

**PENGARUH PEMBERIAN KLORIN BERLEBIH
TERHADAP KADAR MALONDIALDEHIDA DAN
HISTOPATOLOGI ORGAN LAMBUNG PADA
TIKUS PUTIH (*Rattus novergicus*)**

SKRIPSI

Oleh:

**ANWARIFAN
155130100111028**



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

**PENGARUH PEMBERIAN KLORIN BERLEBIH
TERHADAP KADAR MALONDIALDEHIDA DAN
HISTOPATOLOGI ORGAN LAMBUNG PADA
TIKUS PUTIH (*Rattus novergicus*)**

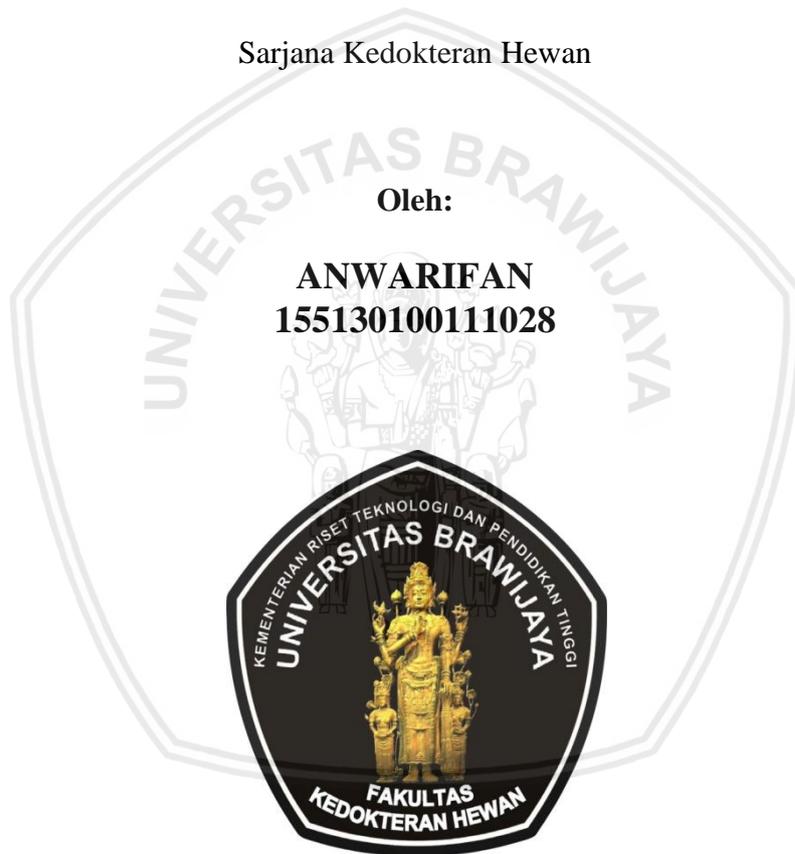
SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

**ANWARIFAN
155130100111028**



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

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**PENGARUH PEMBERIAN KLORIN BERLEBIH TERHADAP
KADAR MALONDIALDEHIDA DAN HISTOPATOLOGI
ORGAN LAMBUNG PADA TIKUS PUTIH
(*Rattus novergicus*)**

Oleh:

Anwarifan

155130100111038

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 16 Mei 2019
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. Husnul Khotimah, S.Si, M.Kes

NIP. 19751125 200501 2 001

drh. Herlina Pratiwi, M.Si

NIP.19870518 201012 2 012

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 : Anwarifan
NIM : 155130100111028
Program Studi : Kedokteran Hewan
Penulis Skripsi berjudul :

Pengaruh Pemberian Klorin Berlebih Terhadap Kadar Malondialdehida dan histopatologi Organ Lambung Pada Tikus Putih (*Rattus Novergicus*)

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 16 Mei 2019
Yang menyatakan,

Anwarifan
NIM.155130100111028

Pengaruh Pemberian Klorin Berlebih Terhadap Kadar Malondialdehida dan histopatologi Organ Lambung Tikus Putih (*Rattus Novergicus*)

ABSTRAK

Klorin (Cl_2) merupakan salah satu bahan kimia yang diperkenalkan pada awal abad ke-20 sebagai desinfektan air. Klorin juga banyak digunakan dalam industri makanan seperti pada pengolahan udang dan beras. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh paparan klorin berlebih terhadap kadar Malondialdehida (MDA) dan histopatologi organ lambung pada tikus putih (*Rattus novergicus*). Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan 20 ekor tikus putih strain *Wistar* jantan umur 8-12 minggu dengan berat rata-rata 200 gram dibagi menjadi 5 kelompok dengan 4 ulangan, yaitu K1 (kontrol negatif), P1, P2, P3, P4 merupakan kelompok yang diberikan paparan klorin dengan konsentrasi 50, 100, 150, dan 200 ppm masing-masing dalam 1 mL/ekor secara per oral menggunakan sonde lambung. Rata-rata MDA yang didapatkan setelah pemberian klorin berlebih pada masing-masing kelompok adalah $553,0 \pm 59,4^a$ untuk kontrol negatif, $569,9 \pm 72,9^{ab}$ untuk paparan 50 ppm, $584,9 \pm 55,2^{ab}$ untuk paparan 100 ppm, $635,5 \pm 49,2^{ab}$ untuk paparan 150 ppm, $679,9 \pm 33,1^b$ untuk paparan 200 ppm. Data dianalisa menggunakan uji *one way ANOVA* dan menunjukkan perbedaan yang signifikan pada paparan 200 ppm ($p < 0,05$), sedangkan untuk histopatologi organ lambung dengan pewarnaan HE dianalisa secara deskriptif. Gambaran histopatologi menunjukkan perubahan berupa infiltrasi sel radang, deskuamasi sel dan vasodilatasi pembuluh darah. Kesimpulan penelitian ini yaitu semakin tinggi konsentrasi klorin yang diberikan maka semakin tinggi kerusakan jaringan lambung yang disebabkan oleh peningkatan kadar MDA akibat paparan klorin berlebih.

Kata kunci : Klorin, Malondiladehida, Lambung, Histopatologi

The Effect of Excessive Chlorine on Malondialdehyde Levels and Histopathology of Gastric Organs in White Rats (*Rattus norvegicus*)

ABSTRACT

Chlorine (Cl₂) is one of the chemicals that was introduced in the early 20th century as a water disinfectant. Chlorine is also widely used in the food industry such as processing shrimp and rice. The purpose of this study was to determine the effect of excessive chlorine exposure on levels of Malondialdehyde (MDA) and histopathology of gastric organs in white rats (*Rattus norvegicus*). This study used a completely randomized design with 20 Wistar male rats aged 8-12 weeks with an average weight of 200 grams divided into 5 groups with 4 replications, namely K1 (negative control), P1, P2, P3, P4 as groups who were given chlorine exposure with concentrations of 50, 100, 150, and 200 ppm each in 1 mL / head orally using a gastric sonde. The average MDA levels obtained after excessive chlorine administration in each group were $553.0 \pm 59.4a$ for negative control, $569.9 \pm 72.9ab$ for exposure to 50 ppm, $584.9 \pm 55.2ab$ for exposure to 100 ppm, $635.5 \pm 49.2ab$ for exposure to 150 ppm, $679.9 \pm 33.1b$ for exposure to 200 ppm. The data were analyzed using one way ANOVA test and showed a significant difference at exposure to 200 ppm ($p < 0.05$), while for histopathology the gastric organs with HE staining were analyzed descriptively. Histopathological features show change in inflammation of inflammatory cells, cell desquamation and vasodilation of blood vessels. The conclusion of this study is that the higher the chlorine concentration given, the higher the damage to gastric tissue caused by an increase in MDA levels due to excessive exposure to chlorine.

Keywords: Chlorine, Malondiladehide, Gastric, Histopathology

KATA PENGANTAR

Puji syukur alhamdulillah penulis haturkan kehadiran Tuhan Yang Maha Esa karena atas limpahan rahmat, hidayah dan pertolongan-Nya lah sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi yang berjudul Pengaruh Pemberian Klorin Berlebih Terhadap Kadar Malondialdehida Dan Histopatologi Organ Lambung Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) dengan lancar.

Selama proses penulisan dan penyusunan skripsi ini penulis banyak mendapat bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Husnul Khotimah, S.Si, M.Kes dan drh. Herlina Pratiwi, M.Si selaku dosen pembimbing atas dukungan, bimbingan, kritik, saran dan waktu yang diberikan kepada penulis.
2. drh. Ahmad Fauzi, M.Sc dan drh. Ani Setianingrum, M.Sc selaku dosen penguji yang telah memberikan kritik dan saran kepada penulis.
3. Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang.
4. Seluruh staf dan karyawan FKH UB, yang telah membantu jalannya proses administrasi dalam membuat tugas akhir.
5. Secara khusus penulis ingin mengucapkan terima kasih banyak kepada Bapak Ikhsan Fadloli, Ibu Nawati, Arifan Al-Qodri, Rayi Ilhamifan, Hyang Bagus M.A, Imam Stafy'I, Uripah, Miwah dan Nimas Ajeng Peristiwanti atas doa, kasih sayang, semangat dan dukungan dalam bentuk moril maupun material tanpa batas kepada penulis selama menempuh pendidikan di FKH UB.

6. Kelompok skripsi yang telah berjuang bersama-sama untuk menyelesaikan penelitian dengan baik dan penuh cerita.
7. Seluruh anggota kontrakan KBC, ibu kontrakan, bapak kontrakan dan tetangga kontrakan yang telah memberikan ketenangan dan kenyamanan selama menjalani kehidupan sehari-hari.
8. Seluruh kolega FKH UB yang selalu memberi keceriaan dan inspirasi.
9. Semua pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan dan penyusunan skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan dalam skripsi ini dapat memberikan manfaat dan menambah pengetahuan tidak hanya bagi penulis tetapi juga bagi pembaca.

Malang, 16 Mei 2019

Penulis

DAFTAR ISI

.....	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
LEMBAR PENGESAHANSKRIPSI	iii
LEMBAR PERNYATAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xiv
 BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Batasan Masalah	4
1.4 Tujuan Penelitian	5
1.5 Manfaat Penelitian	5
 BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Klorin	6
2.1.1 Bahaya Paparan Klorin Dosis Tinggi	7
2.1.2 Mekanisme Toksisitas Klorin	8
2.2 Lambung	10
2.2.1 Anatomi Histologi Lambung	10
2.2.2 Fungsi Lambung	12
2.3 Malondialdehid	13
2.4 Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>)	15
 BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
3.1 Kerangka Konsep	17
3.2 Hipotesa Penelitian	19
 BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN	
4.1 Waktu Dan Tempat Penelitian	20



4.2 Populasi Dan Sampel	20
4.3 Pembagian kelompok tikus	20
4.4 Aklimatisasi.....	21
4.5 Rancangan Penelitian	21
4.6 Penetapan Jumlah Perlakuan Dan Ulangan.....	22
4.7 Karakteristik Sampel Penelitian	23
4.8 Variabel Penelitian	23
4.9 Alat dan Bahan	24
4.10 Prosedur Penelitian.....	25
4.10.1 Pemberian Paparan Klorin Berlebih.....	25
4.10.2 Preparasi untuk histopatologi Lambung Tikus (<i>Rattus novergicus</i>)	25
4.10.3 Penentuan Kadar MDA	26
4.10.4 Pembuatan Preparat Histopatologi	27
4.10.5 Pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE)	28
4.10.6 Pengamatan Histopatologi lambung.....	29
4.10.7 Perhitungan Sel Radang	30
4.11 Analisis Data	30

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Efek Pemberian Klorin Berlebih Terhadap Kadar Malondialdehidida	
Pada Organ Lambung Tikus Putih (<i>Rattus novergicus</i>).....	31
5.2 Pengaruh Pemberian Klorin Berlebih Terhadap Gambaran Histopatologi Organ Lambung Tikus Putih (<i>Rattus novergicus</i>).....	35
5.3 Hubungan Antara Kadar MDA Dengan Tingkat Kerusakan Jaringan Lambung Akibat Paparan Klorin Berlebih	42

BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan.....	44
6.2 Saran.....	44

DAFTAR PUSTAKA	45
-----------------------------	-----------

LAMPIRAN.....	48
----------------------	-----------



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Anatomi Lambung Tikus	11
2.2 Histologi Lambung Tikus Bagian Pylorus.....	12
2.3 Malondialdehida.....	14
2.4 Tikus Putih	16
5.1 Kadar MDA lambung.....	32
5.2 Histopatologi mukosa lambung tikus putih (<i>Rattus novergicus</i>) bagian pylorus; kelompok kontrol negatif; (pewarnaan HE); (Gambar A perbesaran 100x); (Gambar A1 perbesaran 400x)	35
5.3 Histopatologi mukosa lambung tikus putih (<i>Rattus novergicus</i>) bagian pylorus; kelompok paparan 50 ppm; (pewarnaan HE); (Gambar B perbesaran 100x); (Gambar B1 perbesaran 400x)	36
5.4 Histopatologi mukosa lambung tikus putih (<i>Rattus novergicus</i>) bagian pylorus; kelompok paparan 100 ppm; (pewarnaan HE); (Gambar C perbesaran 100x); (Gambar C1 perbesaran 400x)	36
5.5 Histopatologi mukosa lambung tikus putih (<i>Rattus novergicus</i>) bagian pylorus; kelompok paparan 150 ppm; (pewarnaan HE); (Gambar D perbesaran 100x); (Gambar D1 perbesaran 400x)	37
5.6 Histopatologi mukosa lambung tikus putih (<i>Rattus novergicus</i>) bagian pylorus; kelompok paparan 200 ppm; (pewarnaan HE); (Gambar E perbesaran 100x); (Gambar E1 perbesaran 400x).....	37
5.7 Jumlah sel radang lambung	38

DAFTAR TABEL

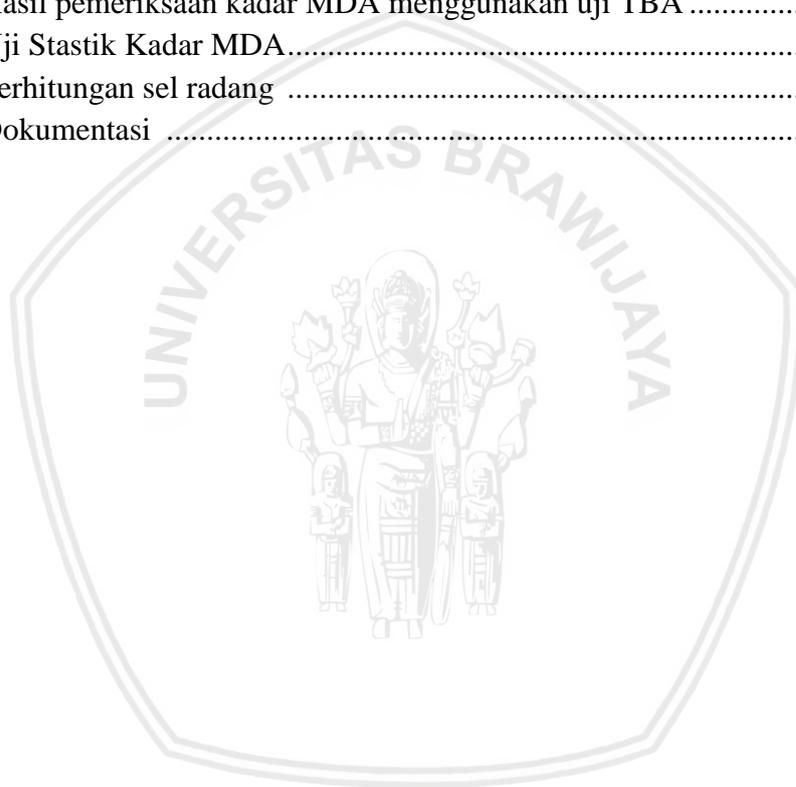
Tabel	Halaman
4.1 Rancangan kelompok Penelitian.....	22
5.1 Kadar MDA lambung tikus.....	32
5.2 Jumlah sel radang.....	38



DAFTAR LAMPIRAN

LampiranHalaman

1. Sertifikat laik etik	49
2. Perhitungan Klorin	50
3. Kerangka Operasional Penelitian	52
4. Pembuatan Preparat Gambaran Histopatologi Jaringan	53
5. Penentuan kadar MDA (malondialdehida).....	54
6. Hasil pemeriksaan kadar MDA menggunakan uji TBA	57
7. Uji Stastik Kadar MDA.....	59
8. Perhitungan sel radang	64
9. Dokumentasi	65



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

Simbol / Singkatan	Keterangan
%	Persen
μL	mikroliter
$^{\circ}\text{C}$	DerajatCelcius
ANOVA	<i>Analysis ofVariance</i>
CaOCl_2	Kalsium Hipoklorit
Cl_2	Klorin
g	Gram
HClO	Asamhipoklorit
HE	<i>Hematoxylin Eosin</i>
MDA	Malondialdehid
mL	Milimeter
NaCl	Natriumklorida
NaOCl	Natriumhipoklorit
OCI^-	IonHipoklorit
PBS	<i>Phosphate BufferedSaline</i>
pH	<i>Power ofHydrogen</i>
ppm	<i>Partper milion</i>
PUFA	<i>PolyUnsaturatedFattyAcid</i>
RAL	RancanganAcak Lengkap
ROS	<i>ReactiveOxygenSpecies</i>
TBA	<i>Thiobarbituric Acid</i>



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Klorin (Cl_2) merupakan senyawa kimia yang sejak pertama kali diperkenalkan pada awal abad ke-20 sebagai desinfektan air. Selain penggunaan senyawa klorin sebagai desinfektan air kolam dan air minum, klorinasi air merupakan kegiatan sanitasi yang sangat umum dalam industri pangan. Pada air minum (PAM), klorin banyak digunakan sebagai desinfektan karena kemampuannya untuk mengikat dan menghancurkan permukaan luar bakteri dan virus, mudah didapat dan sangat ekonomis (Wijaya, 2007).

