	27
5.1 Pemberian Single Dose Indometasin Dengan Perbedaan Waktu Terhadap Ekspresi TNF- α Pada Organ Jejunum Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>).....	27
5.2 Pemberian Single Dose Indometasin Dengan Perbedaan Waktu Terhadap Gambaran Histopatologi Organ Jejunum Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>).....	31
BAB 6 PENUTUP	38
6.1 Kesimpulan	38
6.2 Saran	38



DAFTAR PUSTAKA..... 39



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Struktur Kimia Indometasin	7
Gambar 2.2 Histologi Jejunum	12
Gambar 2.3 Tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>).....	14
Gambar 3.1 kerangka konsep.....	15
Gambar 5.1 Ekspresi Tumor Necrosis Faktor (TNF- α) pada jejunum tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	28
Gambar 5.2 Gambaran histologi jejunum tikus putih kelompok perlakuan kontrol negatif	32
Gambar 5.3 Gambaran histopatologi jejunum tikus putih kelompok perlakuan 1.....	34
Gambar 5.4 Gambaran histopatologi jejunum tikus putih kelompok perlakuan 2.....	34
Gambar 5.5 Gambaran histopatologi jejunum tikus putih kelompok perlakuan 3.....	34



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Rancangan Penelitian.....	20
Tabel 5.1 Presentase ekspresi TNF- α jejunum tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>).	29
Tabel 5.2 Pengamatan gambaran histopatologi jejunum tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>).....	32



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Surat Laik Etik	43
Lampiran 2. Diagram Alur Penelitian	44
Lampiran 3. Pembuatan Preparat Histopatologi Jejunum dengan Pewarnaan HE.....	45
Lampiran 4. Pewarnaan Immunohistokimia.....	46
Lampiran 5. Statistika TNF- α	47



DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN

Simbol/ Singkatan	Keterangan
IBD	: <i>Inflammatory Dowel 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
ppm	: <i>part per million</i>
KU	: kolitis ulseratif
K (-)	: Kontrol Negatif
P1	: Perlakuan Satu
P2	: Perlakuan Dua
P3	: Perlakuan Tiga
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
PC	: penyakit Crohn
IBDU	: <i>Inflammatory Dowel Disease type unclassifi</i>
Th-1	: sel T helper-1
Th-2	: sel T helper-2
HSPGs	: <i>Heparan Sulfate Proteoglycans</i>
TNF- α	: Tumor Necrosis Factor- α
OAINS	: Obat anti-inflamasi nonsteroid
COX	: Cyclooxygenase atau Siklooksigenase

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Inflammatory Bowel Disease (IBD) adalah spektrum dari kondisi radang idiopatik kronis. IBD menyebabkan gejala-gejala gastrointestinal yang signifikan itu termasuk diare, sakit perut, pendarahan, anemia dan penurunan berat badan. IBD secara konvensional adalah dibagi menjadi dua subtipe utama: Kolitis ulserativa dan penyakit Crohn. Kolitis ulseratif ditandai oleh peradangan mukosa usus besar yang konfluen mulai dari ambang anal dan memanjang secara proksimal untuk tingkat variabel (misalnya; proktitis, kolitis sisi kiri, atau pan colitis). Sebaliknya, penyakit Crohn ditandai oleh peradangan mural trans bagian manapun dari saluran pencernaan tetapi paling sering diare yang berdekatan dengan katup ileocecal. Kedua penyakit meningkatkan risiko adenokarsinoma usus besar di daerah yang terkena (Chougule dkk, 2018).

Kasus *inflammatory bowel disease* dapat terjadi pada manusia dan hewan. Dilaporkan bahwa dari tanggal 1 Agustus 2003 sampai dengan tanggal 31 Desember 2009 terdapat 546 anjing yang telah teridentifikasi (Kathrani *et al.*, 2011). Secara umum penyebab *inflammatory bowel disease* menginfeksi saluran pencernaan dibagian organ jejunum.

Berdasarkan penelitian Saptono dkk (2014) menyebutkan bahwa penyakit ini dapat disebabkan oleh efek samping penggunaan obat *non steroidal anti-inflammatory drugs*, seperti indometasin. Indometasin merupakan obat yang banyak digunakan untuk pengobatan rheumatoid arthritis. Dalam aksi kerja, indometasin akan menghambat cyclooxygenase 1 (COX-1) yang berperan dalam

pembentukan prostaglandin pada usus. Penurunan prostaglandin menyebabkan penurunan perlindungan terhadap mukosa barrier usus, sehingga memudahkan invasi bakteri patogen. Selain itu, dalam metabolisme indometasin akan menghasilkan metabolit imunokuinon yang sangat reaktif. Peningkatan imunokuinon akan menyebabkan terjadinya stress oksidatif (Sholichah dkk, 2012).

Indometasin yang masuk ke dalam jejunum akan dikenali sebagai antigen oleh sel T *helper* dan mengaktifkan makrofag untuk melepaskan mediator inflamasi dalam jumlah besar seperti *Reactive Oxygen Species* (ROS). Kerusakan atau inflamasi pada jejunum dapat diketahui melalui perubahan gambaran histopatologi jejunum (Primata dkk., 2013).

Jejunum memiliki banyak lipatan melingkar besar dalam submukosa yang disebut *plicae circulares* yang berfungsi meningkatkan luas permukaan untuk penyerapan nutrisi. Jejunum menjadi bagian dari usus yang paling banyak mengabsorpsi mikronutrien dan obat-obatan. Perubahan histologis jejunum dapat menyebabkan gejala seperti diare, malnutrisi dan penurunan berat badan. Jejunum merupakan bagian terpanjang dari usus halus yakni sekitar 90% (Wijayanti, 2013). Namun pada beberapa Penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, masih belum ada pembahasan terkait timbulnya inflamasi yang diinduksi indometasin dengan perbedaan waktu terhadap perubahan histopatologi organ jejunum.

Berdasarkan latar belakang diatas, penelitian kali ini akan dikaji bagaimana “Pengaruh Pemberian Single Dose Indometasin Dengan Perbedaan

Waktu Terhadap Ekspresi TNF- α dan Gambaran Histopatologi Organ Jejunum Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)”.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka permasalahan yang ingin diketahui pada penelitian ini adalah :

1. Bagaimana efek Pemberian Indometasin Dengan Perbedaan Waktu Terhadap Ekspresi TNF- α pada tikus putih (*Rattus norvegicus*).
2. Bagaimana efek Pemberian Indometasin Dengan Perbedaan Waktu Terhadap Gambaran Histopatologi Organ Jejunum Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)?

1.3 Batasan Masalah

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

1. Hewan model yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar dari Laboratorium Histologi Universitas Brawijaya Malang dengan umur 8-12 minggu dan berat badan 150-200 gram. Penggunaan hewan coba dalam penelitian ini telah mendapatkan sertifikasi laik etik dari Komisi Penelitian Universitas Brawijaya Nomor 1135-KEP-UB.
2. Pembuatan keadaan *Inflammatory Bowel Disease* pada hewan model tikus dilakukan dengan cara pemberian indometasin secara *per-oral* sebanyak 3 mg/kg BB setiap hari selama 3 hari di Laboraturium Histologi UIN (Universitas Islam Negri) Malang.

3. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah ekspresi TNF- α dengan teknik *Imunohistokimia* dan gambaran histopatologi jejunum pada tikus (*Rattus norvegicus*).

1.4 Tujuan Penelitian

Penelitian ini memiliki beberapa tujuan yang ingin dicapai yaitu :

1. Mengetahui hasil dari Pemberian Indometasin Dengan Perbedaan Waktu Terhadap Ekspresi TNF- α pada tikus putih (*Rattus norvegicus*).
2. Mengetahui hasil dari Pemberian Indometasin Dengan Perbedaan Waktu Terhadap Gambaran Histopatologi Organ Jejunum Tikus Putih.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat, yaitu mahasiswa dapat menambah pengetahuan sebagai kajian ilmiah dan membuktikan terhadap Pengaruh Pemberian Single Dose Indometasin Dengan Perbedaan Waktu Terhadap Ekspresi TNF- α dan Gambaran Histopatologi Organ Jejunum Tikus Putih (*Rattus novergicus*).

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Inflammatory Bowel Disease (IBD)

Inflammatory Bowel Disease merupakan penyakit inflamasi yang menyerang saluran pencernaan (Prayoga dkk, 2016). Penyakit radang menahun yang mengenai saluran pencernaan terutama usus halus dan kolon, menggambarkan kondisi peradangan saluran cerna kronik dan idiopatik. Secara umum dibagi atas kolitis ulseratif (KU), penyakit Crohn (PC) dan *IBD type unclassified* (IBDU), dulu dikenal sebagai *indeterminate colitis*. Etiopatogenesis IBD belum sepenuhnya dimengerti. Faktor genetik dan lingkungan dalam saluran cerna seperti perubahan bakteri usus dan peningkatan permeabilitas epitel saluran cerna diduga berperan dalam gangguan imunitas saluran cerna yang berujung pada kerusakan saluran cerna (Firmansyah, 2013).

