

**PENGARUH PREVENTIF PEMBERIAN SUSU KUDA
SUMBAWA TERHADAP EKSPRESI IL-6 DAN
HISTOPATOLOGI LAMBUNG PADA TIKUS
PUTIH (*Rattus norvegicus*) MODEL IBD
(*Inflammatory Bowel Disease*) HASIL
INDUKSI INDOMETASIN**

SKRIPSI

Oleh :

**THERESA LIDYA PRAMESTI
155130101111031**



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

**PENGARUH PREVENTIF PEMBERIAN SUSU KUDA
SUMBAWA TERHADAP EKSPRESI IL-6 DAN
HISTOPATOLOGI LAMBUNG PADA TIKUS
PUTIH (*Rattus norvegicus*) MODEL IBD
(*Inflammatory Bowel Disease*) HASIL
INDUKSI INDOMETASIN**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :

**THERESA LIDYA PRAMESTI
155130101111031**



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

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**PENGARUH PREVENTIF PEMBERIAN SUSU KUDA SUMBAWA
TERHADAP EKSPRESI IL-6 DAN HISTOPATOLOGI
LAMBUNG PADA TIKUSPUTIH (*Rattus norvegicus*)
MODEL IBD (*Inflammatory Bowel Disease*)
HASIL INDUKSI INDOMETASIN**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji

pada 22 Maret 2019

dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh
gelar Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :

THERESA LIDYA PRAMESTI

NIM. 155130101111031

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS.

NIP. 195204121980021001

drh. Nurina Titisari, M.Sc.

NIP. 198601222015042001

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 dibawah:

Nama : Theresa Lidya Pramesti
NIM : 155130101111031
Program Studi : Fakultas Kedokteran Hewan
Penulis Skripsi berjudul :

Pengaruh Preventif Pemberian Susu Kuda Sumbawa Terhadap Ekspresi IL6 dan Histopatologi Lambung Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Model IBD (Inflammatory Bowel Disease) Hasil Induksi Indometasin.

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termasuk 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, 22 Maret 2019

Yang menyatakan,

Theresa Lidya Pramesti
NIM. 155130101111031

Pengaruh Preventif Pemberian Susu Kuda Sumbawa Terhadap Ekspresi IL6 dan Histopatologi Lambung Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Model IBD (*Inflammatory Bowel Disease*) Hasil Induksi Indometasin

ABSTRAK

Inflammatory Bowel Disease (IBD) merupakan penyakit yang ditandai dengan adanya inflamasi pada saluran pencernaan yang terkait dengan perubahan histopatologi mukosa pada saluran pencernaan seperti lambung, usus dan kolon dalam bentuk kerusakan epitel di lamina propria mukosa. Tikus putih hewan model IBD (*Inflammatory Bowel Disease*) dapat dibuat menggunakan indometasin yang masuk dalam golongan *Non Steroidal Antiinflamation Drug* (NSAIDs). Indometasin dalam pembuatan hewan model IBD mengakibatkan perubahan histologi lambung dan memicu sitokin pro-inflamasi seperti IL-6 pada fase inflamasi. Penanganan saat ini banyak dikembangkan cara preventif sebagai alternatif untuk mencegah timbulnya suatu penyakit, salah satunya dengan susu kuda Sumbawa yang mengandung komponen bioaktif sebagai antioksidan eksogen, antiinflamasi dan antimikroba. Penelitian ini bersifat eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Tikus jantan dengan berat 150-200 gram dan berumur 8 minggu dibagi dalam lima kelompok perlakuan, yaitu kontrol negatif (tikus sehat), kontrol positif (tikus tanpa pemberian susu kuda Sumbawa, dan diinduksi indometasin dengan dosis 15mg/kgBB), perlakuan 1, 2, dan 3 yaitu tikus pemberian susu kuda Sumbawa dengan dosis 0,5mL, 1mL, 1,5mL dan diinduksi indometasin dengan dosis 15mg/kgBB. Parameter yang diamati adalah ekspresi IL-6 dan histopatologi lambung. Pengamatan IL-6 menggunakan metode *Flowcytometri*, sedangkan histopatologi lambung menggunakan pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa tikus yang diberi preventif susu kuda Sumbawa menunjukkan adanya peningkatan ekspresi IL-6 sangat nyata ($p<0.01$) dan mampu memperbaiki kerusakan gambaran histopatologi organ lambung tikus model IBD. Kesimpulan penelitian yaitu pemberian susu kuda Sumbawa mampu mencegah kenaikan ekspresi IL-6 dan mencegah terjadi erosi sel mukosa lambung akibat indometasin.

Kata Kunci : IBD (*Inflammatory Bowel Disease*), Indometasin, preventif, susu kuda Sumbawa, IL-6, dan Histopatologi Lambung.

The Effect of Sumbawa Horse Milk as Preventive on IL-6 Expression and Gastric Histopathology of IBD (Inflammatory Bowel Disease) in White Rat (*Rattus norvegicus*) Model by Indomethacin Induction

ABSTRACT

Inflammatory bowel disease (IBD) is characterized by the presence of inflammation in the digestive tract. IBD is associated to the changes in the histopathology of the mucous of the digestive tract such as the stomach, the intestines and the colon in the form of damage in the lamina propria mucosae. White rat animal models of IBD can be made by using indomethacin which belongs to the Non Steroidal Anti-Inflammatory Drug (NSAIDs) group. In the process of making the IBD model animals, indomethacin is being used to create some changes in histology of the stomach and trigger the pro-inflammatory cytokine such as IL-6 in inflammatory phase. Many treatments have been improved preventively as an alternative to prevent diseases to occur, one of which is Sumbawa horse milk which contains bioactive components as exogenous antioxidants, anti-inflammatory and antimicrobial. This research is experimental using a completely randomized design (CRD). Male rats weighing 150-200 grams and 8 weeks old were divided into five treatment groups, namely negative controls (healthy rat), positive controls (rat without Sumbawa horse milk, and indomethacin induced at a dose of 15 mg / kg), treatment 1, 2 and 3, namely rats given Sumbawa horse milk at a dose of 0.5mL, 1mL, 1.5mL and indomethacin induced at a dose of 15mg / kgBB. The parameters observed were expression of IL-6 and gastric histopathology. Observation of IL-6 using Flowcytometry method, while gastric histopathology uses Hematoxylin-Eosin (HE) staining. The results of this study showed that rats given preventive Sumbawa horse milk showed a very significant increase in IL-6 expression ($p<0.01$) and were able to repair histopathological damage of IBD gastric organ models. The conclusion of the study was that Sumbawa horse milk was able to prevent the increase of IL-6 expression and prevent the erosion of gastric mucosa due to indomethacin.

Key words : IBD (*Inflammatory Bowel Disease*), Indomethacin, preventive, Sumbawa Horse milk, IL-6, and Gastric Histopathology.