Klorin (Cl_2) termasuk salah satu unsur yang ada di bumi dan jarang dijumpai dalam bentuk bebas, berwarna kuning kehijauan dan memiliki bau menyengat. Pada umumnya klorin ditemui berikatan dengan unsur atau dengan senyawa lain membentuk garam natrium (NaCl), natrium hipoklorit (NaOCl) dan kalsium hipoklorit (CaOCl_2). Kalsium hipoklorit (CaOCl_2) atau kaporit adalah salah satu jenis klorin berbentuk padat yang banyak digunakan untuk desinfektan air minum dan air kolam, sedangkan natrium hipoklorit adalah salah satu jenis klorin yang banyak dimanfaatkan sebagai pemutih beras, rumput laut dan desinfektan untuk pengolahan udang. Pada pengolahan makanan, natrium hipoklorit biasa digunakan untuk membersihkan peralatan makanan, buah-buahan dan pengolahan sayuran, produksi jamur, daging babi, daging sapi dan produksi unggas, dan pengolahan ikan. Maraknya penggunaan klorin menyebabkan resiko terjadinya keracunan senyawa klorin meningkat (Rohmah dan Lilis, 2017).

Senyawa klorin banyak digunakan sebagai bahan desinfektan pada proses klorinasi air untuk mengatasi pencemaran kuman patogen dalam air minum ternak. Pada peternakan unggas, konsentrasi klorin yang terkandung didalam persediaan air adalah 2 ppm sampai 5 ppm. Jika konsentrasi klorin yang terkandung didalam persediaan air kurang dari 2 ppm atau lebih dari 5 ppm, konsentrasi klorin akan di sesuaikan dan diperiksa lagi setelah 1 jam (Australian Government, 2009). Pada peternakan tradisional sistem klorinasi ini kadang-kadang peternak tidak mengetahui keberadaan kandungan klorin dalam air minum, sehingga kandungan klor yang cukup tinggi dapat mengurangi keaktifan bahan biologik dalam vaksin. Efek keracunan klorin ini menyebabkan iritasi lokal pada saluran pencernaan (Yuningsih, 2005).

Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 033 tahun 2012 tentang Bahan Tambahan Pangan, klorin bukan termasuk kedalam bahan tambahan pangan yang diizinkan ditambahkan dalam makanan dengan tujuan apapun. Penggunaan klorin dalam makanan dapat menimbulkan gangguan baik jangka pendek maupun jangka panjang utamanya dalam saluran gastrointestinal. Gangguan kesehatan yang terjadi dapat berupa keracunan dan keluhan kesehatan

(Kemenkes RI, 2012). Menurut Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 492 tentang persyaratan kualitas air minum, kadar maksimum klorin dalam air minum yang diperbolehkan adalah 5 ppm (Kemenkes RI, 2010). Sedangkan menurut *Food and Drug Administration* (FDA) Amerika Serikat, penggunaan klorin telah disetujui sebagai bahan aditif makanan, akan tetapi pada

dosis yang lebih tinggi dari 45 ppm klorin akan bersifat racun (Hartini dan Pertiwi, 2016).

Paparan klorin dosis berlebih melalui oral dapat menyebabkan terjadinya iritasi pada saluran pencernaan. Paparan klorin melalui oral memicu terbentuknya asam hipoklorus (Hermiyanti, 2016). Asam hipoklorus akan membentuk ion hipoklorus yang mampu menyebabkan inflamasi dan iritasi pada lambung. Ketidakstabilan asam hipoklorus membuatnya mudah menghilang dan membentuk oksigen bebas sehingga meningkatkan oksidasi klorin dan menimbulkan efek korosif (Rohamah dan Lilis, 2017). Semakin banyak asam hipoklorus yang terbentuk maka akan semakin banyak pula atom oksigen bebas yang lepas. Enzim superoksida dismutase (SOD) yang terletak di mitokondria akan mengubah radikal superoksida (O_2^-) yang dihasilkan oksigen bebas yang dilepaskan oleh asam hipoklorus menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2). Hidrogen peroksida yang tidak dikonversi menjadi H_2O dapat membentuk radikal hidroksi yang lebih reaktif dan berbahaya karena dapat menyebabkan kerusakan sel melalui peroksidasi lipid, protein dan DNA (Werdhasari, 2014).

Peningkatan radikal hidroksil akan menyebabkan peningkatan peroksidasi lipid. Malondialdehid (MDA) merupakan salah satu produk hasil dari peroksidasi lipid akibat degradasi radikal bebas hidroksil terhadap asam lemak tak jenuh. Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kadar MDA dan perubahan histologi organ lambung akibat paparan klorin berlebih pada tikus putih (*Rattus norvegicus*).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka rumusan masalah yang diusulkan adalah:

1. Bagaimana pengaruh pemberian klorin berlebih terhadap kadar MDA pada lambung tikus (*Rattus novergicus*)?
2. Bagaimana pengaruh pemberian klorin berlebih terhadap histologi organ lambung pada tikus putih (*Rattus novergicus*) ?

1.3 Batasan Masalah

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

- 1) Hewancobayangdigunakanadalah tikus putih (*Rattus novergicus*) jantanwistardengan umur 8-10minggu.Berat badan tikus antara150-200 gram. Hewan coba yang digunakan didatangkan dari Yogyakarta melalui Biosains UB. Hewancobayang digunakansudah mendapatkan kodelaik etik dari KomisiEtik PenelitianUniversitasBrawijaya (KEP UB) No: 1028- KEP-UB (**Lampiran 1**).
- 2) Konsentrasi klorin yang digunakan adalah 50 , 100, 150, dan 200 ppm masing-masing dalam 1 mL selama 7 hari diberikan secara peroral menggunakan sonde lambung.
- 3) Variabelyangdiamatidalampenelitianiniadalah kadarmalondialdehida (MDA) lambungyang diukurdenganmetode TBA danhistopatologi organ lambung dengan pewarnaan HE.

1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan permasalahan yang telah diuraikan, maka tujuan penelitian adalah:

1. Mengetahui pengaruh pemberian klorin berlebih terhadap kadar Malondialdehida (MDA) lambung pada tikus putih (*Rattus novergicus*) strain wistar.
2. Mengetahui pengaruh pemberian klorin berlebih terhadap histopatologi organ lambung pada tikus putih (*Rattus novergicus*).

1.5 Manfaat Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka manfaat penelitian ini adalah untuk memberikan informasi kepada masyarakat dan dapat digunakan sebagai informasi dasar bagi penelitian lanjut tentang pengaruh pemberian klorin berlebih pada tikus (*Rattus novergicus*).

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Klorin

Klorin (Cl_2) merupakan salah satu unsur yang ada di bumi dan jarang ditemukan dalam bentuk bebas. Senyawa klorin dapat di temui berikatan dengan senyawa lain membentuk garam natrium klorida atau dalam bentuk ion klorida dalam air laut (Nurnawati, 2015). Klor adalah unsur non logam berbentuk gas dan tergolong pada unsur halogen yang mempunyai massa atom 35,46. Klor merupakan unsur diatom karena untuk membentuk molekul, maka klor perlu 2 buah unsur yang sama yaitu menjadi molekul Cl_2 . Klorin dalam suhu kamar berbentuk gas berwarna kehijauan dengan titik beku -101°C dan titik didih -34°C . Klorin berperan dalam reaksi pembakaran dengan menghasilkan panas dan cahaya. Klorin didalam air laut ataupun air sungai, klorin akan terhidrolisis membentuk asam hipoklorit (HClO) yang merupakan suatu oksidator (Tjiptaningdyah dkk, 2017).

Klorin merupakan zat kimia yang berfungsi sebagai desinfektan. Salah satu bentuk klorin adalah kalsium hipoklorit atau kaporit biasa di pakai untuk mensucihamakan air ledeng dan air kolam. Kaporit memiliki kelemahan yaitu kelarutannya tidak sempurna, sehingga sering tersisa sebagai padatan dan tidak bisa dibuang sembarangan. Sodium hipoklorit adalah pemutih berbahan dasar klorin yang berbentuk cair. Sodium hipoklorit berwarna kekuningan dan memiliki aroma yang khas dan menyengat (Tjiptaningdyah dkk, 2017).

Natrium hipoklorit (NaOCl) yang merupakan bahan utama dalam cairan pemutih. Zat ini biasa digunakan untuk pemutih dalam industri pakaian,

industri kertas dan serbuk kayu. Dalam jumlah besar sekitar 70%, natrium hipoklorit biasa digunakan dalam pembuatan pemutih sekitar 5-10% sebagai pembersih dan desinfektan dalam pengolahan air limbah sedangkan dalam industri kadar natrium hipoklorit bisa mencapai 50% sebagai pemutih. Penggunaan klorin juga semakin marak digunakan dalam industri makanan. Jenis makanan yang paling sering mendapatkan tambahan klorin yakni beras dan udang. Penambahan klorin dilakukan sebagai pemutih dalam beras dan desinfektan dalam udang. Pada pengolahan makanan, natrium hipoklorit biasa digunakan untuk membersihkan peralatan makanan, buah buahan dan pengolahan sayuran, produksi jamur, daging babi, daging sapi, dan produksi unggas, serta pengolahan ikan (Rohmah dan Lilis, 2017).

2.1.1 Bahaya Paparan Klorin Dosis Tinggi

Klorin merupakan bahan kimia yang sangat berbahaya bagi kesehatan. Klorin yang digunakan sebagai zat pemutih apabila dicampurkan terhadap bahan pangan, sangat tidak dibenarkan karena dampaknya yang begitu besar bagi kesehatan manusia. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 033 tahun 2012 tentang Bahan Tambahan Pangan, klorin bukan termasuk ke dalam bahan tambahan pangan yang diizinkan ditambahkan dalam makanan dengan tujuan apapun. Penggunaan klorin dalam makanan dapat menimbulkan gangguan baik jangka pendek maupun jangka panjang utamanya dalam saluran gastrointestinal. Gangguan kesehatan yang terjadi dapat berupa keracunan dan keluhan kesehatan (Kemenkes RI, 2012).

Menurut *Food And Drugs Administration* (FDA) Amerika Serikat, pemakaian klorin dengan konsentrasi rendah telah disetujui sebagai bahan aditif makanan, tetapi klorin beracun pada dosis yang lebih dari 45 ppm (Hartini dan Pertiwi, 2016). Paparan klorin melalui ingesti dapat menimbulkan gangguan kesehatan baik jangka pendek maupun jangka panjang. Paparan natrium hipoklorit jangka pendek dapat menyebabkan luka bakar pada mulut dan tenggorokan, iritasi gastrointestinal, mual, muntah, diare. Selain itu juga dapat menyebabkan nyeri pada perut, pingsan, tidak sadar, lidah menghitam, lesu, bau pada napas, pernapasan dangkal/pendek, infeksi paru, gangguan elektrolit, asidosis metabolik (akumulasi asam sehingga pH turun), perubahan status mental, efek kardiovaskuler (jantung) dan edema paru (penumpukan cairan pada paru). Paparan jangka panjang dapat mengakibatkan penurunan fungsi jantung, asidosis laktat (tingginya kadar asam laktat akibat gangguan keseimbangan asam dan basa dalam darah), hipoperfusi jaringan (kurangnya aliran darah ke jaringan sehingga tubuh kekurangan asupan nutrisi dan oksigen), hipotensi (tekanan darah rendah), iritasi saluran pernapasan parah dan kematian (Rohmah dan Lilis, 2017).

2.1.2 Mekanisme Toksisitas Klorin

Jalur masuk klorin ke dalam tubuh dapat melalui tiga jalur utama. Ketika terjadi paparan klorin dalam bentuk larutan, jalur masuk ke dalam tubuh adalah melalui oral dan kontak kulit. Kontak langsung dengan klorin yang bersifat iritan, maka efek yang ditimbulkan pada tubuh adalah iritasi kulit dan mata. Ketika masuk ke dalam oral, maka efek yang terjadi adalah iritasi pada saluran gastrointestinal (Hermiyanti, 2016).

Zat klorin jika bereaksi dengan air akan membentuk asam hipoklorus yang diketahui dapat merusak sel-sel dalam tubuh. Zat klorin yang ada pada rumput laut jika dikonsumsi akan menggerus usus dan lambung (korosif) sehingga rentan terhadap penyakit maag. Dalam jangka panjang mengkonsumsi makanan yang mengandung klorin akan mengakibatkan penyakit kanker hati dan ginjal (Samsuar, 2017).

Efek toksik dari klorin atau kalsium hipoklorit utamanya bergantung pada sifat korosif hipoklorit. Klorin (3-6% hipoklorit) yang tertelan (ingesti), efeknya adalah iritasi pada sistem gastrointestinal. Konsentrasi pemutih yang dapat tertelan dalam konsentrasi yang lebih besar, misalnya hipoklorit 10% atau lebih, efek yang akan dirasakan adalah iritasi korosif hebat pada mulut, tenggorokan, esofagus, dan lambung dengan pendarahan, perforasi (perlubangan), dan pada akhirnya kematian. Jaringan parut permanen dan penyempitan esofagus dapat muncul pada orang-orang yang dapat bertahan hidup setelah mengalami intoksikasi hebat (Samsuar, 2017).

Natrium hipoklorit (NaOCl) dapat mempengaruhi pH dalam darah dan menghalangi kinerja enzim anti karsinogenik karena bersifat basa. Pada tubuh manusia, natrium hipoklorit (NaOCl) akan terpecah menjadi Natrium dan ion hipoklorit. Natrium yang bersifat basa akan diserap di dalam gastrointestinal sehingga menimbulkan iritasi pada usus serta merusak transpor protein. Sedangkan ion hipoklorit akan masuk ke lambung sehingga menimbulkan inflamasi (peradangan) dan iritasi pada lambung. Ketika terjadi kontak dengan jaringan protein, natrium hipoklorit akan membentuk nitrogen, formaldehida dan

asetaldehida dalam waktu singkat dan merusak jaringan peptida. Selama proses tersebut, hidrogen di gugus amino akan digantikan oleh klorin sehingga membentuk *chloramines* yang memainkan peran penting dalam antimikroba (Rohmah dan Lilis, 2017).

2.2 Lambung

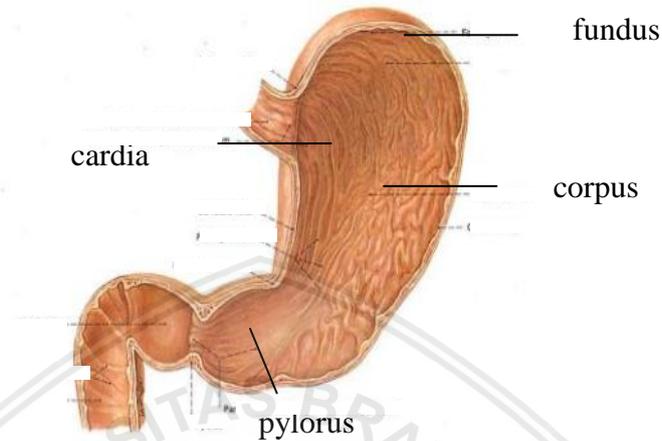
Lambung merupakan saluran yang dapat berdilatasi, berstruktur seperti kantung yang memiliki fungsi mencairkan makanan di lanjutkan dengan proses pencernaan yang di bantu oleh asam klorida (HCL) dan enzim-enzim seperti pepsin, renin, lipase dan hormon parakrin. Makanan hasil dari pencernaan mekanik di rongga mulut masuk melewati *gastrooesophageal junction* menuju lambung kemudian di campur dengan *gastric juice* yang terdiri atas mucus, air, HCL, dan enzim enzim pencernaan (Puspitasari, 2008).