Hingga saat ini, etiologi pasti IBD belum sepenuhnya dimengerti. Banyak teori diajukan namun belum ada kausa tunggal yang diketahui sebagai penyebab IBD (Lubis dkk, 2015). Salah satu teori yang diyakini adalah peranan mediasi imunologi pada individu yang memang rentan secara genetik. IBD diyakini merupakan hasil respons imun yang menyimpang dan berkurangnya toleransi pada flora normal usus yang berakibat terjadinya inflamasi kronik pada usus. Kondisi ini didukung dengan adanya temuan antibodi terhadap antigen mikrobial dan diidentifikasi kasinya gen CARD15 sebagai gen penyebab kerentanan terjadinya IBD. Secara genetik, disebutkan bahwa adanya mutasi pada gen NOD2 (gen IBD1) atau CARD15 (gen NOD2) di kromosom 16 dapat dikaitkan dengan terjadinya IBD (terutama untuk PC). Meski demikian, gen-gen ini tidak

disebutkan bersifat kausal terhadap IBD. Banyak mediator inflamasi telah dikenali dalam patogenesis IBD. Sitokin yang dilepaskan oleh makrofag sebagai respons terhadap berbagai stimulus antigenik akan berikatan dengan beragam reseptor dan menghasilkan efek autokrin, parakrin, dan endokrin. Sitokin mengubah limfosit menjadi sel T dimana sel T helper-1 (Th-1) berperan dalam patogenesis PC dan sel T-helper 2 (Th-2) berperan dalam KU. Respons imun ini akhirnya akan merusak mukosa saluran cerna dan memicu terjadinya kaskade proses inflamasi kronik (Firmansyah, 2013).

Banyak studi pada beberapa tahun terakhir telah menunjukkan bahwa adanya *heparan sulfate proteoglycans* (HSPGs) terikat mengatur aktivitas berbagai faktor inflamasi. Syndecan-1 (Sdc-1) merupakan contoh penting dari HSPGs yang menutup permukaan sel epitel. Sdc-1 memiliki beragam peranan biologis diantaranya penyembuhan luka, tumorigenesis, dan pengaturan respons inflamasi. Peranan Sdc-1 dalam hal respons inflamasi adalah dengan mengatur sinyal sitokin proinflamasi, khususnya tumor necrosis factor- α (TNF- α) (Firmansyah, 2013).

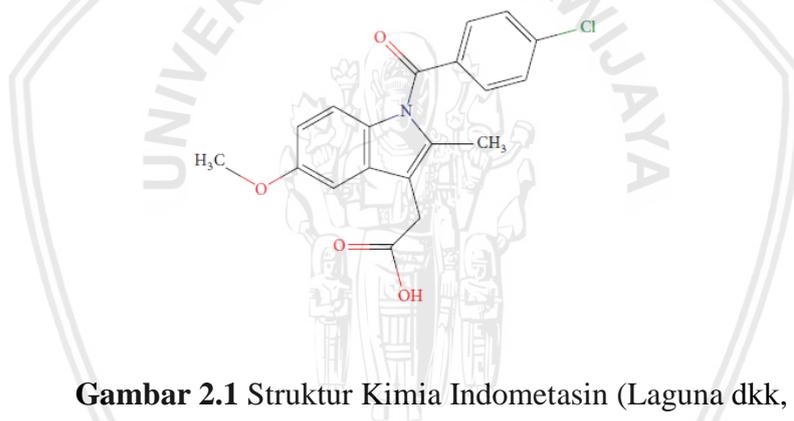
2.2 Indometasin

Obat anti-inflamasi nonsteroid (OAINS) merupakan obat yang sering digunakan pada pengobatan penyakit, karena dapat menghilangkan atau mengurangi tanda dan gejala radang. Salah satu OAINS adalah indometasin yang sering diresepkan (Mustaqim dkk, 2017). 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).

2.2.1 Struktur Kimia Indometasin

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).



Gambar 2.1 Struktur Kimia Indometasin (Laguna dkk, 2016).

2.2.2 Farmakologi 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 mempunyai sifat antiradang yang menonjol dan sifat analgesik-antipiretik yang mirip dengan turunan salisilat. Efek antiradang indometasin terlihat jelas pada pasien arthritis rheumatoid dan arthritis tipe lain, termasuk pirai akut (Robert dan Morrow, 2008).

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 (Mustaqim dkk, 2017).

Absorpsi Indometasin setelah pemberian oral cukup baik ; 92-99% indometasin terikat pada protein plasma. Metabolismenya terjadi di hati. Indometasin diekskresi dalam bentuk asal maupun metabolit melalui urin dan empedu. Waktu paruh plasma kira-kira 2-4 jam (Wilma dan Gan, 2007).

2.3 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. Interaksi antigen-antibodi dapat divisualisasikan oleh spidol termasuk pewarna fluorescent, reaksi warna enzim-substrat, elemen radioaktif atau koloid emas (Zang dkk, 2017).

2.4 TNF- α (*Tumor necrosis factor alpha*)

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 reaksi sistemik. TNF disebut TNF- α atas dasar historis dan untuk membedakannya dari TNF- β atau limfotoksin. Sumber utama TNF- α ialah fagosit mononuklear dan sel T yang diaktifkan antigen, sel NK, dan sel mast.

Lipopolisakarida merupakan rang-sangan poten terhadap makrofag untuk menyekresi TNF. IFN- γ yang diproduksi sel T dan sel NK juga merangsang makrofag antara lain meningkatkan sintesis TNF (Supit dkk, 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 dan 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. Hampir semua proses inflamasi mengakibatkan aktivasi makrofag jaringan dan infiltrasi monosit darah. Aktivasi ini menyebabkan banyak perubahan dalam sel, di antaranya ialah produksi TNF, IL-1, dan IL-6, yaitu sitokin-sitokin yang meyebab-kan efek multipel pada hospes (Supit dkk, 2015).

2.5 Jejunum

2.5.1 Anatomi Jejunum

Organ jejunum pada tikus memiliki panjang 900-1350 mm dan dengan diameter 4-5 mm. berbeda dengan organ usus halus lainnya organ duodenum memiliki panjang 95-100 mm dan diameter 2,5-3 mm, ileum memiliki panjang 25-35 mm dan diameter 3-5 mm, diantara organ duodenum dan jejunum terdapat fleksura duodenojejunalis. Bagian dari usus halus ini terletak dibagian kanan cavum abdominalisventralis (Vdoviakova, 2016).

2.5.2 Histologi Jejunum

Secara umum, struktur utama dari usus halus adalah membran mukosa, lamina propria, submukosa, jaringan limfatik, serosa dan lapisan muskuler. Sel epitel menutupi seluruh permukaan bebas dari membran mukosa dan berbentuk epitel silindris sebaris (Xu and Cranwell 2003). Pada lapis mukosa usus halus terdapat suatu bentuk khusus berupa vili- vili. Vili memperluas permukaan area lumen serta mengefisienkan proses absorpsi. Selain itu pada mukosa usus juga ditemukan kript-kript usus. Kelenjar-kelenjar yang terdapat pada mukosa memiliki bentuk tubular sederhana. Pada daerah di bawah epithelium merupakan lamina propria. Lamina propria mengandung leukosit dan jaringan limfatik berupa nodul-nodul. Ditemukan nodul-nodul limfatik yang beragregasi membentuk *Payer's Patches*. Lapis submukosa usus halus terdiri dari jaringan ikat, pembuluh darah dan pembuluh limfatik (Xu and Cranwell 2003).

Perbedaan organ jejunum dengan organ usus halus lainnya yakni pada daerah submukosa duodenum terdapat sekelompok kelenjar berbentuk tubular seperti gulungan yang disebut dengan kelenjar Brunner, sedangkan pada organ ileum terdapat bagian yang disebut plakat peyer. Pada daerah mukosa bagian dasar vili usus halus terdapat kript Lieberkuhn. Kript Lieberkuhn berbentuk lurus maupun tubular seperti struktur kelenjar yang dilapisi oleh sel epitel silindris sebaris.



Gambar 2.2 Histologi Jejunum. Sel epitel (a), sel goblet (b). Sumber: histology-world.com (2006).