KATA PENGANTAR

Puji syukur atas kehadirat Tuhan Yang Maha Esa atas berkat dan anugrah yang diberikan sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul **“Pengaruh Preventif Pemberian Susu Kuda Sumbawa Terhadap Ekspresi IL6 dan Histopatologi Lambung Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Model IBD (Inflammatory Bowel Disease) Hasil Induksi Indometasin”**. Penelitian ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan di Program Studi Kedokteran Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya.

Penyusun menyampaikan terima kasih sebesar-besarnya kepada seluruh pihak yang telah membantu dalam penyusunan skripsi ini, secara khusus penyusun menyampaikan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS., selaku Dosen Pembimbing I yang telah berkenan memberikan bimbingan, kesabaran, waktu, motivasi sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi.
2. Drh. Nurina Titisari, M.Sc., selaku Dosen Pembimbing II atas segala bimbingan, kesabaran, nasihat, waktu, dan arahan yang diberikan tiada henti kepada penulis.
3. Drh. Ani Setianingrum, M.Sc., dan Drh. Wawid Purwatiningsih,M.Vet., selaku Dosen Penguji yang telah meluangkan waktu serta memberikan saran dan masukan dalam penulisan skripsi ini.
4. Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
5. Seluruh Jajaran Dekanat, Dosen, dan Staff Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya atas dorongan semangat dan fasilitas yang diberikan.
6. Keluarga penulis Yohanes Heru Suyono, Natalia Opkiswati selaku orang tua dan Elyzabeth Hilda Piaster selaku kakak yang telah memberikan dukungan, doa terbaik baik secara moril, maupun materi yang tak terhingga.
7. Tim penelitian “WILD HORSE” yakni Ravi, Oktalita dan Ristia atas kerjasama selama penelitian.

8. Sahabat penulis selama perkuliahan Cuek Aja Keleus, Ilham Akbar, Dinda, Isma, Agnes, Yulia, Taro, Gempit, OMK Tidar, KMK ST ASISI yang selalu memberikan semangat dan dukungan selama menjadi mahasiswa di kota rantau.
9. Teman-teman BRACHIAL dan DNA 2015 FKH UB yang telah banyak memberikan dukungan dan bantuan kepada penulis.
10. Seluruh pihak yang telah membantu dalam penyelesaian skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu.

Akhir kata, penulis berharap semoga Tuhan membalas segala kebaikan serta ketulusan yang telah diberikan. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat dan menambah ilmu pengetahuan bukan hanya untuk penulis namun untuk pembaca yang lain.

Malang, 22 Maret 2019

Penulis



DAFTAR ISI

| | |
|--|-------------|
| HALAMAN JUDUL | ii |
| LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI | iii |
| LEMBAR PERNYATAAN | iv |
| ABSTRAK | v |
| ABSTRACT | vi |
| KATA PENGANTAR..... | vii |
| DAFTAR ISI..... | ix |
| DAFTAR GAMBAR..... | xi |
| DAFTAR TABEL | xii |
| DAFTAR LAMPIRAN | xiii |
| DAFTAR ISTILAH 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 Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)..... | 6 |
| 2.2 Lambung | 7 |
| 2.2.1 Anatomi..... | 7 |
| 2.2.1 Fisiologi | 8 |
| 2.2.1 Histologi..... | 8 |
| 2.3 IBD (<i>Inflammatory Bowel Disease</i>)..... | 9 |
| 2.4 Indometasin | 10 |
| 2.5 Patomekanisme IBD oleh Indometasin | 12 |
| 2.5.1 Interleukin-6 (IL-6) | 13 |
| 2.5.2 Histopatologi Lambung | 14 |
| 2.6 Susu Kuda Sumbawa | 15 |
| BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN | |
| 3.1 Kerangka Konsep | 18 |
| 3.2 Kerangka Konseptual | 19 |
| 3.3 Hipotesis Penelitian..... | 21 |
| BAB 4 METODE PENELITIAN | |
| 4.1 Tempat dan Waktu Penelitian | 22 |
| 4.2 Alat dan Bahan..... | 22 |
| 4.3 Sampel Penelitian..... | 23 |

| | |
|--|-----------|
| 4.4 Rancangan Penelitian | 23 |
| 4.5 Variabel Penelitian | 24 |
| 4.6 Tahapan Penelitian | 25 |
| 4.7 Prosedur Kerja..... | 25 |
| 54.7.1 Persiapan Hewan Coba | 25 |
| 4.7.2 Pembuatan Hewan Model IBD | 26 |
| 4.7.3 Pemberian Susu Kuda Sumbawa | 27 |
| 4.7.4 Isolasi Organ Lambung | 27 |
| 4.7.5 Pembuatan Preparat Histopatologi Lambung | 28 |
| 4.7.6 Ekspresi IL-6 | 29 |
| 4.8 Analisis Data | 30 |
| BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN | |
| 5.1 Ekspresi IL-6 pada Tikus Putih..... | 31 |
| 5.2 Histopatologi Lambung pada Tikus Putih | 35 |
| DAFTAR PUSTAKA | 41 |
| LAMPIRAN..... | 46 |

DAFTAR GAMBAR

| Gambar | Halaman |
|---|----------------|
| 2.1 Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) galur Wistar | 6 |
| 2.2 Anatomi lambung tikus | 8 |
| 2.3 Histologi lambung normal | 9 |
| 2.4 Struktur Molekul Indometasin | 11 |
| 2.5 Histopatologi Lambung yang terkena IBD | 15 |
| 5.2 Histopatologi mukosa lambung tikus putih..... | 35 |