Lambung tikus terletak di sebelah kiri ruang abdomen yang berkontak langsung dengan hati. Tepi bagian tengah yang berbentuk cekung dari lambung disebut *curvature minor*. Tepi bagian lateral yang berbentuk cembung disebut *curvature mayor* (Puspitasari, 2008).

2.2.1 Anatomi Histologi Lambung

Secara anatomi lambung mamalia dibagi atas 4 regio, yaitu cardia, fundus, corpus dan pylorus. Cardia merupakan bagian luas kecil dan zona pembatas dekat *gastrophageal junction*. Fundus merupakan regio yang berbentuk kubah terletak sebelah kiri dari esophagus dan banyak sel kelenjar. Corpus merupakan bagian terluas dari lamung (kurang lebih 2/3 bagian lambung) yang membentang dari fundus inferior sampai ke pylorus. Pylorus merupakan bagian terakhir, berbentuk

corong dengan perluasan kerucut, pada sambungan dengan corpus disebut *pyloric antrum* dan batang corongnya disebut *pyloric anal* (Puspitasari, 2008).

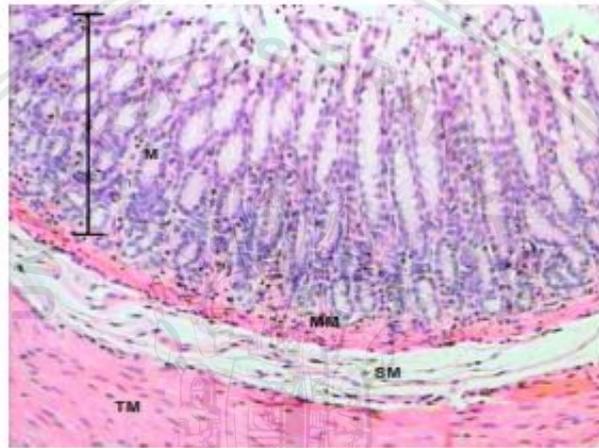


Gambar 2.1 Anatomi lambung tikus (Paulsen and Waschke, 2011).

Secara umum, histologi lambung dapat dibedakan menjadi beberapa bagian yaitu: mukosa, submukosa, muskularis mukosa dan serosa. Membran mukosa lambung berbentuk irreguler seperti tiang, membentuk lipatan longitudinal yang disebut rugae dan jumlahnya tergantung pada tinggi rendahnya rentangan organnya. Membran mukosa terdiri dari tiga komponen yaitu epitelium, lamina propia dan muskularis mukosa. Epitel permukaan mukosa ditandai oleh adanya lubang sumuran yang terletak rapat satu dengan yang lain dan dilapisi epitel sejenis. Bentuk dan kedalaman dari sumuran ini serta sifat kelenjarnya berbeda pada tiap bagian lambung. Di bawah epitel terdapat suatu lamina propia dan lapisan di bawah sumuran ini mengandung kelenjar lambung (Puspitasari, 2008).

Di bawah lapisan mukosa terdapat lapisan submukosa. Lapisan submukosa umumnya lebih luas, bersifat fibroelastis dan terdiri dari kelenjar, pembuluh darah, pembuluh limfatika dan syaraf. Tunika muskularis terdiri dari

tiga lapis otot. Lapisan dalam berupa lapisan oblique, lapisan tengah berupa lapisan otot sirkuler dan lapisan luar berupa lapis otot longitudinal. Antara lapis sirkuler dan lapisan longitudinal dipisahkan oleh pleksus syaraf mesenterium dan sel ganglion parasimpatis (*pleksus Auerbach's*) yang menginervasi kedua lapis otot. Lapisan paling luar yang melapisi saluran pencernaan adalah adventisia atau serosa. Adventisia atau serosa tersusun dari jaringan longgar yang sering mengandung lemak, pembuluh darah dan syaraf (Puspitasari, 2008).



Gambar 2.2 Histologi lambung tikus bagian pylorus, M = mukosa, MM = Muskularis mukosa, SM = Submukosa, TM = Tunika muskularis (Puspitasari, 2008).

2.2.2 Fungsi Lambung

Lambung memiliki dua fungsi utama yaitu fungsi pencernaan dan fungsi motorik. Fungsi pencernaan dan sekresi lambung berkaitan dengan pencernaan protein, sintesis dan sekresi enzim-enzim pencernaan. Selain mengandung sel-sel yang mensekresi mukus, mukosa lambung juga mengandung dua tipe kelenjar tubular yang penting yaitu kelenjar oksintik (gastrik) dan kelenjar pilorik. Kelenjar oksintik terletak pada bagian corpus dan fundus lambung, meliputi 80% bagian proksimal lambung. Kelenjar pilorik terletak pada bagian antral lambung. Kelenjar

oksintik bertanggung jawab membentuk asam dengan mensekresikan mukus untuk melindungi mukosa pylorus, juga beberapa pepsinogen, renin, lipase lambung dan hormon gastrin (Puspitasari, 2008).

Fungsi motorik lambung terdiri atas penyimpanan sejumlah besar makanan sampai makanan dapat diproses dalam duodenum, pencampuran makanan dengan sekresi lambung hingga membentuk suatu campuran setengah cair yang disebut kimus, dan pengosongan makanan dari lambung ke dalam usus dengan lambat pada kecepatan yang sesuai untuk pencernaan dan absorpsi dalam usus halus (Puspitasari, 2008).

2.3 Malondialdehida (MDA)

Malondialdehid (MDA) adalah senyawa dialdehida atau berkarbon tiga yang reaktif merupakan produk final peroksidasi lipid di dalam membran sel. Malondialdehid (MDA) dalam material hayati terdapat dalam bentuk bebas atau membentuk ikatan kompleks dengan unsur lainnya di dalam jaringan. Sumber utama peroksidasi lipid yaitu asam lemak yang memiliki tiga atau banyak ikatan ganda dalam suatu rantai asam lemak (Yomes, 2016).

Malondialdehid (MDA) adalah salah satu marker radikal bebas hasil peroksidasi lipid dalam tubuh. Radikal bebas merupakan molekul yang terbentuk akibat kerusakan oksidatif. Malondialdehyde (MDA) dapat terbentuk apabila *Reactive Oxygen Species* (ROS) yaitu radikal hidroksil bereaksi dengan komponen asam lemak tak jenuh ganda (*polyunsaturated fatty acid*, PUFA) dari membran sel sehingga terjadi reaksi berantai yang dikenal dengan peroksidasi lemak. Peroksidasi lemak tersebut akan menyebabkan terputusnya rantai asam

lemak menjadi berbagai senyawa toksik dan menyebabkan kerusakan pada membran sel. Malondialdehida (MDA) merupakan senyawa yang dapat menggambarkan aktivitas radikal bebas di dalam sel sehingga dijadikan sebagai salah satu petunjuk terjadinya stres oksidatif akibat radikal bebas (Hermiyanti, 2016).



Gambar 2.3 Struktur Kimia MDA (Surya, 2012).

Malondialdehid (MDA) dapat dijadikan sebagai biomarker untuk stress oksidatif karena beberapa alasan yaitu pembentukan MDA meningkat sesuai dengan stres oksidatif, kadarnya dapat diukur secara akurat dengan berbagai metode yang telah tersedia karena bersifat stabil dalam sampel cairan tubuh yang diisolasi, pengukurannya tidak dipengaruhi oleh variasi diurnal dan tidak dipengaruhi oleh kandungan lemak dalam diet, merupakan produk spesifik dari peroksidasi lemak, terdapat dalam jumlah yang dapat dideteksi pada semua jaringan tubuh dan cairan biologis, sehingga memungkinkan untuk menentukan referensi interval (Surya, 2012).

2.4 Tikus (*Rattus novergicus*)

Hewan percobaan atau hewan laboratorium adalah semua jenis hewan dengan persyaratan tertentu dipergunakan sebagai salah satu sarana dalam berbagai percobaan penelitian dan kedokteran. Hewan coba harus memenuhi persyaratan genetik atau keturunan dan lingkungan yang memadai dalam

pemeliharaan, serta memperlihatkan reaksi biologi sesuai yang dikehendaki (Puspitasari, 2008). Tikus termasuk mamalia, oleh sebab itu dampaknya terhadap suatu perlakuan akan menunjukkan hasil yang tidak jauh berbeda dengan mamalia lainnya. Penggunaan tikus sebagai hewan coba juga didasarkan atas pertimbangan ekonomis dan kemampuan hidup tikus hanya 2-3 tahun dengan lama reproduksi 1 tahun (Maula, 2014).

Tikus putih (*Rattus sp.*) merupakan hewan coba yang memiliki kekhususan karena pertumbuhannya relatif cepat dan lebih mudah berkembang biak. Tikus banyak digunakan dalam penelitian tentang tingkah laku, neoplasia, daya kerja obat, toksikologi, metabolisme lemak, alkoholisme, hepatitis, hipertensi, diabetes insipidus dan penyakit menular. Tikus (*Rattus sp.*) memiliki sifat-sifat yang mudah dipelihara, mudah berkembang biak dan morfologi organ tubuhnya analog dengan organ manusia. Oleh karena itu, tikus sering digunakan sebagai hewan pengujian obat sebelum diberikan kepada manusia. Tikus juga memiliki sifat mudah dipelihara dan merupakan hewan yang relatif sehat dan cocok untuk penelitian (Puspitasari, 2008).

Menurut (Puspitasari,2008) taksonomi tikus putih di klasifikasikan sebagai berikut :

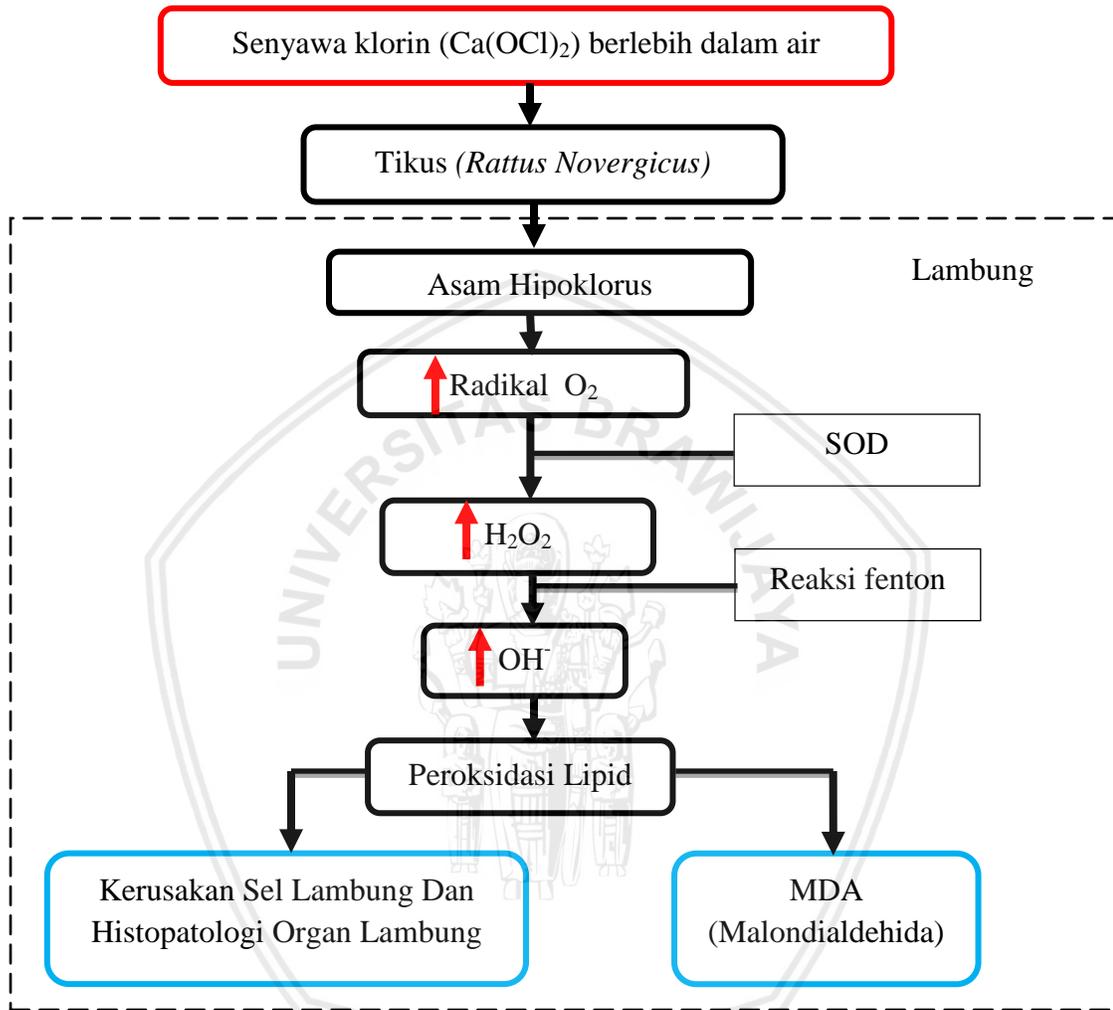
kelas : Mammalia
ordo : Rodentia
sub ordo : Myomorpha
super famili : Muroidea
famili : Muridae
sub famili : Murinae
genus : Rattus
spesies : *Rattus sp.*



Gambar 2.4 Tikus putih galur wistar (Suckwow *et al.*, 2006)

BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Kerangka Konseptual Penelitian

Keterangan:



: Peningkatan

: Memicu

: Paparan klorin

: Parameter yang diamati

: Didalam lambung

Klorin masuk ke dalam tubuh tikus melalui sonde lambung. Klorin akan bereaksi dengan air membentuk asam hipoklorus, ketidakstabilan asam hipoklorus akan membentuk oksigen bebas sehingga meningkatkan oksidasi klorin dan dapat menimbulkan efek korosif (Rohmah dan lilis, 2017). Ketidakstabilan asam hipoklorus memicu terbentuknya oksigen bebas (radikal superoksida). Semakin banyak asam hipoklorus maka akan semakin banyak oksigen bebas yang dihasilkan. Terbentuknya radikal superoksida memicu terbentuknya superokasida dismutase (SOD) yang merupakan antioksidan bagi radikal superoksida. Enzim *Superoksida dismutase(SOD)* yang terdapat di dalam sitosol dan mitokondria akan merubah radikal superoksida yang dihasilkan oleh respirasi sel dan oksigen bebas yang dihasilkan oleh asam hipoklorus menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2). Hidrogen peroksida yang tidak dikonversi menjadi air akan di ubah menjadi radikal hidroksil melalui reaksi fenton. Radikal hidroksil akan bereaksi dengan asam lemak tak jenuh pada membran sel dan memicu terjadinya peroksidasi lipid pada membran sel. Peroksidasi lipid yang terjadi mengakibatkan lepasnya MDA (*Malondialdehida*) yang selanjutnya senyawa ini akan menyebabkan kerusakan sel. Hal ini akan memicu kerusakan sel lambung yang lebih parah.

3.2 Hipotesis Penelitian

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

- a. *Pemberian klorin berlebih dapat meningkatkan kadar malondialdehida pada lambung tikus putih (Rattus novergicus).*
- b. *Pemberian klorin berlebih dapat menimbulkan kerusakan histologi pada lambung tikus putih (Rattus novergicus).*



BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium hewan Institut Biosains Universitas Brawijaya, Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Laboratorium Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Hewan. Penelitian ini dilakukan dari bulan Januari 2019.

4.2 Populasi dan Sampel

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

4.3 Pembagian Kelompok Tikus

Tikus yang digunakan sebanyak 20 ekor, dimana terbagi menjadi 5 kelompok perlakuan dan masing-masing perlakuan terdiri dari 4 ekor tikus. Tikus diberikan paparan klorin secara peroral menggunakan sonde lambung dengan konsentrasi 50, 100, 150 dan 200 ppm. Penentuan konsentrasi klorin berdasarkan LD50 pada tikus yaitu 850 ppm (WHO, 2003). Pembagian kelompok sebagai berikut:

1. Kelompok pertama sebagai kontrol negatif. Tikus tidak diberikan paparan klorin, hanya dengan pemberian air minum berupa aquades.
2. Kelompok kedua adalah tikus yang diberikan paparan klorin menggunakan sonde lambung dengan konsentrasi 50 ppm sebanyak 1 mL/ekor dalam waktu 7 hari.