Sel epitel yang terdapat dalam kelenjar kriptra termasuk stem sel *undifferentiated*, sel goblet, sel Paneth dan sel endokrin. Sel goblet mensekresikan mukus dan memiliki fungsi yang sama dengan sel goblet pada vili usus. Sel endokrin memproduksi berbagai macam hormon maupun peptida (Xu and Cranwell 2003). Sel Paneth merupakan sel eksokrin dengan granul-granul sekretori pada apikal sitoplasma. Granul-granul sekretori ini menghasilkan lisosim yang memiliki aktivitas antibakterial dan mengontrol mikrobiota. Stem sel yang belum terdiferensiasi memiliki kemampuan mitotik yang tinggi. Sel epitel baru yang tumbuh oleh proses mitosis dari stem sel berpindah ke atas sepanjang vili dan sering menembus ujung vili (Xu and Cranwell 2003).

Inflamasi pada saluran pencernaan atau gastrointestinal tract (GIT) khususnya organ jejunum sering terjadi karena bakteri pathogen dan efek penggunaan obat-obatan. Jejunum memiliki fungsi seperti halnya bagian usus halus lainnya sebagai tempat penyaluran makanan dan penyerapan nutrisi ke dalam pembuluh darah dan pembuluh limfe. Dalam usus, asam lemah terutama akan berada dalam bentuk ion sehingga tidak mudah

diserap, sedangkan basa lemah akan berada dalam bentuk non-ion sehingga mudah diserap. Absorpsi usus akan lebih tinggi lagi dengan lamanya waktu kontak dan luasnya daerah permukaan vili dan mikrovili usus.

2.6 Hewan Coba Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Hewan laboratorium atau hewan percobaan adalah hewan yang sengaja dipelihara dan diternakkan untuk dipakai sebagai hewan model guna mempelajari dan mengembangkan berbagai macam bidang ilmu dalam skala penelitian atau pengamatan laboratoris. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) banyak digunakan sebagai hewan percobaan pada berbagai penelitian (Widiartini dkk, 2014). Hewan percobaan yang akan digunakan dalam penelitian ilmiah ini adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar. Tikus (*Rattus norvegicus*) biasa digunakan sebagai hewan percobaan karena hewan ini mudah diperoleh dalam jumlah yang banyak, memiliki respon yang cepat terhadap perlakuan yang diberikan, memberi gambaran secara ilmiah yang mungkin terjadi pada manusia, serta harganya relatif murah (Sihombing dan Tuminah, 2011).

Klasifikasi tikus putih menurut Akbar (2010) adalah sebagai berikut :

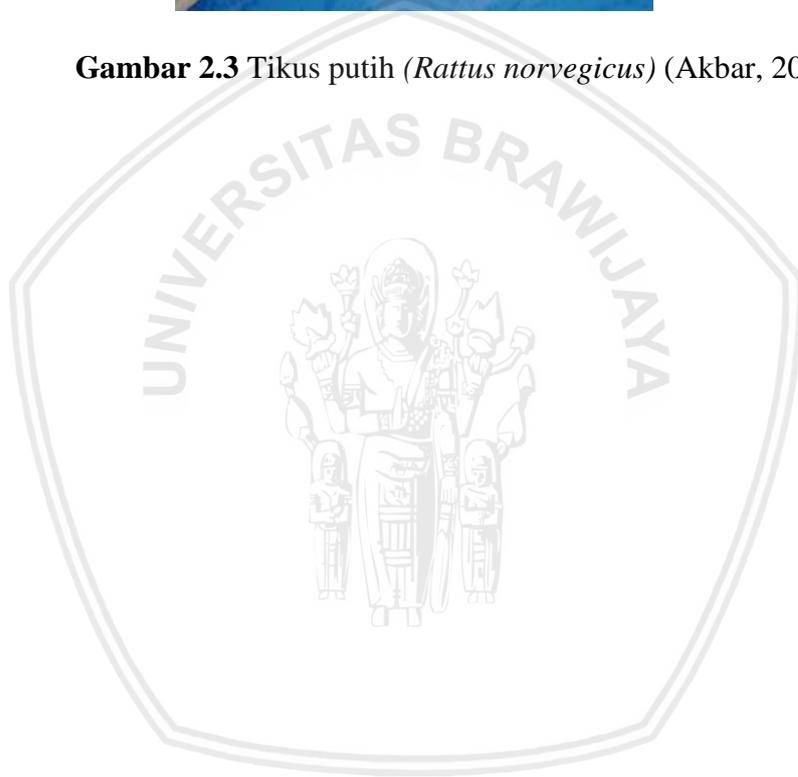
Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Subordo	: Odontoceti
Familia	: Muridae

Genus : *Rattus*

Spesies : *Rattus norvegicus*

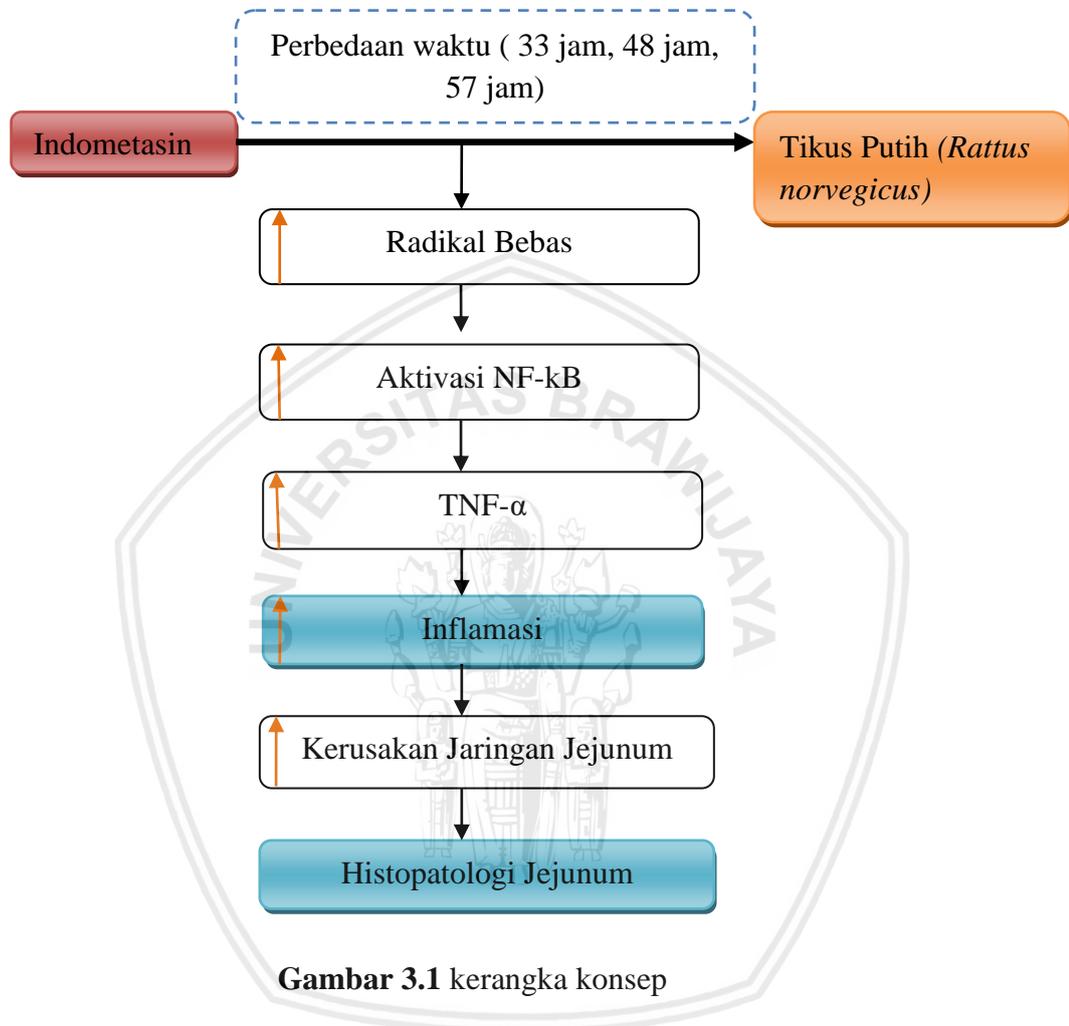


Gambar 2.3 Tikus putih (*Rattus norvegicus*) (Akbar, 2010).



BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan :

-  : Variabel yang diamati
-  : Perlakuan
-  : Efek pemberian induksi indometasin
-  : Menstimulasi

Indometasin merupakan salah satu obat antiinflamasi nonsteroid derivat indol-asam asetat yang menyebabkan terjadinya *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) pada tikus putih (*Rattus norvegicus*). Indometasin diinduksi pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) secara per oral dengan menggunakan sonde lambung dan dengan perbedaan waktu selama 33 jam, 48 jam dan 57 jam. Induksi Indometasin pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) akan menghambat enzim siklooksigenase 1 (COX 1) 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.