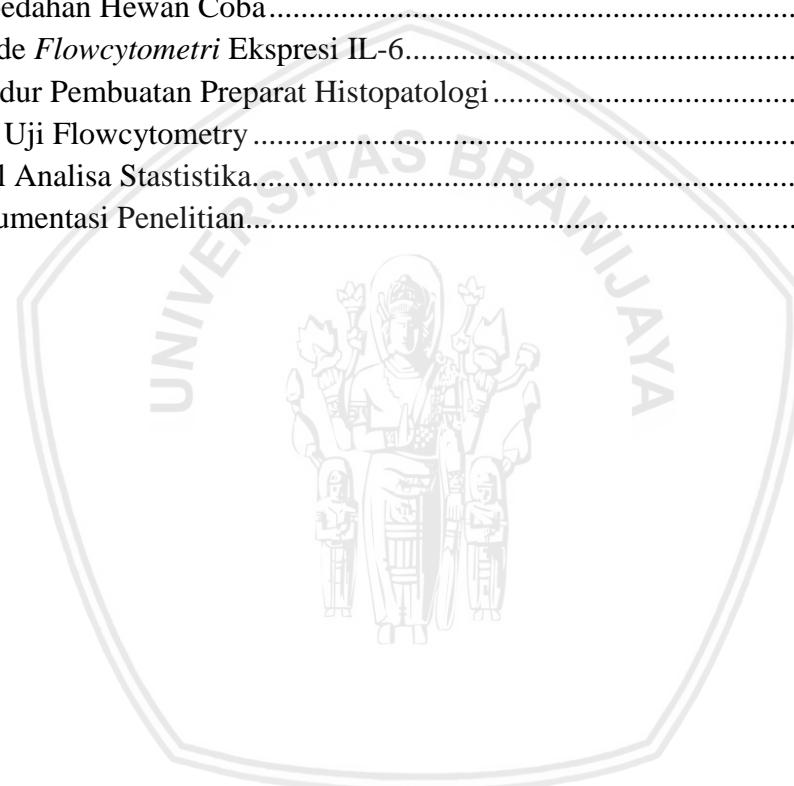
DAFTAR TABEL

| Table | Halaman |
|---|----------------|
| 4.1 Kelompok Perlakuan pada Penelitian | 23 |
| 4.2 ANOVA (<i>Analysis of Variance</i>) | 23 |
| 5.1 ANOVA (<i>Analysis of Variance</i>) Ekspresi IL-6 | 31 |
| 5.2 Tabel rata-rata ekspresi interleukin 6 (IL-6) organ lambung | 32 |



DAFTAR LAMPIRAN

| Lampiran | Halaman |
|---|----------------|
| 1. Sertifikat Laik Etik | 46 |
| 2. Hasil Uji Antioksidan dan Bakteri Asam Laktat..... | 47 |
| 3. Kerangka Operasional Penelitian | 48 |
| 4. Data Berat Badan Tikus | 49 |
| 5. Perhitungan Dosis Indometasin..... | 50 |
| 6. Pembedahan Hewan Coba..... | 51 |
| 7. Metode <i>Flowcytometri</i> Ekspresi IL-6..... | 52 |
| 8. Prosedur Pembuatan Preparat Histopatologi | 53 |
| 9. Hasil Uji Flowcytometry | 54 |
| 10. Hasil Analisa Stastistika..... | 59 |
| 11. Dokumentasi Penelitian..... | 64 |



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

| Simbol/singkatan | Keterangan |
|-------------------------|--|
| % | : Persen |
| ± | : Kurang lebih |
| °C | : Derajat Celcius |
| μl | : Mikroliter |
| ANOVA | : <i>Analysis of Variance</i> |
| BNF | : Buffer Neutral Formalin |
| BNJ | : Beda Nyata Jujur |
| kDa | : kilo dalton |
| cm | : Centimeter |
| g | : gram |
| HE | : Hematoksilin Eosin |
| NaCl | : Natrium Klorida |
| IL-1 | : Interleukin 1 |
| IL-6 | : Interleukin 6 |
| IL-18 | : Interleukin 18 |
| UC | : <i>ulcerative colitis</i> |
| CD | : <i>Crohn's disease</i> |
| kg | : kilogram |
| ATP | : <i>Adenosin Triphosphat</i> |
| kgBB | : kilogram berat badan |
| mL | : Mililiter |
| mg | : Miligram |
| mm | : Milimeter |
| PGI2 | : Prostasiklin |
| PGE2 | : Prostagrandin E2 |
| TXA2 | : Tromboxan A2 |
| DAB | : <i>Diamino Benzidine</i> |
| NF- κ B | : <i>Nuclear Factor kappa B</i> |
| pH | : <i>power of hidrogen</i> |
| PBS | : <i>Phospat Buffered Saline</i> |
| IgA | : Immune-globulin A |
| RAL | : Rancangan Acak Lengkap |
| ROS | : <i>reactive oxygen space</i> |
| TGF-1 β | : <i>Transforming Growth Factor 1 Beta</i> |
| TNF- α | : <i>Tumor Necrosis Factor Alfa</i> |
| COX | : <i>Siklooksigenase</i> |
| Biotin | : <i>Biotinylated Rabbit Anti-Rat IgG Antibody</i> |
| IBD | : <i>Inflammatory Bowel Disease</i> |

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

IBD (*Inflammatory Bowel Disease*) merupakan penyakit yang ditandai dengan adanya inflamasi pada saluran pencernaan yang terkait dengan perubahan histopatologi mukosa pada saluran pencernaan seperti lambung, usus dan kolon dalam bentuk infiltrasi sel radang di lamina propria mukosa (Washabau, 2008). Gejala umum dari IBD adalah diare dan pendarahan pada saluran pencernaan yang beresiko tinggi menyebabkan kerusakan saluran pencernaan (McFarland, 2008). IBD dibagi menjadi dua macam, yaitu *Ulcerative Colitis* (inflamasi kronik usus besar) dan *Chron's Disease* (inflamasi kronik usus halus) (Xavier and Podolsky, 2007). Menurut penelitian Volkman (2017), terdapat 136 kasus IBD (*Inflammatory Bowel Disease*) yang dilaporkan pada klinik hewan *Clinic for Small Animals, Faculty of Veterinary Medicine, Freie Berlin*, Jerman sepanjang tahun 2017.

Penyebab terjadinya IBD (*Inflammatory Bowel Disease*) belum diketahui secara pasti, namun diduga etiopatogenesinya dipengaruhi oleh faktor kegagalan regulasi imun, faktor eksogen, dan peranan flora usus (Thorenson *et al.* 2007). IBD (*Inflammatory Bowel Disease*) terjadi karena aktivasi sel T mukosa dan makrofag yang mengalami peningkatan ekspresi kemudian sebagai pencetus inflamasi dengan merangsang produksi sitokin pro-inflamasi seperti TNF, IL-6, IL-18 dan IL-1 β yang dapat memicu produksi radikal bebas berlebihan (Ahluwalia, 2018). Radikal bebas merupakan sekelompok bahan kimia baik atom maupun molekul yang memiliki elektron tidak berpasangan pada lapisan luarnya dan dapat menimbulkan terjadinya stres oksidatif (Suksamrarn, 2003). Stres oksidatif yang

terjadi dapat dinetralisir oleh senyawa antioksidan. Secara fisiologis tubuh akan memproduksi antioksidan endogen untuk mengatasinya, namun seringkali jumlahnya tidak mencukupi untuk menetralkan radikal bebas tersebut. Oleh karena itu, diperlukan suatu senyawa antioksidan eksogen untuk menekan radikal bebas yang bereaksi dengan komponen-komponen sel dan menimbulkan kerusakan sel organ (Arnelia, 2002).