3. Kelompok ketiga adalah tikus yang diberikan paparan klorin menggunakan sonde lambung dengan konsentrasi 100 ppm sebanyak 1 mL/ekor dalam waktu 7 hari.
4. Kelompok keempat adalah tikus yang diberikan paparan klorin menggunakan sonde lambung konsentrasi 150 ppm sebanyak 1 mL/ekor dalam waktu 7 hari.
5. Kelompok kelima adalah tikus yang diberikan paparan klorin menggunakan sonde lambung konsentrasi 200 ppm sebanyak 1 mL/ekor dalam waktu 7 hari.

4.4 Aklimatisasi

Aklimatisasi hewan coba selama 7 hari dengan tujuan mengadaptasikan hewan coba dengan lingkungannya yang baru. Pada tahap ini dilakukan pengamatan terhadap keadaan umum hewan coba. Tikus diberikan ransum pakan BR-1 dan diberikan minum secara *ad libitum* serta dipelihara pada ruang bersuhu 26-27⁰C dengan kelembapan 50-60% .

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 hewan coba terdiri dari 4 ekor hewan coba. Kelompok 1 adalah tikus tanpa paparan klorin berlebih, hanya dengan pemberian air minum berupa aquades (kontrol negatif). Kelompok 2 tikus dengan paparan klorin berlebih dengan konsentrasi 50 ppm sebanyak 1 mL secara per oral menggunakan sonde lambungselama 7 hari. Kelompok 3 tikus dengan paparan klorin berlebih dengan konsentrasi 100 ppm sebanyak 1 mL secara per oral menggunakan sonde

lambungselama 7 hari. Kelompok 4 tikus dengan paparan klorin berlebih dengan konsentrasi 150 ppm sebanyak 1 mL secara per oral menggunakan sonde lambungselama 7 hari. Kelompok 5 tikus dengan paparan klorin berlebih dengan konsentrasi 200 ppm sebanyak 1 mL secara per oral menggunakan sonde lambungselama 7 hari. Semua tikus diberi pakan standar berupa pelet dan air minum ad libitum.

Tabel 4.1 Rancangan kelompok penelitian

Perlakuan	Ulangan			
	1	2	3	4
Kontrol negatif tanpa diberi paparan klorin konsentrasi berlebih				
Perlakuan 1 Paparan klorin menggunakan sonde lambung 50 ppm sebanyak 1 mL selama 7 hari				
Perlakuan 2 Paparan klorin menggunakan sonde lambung 100 ppm sebanyak 1 mL selama 7 hari				
Perlakuan 4 Paparan klorin menggunakan sonde lambung 150 ppm sebanyak 1 mL selama 7 hari				
Perlakuan 5 Paparan klorin menggunakan sonde lambung 200 ppm sebanyak 1 mL selama 7 hari				

4.6 Penetapan Jumlah Perlakuan dan Ulangan

Penelitian ini menggunakan hewan coba berupa Tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar berumur 8-10 minggu dengan berat badan rata-rata 150-

200gram. Hewan coba dibagi menjadi 5 kelompok dan besar sampel ditentukan dengan rumus *Federer* (Kusriningrum, 2010) :

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

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

<p>Keterangan : P = jumlah perlakuan n = jumlah pengulangan</p>

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 Karakteristik Sampel Penelitian

1. Kriteria Inklusi

- Tikus putih (*Rattus novergicus*) strain Wistar dengan umur 8-10 minggu.
- Berat badan rata-rata 150-200 gram.
- Jenis kelamin jantan.
- Sehat, ditandai dengan gerakan yang aktif, tidak cacat, dan matanya jernih.

2. Kriteria Eksklusi

Tikus putih yang mati saat penelitian.

4.8 Variabel Penelitian

Adapun variabel dalam penelitian ini adalah:

Variabel bebas : Pemberian Klorin

Variabel antara	: Kadar MDA (malondialdehida)
Variable tergantung	: Histopatologi lambung
Variabel kontrol	: Tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>) jantan strain wistar, umur, berat badan, suhu, kelembapan kandang, dan pakan

4.9 Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain:

- a. Alat untuk pemeliharaan : kandang pemeliharaan berukuran 45x38x20 cm yang terbuat dari plastik polyvinyl dengan tutup jaring jaring dari bahan stainless steel sebanyak 5 buah, botol minum, tempat makan tikus, lampu, sonde.
- b. Peralatan untuk pembuatan preparat irisan histologis adalah bakparaffin, *dissecting kit*, botol flakon, oven, *rotary microtome*, *base molt*, *holder*, cawanpetri, *hot plate*, pipet tetes, mikroskop cahaya, micrometer objektif, dan micrometer okuler.
- c. Alat untuk pengukuran kadar MDA, yaitu spektrofotometer, mortar, vortex, waterbath, thermometer.

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan berat 150-200 gram, aquades, pakan tikus(pellet), kertas label, gelas objek, gelas penutup, *staining kit*, *base molt*, Blok paraffin, NaCl

fisiologis, pewarna Hematoxyline Eosin (HE), alkohol 70%, alkohol 90%, alkohol 95%, HCL, malondialdehida, TCA, HCL, Na Thio.

4.10 Prosedur Penelitian

4.10.1 Pemberian Paparan Klorin Berlebih

Klorin yang diberikan pada hewan coba adalah kalsium hipoklorit atau kaporit 90% yang akan dilarutkan dengan aquades dan diukur kadar klorin agar diperoleh kadar sesuai perlakuan yang akan dipakai. Klorin diencerkan dengan aquades. Selanjutnya diukur dengan *chlorinometer* untuk mengetahui kadar klorin dalam larutan tersebut. Cara membuat 50 ppm klorin caranya dengan melarutkan 50 mg klorin dalam 1 liter aquades. Cara membuat 100 ppm klorin caranya dengan melarutkan 100 mg klorin dalam 1 liter aquades. Cara membuat 150 ppm klorin caranya dengan melarutkan 150 mg klorin dalam 1 liter aquades. Cara membuat 200 ppm klorin caranya dengan melarutkan 200 mg klorin dalam 1 liter aquades.

Larutan aquades yang telah dicampur dengan senyawa klorin berlebih diberikan secara peroral menggunakan sonde lambung sebanyak 1 mL/ekor sekali setiap hari pada tikus P1, P2, P3, P4. Induksi klorin dilakukan selama 7 hari.

4.10.2 Preparasi untuk Histopatologi Lambung Tikus (*Rattus norvegicus*)

Pengambilan lambung tikus dilakukan setelah dilakukan eutanasi pada tikus. Metode eutanasi yang digunakan adalah dislokasi cervical karena teknik ini sangat efektif, cepat, murah dan efek terhadap tes diagnostik sangat rendah. Tikus diletakkan di atas sterofoam setelah tikus yang telah dilapisi aluminium foil pada posisi *dorsal recumbency* kemudian difiksasi dengan menggunakan jarum

pentulpada keempat ekstremitasnya. Permukaanabdomen tikus dibasahi dengan alkohol 70% untuk mempermudah pada saat proses nekropsi. Tahap nekropsi dilakukan padalinea alba dengan membuka lapisan kulit dan fascia. Rongga abdomen dibukasampai batas bawah diafragma. Lambung yang terletak oblik dari kiri ke kanan menyilang di abdomen atas tepat dibawah diafragma. Organ lambung yang diambil adalah pylorus. Kelenjar pilorik berfungsi mensekresikan mukus untuk melindungi mukosa pylorus, juga beberapa pepsinogen, renin, lipase lambung dan hormon gastrin. Organtersebut dimasukkan ke dalam larutan BNF 10% dan disimpan sampai proses berikutnya (Puspitasari, 2008).

4.10.3 Penentuan Kadar Malondialdehida

A. Pembuatan Kurva Baku Malondialdehida

Sebanyak 2 mL larutan standar MDA ($1.2520\mu\text{M}$)dengan berbagai konsentrasi laluditambahkan 1mL TCA 20% dan 200 μL TBA0.67% lalu dihomogenkan dengan vorteks.Selanjutnya dipanaskan dalam waterbath dengansuhu 100°C selama 10 menit. Setelah 10 menit,diangkat dan didinginkan pada suhu ruang.Absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada λ maksimum. Larutan standar kemudian dibaca pada panjang gelombang 532 nm menggunakan spektrofotometer (*Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-1601*). Nilai absorbansi yang didapatdiplot menggunakan Microsoft Excel sehinggadidapatkan kurva baku MDA (Masruroh dan Sri, 2013).

B. Pengukuran Kadar Malondialdehida Metode TBA Test

Organ lambung bagian korpus sebanyak 0,2 gram dipotong kecil-kecil, kemudian digerus pada mortar dingin yang diletakkan diatas balok es. Tujuan pemotongan kecil-kecil adalah untuk mempermudah penggerusan. Ditambahkan NaCl fisiologis 0,9%, selanjutnya homogenat dipindah ke dalam tabung *microtube* dan disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 8000 rpm. Supernatan yang terbentuk diambil 100 μ L dimasukkan kedalam *microtube*, ditambah 550 μ L akuades, 100 μ L TCA kemudian dihomogenkan dengan *vortex*, ditambahkan 250 μ L HCL 1N lalu dihomogenkan dengan *vortex*, dan ditambahkan 100 μ L Na-Thio 1% kemudian dihomogenkan kembali dengan *vortex*. Setelah itu, *microtube* disentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm selama 15 menit. Supernatan yang terbentuk, dipisahkan ke *microtube* baru. Kemudian dilakukan inkubasi dalam *waterbath* dengan suhu 100°C selama 30 menit. Kemudian didinginkan disuhu ruang dan sampel diukur absorbansinya dengan spektrofotometer (*Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-1601*) pada panjang gelombang maksimum untuk uji TBA dan diplotkan pada kurva standar yang telah dibuat untuk menghitung konsentrasi sampel (Yustika, 2013).

4.10.4 Pembuatan Preparat Histopatologi

Organ lambung bagian pylorus hasil nekropsi dimasukkan ke dalam *Neutral Buffered Formalin* (NBF) 10% sebagai bahan fiksasi, kemudian dilakukan blok parafin. Tahap awal adalah dehidrasi, setelah organ difiksasi,

dehidrasi organ dalam aseton (I, II), masing-masing selama 1 jam pada suhu kamar. Selanjutnya dilakukan proses kliring dengan xylol (I, II) masing-masing selama 0,5-1 jam. Kemudian proses infiltrasi dengan parafin xylol (I, II) masing-masing selama 30 menit dengan suhu 54-56°C. Proses selanjutnya adalah *embedding* dalam parafin dan didinginkan dalam suhu kamar. Blok-blok dikumpulkan dan dilakukan proses penyayatan dengan ketebalan 3 µL serta diletakkan pada gelas objek lalu teteskan balsem Kanada, ditutup dengan *cover* gelas, dan dimasukkan ke dalam inkubator pada suhu 37°C satu malam. Kemudian preparat ini siap untuk dilakukan pewarnaan HE (Aisyah, 2014).

4.10.5 Pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE)

Prosedur pewarnaan HE terdiri dari deparafinisasi, rehidrasi, pewarnaan I, differensiasi, *blueing*, pewarnaan II, dehidrasi, *clearing* dan *mounting*. Deparafinisasi, yaitu melarutkan dan menghilangkan parafin yang terdapat pada jaringan. Preparat dimasukkan ke dalam xylol bertingkat I, II, dan III masing-masing selama 5 menit. Rehidrasi, yaitu preparat dimasukkan ke dalam alkohol bertingkat mulai dari alkohol 95%, 90%, 80%, dan 70% masing-masing selama 5 menit, lalu direndam dalam aquades selama 5 menit. Pewarnaan I, yaitu pewarnaan dengan menggunakan hematoxylin selama 10 menit. Tujuan dari pewarnaan ini adalah untuk memberikan warna biru pada inti sel. Differensiasi, yaitu preparat dimasukkan dalam Hydrochloric acid (HCl) 0,6% selama 1 menit. Kemudian dicuci dengan air mengalir. Tujuan differensiasi adalah untuk menghilangkan warna biru yang pekat pada inti sel dan sitoplasma. *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. Dehidrasi, yaitu menghilangkan air dari jaringan. Preparat dimasukkan kedalam alkohol bertingkat mulai dari alkohol 70%, 80%, 90%, dan 95% masing-masing 5 menit. *Clearing*, yaitu preparat dimasukkan dalam xylol I dan II selama 1 menit dan ditunggu sampai kering. *Mounting*, yaitu preparat diberi Entelan atau canada balsam dan ditutup dengan *cover glass*. Hal ini bertujuan untuk mengawetkan jaringan yang sudah diwarnai (Jusuf, 2009).

4.10.6 Pengamatan Histopatologi Lambung

Pengamatan preparat dibawah mikroskop cahaya dapat dilakukan dengan meletakkan preparat pada meja benda dan diamati dengan perbesaran objektif 4x. Digunakan *revolving nosepiece* untuk mengganti ke perbesaran objektif 10x sampai 40x jika diperlukan. Pada perbesaran objektif 40x pengaturan terhadap kondensor perlu dilakukan. Pengamatan histopatologi organ lambung bagian pylorus akibat paparan klorin dosis berlebih dilakukan dibawah mikroskop untuk mengetahui tingkat kerusakan pada sel epitel lambung dan adanya sel inflamasi pada mukosa lambung bagian pilorus. Evaluasi hasil pengamatan histopatologi dilakukan secara deskriptif.

4.10.7 Perhitungan Sel Radang

Preparat histopatologi diperiksa dibawah mikroskop masing-masing pada 5 lapang pandang mikroskopik untuk menghitung jumlah infiltrasi sel radang pada setiap perlakuan. Perhitungan dilakukan dengan menghitung sel radang secara umum yang ada di preparat histopatologi. Perhitungan dilakukan dibawah mikroskop dengan perbesaran 400x.

Ketika klorin mengiritasi saluran pencernaan, maka efek iritan tersebut akan membuat epitel saluran pencernaan mengalami inflamasi. Tubuh akan mengeluarkan mekanisme pertahanan berupa pengaktifan neutrophil yang mengundang makrofag untuk memfagosit klorin, sehingga semakin banyak sel radang yang ditemukan menunjukkan tingkat kerusakan paling parah yang disebabkan oleh klorin (Hermiyanti, 2016).

4.11 Analisis Data

Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah kadar malondialdehida (MDA) dan histopatologi pada organ lambung. Kadar MDA diamati menggunakan uji TBA. Selanjutnya dilakukan analisis statistika dengan uji sidik ragam *one way analysis of varians* (ANOVA) dengan homogenitas dan normalitas yang telah terpenuhi dan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) atau *Tukey Test* dengan $\alpha = 5\%$ menggunakan *Statistical Package for The Social Science* (SPSS) *version 22.0 for windows*. Sementara itu, hasil pengamatan histopatologi lambung dianalisa secara deskriptif.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Efek Pemberian Klorin Berlebih Terhadap Kadar MDA (Malondialdehida) Pada Organ Lambung Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

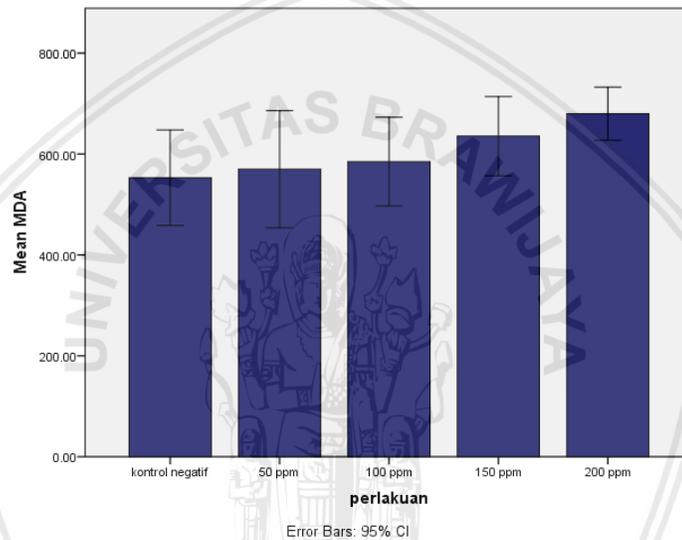
Pengukuran kadar MDA dilakukan untuk mengetahui tingkat kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh ROS. Sampel kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotoneter dengan panjang gelombang 532 nm. Data yang telah didapat akan dilakukan analisis statistik dengan uji *one way analysis of varians* (ANOVA) dan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) atau *Tukey Test* dengan $\alpha = 5\%$. Rata-rata kadar MDA yang didapatkan pada penelitian ini adalah sebagai berikut : pada kelompok kontrol didapati hasil 553,0 ng/mL, paparan 50 ppm didapati hasil 569,9 ng/mL, paparan 100 ppm didapati hasil 584,9 ng/mL, paparan 150 ppm didapati hasil 635,5 ng/mL, dan pada paparan 200 ppm didapati hasil 679,9 ng/mL. Berdasarkan kadar MDA yang didapatkan pada penelitian ini menunjukkan adanya peningkatan kadar MDA pada pemberian klorin 50, 100, 150, 200 ppm dengan peningkatan 3 %, 5 %, 15 %, dan 23 % secara berurutan.