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 jejunum.

3.2 Hipotesis Penelitian

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

1. Pemberian indometasin dengan perbedaan waktu dapat memberi efek terhadap ekspresi TNF- α pada tikus putih (*Rattus norvegicus*).
2. Pemberian Indometasin dengan Perbedaan waktu terhadap gambaran histopatologi organ jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*).



BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April hingga Juli 2019. Pelaksanaan penelitian dilakukan di beberapa laboratorium, yaitu; Laboratorium Fisiologi Hewan Universitas Islam Negeri (UIN) Malang sebagai tempat pemeliharaan hewan coba dan pemberian perlakuan dilakukan. Laboratorium Histologi FKH UB sebagai tempat untuk *Euthanasia*, pengambilan sampel organ jejunum. Laboratorium Patologi Anatomi FK UB sebagai tempat untuk pembuatan preparat Histopatologi organ jejunum, pewarnaan HE dan pewarnaan immunohistokimia. Laboratorium Histologi FKH UB sebagai tempat untuk pengamatan preparat immunohistokimia dan Histopatologi organ jejunum.

4.2 Alat dan Bahan

4.2.1 Alat

Alat yang diperlukan dalam penelitian ini antara lain kandang tikus dari bahan plastik beserta penutup dari kawat jala untuk masing-masing 16 ekor tikus, botol minum tikus, tempat makan tikus, *disposable syringe* 1 ml dan 5 ml, timbangan digital, *scalpel*, *blade*, gunting, gelas objek, gunting, pinset, lampu, sonde, gelas ukur, mikroskop cahaya, spektrofotometer, *yellow tip*, *blue tip*, *cover glass*, lemari pendingin, incubator, pot sampel, plastik klip dan mikrotom, pipet, system pencuci (*washer system*), pembaca plat ELISA: pembaca, dan pencuci.

4.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus (*Rattus norvegicus*) strain *Wistar* jantan, pakan tikus, Indometasin, NaCL, alkohol 70%, NaCL 0,9%, *aquadest*, etanol 96%, etanol absolut, etanol bertingkat 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, xylol, paraffin, pewarna HE, kertas saring, vaselin albumin, formalin 10% dan reagen.

4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan desain *The Post Test-Only Control Group*. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan membagi kelompok hewan coba menjadi 4 kelompok perlakuan, sehingga setiap kelompok perlakuan terdiri dari 4 ekor hewan coba, yakni K(-), P1, P2 dan P3 atau kelompok kontrol negatif yaitu tikus sehat. P(1) atau perlakuan 1, yaitu tikus yang diinduksi indometasin 3 mg/kg BB *per-oral* sehari selama 33 jam. P(2) atau perlakuan 2, yaitu tikus yang diinduksi indometasin 3 mg/kg BB *per-oral* selama 48 jam. P(3) atau perlakuan 3, yaitu tikus yang diinduksi indometasin 3 mg/kg BB *per-oral* selama 57 jam. Kelompok perlakuan dapat dilihat pada **tabel 4.1**.

Tabel 4.1 Rancangan kelompok penelitian

Kelompok Perlakuan	Perlakuan
Kelompok K(-)	Tikus sehat
Kelompok P(1)	Indometasin 3 mg/kg BB, waktu tunggu 33 jam
Kelompok P(2)	Indometasin 3 mg/kg BB, waktu tunggu 48 jam
Kelompok P(3)	Indometasin 3 mg/kg BB, waktu tunggu 57 jam

4.4 Sampel Penelitian

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan, strain *Wistar* berumur 8-12 minggu dengan berat badan 150 gram. Berdasarkan rancangan penelitian yang menggunakan 4 kelompok perlakuan, maka jumlah ulangan untuk masing-masing kelompok perlakuan adalah sebagai berikut (Kusriningrum, 2008):

$$\begin{array}{l}
 p(n-1) > 15 \\
 5(n-1) > 15 \\
 5n-1 > 15 \\
 n > 19/5 \\
 n > 4,75=5
 \end{array}$$

keterangan	:
t	= Jumlah perlakuan
n	= Jumlah ulangan

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

4.5 Variabel Penelitian

Adapun variable dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

Variabel bebas : Induksi indometasin, perbedaan waktu

Variabel terikat : Ekspresi TNF- α dan gambaran histopatologi jejunum tikus putih.

4.6 Tahap penelitian

4.6.1 Persiapan Hewan Percobaan

Persiapan hewan coba meliputi pembuatan surat laik etik dari komisi etik penelitian universitas brawijaya. Aklimatisasi tikus (*Rattus norvegicus*) sebelum mendapatkan perlakuan selama 7 hari dengan diberikan pakan dan minum secara *ad-libitum* serta dipersiapkan kandang tikus putih (*Rattus norvegicus*) berukuran 17,5 cm x 23,75 cm yang dilengkapi dengan penutup kawat. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) ditempatkan di tempat yang tenang dan bebas dari polusi dengan lantai kandang mudah dibersihkan dan disanitasi. Suhu optimum ruangan untuk tikus putih (*Rattus norvegicus*) adalah 22-24°C dan memiliki kelembapan udara 50-60% dengan ventilasi yang cukup.

4.6.2 Pemberian Indometasin

Menurut Hakim (2015) hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) di induksi indometasin secara per oral dengan dosis 20mg/kg BB. Tikus yang digunakan memiliki berat badan 150 gram. Dosis pemberian indometasin diberikan peroral Pada kelompok perlakuan (1), perlakuan (2) dan kelompok perlakuan (3) adalah 3 mg/kg BB dan diberikan dengan perbedaan waktu yaitu 33 jam, 48 jam dan 57 jam.

Perhitungan dosis indometasin yang diberikan secara per oral adalah sebagai berikut:

Kebutuhan indometasin:

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

Hasil induksi indometasin dapat mengakibatkan kerusakan sel-sel pada jejunum yang diinduksi dengan perbedaan waktu.

4.6.3 Pengambilan Organ Jejunum

Pengambilan organ dilakukan setelah dilakukan eutanasi tikus (*Rattus norvegicus*) dengan cara dislokasi leher pada hari ke 1 (33 jam), hari ke 2 (48 jam), dan hari ke 3 (57 jm). Selanjutnya pada hari yang sama dilakukan pembedahan bagian abdomen untuk diambil dan dilakukan pencucian organ jejunum menggunakan NaCl fisiologis 0,9% yang bertujuan untuk menghilangkan darah, namun sebelum itu tikus diletakkan diatas styrofoam pada posisi dorsal (terlentang), kemudian dilakukan fiksasi pada keempat ekstremitas menggunakan jarum pentul. Nekropsi dilakukan tepat pada linea alba tikus (*Rattus norvegicus*) dengan membuka kulit dan fascia. Setelah rongga abdomen terbuka, dilakukan pengambilan organ jejunum dan dimasukkan ke dalam larutan formalin 10% untuk pembuatan preparat kosong dan kemudian akan digunakan untuk pengamatan histopatologi dan sebagian lainnya dimasukkan kedalam untuk pengukuran kadar antibodi.

4.6.4 Pembuatan Preparat Histopatologi Jejunum

Proses pembuatan preparat histopatologi terbagi menjadi beberapa tahap diantaranya fiksasi, dehidrasi, penjernihan, infiltrasi paraffin, *embedding*, *sectioning* dan penempelan digelas objek. Pada proses fiksasi organ jejunum yang didapat segera dimasukkan kedalam larutan formalin 10% sampai maksimal 2 hari untuk mencegah terjadinya kerusakan organ.

Pada tahap dehidrasi, jaringan dimasukkan kedalam larutan etanol dengan konsentras bertingkat yakni 70% selama 2 jam, 80% selama 2 jam dan etanol 90%, 95% sampai etanol absolute masing-masing 20 menit. Setelah tahap dehidrasi jaringan dipindahkan kedalam larutan xylol I (20 menit) dan xylol II (30 menit) untuk proses penjernihan. Pada tahap *embedding*, jaringan dicelupkan dalam cetakan yang berisi paraffin cair dan ditunggu beberapa saat sampai cairan memadat dan terbentuk blok-blok, kemudian disimpan dalam lemari pendingin.

Setelah blok paraffin terbentuk, dilanjutkan tahap *sectioning*, pada tahap ini dilakukan pengirisan dari jaringan yang telah dipadatkan dengan paraffin dimana ketebalan irisan $\pm 6-8\mu\text{m}$ menggunakan sebuah alat khusus, yakni mikrotom. Hasil potongan diapungkan kedalam air hangat bersuhu 60°C (*waterbath*) untuk merenggangkan agar jaringan tidak berlipat. Diangkat sediaan dan diletakkan pada gelas objek untuk dilakukan pewarnaan hematoxilin eosin dan imunohistokimia (ekspresi TNF- α).