Selain penyebab tersebut, beberapa penelitian menunjukkan bahwa penyebab IBD karena pemakaian obat anti-inflamasi non steroid (NSAID) seperti indometasin (Podolsky, 2002). Indometasin merupakan derivate indol-asam asetat yang digunakan sebagai pengobatan *arthritis*. Selain efek kuratifnya, indometasin memiliki efek samping yaitu dapat menghambat siklookksigenase (COX) 1 yang berfungsi terhadap sintesis prostaglandin dan produksi mukus untuk melindungi mukosa usus halus dari serangan bakteri dan virus penyebab infeksi (Takeuchi, 2003). Efek samping lain indometasin yaitu mempu meningkatkan radikal bebas, sehingga organ pencernaan mengalami kerusakan yang ditandai dengan berkurangnya mikroflora pada organ pencernaan (Strus *et al.*, 2009).

IBD (*Inflammatory Bowel Disease*) dapat diobati dengan menggunakan bahan kimia yaitu obat jenis steroid yang efektif untuk mengurangi peradangan, namun akan menimbulkan efek samping jika digunakan dalam jangka waktu lama yaitu dapat menghambat pembentukan tulang baru dan mempercepat kerusakan tulang (CCFA, 2013). Pada penelitian ini memberikan solusi sebagai tindakan pencegahan dengan menggunakan susu kuda Sumbawa. Susu kuda Sumbawa memiliki komponen protein yaitu lisozim (BM 17 kDa) dan laktoperin (BM 75 kDa)

yang berperan sebagai protein indigenus yang berfungsi untuk senyawa antimikroba dan memiliki senyawa bioaktif sebagai antioksidan yang berperan penting untuk melindungi tubuh dari kondisi stress oksidatif akibat dari proses inflamasi (Saputro, 2016). Elias (2008) menyatakan bahwa senyawa bioaktif pada susu kuda Sumbawa memiliki struktur primer asam amino histidin yang memiliki gugus imidazole sebagai pemberi hydrogen, penangkap lipid-peroksil radikal, dan hidrifobik yang berpotensi sebagai antioksidan eksogen.

Dari latar belakang di atas maka penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh preventif pemberian pemberian susu kuda Sumbawa, karena antioksidan pada susu kuda Sumbawa dapat menekan adanya inflamasi yang terjadi sehingga menurunkan kadar sitokin pro-inflamasi salah satunya IL-6 (Tonnesen *et al.* 2000). Selain itu, untuk melihat histopatologi organ lambung agar dapat mengetahui kerusakan yang terjadi pada tikus (*Rattus novergicus*) model IBD (*Inflammatory Bowel Disease*) yang diinduksi indometasin yang sesuai dengan rumusan masalah seperti di bawah ini.

1.2 Rumusan Masalah

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

1. Bagaimana pengaruh preventif pemberian susu kuda Sumbawa terhadap ekspresi IL-6 pada organ lambung tikus model IBD (*Inflammatory Bowel Disease*) yang diinduksi indometasin?
2. Bagaimana pengaruh preventif pemberian susu kuda Sumbawa terhadap histopatologi pada organ lambung tikus model IBD (*Inflammatory Bowel Disease*) yang diinduksi indometasin?

1.3 Batasan Masalah

1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus putis (*Rattus norvegicus*) jantan usia 8-12 minggu dengan berat antara 150-200 gram. Penggunaan hewan coba telah lolos sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya (KEP-UB) (**Lampiran 1**).
2. Induksi indometasin satu kali selama penelitian secara per oral diberikan menggunakan sonde lambung dengan dosis 15mg/kgBB (Aulanni'am, 2012). Indometasin didapatkan dari laboratorium farmakologi FK UB.
3. Susu kuda Sumbawa diperoleh dari pulau Sumbawa. Susu kuda Sumbawa diberikan satu kali dalam sehari dengan dosis 0,5mL , 1mL , 1,5mL selama 7 hari dengan menggunakan sonde lambung (Reni, 2010).
4. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah ekspresi IL-6 dan histopatologi pada organ lambung.

1.4 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui pengaruh preventif pemberian susu kuda Sumbawa terhadap ekspresi IL-6 pada organ lambung tikus model IBD (*Inflammatory Bowel Disease*) yang diinduksi indometasin.
2. Mengetahui pengaruh preventif pemberian susu kuda Sumbawa terhadap histopatologi pada organ lambung tikus model IBD (*Inflammatory Bowel Disease*) yang diinduksi indometasin.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dalam penelitian adalah sebagai berikut :

1. Bagi masyarakat yaitu sebagai bahan informasi pengaruh preventif pemberian susu kuda Sumbawa pada penyakit IBD (*Inflammatory Bowel Disease*).
2. Bagi mahasiswa yaitu sebagai dasar bagi penelitian selanjutnya yang berkaitan dengan pengaruh preventif terhadap ekspresi IL6 dan histopatologi pada organ lambung tikus model IBD (*Inflammatory Bowel Disease*) yang diinduksi indometasin.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Tikus putih memiliki ciri-ciri berwarna putih pada rambutnya, memiliki ekor panjang yang terdapat sedikit rambut dan memiliki deretan lingkaran sisik (Gambar 2.1). Berat badan tikus putih berkisar 90-200 gram. Menurut Mark (2005) klasifikasi tikus putih (*Rattus norvegicus*) adalah sebagai berikut:

| | | |
|---------|---|--------------------------|
| Kingdom | : | Animalia |
| Filum | : | Chordata |
| Kelas | : | Mamalia |
| Ordo | : | Rodentia |
| Subordo | : | Odontoceti |
| Familia | : | Muridae |
| Genus | : | Rattus |
| Species | : | <i>Rattus norvegicus</i> |

Gambar 2.1 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar (Kusumawati, 2004).

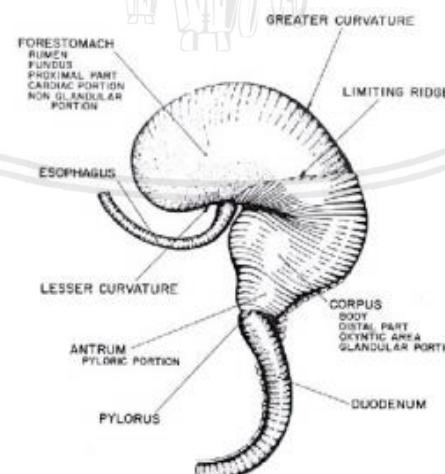
Tikus putih jenis *Wistar* merupakan salah satu hewan laboratorium. Hewan laboratorium merupakan hewan yang sengaja untuk dikembang biakkan sebagai hewan model dalam mempelajari serta mengembangkan berbagai macam ilmu dalam skala penelitian atau pengamatan laboratorik

(Wolfensohn dan Lloyd, 2003). Beberapa strain yang digunakan dalam penelitian antara lain *Wistar*, *Sprague Dawley*, *Long Evans* dan *Holdzman* namun strain yang paling sering digunakan adalah *Wistar* dan *Sprague*. Penggunaan tikus jantan lebih banyak digunakan daripada tikus betina disebabkan dari segi hormonal tikus jantan bersifat lebih stabil daripada tikus betina dan pemeliharaan tikus jantan jauh lebih mudah (Maley, 2003).