Data tersebut dapat diamati pada tabel 5.1

Tabel 5.1 Kadar MDA lambung tikus

Kelompok perlakuan	Rerata \pm SD kadar MDA (ng/mL)	% Peningkatan kadar MDA terhadap kontrol negatif
1 (Kontrol negatif)	553,0 \pm 59,4 ^a	-
2 (Paparasi 50 ppm)	569,9 \pm 72,9 ^{ab} 3%	
3 (Paparasi 100 ppm)	584,9 \pm 55,2 ^{ab} 5%	
4 (Paparasi 150 ppm)	635,5 \pm 49,2 ^{ab} 15%	
5 (Paparasi 200 ppm)	679,9 \pm 33,1 ^b 23%	

Keterangan : perbedaan notasi a,ab,b menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) diantara kelompok kontrol negatif dan kelompok paparan 200 ppm.



Gambar 5.1 Kadar MDA lambung

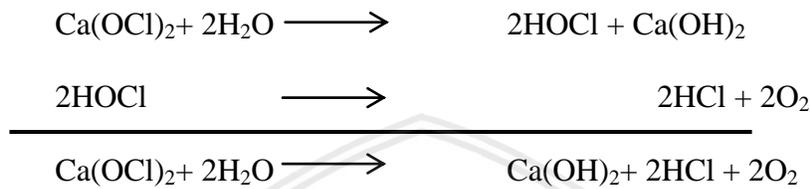
Berdasarkan data statistik yang didapat, pada paparan klorin 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p > 0,05$), sedangkan pada paparan 200 ppm menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$), sehingga dapat dinyatakan bahwa klorin berlebih dengan konsentrasi 200 ppm dapat memberikan efek yang signifikan terhadap kerusakan jaringan lambung.

Pada kelompok kontrol negatif didapatkan kadar MDA 553,0 ng/mL, hal ini dikarenakan secara normal didalam lambung terdapat MDA karena setiap lapisan sel-sel epitel lambung terus menerus berganti dan regenerasi sel untuk memperbaiki sel-sel yang rusak (Malik, 1992). Secara fisiologis sel yang rusak akan menghasilkan senyawa MDA (Marnett, 1999). Pada penelitian ini kadar MDA meningkat seiring tingginya konsentrasi klorin yang diberikan. Hal ini disebabkan oleh klorin ketika bereaksi dengan air akan membentuk asam hipoklorus. Ketidakstabilan asam hipoklorus dapat membentuk oksigen bebas yang merupakan senyawa *Reactive Oxygen Species* (ROS). Peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dapat menyebabkan terjadinya kerusakan jaringan akibat stres oksidatif yang mana akan diikuti dengan peningkatan kadar MDA.

Pada paparan 50, 100, 150 ppm tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan, sehingga dapat dikatakan bahwa sistem pertahanan mukosa lambung masih dapat mempertahankan keutuhan mukosa lambung terhadap paparan klorin 50, 100, 150 ppm. Lambung memiliki sistem proteksi yang berlapis-lapis terhadap bahan-bahan yang berasal dari luar tubuh maupun produk-produk pencernaan yang dapat merusak jaringan mukosa lambung. Lapisan mukus dan mukosa lambung merupakan garis depan pertahanan lambung. Lapisan ini memberikan perlindungan terhadap trauma mekanis dan kimia (Puspitasari, 2008). Sedangkan paparan 200 ppm terjadi peningkatan kadar MDA yang signifikan terhadap kontrol negatif, hal ini menunjukkan bahwa pada paparan 200 ppm terjadi peningkatan ROS yang menyebabkan sistem pertahanan mukosa

lambung melemah dan tidak dapat mempertahankan kondisi lambung, sehingga terjadi kerusakan membran yang diikuti dengan peningkatan kadar MDA.

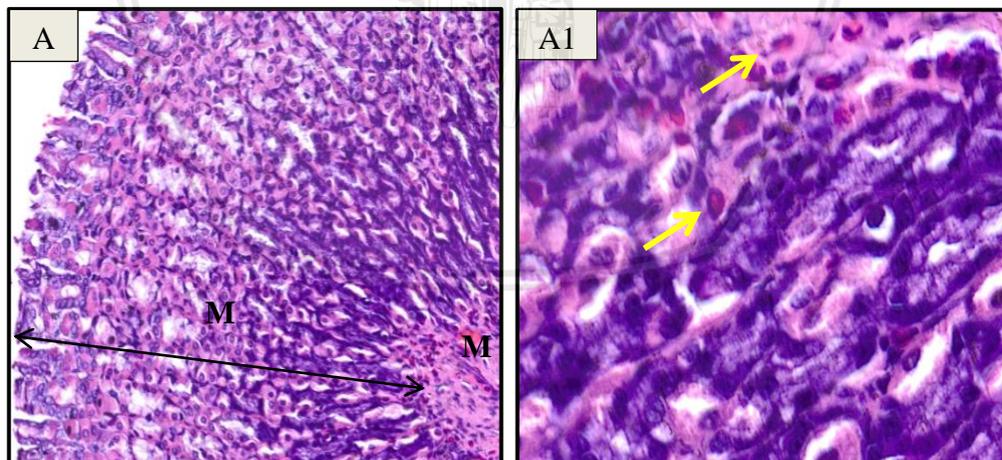
Menurut Handriyanto (2010), Reaksi kimia terbentuknya ROS akibat paparan klorin secara peroral dapat di ilustrasikan sebagai berikut :



Reaksi klorin dengan air akan menghasilkan asam hipoklorus, dan ketidakstabilan asam hipoklorus membuatnya mudah menghilang dan membentuk oksigen bebas sehingga menimbulkan efek korosif. Semakin banyak asam hipoklorus yang terbentuk akan mengakibatkan semakin banyak oksigen bebas yang terbentuk (Rohmah dan Lilis, 2017). Paparan klorin berlebih dapat menginduksi terbentuknya oksigen berlebih yang merupakan *Reactive oxygen species* (ROS) yang dapat menyebabkan gangguan kesehatan. Reaktifitas ROS dapat mempengaruhi struktur molekul penyusun membran sel yang terdiri atas komponen asam lemak tak jenuh. Fenomena peroksidasi lipid yang terjadi akibat ikatan radikal hidroksil dengan asam lemak tak jenuh (*Poly Unsaturated Fatty Acid*) pada jaringan mengakibatkan lepasnya Malondialdehida (Hermiyanti, 2016). Maka dapat disimpulkan bahwa paparan klorin berlebih secara peroral mampu mengakibatkan peningkatan ROS yang akan diikuti peningkatan marker kerusakan jaringan yaitu MDA.

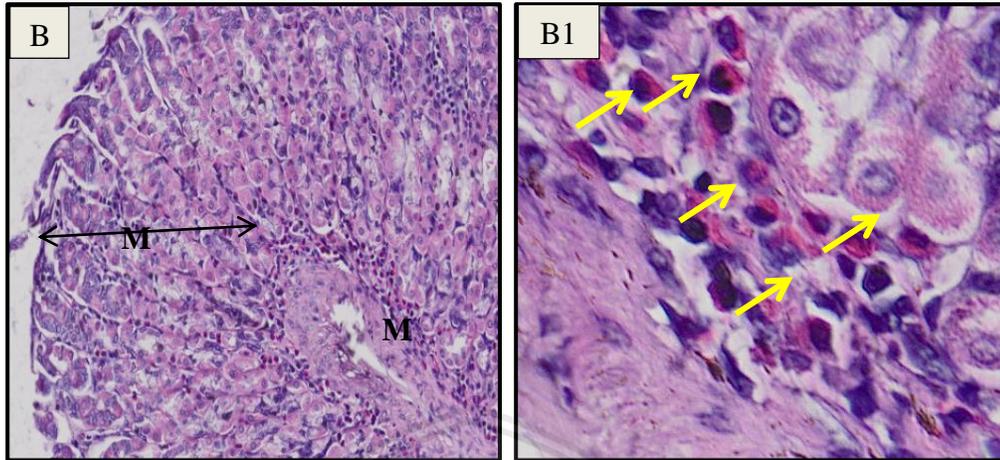
5.2 Pengaruh Pemberian Klorin Berlebih Terhadap Gambaran Histopatologi Pada Organ Lambung Tikus Putih (*Rattus novergicus*)

Gambaran histopatologi dengan pewarnaan Hematoxylin Eosin digunakan untuk melihat adanya kerusakan yang terjadi pada lambung tikus pada tiap perlakuan. Pengamatan preparat histopatologi lambung meliputi lambung bagian mukosa dan submukosa. Gambaran histopatologi tikus kelompok kontrol negatif (**Gambar 5.2**) tidak menunjukkan adanya perubahan histopatologi. Tidak adanya perubahan pada kelompok kontrol negatif ditunjukkan dengan keadaan mukosa lambung (tersusun atas kumpulan sel epitel kolumnar simplek) yang masih utuh. Menurut Puspitasari (2008), Membran mukosa lambung terdiri dari tiga komponen yaitu epitelium, lamina propia dan muskularis mukosa. Epitel permukaan mukosa ditandai oleh adanya *gastric pit* dan *gastric gland* yang terletak rapat satu dengan yang lain dan dilapisi epitel sejenis.



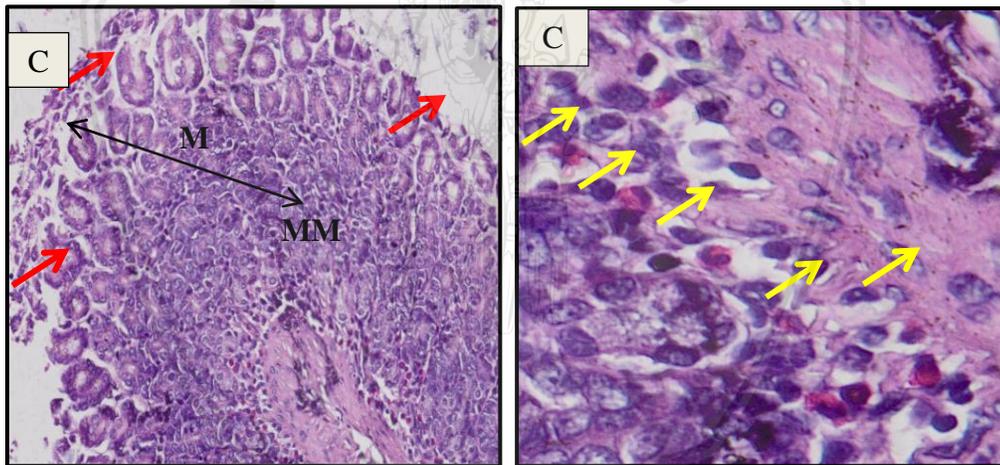
Gambar 5.2 Histopatologi mukosa lambung tikus putih (*Rattus novergicus*) bagian pylorus; kelompok kontrol negatif; (pewarnaan HE); (Gambar A perbesaran 100x); (Gambar A1 perbesaran 400x)

Keterangan : (M) : mukosa ; (MM) : muskularis mukosa
(panah warna kuning) : sel radang



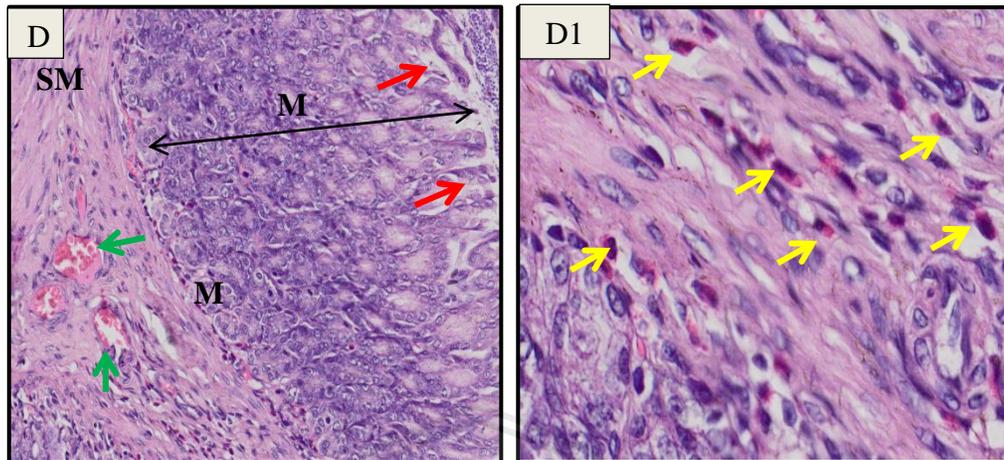
Gambar 5.3 Histopatologi mukosa lambung tikus putih (*Rattus norvegicus*) bagian pylorus; kelompok paparan 50 ppm; (pewarnaan HE); (Gambar B perbesaran 100x); (Gambar B1 perbesaran 400x)

Keterangan : (M) : mukosa ; (MM) : muskularis mukosa
(panah warna kuning) : sel radang



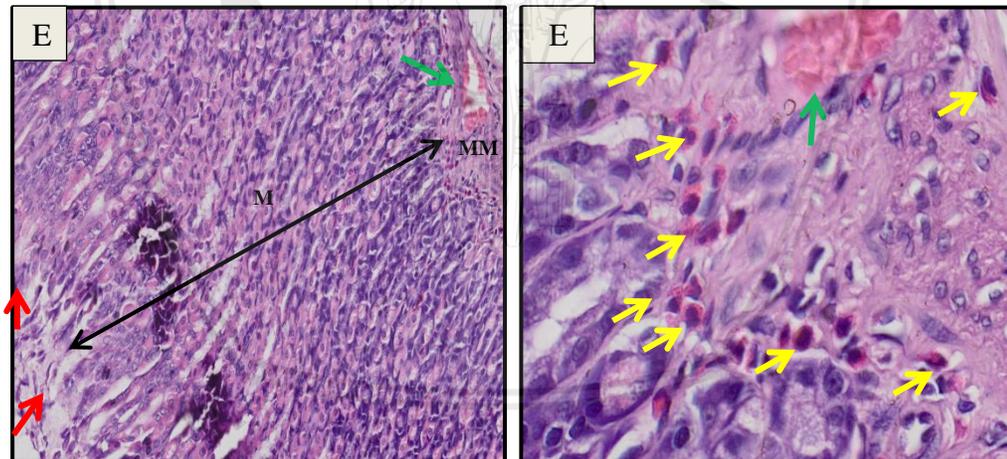
Gambar 5.4 Histopatologi mukosa lambung tikus putih (*Rattus norvegicus*) bagian pylorus; kelompok paparan 100 ppm; (Pewarnaan HE) (Gambar C perbesaran 100x); (Gambar C1 perbesaran 400x)

Keterangan : (M) : mukosa ; (MM) : muskularis mukosa
(panah warna kuning) : sel radang
(panah warna merah) : deskuamasi epitel



Gambar 5.5 Histopatologi lambung tikus putih (*Rattus norvegicus*) bagian pylorus; kelompok paparan 150 ppm; (Pewarnaan HE) (Gambar D perbesaran 100x); (Gambar D1 perbesaran 400x)

Keterangan : (M) : mukosa ; (MM) muskularis mukosa ; (SM) : Submukosa
 (panah warna kuning) : sel radang
 (panah warna merah) : deskuamasi epitel
 (panah warna hijau) : pembuluh darah



Gambar 5.6 Histopatologi lambung tikus putih (*Rattus norvegicus*) bagian pylorus; kelompok paparan 200 ppm; pewarnaan HE (Gambar E perbesaran 100x); (Gambar E1 perbesaran 400x)

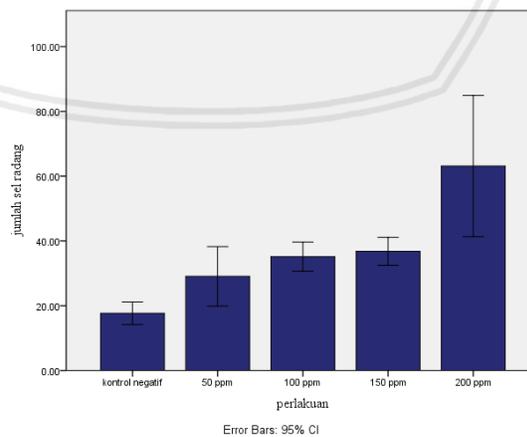
Keterangan : (M) : mukosa ; (MM) : muskularis mukosa
 (panah warna kuning) : sel radang
 (panah warna merah): deskuamasi epitel
 (panah warna hijau): pembuluh darah

Paparan klorin 50 ppm menunjukkan adanya inflamasi dengan kondisi mukosa lambung yang masih normal (**Gambar 5.3**). Pada paparan 100 ppm menunjukkan adanya deskuamasi epitel yang disertai infiltrasi sel radang (**Gambar 5.4**). Pada paparan 150 ppm menunjukkan adanya deskuamasi epitel, infiltrasi sel radang dan vasodilatasi (**Gambar 5.5**). Kemudian pada paparan 200 ppm menunjukkan adanya deskuamasi epitel, infiltrasi sel radang dan vasodilatasi (**Gambar 5.6**). Berdasarkan gambaran histopatologi yang didapatkan pada penelitian ini menunjukkan adanya infiltrasi sel radang yang semakin meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi klorin yang diberikan.