4.5.6 Pembuatan Histopatologi Jejunum menggunakan Pewarnaan Hematoxillin Eosin

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 memberi warna merah muda. Pewarna HE diawali dengan proses deparafinasi dengan 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 aquades selama 5 menit. Setelah itu, diwarnai dengan pewarnaan *hematoxylin* selama 10 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 30 menit dilanjutkan dengan selama 5 menit.sedian diwarnai dengan pewarna 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, dan III selama 3 menit. Langkah terakhir, dilakukan mounting menggunakan entellan serta ditutup menggunakan cover glass (Talley et. Al., 2011). Perhitugn sel radang dilakukan dengan menghitung dari makrofag dan nutrofil pada hasil pewarnaan histologi menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali. Perhitungan dilakukan sebanyak 5 lapang pandang.

4.6.6 Pembuatan Preparat Menggunakan Metode Imunohistokimia (TNF- α)

Prosedur yang dilakukan pada uji imunihistokimia ini adalah dimana sebelum diwarnai, dilakukan proses deparafinasi dengan cara slide yang sudah ditemplei potongan jaringan biopsi dari blok parafin direndam ke dalam xylol I, xylol II, xylol III sealama 10 menit, dilanjutkan proses dehidrasi dilakukan dengan menggunakan etanol sbdolut I dan II lalu alkohol bertingkat 70% masing-masing 10 menit, lalu dicuci menggunakan aquades sebanyak 3 kali masing-masing direndam selama 5 menit. Dicuci

dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Kemudian, ditetsi H₂O₂ 3% selama 40 menit, lalu dicuci dengan PBS selama 3 kali 5 menit. Setelah itu, direndam ke dalam 5% FBS dimasukkan ke dalam kulkas suhu 4°C selama 24 jam dan dicuci dalam PBS selama 3 kali dalam 5 menit. Preparat kemudian direaksikan dengan antibodi primer (*anti rat* TNF- α) selama kulkas suhu 4°C selama 24 jam dengan suhu 4°C dilakukan pencucian kembali dengan dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3 kali dalam 5 menit. Berikutnya dilakukan direaksikan dengan antibodi sekunder berlabel biotin (*anti rabbit igG*) berlabel biotin selama 1 jam pada suhu ruang. Selanjutnya dicuci dalam PBS selama 3 kali dalam 5 menit dan ditetesi substrat enzim *Diamano Benzidine* (DAB) selama 10 menit, dicuci kembali dengan PBS 3 kali 5 menit. Selanjutnya dilakukan proses counterstaining menggunakan pewarnaan mayer hematoxylen selama 3 menit, dicuci dengan air pH 8.0 dan dikeringkan. Selanjutnya dilakukan mounting dengan etellan dan ditutup dengan menggunakan cover glass (setiabudi,2005). Pengamatan dilakukan dengan perbesaran mikroskop 400x dengan lima bidang pandang pengamatan. Hasil pengamatan ekspresi TNF- α akan memberikan warna kecoklatan pada sitoplasma sel endotel dan sel radang berupa makrofag (Junquera dan Carneiro, 2007).

4.7 Analisis Data

Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah *imunohistokimia* (IHK) dan perubahan gambaran histopatologi pada organ jejunum tikus (*Rattus norvegicus*). Ekspresi TNF- α dianalisa secara kuantitatif menggunakan uji

Imunohistokimia (IHK), sedangkan perubahan struktur histopatologi jejunum dianalisa secara deskriptif. Data yang telah diperoleh dianalisis menggunakan program komputer *SPSS version 22 for windows* dengan analisis ragam ANOVA serta dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) $\alpha < 5\%$.



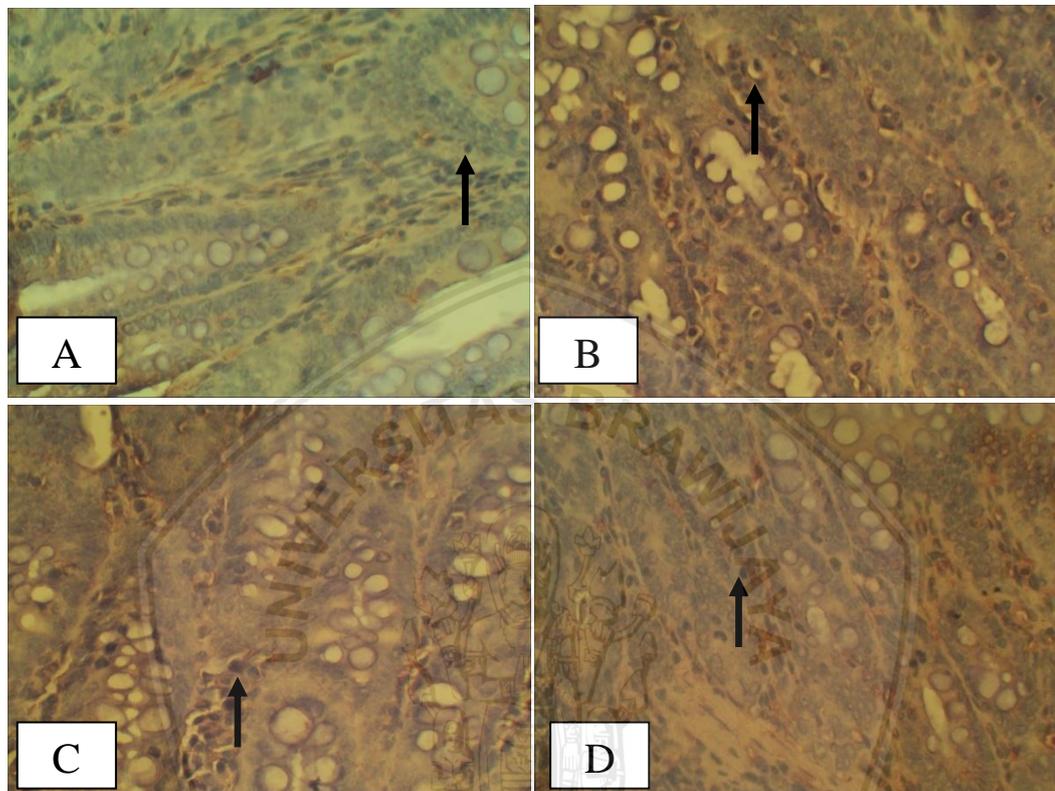
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

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

Tumor Necrosis Factor (TNF- α) adalah satu sitokin yang dihasilkan oleh makrofag yang sangat penting pada proses inflamasi. Ekspresi TNF- α diamati dengan metode imunohistokimia. Warna coklat pada gambaran jejunum (**Gambar 5.1**) yang ditunjuk dengan tanda (\uparrow) merupakan ekspresi dari TNF- α . Menurut Murch *et al.*, (2013), pada penyakit *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) ekspresi TNF- α terdapat pada sel makrofag. Timbulnya warna coklat disebabkan oleh antigen dalam jejunum berikatan dengan antibodi primer (*Rat Anti TNF- α*) selanjutnya dilabeli oleh antibodi sekunder (*Goat Anti Rat biotin labeled*), setelah semua berikatan dilakukan penambahan substrat *Diamino benzidine* (DAB) yang bertujuan untuk menghasilkan warna coklat pada sitokin (TNF- α). Fungsi TNF- α selain menginduksi ekspresi TNF- α juga berpotensi merangsang aktivitas siklooksigenase yang bersifat kemotaksis neutrofil dan pelepasan TNF- α akan menyebabkan terjadinya proses inflamasi (Duansak *et al.*, 2003).

Pengukuran ekspresi TNF- α pada jejunum tikus putih dalam penelitian ini diamati secara kuantitatif menggunakan pewarnaan imunohistokimia. Ekspresi TNF- α dengan metode imunohistokimia akan muncul warna kecoklatan. Pada pengamatan ekspresi *Tumor Necrosis Factor* (TNF- α) pada jejunum tikus putih ini memiliki 4 kelompok perlakuan yaitu kelompok kontrol negatif (-), kelompok perlakuan 1 yang diinduksi indometasin 3mg/kg BB dengan waktu 33 jam, kelompok perlakuan 2 yang diinduksi indometasin 3mg/kg BB dengan waktu 48

jam, dan kelompok perlakuan 3 yang diinduksi indometasin 3mg/kg BB dengan waktu 57 jam yang dapat ditunjukkan pada gambar berikut :



Gambar 5.1 Ekspresi Tumor Necrosis Faktor (TNF- α) pada jejunum tikus putih (*Rattus norvergicus*) Inflammatory Bowel Disease (IBD) hasil induksi indometasin dengan perbedaan waktu (perbesaran 400X).