2.2 Lambung

2.2.1 Anatomi

Lambung merupakan bagian saluran pencernaan berbentuk kantong seperti huruf ‘J’, yang dapat mekar paling besar dengan volume 1200-1500 ml pada saat berdilatasi. Secara makroskopik lambung di bagi menjadi 4 bagian yaitu: kardia, fundus, korpus dan pylorus (Gambar 2.2) (Ganong, 2001).



Gambar 2.2 Anatomi lambung tikus (Baker, et al., 1979)

Lambung menerima makanan dan bekerja sebagai penampung untuk jangka waktu pendek (Pearce, 2006). Menurut Brown dan Hardisty (1990), lambung tikus dibedakan menjadi dua bagian yaitu lambung depan (bagian tipis di sebelah kiri) dan lambung kelenjar.

2.1.2 Fisiologi

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, asam hidroklorida (HCl), faktor intrinsik dan pepsinogen. Kelenjar pilorik berfungsi mensekresikan mucus untuk melindungi mukosa pilorus, juga beberapa pepsinogen, renin, lipase lambung dan hormon gastrin (Guyton, 1997).

2.1.3 Histologi

Menurut Gartner dan Hiatt (2001) serta Frappier (1998) menyatakan mukosa lambung depan (lambung nonkelenjar) berbentuk epitel pipih banyak lapis yang tertutupi oleh lapis keratin (Gambar 2.3). Ketebalan lapisan keratin bervariasi tergantung pada spesies, umur, diet dan derajat perluasan lambung.



Gambar 2.3 Histologi lambung normal (perbesaran 40x) (M) mucosa; (MM) muscularis mucosa; (SM) submucosa; (PG) pyloric gland; (GP) gastric pit; (BV) blood (Aryani, 2017).

Menurut Gartner dan Hiatt (2001), Lambung normal pada tikus dapat dibedakan menjadi beberapa bagian yaitu: mukosa, submukosa, muskularis mukosa dan serosa. Lapisan mukosa terdiri atas epitel kolumnar selapis yang masuk dalam lamina propria membentuk *gastric-pit*. Cardia lambung berbatasan dengan esofagus yang ditunjukkan adanya peralihan epitel skuamus simplek menjadi kolumnar simplek sedangkan bagian pylorus berbatasan dengan duodenum yang ditandai dengan adanya epitel kolumnar yang tidak memiliki sel kelenjar namun terlihat adanya kripta *lyberkulin* dan kelenjar brunner (Junquiera *et al.*, 2004).

2.3 IBD (*Inflammatory Bowel Disease*)

Inflammatory Bowel Disease (IBD) merupakan penyakit peradangan usus yang memiliki gejala antara lain, diare, rasa nyeri pada abdomen, penurunan berat badan dan melena. IBD ini dibagi menjadi dua subtipe klinis, yaitu *Crohn's disease* (CD) dan *ulcerative colitis* (UC). *Crohn's disease* (CD) merupakan

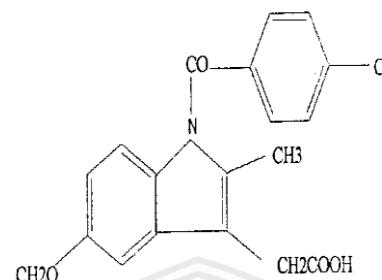
inflamasi yang terjadi pada bagian yang lapisan dinding usus dan bagian saluran pencernaan meliputi mulut, esophagus, perut dan usus halus, sedangkan *ulcerative colitis* (UC) hanya terbatas pada usus besar, rektum dan peradangan terjadi pada lapisan usus (Korpaska *et al.*, 2009). Penyebab terjadinya IBD belum diketahui secara pasti, namun diduga etiopatogenesisisnya dipengaruhi oleh faktor kegagalan regulasi imun, faktor eksogen, genetik dan peranan flora usus (Thorenson *et al.*, 2007). Berdasarkan imunologi, IBD terjadi karena invasi bakteri patogen pada usus halus akan mengaktifkan aktivasi sel T neutrofil yang berperan untuk dalam perusakan mikroorganisme secara fagositosis yang selanjutnya didegradasi oleh *reactive oxygen species* (ROS) dan protease menyebabkan terjadinya kerusakan jaringan dan inflamasi (Volkman, 2017), dengan merangsang produksi sitokin pro-inflamasi seperti TNF, IL-6, IL-18 dan IL-1 β yang dapat memicu produksi radikal bebas berlebihan (Ahluwalia, 2018). Radikal bebas merupakan sekelompok bahan kimia baik atom maupun molekul yang memiliki elektron tidak berpasangan pada lapisan luarnya dan dapat menimbulkan terjadinya stres oksidatif (Suksamrarn, 2003).

2.4 Indometasin

Indometasin merupakan salah satu obat antiinflamasi nonsteroid derivant yang masuk dalam golongan *Non Steroidal Antiinflammation Drug* (NSAIDs) dan merupakan turunan indol termetilisasi (Gambar 2.4). Indometasin dapat digunakan untuk pengobatan pada arthritis dan inflamasi, seperti nyeri pada penyakit *osteoarthritis*, *arthritis*, *bursitis*, dan *tendinitis* (Morrow & Robets, 2001).

Profil indometasin dapat dilihat pada keterangan dibawah ini (Rosyidah, 2007) :

Rumus bangunan :



Gambar 2.4 Struktur Molekul Indometasin

Nama kimia : asam 1-(p-klorobenzil)-5-metoksi-2-metilindol-3- asam asetat.

Berat molekul : 357,79

Rumus empirik : C₁₉H₁₆ClNO₄

Kelarutan : Tidak larut dalam air, sukar larut dalam etanol, kloroform dan eter.