Data tersebut dapat diamati pada tabel 5.2

Tabel 5.2 Jumlah sel radang

Kelompok perlakuan	Rerata Jumlah sel radang (sel/5 lapang pandang)	Standard deviasi
1 (Kontrol negatif)	17,6	1,4
2 (Paparan 50 ppm)	29,06	3,7
3 (Paparan 100 ppm)	35,1	1,8
4 (Paparan 150 ppm)	36,8	1,7
5 (Paparan 200 ppm)	63,1	8,7



Gambar 5.7 Jumlah sel radang

Hasil penelitian mengenai pemberian paparan klorin berlebih secara peroral kepada tikus putih (*Rattus norvegicus*) menunjukkan bahwa paparan klorin dengan konsentrasi berlebih mampu menyebabkan kerusakan sel lambung. Kerusakan sel lambung yang dapat diamati adalah adanya deskuamasi epitel, infiltrasi sel radang, dan vasodilatasi pada submukosa. Pada paparan 50 ppm menyebabkan terjadinya infiltrasi sel radang dengan kondisi mukosa lambung yang masih normal. Menurut Puspitasari (2008), bahwa adanya sel neutrophil dalam jumlah sedikit masih tidak menunjukkan gejala patologis karena neutrophil memiliki peran untuk melawan agen-agen asing yang bersifat patogen. Hal ini sesuai dengan pendapat Nugroho (2009), yang menyatakan bahwa kandungan klorin 50 ppm apabila dikonsumsi tidak mengakibatkan sakit ataupun gangguan kesehatan.

Pada paparan 100 ppm menunjukkan deskuamasi epitel dan infiltrasi sel radang. Deskuamasi epitel merupakan lepasnya sel epitel dari permukaan jaringan. Dalam keadaan normal menurut Malik (1992), lapisan sel-sel epitel saluran pencernaan terus menerus berganti dan regenerasi dengan cara deskuamasi setiap 1-3 hari. Deskuamasi epitel juga turut dipengaruhi oleh adanya reaksi fisiologis tubuh sebagai respon pertahanan jaringan terhadap suatu rangsangan (iritan). Pada penelitian ini pada paparan 100, 150 dan 200 ppm dapat menimbulkan terjadinya deskuamasi epitel. Hal ini sesuai dengan pendapat Nugroho (2009), yang menyatakan bahwa konsumsi air yang mengandung klorin lebih dari 90 ppm dapat menyebabkan kerusakan organ pencernaan. Kerusakan sel lambung yang ditandai dengan deskuamasi epitel pada gambaran histopatologi lambung merupakan dampak yang

diberikan ROS akibat paparan klorin berlebih. Hal ini didukung oleh pendapat Eman (2016), yang menyatakan bahwa *Reactive Oxygen Species* (ROS) dapat menyebabkan kerusakan oksidatif membran sel dan lisis sel.

Pada paparan 150 dan 200 ppm juga menunjukkan infiltrasi sel radang, deskuamasi epitel dan vasodilatasi pembuluh darah pada bagian submukosa. Pada paparan 150 dan 200 ppm deskuamasi epitel dan infiltrasi sel radang menunjukkan kerusakan yang lebih parah. Paparan klorin 150 dan 200 ppm yang bersifat asam dan iritan menyebabkan iritasi mukosa lambung sehingga merangsang terjadi deskuamasi epitel. Pada paparan 200 ppm menunjukkan infiltrasi sel radang yang semakin parah, hal ini ditunjukkan dengan ditemukannya sel radang pada bagian mukosa dan submukosa. Menurut Mac Farlane *et al* (2000), menyatakan bahwa proses peradangan akut disertai dengan dilatasi pembuluh darah dan peningkatan permeabilitas pembuluh darah. Peningkatan permeabilitas pembuluh darah akan menyebabkan sel radang keluar dari pembuluh darah menuju ke jaringan. Fungsi sel radang adalah untuk memfagosit dan mendegradasi agen yang menyerang seperti mikroorganisme, bahan merusak seperti senyawa klorin berlebih, dan antigen asing.. infiltrasi sel radang terjadi karena pembuluh darah mengalami peningkatan permeabilitas membran. Sel sel radang keluar dari pembuluh darah akan terakumulasi pada lapisan submukosa yang lebih longgar sebelum menyebar ke jaringan (Puspitasari, 2008). Hal ini menunjukkan bahwa pada paparan 200 ppm dapat menimbulkan kerusakan yang paling parah.

Menurut Hermiyanti (2017), paparan klorin dapat menginduksi terbentuknya ROS yang merupakan oksidan endogen. Reaktifitas ROS mempengaruhi struktur membran sel. Fenomena peroksidasi lipid yang terjadi akibat ikatan radikal hidroksil dengan molekul penyusun membran sel yang terdiri atas asam lemak tak jenuh dapat menyebabkan kerusakan pada membran sel. Ketika klorin mengiritasi saluran pencernaan maka klorin akan berubah bentuk menjadi asam hipoklorit yang lebih iritan. Efek iritan ini akan menyebabkan epitel lambung mengalami inflamasi yang ditunjukkan oleh adanya infiltrasi sel radang pada mukosa lambung. Tubuh akan mengeluarkan mekanisme pertahanan tubuh berupa pengaktifan sel radang untuk memfagosit hipoklorit dan proses peradangan akut yang semakin parah akan menyebabkan dilatasi pembuluh darah. Selain menyebabkan inflamasi dan vasodilatasi pembuluh darah, menurut Rohmah dan Lilis (2017) asam hipoklorit merupakan senyawa yang tidak stabil dan dapat membentuk oksigen bebas sehingga meningkatkan oksidasi klorin dan menimbulkan efek korosif. Efek korosif ini ditunjukkan ditunjukkan oleh deskuamasi epitel yang diperlihatkan pada paparan klorin lebih dari 90 ppm. Deskuamasi epitel yang semakin parah seiring meningkatnya konsentrasi klorin yang diberikan.

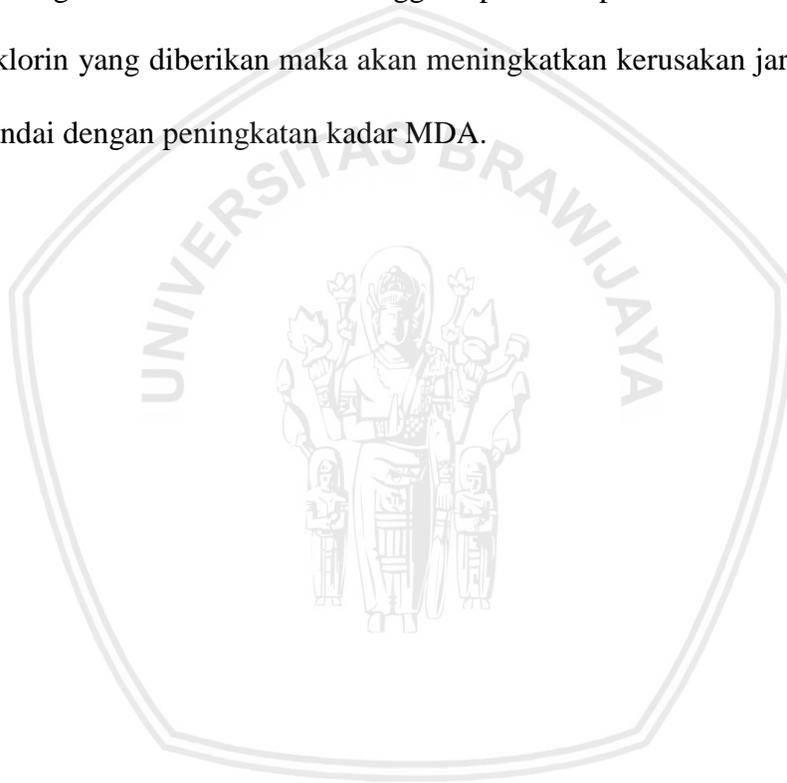
5.3 Hubungan Antara Kadar MDA Dengan Tingkat Kerusakan Jaringan Lambung Akibat Paparan Klorin Berlebih

Berdasarkan penelitian ini menunjukkan bahwa terjadi peningkatan kadar MDA seiring meningkatnya konsentrasi klorin yang diberikan. Hal ini ditunjukkan oleh paparan 50, 100, 150, 200 ppm dapat meningkatkan kadar MDA sebesar 3%, 5%, 15% dan 23 % dengan peningkatan yang signifikan pada paparan 200 ppm ($p < 0,05$).

Pada gambaran histopatologi organ lambung juga menunjukkan kerusakan sel lambung yang semakin parah seiring meningkat konsentrasi klorin yang diberikan. Hal ini ditunjukkan dengan hasil gambaran histopatologi pada kelompok kontrol negatif masih normal. Kemudian pada paparan klorin 50 ppm mulai menunjukkan adanya infiltrasi sel radang dengan kondisi mukosa lambung yang masih normal. Pada paparan 100 ppm sudah terjadi kerusakan mukosa lambung yang ditandai dengan adanya deskuamasi epitel yang disertai infiltrasi sel radang. Pada paparan 150 ppm menunjukkan adanya deskuamasi epitel, infiltrasi sel radang dan vasodilatasi. Kemudian pada paparan 200 ppm juga menunjukkan adanya deskuamasi epitel, infiltrasi sel radang dan vasodilatasi pembuluh darah. Kerusakan paling parah terjadi pada paparan 200 ppm karena infiltrasi sel radang yang terjadi paparan 200 ppm terdapat pada bagian mukosa dan submukosa.

Berdasarkan data statistik kadar MDA organ lambung dan gambaran histopatologi organ lambung yang didapat pada penelitian ini menunjukkan bahwa kerusakan histopatologi seiring dengan peningkatan kadar MDA dengan kerusakan

lambung yang paling parah ditunjukkan pada paparan 200 ppm. Kerusakan lambung yang semakin parah disebabkan oleh tingginya kadar peroksidasi lipid yang ditandai dengan peningkatan kadar MDA pada setiap peningkatan konsentrasi klorin yang diberikan. Hal ini sesuai dengan pendapat Shali (2015), bahwa semakin parah kerusakan sel maka semakin tinggi kadar peroksidasi lipid yang ditunjukkan dengan adanya peningkatan kadar MDA. Sehingga dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi paparan klorin yang diberikan maka akan meningkatkan kerusakan jaringan lambung yang ditandai dengan peningkatan kadar MDA.



BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa :

1. Pemberian klorin berlebih pada konsentrasi 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, dan 200 ppm mampu meningkatkan kadar MDA (malondialdehida) organ lambung tikus putih (*Rattus novergicus*) dengan peningkatan yang signifikan pada paparan 200 ppm ($p < 0,05$).
2. Pemberian klorin berlebih pada konsentrasi 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, dan 200 ppm mampu mengakibatkan kerusakan mukosa lambung tikus putih (*Rattus novergicus*) dengan kerusakan paling parah pada paparan 200 ppm.
3. Peningkatan kadar MDA menyebabkan peningkatan kadar MDA kerusakan lambung pada pemberian klorin berlebih dengan konsentrasi 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm dan 200 ppm.

6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menganalisis patomekanisme paparan klorin terkait marker biomolekuler kerusakan sel dan penambahan perlakuan terapi untuk mengetahui jenis terapi yang sesuai jika terpapar klorin dengan konsentrasi yang tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Aisyah, S., Balqis, U., dan Friyan, K, E. 2014. Histopatologi Jantung Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Akibat Pemberian Minyak Jelantah. *Banda Aceh. Jurnal Medica Veterinaria*
- Australian Government. 2009. *National Farm Biosecurity Manual Poultry Production*. Departement of Agriculture, Fisheries And Forestry
- Eman B, E. 2016. Effect Of Ellagic Acid On Gastric Mucosa Of Experimentally Induced Gastric Ulcer: Histological And Immunohistochemical Study. *Kairo. European Journal Of Pharmaceutical And Medical Research*
- Hartini, H dan Pertiwi, A. 2016. Penentuan Kadar Klorin (Cl_2) Pada Tepung Terigu Yang Dijual Dipasar Kodim Kota Pekanbaru Dengan Metode Spektrofotometri. Pekanbaru. *Jurnal Sains Dan Teknologi Laboratorium Medik*
- Hermiyanti, P. 2016. Pengaruh Paparan Klorin Di Udara Terhadap Peroksidasi Lipid Pada Pekerja Kolam Renang. Surabaya. *Jurnal Penelitian Kesehatan Suara Forikes*
- Hestianah, P. 2014. *Buku Ajar Histologi Veteriner*. Surabaya. PT. Revka Petra Media
- Jusuf, A. 2009. *Histoteknik Dasar*. Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Depok.
- Handriyanto. 2010. *Pendeteksian Gas Klor Dan Analisis Kualitas Air PDAM Di Titik Terjauh Dan Pemahaman Masyarakat Terhadap Gas Klor Di Wilayah Pelanggan Ipa Jurug Kota Surakarta* [Skripsi]. Jurusan Teknik Sipil Non Regular Fakultas Teknik. Universitas Sebelas Maret Surakarta
- Kemenkes RI. 2010. *Peraturan menteri kesehatan tentang Persyaratan Kualitas Air Minum No. 492 /menkes /per/IV/2010*
- Kemenkes RI. 2012. *Peraturan menteri kesehatan tentang bahan tambahan pangan No. 033 /menkes /per/IX/2012*
- Kusriningrum, R.S. 2008. *Perancangan Percobaan: Untuk Penelitian Bidang Biologi, Pertanian, Peternakan, Perikanan, Kedokteran, Kedokteran Hewan, Farmasi*. Cetakan Pertama. Airlangga University Press. Surabaya.

- Mac Farlare PS, Reid R, dan Callander R. 2000. *Pathology Illustrated*. Toronto. Huerchill livingstone. Pp: 32-53; 301-310.
- Malik A. 1992. Mekanisme Proteksi Mukosa Saluran Cerna. *Cermin Dunia Kedokteran*.79:5-8.
- Maula, F, I. 2014. *Uji fertilitas ekstrak N-heksana biji jarak pagar (jatropha curcas L.) pada tikus jantan (rattus novergicus) galur Sprague dawley secara in vivo* [Skripsi].Fakultas Kedokteran Dan Ilmu Kesehatan. UIN syarif Hidayatullah Jakarta
- Marnett, L.J. 1999. Lipid Peroxidation–DNA damage by Malondialdehyde. *Mutation Research*. 424. 8-95.
- Masruroh, A dan Sri widyarti, 2013.Uji Kemampuan Antioksidan Ekstrak Etanol Dan Kloroform Rumput Laut Melalui Penghambatan Peroksidasi Lipid Homogenate Hepar Mencit. Malang. *Jurnal Biotropika*
- Nugroho, R, N. 2009. Klorinasi Telur Ayam Ras Konsumsi Dengan Metode Imersi Untuk Mendisinfeksi Permukaan Kerabang Yang Tercemar Virus HPAI Subtipe H5 [Tesis]. Sekolah Pascasarjana. Institute Pertanian Bogor
- Nurnawati, H. 2015. *Kandungan Klorin Pada Beras Putih Di Pasar Tanjung Kabupaten Jember*[Skripsi].Fakultas Kesehatan Masyarakat. Universitas Jember
- Paulsen F, Waschke J. 2011. *Sobotta atlas of human anatomy*. United States of America: Elsevier Health Sciences.
- Puspitasari, A,D. 2008. *Gambaran histopatologi lambung tikus putih (rattus novergicus) akibat pemberian asam asetil salisilat* [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor
- Rohmah, S dan Lilis sulistyarini, 2017.Gambaran Konsumsi Udang Berklorin Terhadap Keluhan Kesehatan Gastrointestinal Pekerja Sub Kontrak Perusahaan X. Surabaya.*Jurnal kesehatan lingkungan*
- Samsuar., Mariana, F., dan Setyowati, M. 2017. Analisis Kadar Klorin (Cl₂) Sebagai Pemutih Pada Rumput Laut(*Eucheuma Cottonii*) Yang Beredar Di Lampung.Lampung.*Jurnal farmasi Lampung*
- Shali L., Tan. Y. H., Wang. N., Zhang. J. Z., Lao. L., Wong. W. C., and Feng. Y. 2015. *The Role of Oxydative Stres and Antioxidants in Liver*

Disease. Receive: 12 August 2015; Accepted: 19 October 2015;
Published: 2 November 2015. Int.J.Sci.hal; 26087-26124

Surya, P, G. 2012. *Kadar malondialdehid yang tinggi meningkatkan risiko terjadinya preeclampsia*. Bagian / SMF Obstetri dan Ginekologi. Fakultas Kedokteran. Universitas Udayana

Suckow, M.A., Weisbroth, S.H., and Franklin, C.L. 2006. *The Laboratory Rat*. Elsevier., San Diego.