Keterangan : **A.** Kontrol negatif; **B.** Jejunum tikus putih yang diinduksi indometasin 3mg/kg BB dengan waktu 33 jam; **C.** Jejunum tikus putih yang diinduksi indometasin 3mg/kg BB dengan waktu 48 jam; **D.** Jejunum tikus putih yang diinduksi indometasin 3mg/kg BB dengan waktu 57 jam. Panah hitam (↑) mengarah pada ekspresi TNF- α .

Kontrol negatif merupakan kelompok tanpa perlakuan **Gambar 5.1 A.** Kelompok perlakuan 1 merupakan kelompok tikus putih yang diinduksi indometasin 3mg/kg BB dengan waktu 33 jam yang ditunjukkan **Gambar 5.1 B,** terlihat jelas penyebaran warna coklat cukup tinggi, hal ini menunjukkan bahwa jejunum mengalami inflamasi yang cukup signifikan. Pada kelompok perlakuan 2

yang diinduksi indometasin 3mg/kg BB dengan waktu 48 jam yang ditunjukkan **Gambar 5.1 C**, terlihat intensitas penyebaran warna cokelat yang lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok perlakuan 1. kelompok perlakuan 3 yang diinduksi indometasin 3mg/kg BB dengan waktu 57 jam yang ditunjukkan **Gambar 5.1 D**, terlihat intensitas penyebaran warna cokelat yang cukup banyak dibandingkan dengan kelompok perlakuan 1 dan perlakuan 2. Terlihat adanya penyebaran warna cokelat yang merupakan ekspresi TNF- α .

Untuk mengetahui tingkat ekspresi TNF- α dilakukan dengan pengukuran presentase area menggunakan *software immunoratio* dan didapatkan jumlah rata-rata ekspresi TNF- α . Data yang diperoleh kemudian diuji statistik menggunakan one-way ANOVA dan dilanjutkan dengan uji pembandingan yaitu BNJ dengan $\alpha < 0.05$ dengan hasil uji statistik pada **Lampiran 5**. Peningkatan dan penurunan ekspresi TNF- α dapat dilihat pada **Tabel 5.1**.

Tabel 5.1 Presentase ekspresi TNF- α jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*)

Perlakuan	Rata-Rata Ekspresi TNF- α (%) \pm SD
P(0) kontrol negatif	0,48 \pm 0,010
P(1) Indometasin 3 mg/kg BB dengan waktu tunggu 33 jam	0,92 \pm 0,09 ^a
P(2) Indometasin 3 mg/kg BB dengan waktu tunggu 48 jam	0,87 \pm -0,07 ^a
P(3) Indometasin 3 mg/kg BB dengan waktu tunggu 57 jam	1,06 \pm 0,48 ^a

Keterangan : perbedaan a menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan dengan nilai ($p < 0,05$).

Hasil analisa data statistika **Tabel 5.1** bahwa pemberian single dose indometasin menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan ($p < 0,05$) yang ditunjukkan dengan perbedaan notasi antar perlakuan. Rata-rata ekspresi TNF- α pada jejunum tikus putih kontrol negatif adalah $0,48 \pm 0,010$. Keadaan normal sitokin pasti terdapat dialam tubuh meskipun hal tersebut hanya terdapat dalam jumlah sedikit sebagai sistem homeostatis tubuh. Sitokin TNF- α yang diproduksi secara tidak tepat dapat menyebabkan destruksi atau penyakit, sitokin yang diproduksi merupakan dasar untuk perkembangan perlindungan imun (Popa et al., 2007).

Kelompok perlakuan 1 yang diinduksi indometasin dengan waktu 33 jam adalah $0,92 \pm 0,09\%$. Hal tersebut membuktikan bahwa TNF- α ini diekspresikan dalam kondisi normal (Banno, *et al.*, 2004). Hasil analisa statistika untuk kelompok perlakuan 2 merupakan kelompok tikus putih yang diinduksi indometasin dengan waktu 48 jam, menunjukkan ekspresi TNF- α pada jejunum sebesar $0,89 \pm 0,07\%$ menurun $0,12\%$ terhadap kelompok perlakuan 1. Sedangkan pada kelompok perlakuan 3 merupakan kelompok tikus putih yang diinduksi indometasin dengan waktu tunggu 57 jam menunjukkan rata-rata ekspresi TNF- α yaitu $1,05 \pm 0,48$ mengalami peningkatan $0,16\%$ dibandingkan dengan kelompok perlakuan 2.

Peningkatan TNF- α disebabkan oleh indometasin. Indometasin yang bersifat lipofilik nantinya akan berikatan dengan membran sel yang tersusun dari fosfolipid sehingga terjadinya pembentukan ROS, pembentukan ROS yang meningkat akan mengaktifasi NF- κ B (*Nuclear Factor* κ B) dan fosforilasi I κ B

(*Inhibitor* NF-kB). Aktivasi NF-kB yang meningkat akan direspon oleh makrofag untuk memproduksi dan mensekresi sitokin proinflamasi TNF- α sebagai indikator terjadinya inflamasi, dan TNF- α akan mengaktifasi dari neutrofil ke daerah yang mengalami inflamasi (Takeuchi et al., 2013).

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

Jejunum merupakan organ yang mempunyai fungsi absorpsi paling utama (Djauhari, 2011). Secara umum, struktur utama dari usus halus adalah membran mukosa, lamina propria, submukosa, jaringan limfatik, serosa dan lapisan muskuler. Sel epitel menutupi seluruh permukaan bebas dari membran mukosa dan berbentuk epitel silindris sebaris (Xu and Cranwell 2003). Perbedaan organ jejunum dengan organ usus halus lainnya yakni pada daerah submukosa duodenum terdapat sekelompok kelenjar berbentuk tubular seperti gulungan yang disebut dengan kelenjar Brunner. Kripta Lieberkuhn berbentuk lurus maupun tubular seperti struktur kelenjar yang dilapisi oleh sel epitel silindris sebaris. Sel epitel yang terdapat dalam kelenjar kripta termasuk stem sel *undifferentiated*, sel goblet, sel Paneth dan sel endokrin. Sel goblet mensekresikan mukus dan memiliki fungsi yang sama dengan sel goblet pada vili usus.

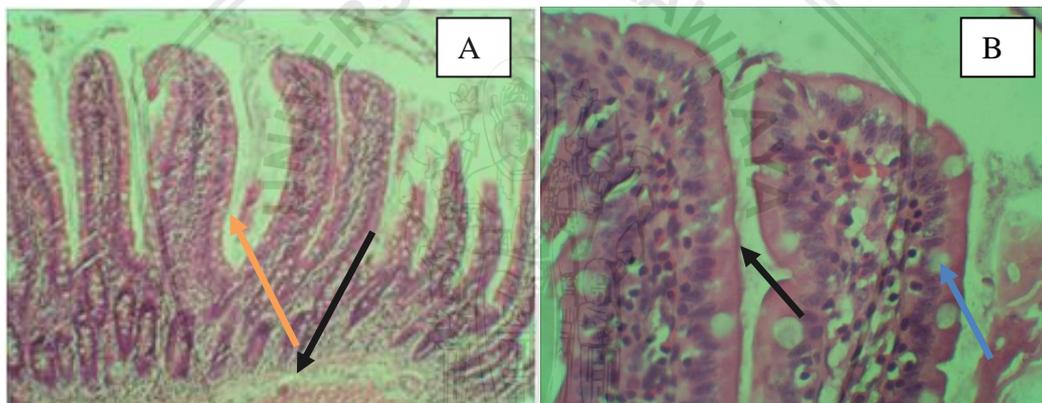
Pewarnaan Hematoksin Eosin (HE) pada preparat histopatologi organ jejunum digunakan untuk mengetahui perubahan sel-sel pada jaringan organ jejunum. Hematoksin merupakan zat warna yang bersifat basa dan berfungsi untuk mewarnai sel yang bersifat basa, sedangkan eosin adalah zat warna yang bersifat basa (Dayatri, 2009). Pengamatan preparat histopatologi ini dilakukan

menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400X dan 100X. Pengamatan gambaran histopatologi jejunum tikus putih dapat dilihat pada **Tabel 5.2**.