Sampai saat ini, frekuensi penggunaan obat-obat golongan NSAID masih tinggi, disamping kegunaan yang sesuai dengan indikasi, indometasin pada dosis tinggi dapat menimbulkan efek samping seperti gangguan pencernaan, reaksi anafilaksis, dermatitis, hipersensitivitas dan gangguan pada sistem saraf pusat (Bures, 2011). Menurut Tjay dan Kirana (2007), obat ini 92-99% berikatan dengan protein plasma. Indometasin diekskresi dalam bentuk asal maupun metabolit melalui urin dan empedu dengan waktu pengaruh plasma kira-kira 2-4 jam. Indometasin mempunyai efek analgesic dan anti inflamasi. Indometasin biasa digunakan untuk terapi seperti nyeri pada penyakit *osteoarthritis*, *spondylitis*, *arthritis*, *bursitis*, dan *tendinitis*. Mekanisme kerja dari indometasin yaitu dapat

menghambat aktivitas katalitik dua isoform enzim siklooksigenase (COX), yaitu COX-1 yang berperan dalam pembentukan mukus lambung dari iritasi lambung dan COX-2 yang berperan sebagai efek anti-inflamasi, analgesik, antipiretik (Hatazaws et al, 2006). Indometasin menghambat fosfolirasi oksidatif ATP (*Adenosin Triphosphat*) dalam sel. Penghambatan fosfolirasi oksidasi ATP mengakibatkan apoptosis sehingga sel akan menghasilkan ROS (*Reactive Oxygen Species*). Peningkatan ROS (*Reactive Oxygen Species*) berlebih akan mengakibatkan stress oksidatif dan menyebabkan peroksidasi lipid sehingga rusak epitel lambung (Takeuchi et al, 2003).

2.5 Patomekanisme IBD oleh Indometasin

Salah satu penyebab *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) adalah penggunaan *Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs* (NSAIDs) seperti indometasin. Patofisiologi IBD terjadi secara langsung dan tidak langsung. Patofisiologi secara langsung terjadi akibat senyawa asam pada obat yang menyebabkan iritasi pada mukosa lambung. Sedangkan patofisiologi tidak langsung terjadi berkaitan dengan mekanisme aksi dari obat yang menghambat enzim *siklooksigenase* (COX) yang mensintesis prostanoid (Prusakiewicz et al., 2004). Indometasin diserap oleh sel epitel kolumner simplek ke bagian membran sel selanjutnya akan melepaskan asam arakidonat yang terdapat di membran. Dalam aksi kerja, indometasin akan menghambat enzim COX yang mengkonversi asam arakhidonat yang akan menyebabkan biosintesis menjadi prostasiklin (PGI2), prostaglandin E2 (PGE2), dan tromboxan A2 (TXA2) (Katzung, 1998). Enzim cyclooxygenase

(COX) memiliki dua isoform yaitu COX-1 untuk menjaga mukosa lambung dengan mencegah pembentukan asam lambung, meningkatkan produksi bikarbonat dan mukus, dan COX-2 yang terdapat pada makrofag, leukosit, fibroblast, dan endothel yang berperan dalam pembentukan prostaglandin dalam kondisi inflamasi akut (Podolsky, 2002). Prostaglandin berperan pada proses fisiologis normal dan pemeliharaan fungsi regulasi berbagai organ. Prostaglandin pada lambung berfungsi untuk mempertebal lapisan mukosa, menurunkan pH, memacu sekresi biarbonat dan meningkatkan aliran darah ke mukosa lambung. Penurunan prostalglandin menyebabkan penurunan perlindungan terhadap mukosa barrier usus, mengakibatkan terjadinya peningkatan kematian sel sehingga memudahkan invasi bakteri pathogen. Bakteri yang menginvasi mengakibatkan terjadinya aktifitas makrofag, aktivasi neutrofil, induksi sitokin pro-inflamasi, produksi radikal NO⁻, pembentukan peroksi nitrit, dan pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS) sehingga menyebabkan kerusakan lambung (Takeuchi *et al.*, 2003). Pemberian indometasin selama 24 jam pada tikus putih galur wistar berpengaruh pada peradangan dan nekrosis mukosa lambung (Aulanni'am, 2003).

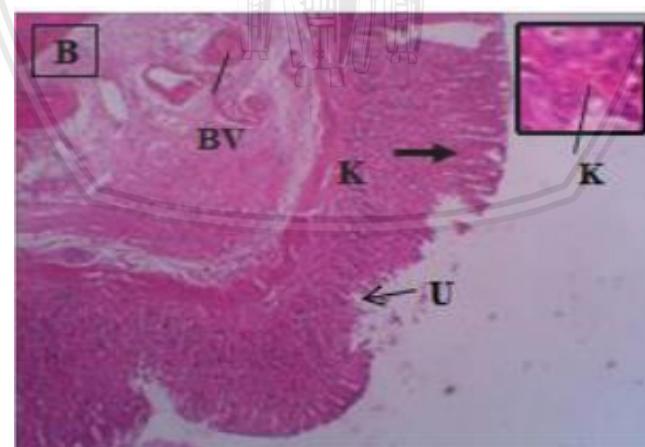
2.5.1 Interleukin-6 (IL-6)

Interleukin-6 adalah salah satu sitokin pro-inflamasi yang berfungsi dalam imunitas nonspesifik dan spesifik. Interleukin-6 diproduksi oleh fagosit mononuklear, sel endotel vaskuler, fibroblas dan sel lain sebagai respon terhadap mikroba dan sitokin lain. Dalam imunitas nonspesifik, Interleukin-6 merangsang hepatosit untuk memproduksi *acute phase protein* (APP) dan

bersama *colony stimulating factor* (CSF) merangsang progenitor di sumsum tulang untuk memproduksi neutrofil. Dalam imunitas spesifik Interleukin-6 merangsang pertumbuhan dan diferensiasi sel B menjadi sel plasma yang memproduksi antibodi (Paraskevas, 2009).

2.5.2 Histopatologi Lambung

Gambaran histopatologi lambung yang terkena IBD berupa permukaan epitel yang masih utuh, namun ada sebagian permukaan epitel yang terlepas juga pada lapisan permukaan mukosa dan terjadi hiperplasia daerah foveolar, pada IBD juga mengalami hemoragik akut dimana perdarahannya segar, nekrosis bersifat fokal pada permukaan pada daerah foveolar (Gambar 2.5). Sel radang neutrofil ditemukan pada daerah foveolar dan lumen kelenjar, namun peradangan tidak terjadi secara menyeluruh. Bila erosi meluas lebih dalam dapat berkembang menjadi ulkus (Junquiera *et al.*, 2004).



Gambar 2.5 Histopatologi Lambung yang terkena IBD (perbesaran 40x) (U) Ulser; (K) Kongesti; (BV) Blood Vessels (Aryani, 2017).

2.6 Susu Kuda Sumbawa

Komposisi susu kuda ditentukan oleh beberapa faktor, yaitu genetik (galur) dan lingkungan (jenis makanan, cara pemeliharaan dan pemerahannya). Pada umumnya susu kuda mengandung 102 gram total padatan, 21.4 gram protein, 0.5–2.0 gram lemak, 1.5–2.8 gram protein, 5.8–7.0 gram laktosa, dan 9.3–11.6 gram abu per 100 gram susu (Park 2009). Susu kuda Sumbawa terdapat 12 jenis asam lemak antara lain : kaprat, laurat, myristat, palmitat, oleat, linoleat dan linolenat, dan 4 macam asam amino esensial yaitu: histidin, treo-nin, metionin, dan lisin (Yun *et al.*, 2012).