Tjiptaningdiyah, R., Hariyani, N., dan Handarini K. 2017. *Analisis Keamanan Pangan Pada Beras Kajian Dari Kandungan Klorin*. Surabaya. E-Journal Universitas Budi Utomo

Wijaya, H. 2007. Klorin Vs Pangan. Suara pembaruan

Werdhasari, A. 2014. Peran Antioksidan Bagi Tubuh. Jakarta. Jurnal Biotek Medisina Indonesia

Yomes, T, A. 2016. *Sifat Prooksidan Dan Antioksidan Vitamin C Dan Teh Hijau Pada Sel Khamir Candida Sp. Berdasarkan Peroksidasi Lipid* [Skripsi]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor.

Yustika, R,A. 2013. *Kadar Malondialdehid (MDA) Dan Gambaran Histologi Pada Ginjal Tikus Putih (Rattus Norvegicus) Pasca Induksi Cylosporine-A*. Malang. Kimia student journal Vol 1



Lampiran 1. Sertifikat 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.
NIP. 19600903 198802 2 001



Lampiran 2. Perhitungan Senyawa Klorin (Ca (ClO₂))

Senyawa klorin yang digunakan didapatkan dari CV. Dunia Kimia lestari

Granular Ca(ClO)₂ = 0,949 g/ 1 g senyawa

Setelah melalui titrasi didapatkan hasil dalam Ca(ClO)₂ mengandung 95% Cl₂

➤ Jumlah senyawa untuk membuat 50 ppm dalam 100 ml:

$$\frac{Cl_2}{Ca(ClO)_2} = \frac{50}{x}$$

$$\frac{71}{143} = \frac{50}{x}$$

$$71x = 50 \times 143$$

$$x = \frac{50 \times 143}{71}$$

$$x = 100,704 \text{ mg}$$

$$50 \text{ ppm} = 10,0704 \text{ mg} / 100 \text{ mL}$$

➤ Jumlah senyawa untuk membuat 100 ppm dalam 100 ml:

$$\frac{Cl_2}{Ca(ClO)_2} = \frac{100}{x}$$

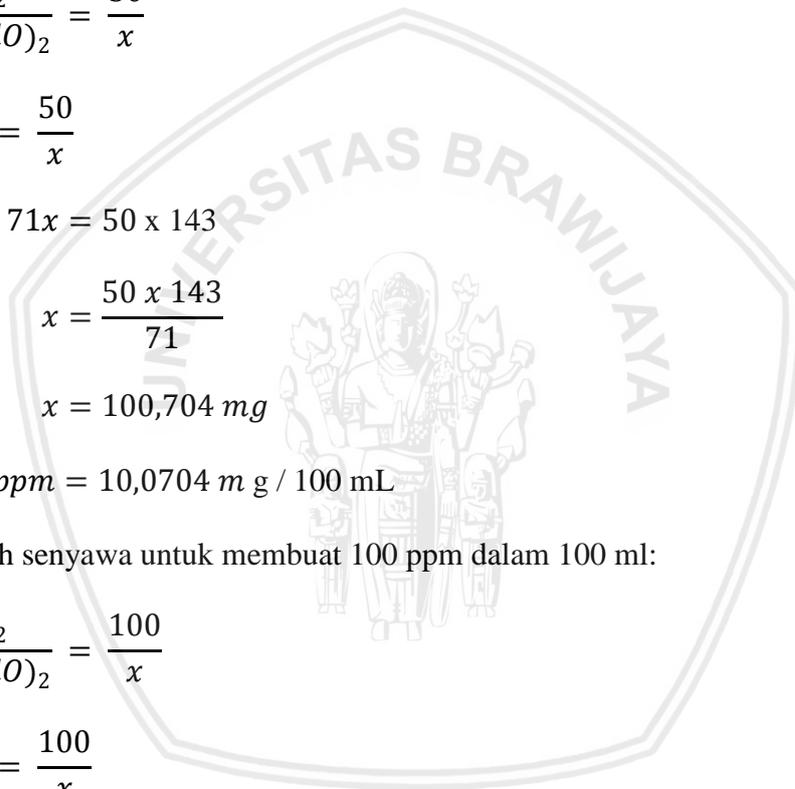
$$\frac{71}{143} = \frac{100}{x}$$

$$71x = 1000 \times 143$$

$$x = \frac{100 \times 143}{71}$$

$$x = 201,408 \text{ mg}$$

$$100 \text{ ppm} = 20,1408 \text{ mg} / 100 \text{ mL}$$



- Jumlah senyawa untuk membuat 150 ppm dalam 100 ml:

$$\frac{Cl_2}{Ca(ClO)_2} = \frac{150}{x}$$

$$\frac{71}{143} = \frac{150}{x}$$

$$71x = 150 \times 143$$

$$x = \frac{150 \times 143}{71}$$

$$x = 302,112 \text{ mg}$$

$$150 \text{ ppm} = 30,02112 \text{ mg} / 100 \text{ mL}$$

- Jumlah senyawa untuk membuat 200 ppm dalam 100 ml:

$$\frac{Cl_2}{Ca(ClO)_2} = \frac{200}{x}$$

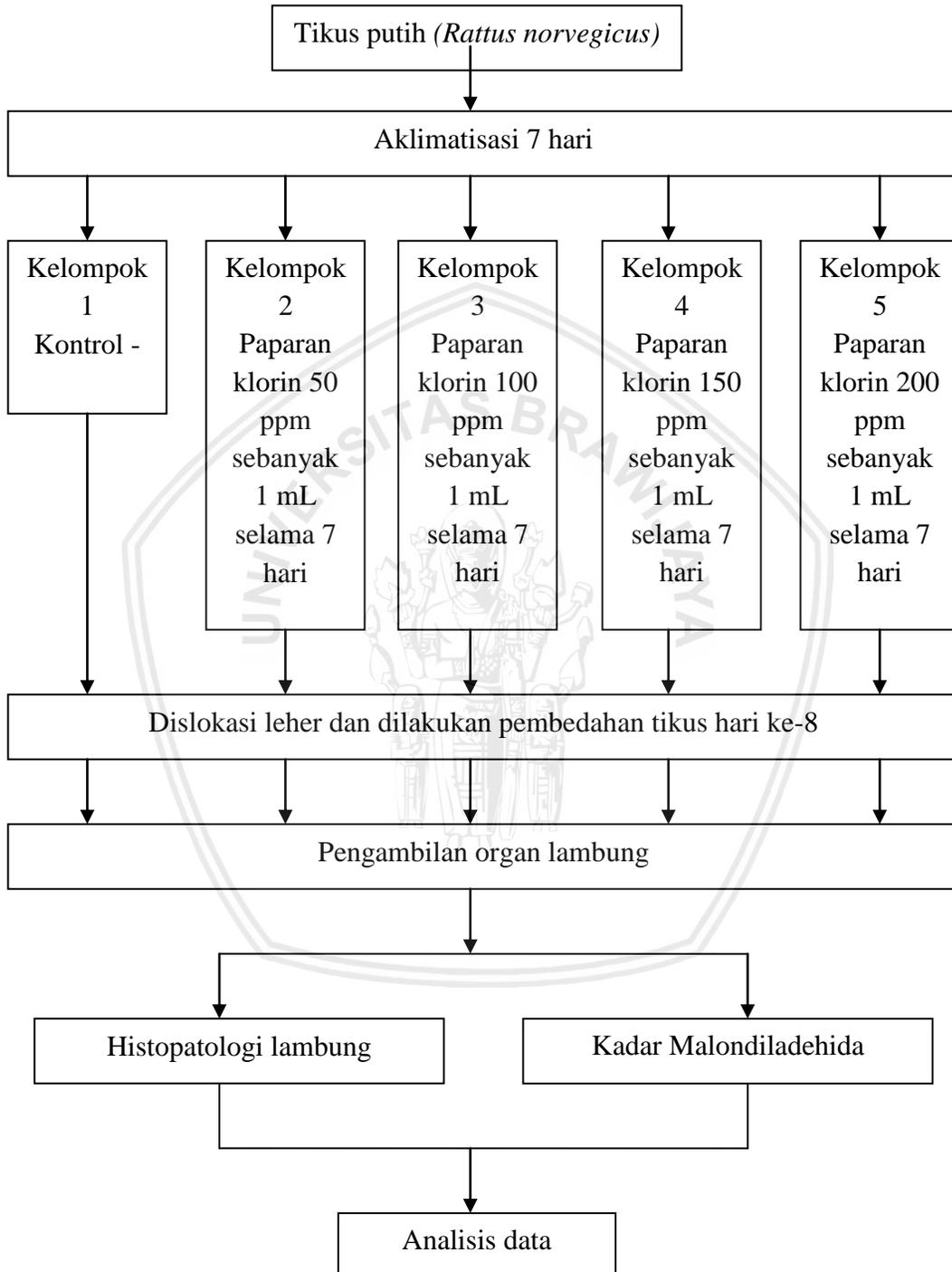
$$\frac{71}{143} = \frac{200}{x}$$

$$71x = 200 \times 143$$

$$x = \frac{200 \times 143}{71}$$

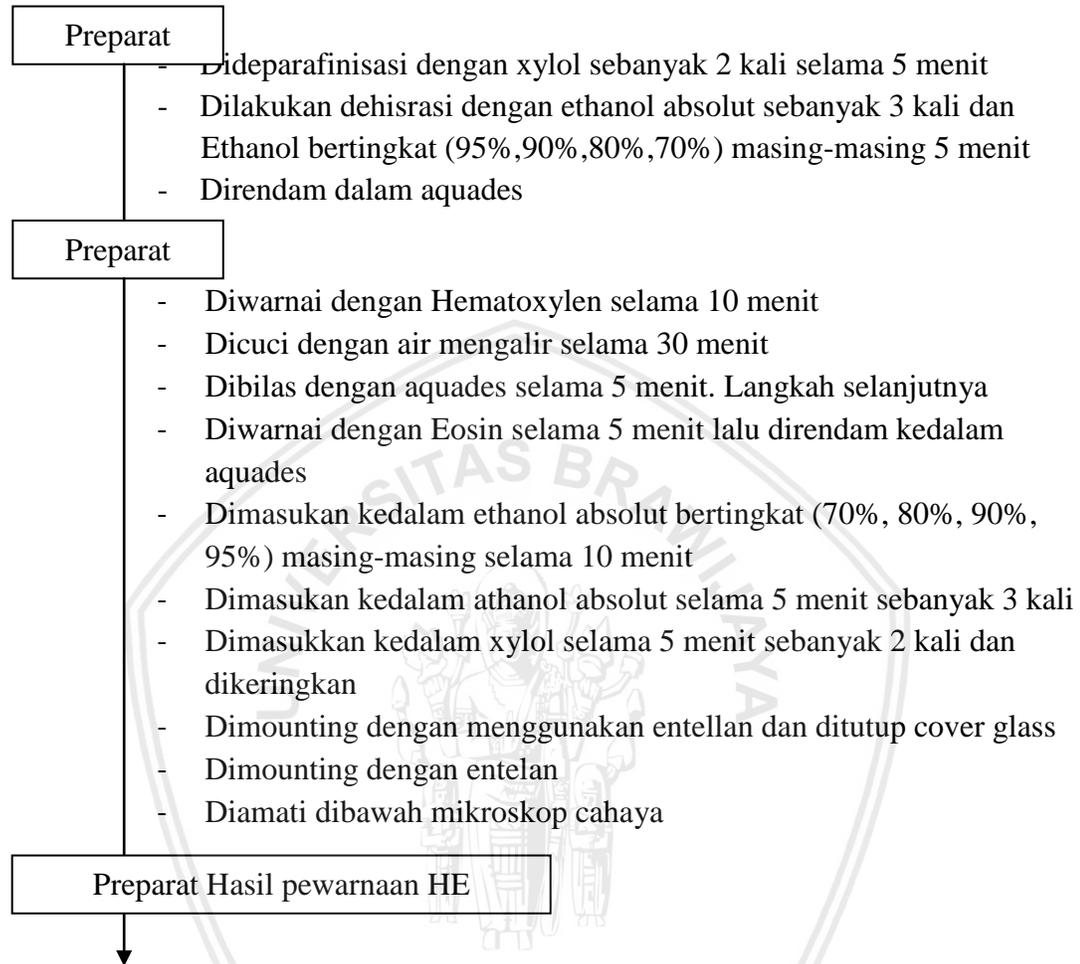
$$x = 402,816 \text{ mg}$$

$$200 \text{ ppm} = 40,2816 \text{ mg} / 100 \text{ mL}$$

Lampiran 3. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian

Lampiran 4. Pembuatan Preparat Gambaran Histopatologi Jaringan

4.1 Pewarnaan Hematoxylin-Eosin



Lampiran 5. Penentuan kadar MDA (malondialdehida)**5.1 Pembuatan Kurva Standar MDA****Larutan Standar MDA Konsentrasi**

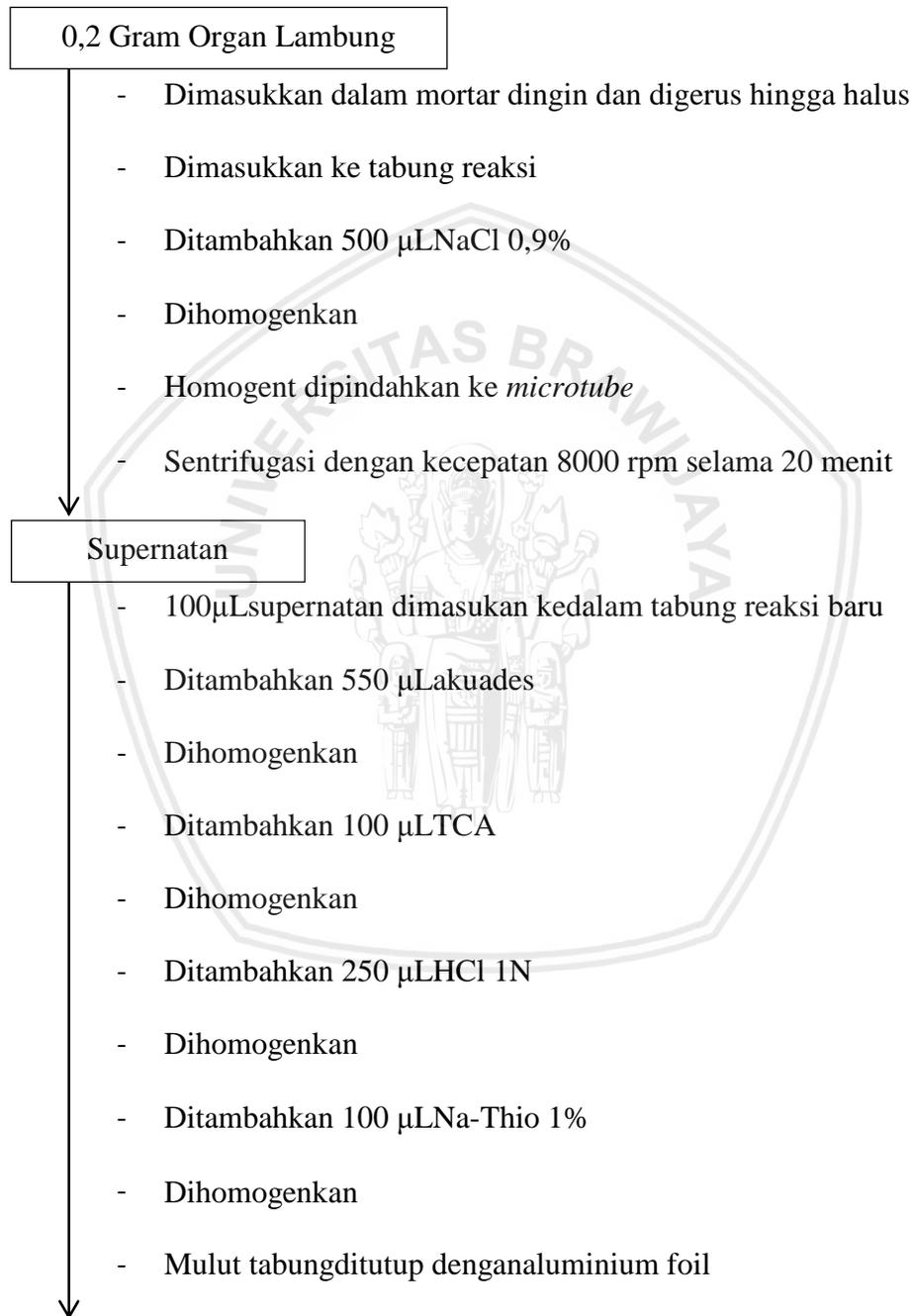
- Di pipet 100 μ L
- Dimasukkan dalam tabung reaksi kecil
- Ditambahkan 550 μ L aquades
- Ditambahkan 100 μ L TCA 10 %
- Dihomogenkan dengan vortex
- Ditambahkan 250 μ L HCl 1N
- Dihomogenkan dengan vortex
- Ditambahkan 100 μ L Na-Thio
- Dihomogenkan dengan vortex
- Disentrifuge 800 rpm selama 20 menit