Tabel 5.2 Pengamatan gambaran histopatologi jejunum tikus putih

No	Keterangan	P0	P1	P2	P3
1	Sel radang	Tidak ada	Ada (+)	Ada (++)	Ada (+++)
2	Sel goblet	Ada (+++)	Ada (+++)	Ada (++)	Ada (+)
5	Nekrosis vili	Tidak ada	Ada (++)	Ada (+++)	Ada (+++)

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



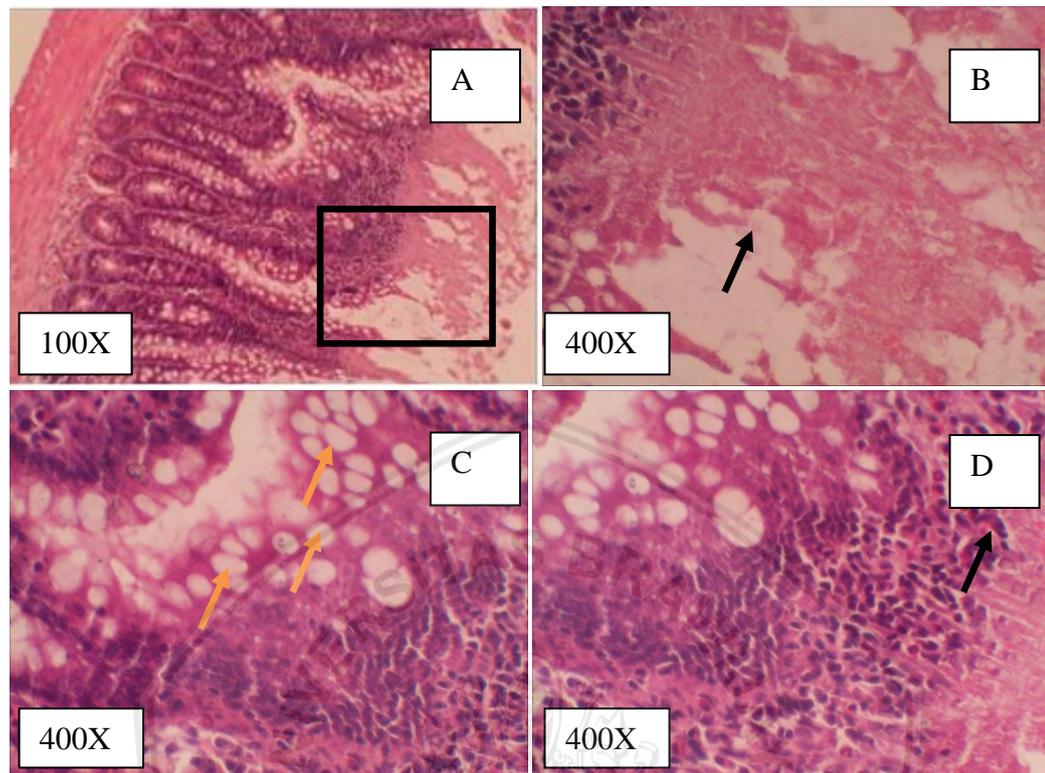
Gambar 5.2 Gambaran histologi jejunum tikus putih kelompok perlakuan kontrol negatif yang diinduksi indometasin dengan waktu 33 jam

Keterangan : **A.** Tunika mukosa dan tunika submuka jejunum dengan keadaan normal; **B.** vili ↑ sel goblet ↑

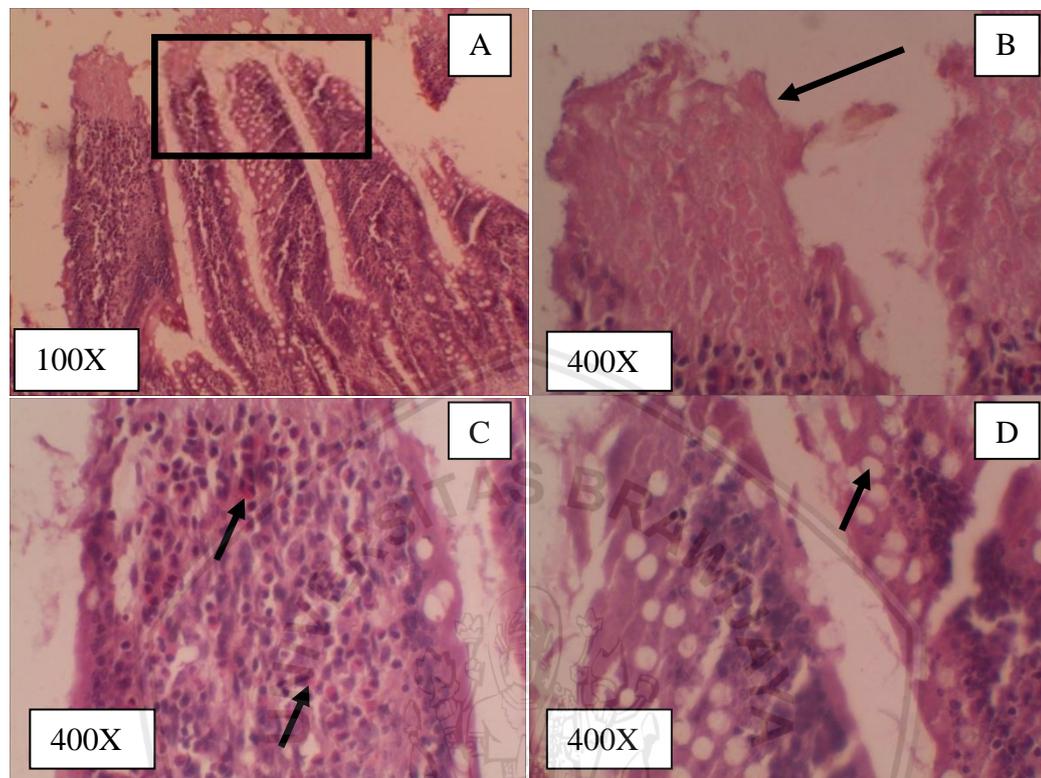
Gambar histopatologi jejunum tikus kelompok kontrol negatif (K-) yang terlihat pada **Gambar 5.2** terdiri dari 2 lapisan, yaitu tunika mukosa dan tunika submukosa. Pada tunika mukosa (**Gambar 5.2 B**) terlihat epitelium berupa epitel selapis silindris, sel goblet dan vili.

Secara umum, struktur utama dari usus halus adalah membran mukosa, lamina propria, submukosa, jaringan limfatik, serosa dan lapisan muskuler. Sel epitel menutupi seluruh permukaan bebas dari membran mukosa dan berbentuk

epitel silindris sebaris (Xu and Cranwell 2003). Pada lapis mukosa usus halus terdapat suatu bentuk khusus berupa vili- vili. Vili memperluas permukaan area lumen serta mengefisienkan proses absorpsi. Selain itu pada mukosa usus juga ditemukan kript-kript usus. Kelenjar-kelenjar yang terdapat pada mukosa memiliki bentuk tubular sederhana. Pada daerah di bawah epithelium merupakan lamina propria. Lamina propria mengandung leukosit dan jaringan limfatik berupa nodul-nodul. Perbedaan organ jejunum dengan organ usus halus lainnya yakni pada daerah submukosa duodenum terdapat sekelompok kelenjar berbentuk tubular seperti gulungan yang disebut dengan kelenjar Brunner, sedangkan pada organ ileum terdapat bagian yang disebut plakat peyer. Pada daerah mukosa bagian dasar vili usus halus terdapat kript Lieberkuhn. Kript Lieberkuhn berbentuk lurus maupun tubular seperti struktur kelenjar yang dilapisi oleh sel epitel silindris sebaris (Xu and Cranwell 2003).

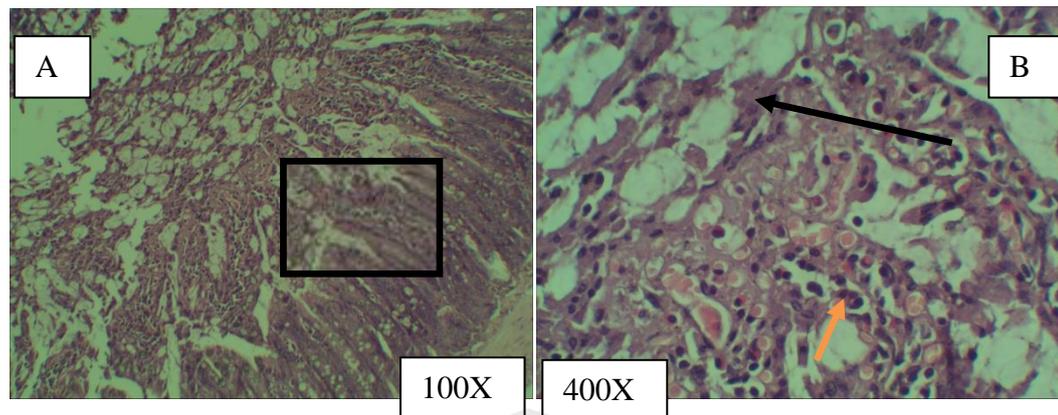


Gambar 5.3 Gambaran histopatologi jejunum tikus putih kelompok perlakuan 1 yang diinduksi indometasin dengan waktu 33 jam.
 Keterangan : **A.** Tunika submukosa jejunum mengalami kerusakan; **B.** Nekrosis vili; **C.** Sel goblet **↑** **D.** terlihat adanya sel radang.



Gambar 5.4 Gambaran histopatologi jejunum tikus putih kelompok perlakuan yang diinduksi indometasin dengan waktu 48 jam.

Keterangan : **A.** Tunika submukosa jejunum mengalami kerusakan; **B.** Terlihat adanya nekrosis vili; **C.** terlihat sel radang; **D.** Sel goblet ↑



Gambar 5.5 Gambaran histopatologi jejunum tikus putih kelompok perlakuan 3 yang diinduksi indometasin dengan waktu 57 jam.

Keterangan : **A.** Gambaran kerusakan pada tunika submukosa jejunum;

B. Nekrosis vili ↑ terdapat sel radang ↑

Pewarnaan imunohistokimia dan gambaran histopatologi jejunum menunjukkan pemberian single dose indometasin dengan waktu tunggu 33 jam menunjukkan peningkatan TNF- α . Pada kelompok perlakuan 1 tingkat keparahan atau tingkat terjadinya kerusakan pada organ jejunum menunjukkan hasil yang signifikan. Pada kelompok perlakuan 2 dengan waktu tunggu 48 jam, dimana tingkat keparahan pada organ jejunum menurun, terlihat pada hasil pewarnaan imunohistokimia (intensitas ekspresi TNF- α menurun) dan hasil gambaran histopatologi organ jejunum. Pada kelompok perlakuan 3 dengan waktu tunggu 57 jam mendapatkan hasil dimana tingkat keparahannya lebih parah dibandingkan dengan kelompok perlakuan 1 dan kelompok perlakuan 3 dilihat dari hasil rata-rata tingkat ekspresi TNF- α dan dilihat dari hasil gambaran histopatologi.

Gambaran histopatologi kelompok perlakuan 1 yaitu pemberian single dose indometasin dengan waktu tunggu selama 33 jam (**Gambar 5.3**) terlihat nekrosis vili, terdapat sel goblet, dan terlihat adanya sel radang. **Gambar 5.4** merupakan gambar histopatologi organ jejunum kelompok perlakuan 2 yaitu

pemberian single dose indometasin dengan waktu tunggu selama 48 jam yang terlihat mengalami kerusakan. Pada tunika submukosa jejunum terlihat adanya nekrosis vili, sel goblet dan terdapat sel radang yang dikarenakan adanya respon terhadap inflamasi akibat induksi 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 penguasai (heterolisis) (Kumar; Cotran & Robbins, 2007).

Gambar 5.5 merupakan gambar histopatologi organ jejunum kelompok perlakuan 3 yaitu pemberian single dose dengan waktu tunggu 57 jam. Terlihat keparahan pada tunika submukosa jejunum dengan tingkat keparahan yang cukup parah dibandingkan dengan perlakuan 1 dan perlakuan 2.

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).

Induksi Indometasin pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) akan 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 (Mustaqim dkk, 2017).

BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan di atas, dapat disimpulkan:

1. Pemberian single dose indometasin dengan perbedaan waktu (33 jam, 48 jam dan 57 jam) dapat meningkatkan ekspresi TNF- α pada organ jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*).
2. Pemberian single dose indometasin dengan dengan perbedaan waktu (33 jam, 48 jam dan 57 jam) dapat meningkatkan inflamasi pada organ jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*).

6.2 Saran

Saran yang dapat diberikan peneliti, yaitu diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai variasi perbedaan waktu dengan dosis optimum pemberian indometasin sehingga diketahui efek induksi indometasin terhadap *Inflammatory Bowel Disease* dan berapa lama *Inflammatory Bowel Disease* dapat bertahan.

DAFTAR PUSTAKA

- Akbar, Budhi. 2010. *Tumbuhan dengan kandungan senyawa aktif yang berpotensi sebagai antifertilitas*. Adabia Press. Jakarta.
- 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, Vol 10*. Department of Centre for Research and Development, PRIST University, Vallam, Thanjavur 613 403, Tamil Nadu, India.
- Firmansyah, Mohammad Adi. 2017. Perkembangan Terkini Diagnosis dan Penatalaksanaan Imflammatory Bowel Disease. CDK-203/ vol. 40 no. 4. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- Hakim, G., D. Mujde,S. Mehtat, U. Pinar,A. Meral, K. Ozgul, S. Elif,B. Osman, Y. 2015. Mucosal healing effect of nilotinib in indomethacin-induced enterocolitis: A rat model. Department of Gastroenterology, School of Medicine, Dokuz Eylul University, Inciralti, Turkey. *World Journal of Gastroenterology* 28; 21(44): 12576-12585.
- Hasanah, Annisa. 2015. Efek Jus Bawang Bombay (*Allium cepa* linn) Terhadap Mortalitas Spermatozoa Mencit yang Diinduksi Streptozotocin (STZ). Fakultas Kedokteran, Universitas Muhammadiyah Malang.
- Junqueira, L.C and J. Carneiro. 2007. *Basic Histology Text and Atlas*. McGraw-Hill Education, New York.
- Jusuf, A. 2009. *Histoteknik dasar*. Bagian Histologi Fakultas Kedokteran. Universitasn Indonesia Jakarta.
- Kathrani, A., D. Werling And K. Allenspach. 2011. Canine Breeds at High Risk of Developing Inflammatory Bowel Disease in The South- Eastern UK. *Veterinary Record*. 169 (24):635.
- 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, García, Rosario, M., H. Alberto, R., H. and Rodolfo, G., B. 2016. Chemical Speciation of the System Cu(II)-Indomethacin in

Ethanol and Water by UV-Vis Spectrophotometry. *Journal of Chemistry*. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico.

Lubis, M. Lukman, H., Z. Leonardo, B. D. Mabel, S. Ilhamd, Djuwita, S. Arina, V. 2015. Hubungan Inflammatory Bowel Disease dengan Diet. Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara.

Murch, S.H., C.P. Braegger, J.A. Walker-Smith and T.T Mac Donald. 2013. Location of tumor necrosis factor α by immunohistochemistry in chronic inflammatory bowel disease. *Gut* 2013.;34:1705-1709.

Popa, C.M.G. Netea, P.L.M. van Real, M.J.W van Der Meer and A.F Stalenhoef. 2007. The role of TNF- α in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *Journal of Lipid Research*. 48: 751-762.

Sihombing, M., dan Tuminah, S. 2011. Perubahan nilai hematologi, biokimia Darah, Bobot Organ dan Bobot Badan Tikus Putih pada Umur Berbeda. *Jurnal Veteriner*. 12 (1): 58 – 64.

Supit, I., A. Damajanty, H. C. Pangemanan, S., R., M. 2015. Profil Tumor Necrosis Factor (TNF- α) Berdasarkan Indeks Massa Tubuh (IMT) pada Mahasiswa fakultas Kedokteran Unsrat angkatan 2014. *Jurnal e-Biomedik (eBm)*. Volume 3, Nomor 2. Bagian Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Sam Ratulangi Manado.

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., and Stevens, A. 2011. *Theory and practice of histological techniques: fixation and fixatives*. 3rd Edition. New York: Churchill Livingstone.

Takeuchi, K., A. Tanaka, R. Ohno and A. Yokota. 2003. Role of COX inhibition in pathogenesis of NSAID-induced small intestinal. *Journal of physiology and pharmacology*. 54 (Suppl 4): 165-182.

Vdoviakova, K. Eva P. Marcela M. 2016. Surgical Anatomy of the Gastrointestinal Tract and Its Vasculature in the Laboratory Rat. Hindawi Publishing Corporation. Gastroenterology Research and Practice. Volume 2016, Article ID 2632368.

Widiartini, W. Eka S. Ana S. Ita, M., R. Eko, P. 2014. Pengembangan usaha Produksi tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Terserifikasi dalam Upaya Memenuhi Kebutuhan Hewan Laboratorium. Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro.

- Wijayanti, A.H. 2013. Pengaruh Pemberian Boraks Terhadap Gambaran Histopatologi Ileum Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). Universitas Airlangga. Surabaya.
- Wilmna, 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.
- Xu, Cranwell PD. 2003. *Gastrointestinal and Nutrition the Neonatal Pig*. United Kingdom: Nottingham University Press.
- Zhang, Hui. Wen, Wen. Jizhou, Yan. 2017. Application of immunohistochemistry technique in hydrobiological studies. Department of Biology, College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai. China.