Supernatan

- Diinkubasi pada waterbath 100 $^{\circ}$ C selama 230 menit
- Dibiarkan dalam suhu ruang
- Diukur absorbansinya dengan spektrofotometer (λ 535nm)

Absorbansi Larutan Standard Dan Kurva Standar MDA

5.2 Pengukuran Kadar Malondialdehida (MDA) Menggunakan Uji TBA



- Diinkubasi dalam *waterbath* dengan suhu 100°C selama 30 menit
- Didinginkan di suhu ruang
- Disentrifugasi dengan kecepatan 500rpm selama 10 menit
- Dipindahkan ke tabung reaksi baru
- Diukur absorbansinya dengan spektrofotometer ($\lambda_{\text{maks}}=535\text{nm}$)
- Diplotkan pada kurva standar

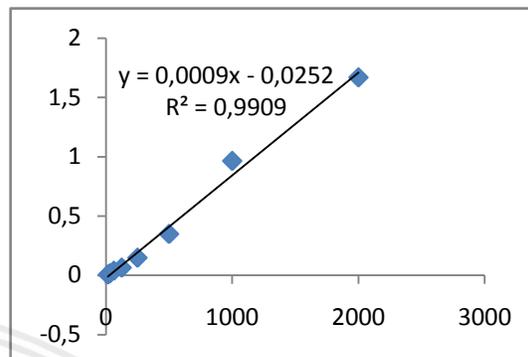
Supernatan



Lampiran 6. Hasil pemeriksaan kadar MDA menggunakan uji TBA

Tabel 6.1 Tabel Dan Kurva Standar Absorbansi

No	Kadar (ng/ml)	Abs
1	16.125	0.006
2	31.25	0.016
3	62.5	0.038
4	125	0.064
5	250	0.148
6	500	0.348
7	1000	0.964
8	2000	1.668

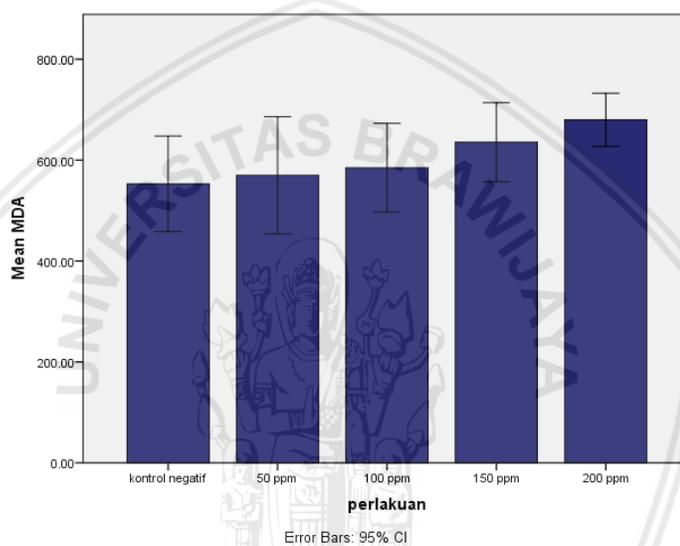


Tabel 6.2 Tabel Kadar MDA Berdasarkan Nilai Absorbansi

No	Kode	Abs	Kadar (ng/ml)
1	K-1	0.466	545.8
2	K-2	0.420	494.7
3	K-3	0.457	535.8
4	K-4	0.547	635.8
Rata-rata			553.0
5	P1.1	0.579	671.3
6	P1.2	0.452	530.2
7	P1.3	0.430	505.8
8	P1.4	0.490	572.4
Rata-rata			569.9
9	P2.1	0.573	664.7
10	P2.2	0.477	558.0
11	P2.3	0.461	540.2
12	P2.4	0.494	576.9
Rata-rata			584.9
13	P3.1	0.573	664.7
14	P3.2	0.502	585.8
15	P3.3	0.517	602.4
16	P3.4	0.595	689.1
Rata-rata			635.5
17	P4.1	0.586	679.1
18	P4.2	0.558	648.0
19	P4.3	0.575	666.9
20	P4.4	0.628	725.8
Rata-rata			679.9

Tabel 6.3 Tabel Rata-Rata Kadar MDA dan Diagram Kadar MDA

No	Kode	Kadar (ng/ml)
1	K-	553.0
2	P1	569.9
3	P2	584.9
4	P3	635.5
5	P4	679.9



Kadar MDA lambung

Lampiran 7. Uji Stastik Kadar MDA

Descriptives

MDA

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
k-	4	553.0250	59.44860	29.72430	458.4290	647.6210	494.70	635.80
p1	4	569.9250	72.96828	36.48414	453.8162	686.0338	505.80	671.30
p2	4	584.9500	55.23806	27.61903	497.0539	672.8461	540.20	664.70
p3	4	635.5000	49.29943	24.64971	557.0536	713.9464	585.80	689.10
p4	4	679.9500	33.13633	16.56817	627.2227	732.6773	648.00	725.80
Total	20	604.6700	68.76277	15.37582	572.4880	636.8520	494.70	725.80

1. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

MDA

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.490	4	15	.743

Uji homogenitas ini bertujuan untuk berlaku tidaknya asumsi ANOVA, yaitu apakah kelima kelompok perlakuan mempunyai varian yang sama dan untuk mengetahui apakah asumsi kelima kelompok perlakuan mempunyai varian yang sama dapat diterima, sebelumnya perlu dipersiapkan hipotesis tentang hal itu.

Adapun hipotesisnya adalah sebagai berikut:

H_0 : Kelima Variansi populasi adalah sama

H_1 : kelima variansi populasi adalah tidak sama

Dengan pengambilan keputusan :

- a) Jika signifikan > 0.05 maka H_0 diterima
- b) Jika signifikan < 0.05 maka H_0 ditolak

Berdasarkan hasil yang diperoleh pada *Test of Homogeneity of Variances*, dimana dihasilkan bahwa probabilitas atau signifikannya adalah 0.743 yang berarti lebih besar dari 0.05 maka dapat disimpulkan bahwa hipotesis awal (H_0) diterima, yang berarti asumsi bahwa kelima varian populasi adalah sama (homogen) dapat diterima, sehingga dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA.

2. Uji Normalitas

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	Df	Sig.	Statistic	Df	Sig.
MDA	.159	20	.200 [*]	.942	20	.258

Uji normalitas menunjukkan hasil p (signifikan) > 0.05 , hal ini menunjukkan bahwa data berdistribusi normal dan dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA.

3. Uji One-way ANOVA

ANOVA

MDA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	43523.467	4	10880.867	3.524	.032
Within Groups	46314.595	15	3087.640		
Total	89838.062	19			

Uji ANOVA untuk menguji apakah kelima sampel mempunyai rata-rata yang sama. Output ANOVA adalah akhir dari perhitungan yang digunakan sebagai penentuan analisis terhadap hipotesis yang akan diterima atau ditolak.

Dalam hal ini, hipotesis yang akan diuji adalah:

H_0 = tidak ada perbedaan kadar MDA dengan pemberian klorin berlebih yang berbeda (sama)

H_1 = ada perbedaan kadar MDA dengan pemberian klorin berlebih yang berbeda (tidak sama)

Untuk menentukan H_0 atau H_1 diterima atau tidak, maka ketentuan yang harus diikuti adalah sebagai berikut:

Jika signifikan atau probabilitas > 0.05 maka H_0 diterima

Jika signifikan atau probabilitas < 0.05 maka H_0 ditolak

Berdasarkan hasil yang diperoleh pada uji ANOVA, nilai probabilitas adalah $0.032 < 0.05$ dengan taraf kepercayaan 95%. Dengan demikian hipotesis awal (H_0) ditolak. Hal ini menunjukkan bahwa ada perbedaan kadar MDA dengan pemberian klorin yang berbeda. Pemberian klorin yang berbeda mempunyai pengaruh terhadap kadar MDA. Karena hasil analisis ANOVA menunjukkan adanya perbedaan kadar MDA pada setiap kelompok perlakuan, maka dilanjutkan dengan uji *Tukey* atau *BNJ*

(Benar Nyata Jujur) untuk mengetahui adanya perbedaan yang signifikan dari kadar MDA dengan pemberian klorin.

4. Uji Tukey/ BNJ (Beda Nyata Jujur)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: MDA

Tukey HSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
k-	p1	-16.90000	39.29147	.992	-138.2291	104.4291
	p2	-31.92500	39.29147	.923	-153.2541	89.4041
	p3	-82.47500	39.29147	.270	-203.8041	38.8541
	p4	-126.92500*	39.29147	.038	-248.2541	-5.5959
p1	k-	16.90000	39.29147	.992	-104.4291	138.2291
	p2	-15.02500	39.29147	.995	-136.3541	106.3041
	p3	-65.57500	39.29147	.480	-186.9041	55.7541
	p4	-110.02500	39.29147	.085	-231.3541	11.3041
p2	k-	31.92500	39.29147	.923	-89.4041	153.2541
	p1	15.02500	39.29147	.995	-106.3041	136.3541
	p3	-50.55000	39.29147	.703	-171.8791	70.7791
	p4	-95.00000	39.29147	.164	-216.3291	26.3291
p3	k-	82.47500	39.29147	.270	-38.8541	203.8041
	p1	65.57500	39.29147	.480	-55.7541	186.9041
	p2	50.55000	39.29147	.703	-70.7791	171.8791
	p4	-44.45000	39.29147	.788	-165.7791	76.8791
p4	k-	126.92500*	39.29147	.038	5.5959	248.2541
	p1	110.02500	39.29147	.085	-11.3041	231.3541
	p2	95.00000	39.29147	.164	-26.3291	216.3291
	p3	44.45000	39.29147	.788	-76.8791	165.7791

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

Hasil Uji *Tukey* menunjukkan adanya tanda (*) pada perlakuan 4 terhadap kontrol negatif yang artinya terdapat perbedaan signifikan pada rata-rata nilai tengah perlakuan 4, dengan kata lain bahwa pada perlakuan 4 atau pemberian klorin dengan konsentrasi 200 ppm memberikan pengaruh yang signifikan terhadap kontrol negatif.

5. Uji *Homogenous Subsets*

MDA

Tukey HSD^a

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
k-	4	553.0250	
p1	4	569.9250	569.9250
p2	4	584.9500	584.9500
p3	4	635.5000	635.5000
p4	4		679.9500
Sig.		.270	.085

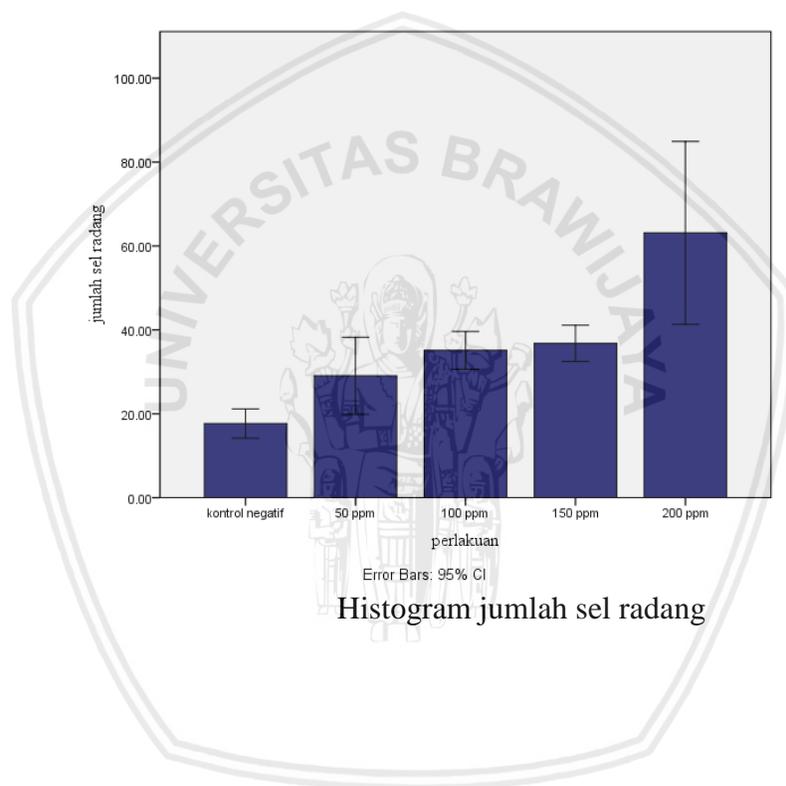
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

Untuk mengetahui kelompok mana saja yang mempunyai perbedaan rata-rata yang tidak signifikan, maka diperlukan output *Homogenous Subsets*.

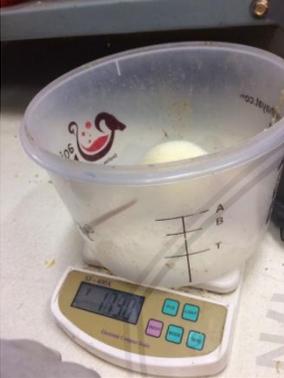
lampiran 8. Hasil Perhitungan Sel Radang

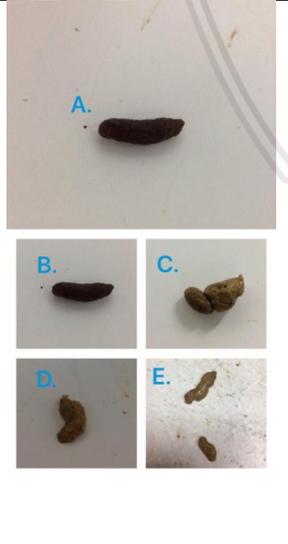
	1	2	3	Rerata	Standard deviasi
K-	17.8	16.2	19	17.67	1.40
P1	25.4	29	32.8	29.06	3.70
P2	37.2	34.4	33.8	35.13	1.81
P3	34.8	38	37.6	36.8	1.74
P4	53	68	68.4	63.13	8.77



Lampiran 9. Dokumentasi

Gambar	Keterangan
--------	------------

	<p>Kondisi kandang saat pemeliharaan</p>
	<p>Penimbangan berat badan tikus</p>
	<p>Penimbangan Klorin sebelum dilarutkan</p>
	<p>Proses penggerusan klorin, dan pelarutan dengan akuades</p>

	<p>Proses titrasi klorin</p>
	<p>Proses penyondean klorin pada tikus</p>
	<p>Proses nekropsi tikus</p>
	<p>A. Feses tikus kontrol negatif: warna coklat kehitaman, konsistensi padat</p> <p>B. Feses tikus perlakuan 1: warna coklat kehitaman, konsistensi padat</p> <p>C. Feses tikus perlakuan 2 : warna coklat terang, konsistensi lebih lunak</p> <p>D. Feses tikus perlakuan 3 : warna coklat terang, konsistensi seperti pasta</p> <p>E. Feses tikus perlakuan 4 : warna coklat terang, konsistensi lebih lunak dan berair</p>