Susu kuda Sumbawa bersifat asam dengan pH 3-4, tidak mengandung bakteri pathogen, nilai gizinya baik, berwarna putih hingga biru putih dan mempunyai kadar laktosa tinggi (6,5%). Susu kuda Sumbawa mempunyai keistimewaan yaitu tidak mengalami penggumpalan ataupun kerusakan meskipun tidak dipasteurisasi dan tanpa diberi bahan pengawet apapun. Susu kuda Sumbawa tahan disimpan pada suhu kamar sampai 5 bulan, sifat ini membuktikan bahwa dalam susu kuda Sumbawa terkandung zat yang dapat menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri yang berupa senyawa antimikroba alami (Hermawati, 2005).

Susu kuda Sumbawa juga mengandung berbagai macam imunoglobulin, yang berperan untuk mendukung sistem imun. Imunoglobulin IgA ialah jenis imunoglobulin yang paling dominan pada susu kuda Sumbawa (Uniacke-Lowe *et al.* 2010). Susu kuda Sumbawa memiliki komponen protein lisozim (BM 17 kDa) dan laktoferin (BM 75 kDa). Salah satu ciri khas susu kuda Sumbawa ialah kandungan lisozimnya yang tinggi yang dilaporkan sangat termostabil, resisten

terhadap asam dan protease. Lisosim efektif terhadap *Escherichia coli* bila bekerjasama dengan IgA yang banyak terdapat pada susu, dengan demikian resiko sakit perut atau diare akibat mengonsumsi susu kuda dapat dikurangi. Kemampuan lisosim sebagai agen antiinflamasi dalam membatasi migrasi *neutrofil* pada jaringan yang rusak (Takeuchi *et al.*, 2013). Salah satu ciri khas susu kuda ialah kandungan lisozimnya yang tinggi dan dilaporkan sangat termostabil, resisten terhadap asam dan protease (UniackeLowe *et al.* 2010). Hasil penelitian Sacharczuk *et al.*, (2005), menunjukkan laktoferin pada mamalia mempunyai fungsi utama yaitu berhubungan langsung dengan sistem kekebalan tubuh. Kadar laktoferin susu kuda memiliki peran untuk pengikat Fe di mukosa usus dan beraksi sebagai agen bakteriostatis yang sebanding susu ASI. Lisozim dan laktoferin bekerja secara sinergis sebagai antimikroba dan antiinflamasi (Uniacke-Lowe *et al.* 2010).

Senyawa bioaktif pada susu kuda merupakan bagian atau fragmen spesifik dari protein yang dilaporkan memiliki beberapa mekanisme antioksidan, antara lain: sebagai *radical scavenging*, pengelat mineral, reduktor logam, dan pelindung. Tipe mekanisme antioksidan sangat ditentukan oleh struktur primer asam aminonya. Elias *et al.* (2008) menyatakan bahwa asam amino histidin memiliki gugus imidazol yang dapat berfungsi sebagai pemberi hydrogen dan penangkap lemak hidroksil radikal bebas. Hal ini sangat ditentukan oleh spesifitas enzim protease yang digunakan sehingga dapat bekerja secara sinergis ataupun antagonis dengan antioksidan lainnya (Phelan *et al.* 2009). Antioksidan memiliki peranan penting untuk melindungi tubuh dari kondisi stres oksidatif.

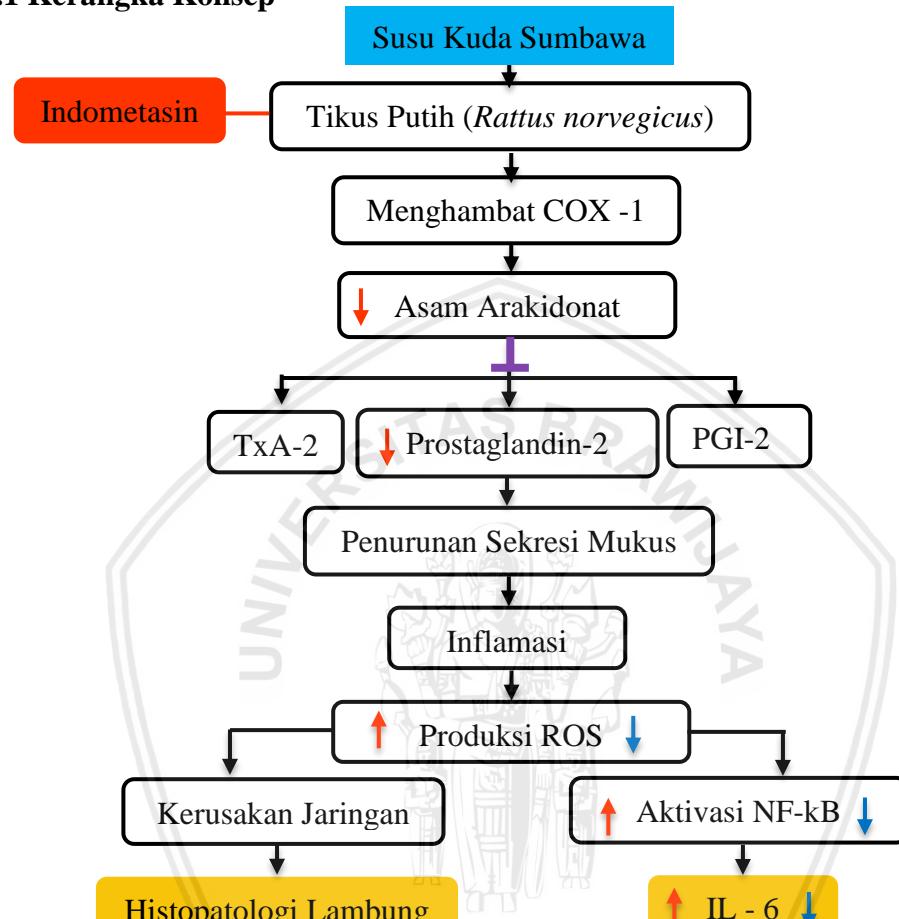
Stres oksidatif merupakan salah satu faktor resiko penting sebagai potensi peptida sebagai antioksidan sebagai pencegahan faktor resiko penyakit degenerative.

Reactive Oxygen Species (ROS) ialah spesies oksigen reaktif yang dihasilkan dari proses oksidasi dan detoksifikasi. Kerusakan sel akibat ROS dapat dicegah melalui aktivitas antioksidan (Lakhsni *et al.* 2009).



BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN

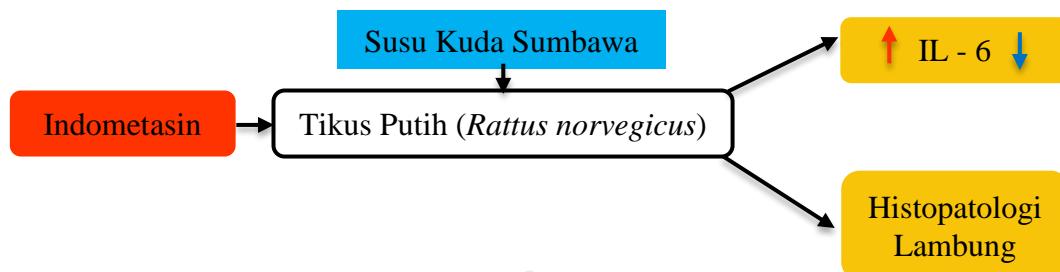
3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1. Kerangka Konseptual Penelitian

- | | | | |
|--|--------------------------------|--|-------------------------|
| | : Pengaruh Induksi Susu Kuda | | : Variabel yang diamati |
| | : Pengaruh Induksi Indometasin | | : Preventif susu kuda |
| | : Menghambat | | : Induksi Indometasin |

3.2 Kerangka Konseptual



Berdasarkan kerangka konsep tersebut, hewan coba tikus jantan strain wistar diberikan susu kuda Sumbawa menggunakan sonde lambung dengan dosis 0,5mL per ekor, 1mL per ekor, 1,5mL per ekor. Susu kuda sumbawa memiliki kandungan senyawa bioaktif yaitu Lisosim dan lakoferin yang berfungsi sebagai antioksidan, antiinflamasi dan antibakteri. Laktoferin berpotensi mencegah proses inflamasi yang akan menghambat pengeluaran sitokin proinflamasi seperti TNF- α , IL-6, dan IL-1 β dan terbukti berfungsi sebagai antioksidan untuk mengikat Fe sehingga menurunkan radikal hidroksil yang dapat mencegah adanya stress oksidatif dan kerusakan membran. Lisozim memiliki aktifitas antibakteri dan kemampuan dalam membatasi migrasi neutrofil ke jaringan yang rusak memberikan kemungkinan untuk menggunakan lisosim sebagai agen inflamatori.

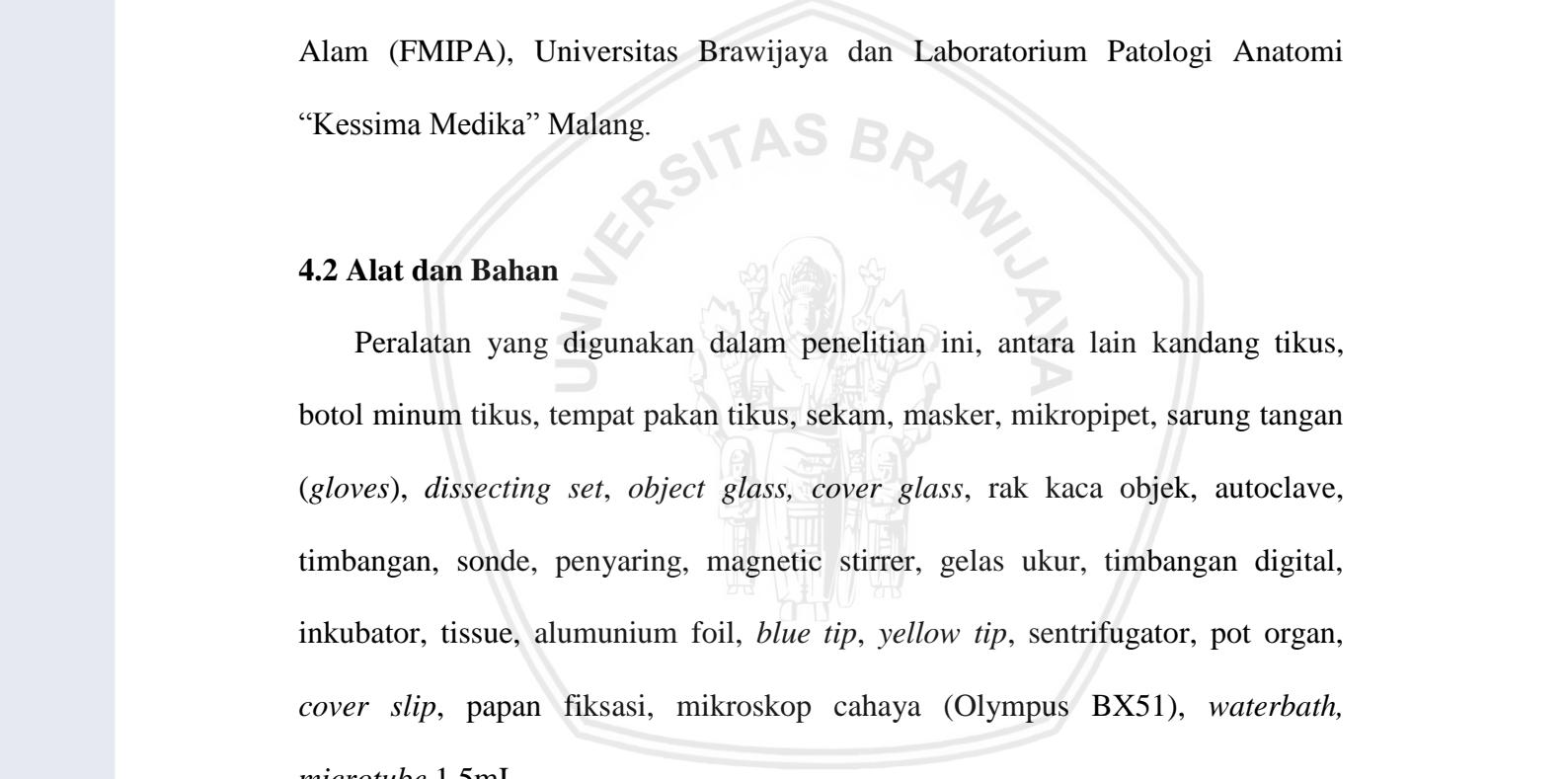
Tikus putih (*Rattus norvegicus*) di induksi Indometasin 15mg/kgBB untuk membuat hewan coba IBD (*Inflammatory Bowel Disease*). Indometasin dengan dosis 15mg/kgBB masuk dalam tubuh hewan coba selanjutnya diserap oleh sel epitel kolumner simplek lambung yang menghambat produksi dua enzim yaitu (COX-1) dan sikloksigenase-2 (COX-2). COX-1 menjaga permukaan mukosa lambung tetap utuh dengan mencegah pembentukan asam lambung,

meningkatkan produksi bikarbonat dan mucus. Indometasin menghambat enzim siklooksigenase-1 (COX-1) berikatan dengan asam arakidonat yang berperan dalam mengkonversi asam arakidonat menjadi endoperoksidase yang bertanggung jawab pembentukan prostanoïd yaitu tromboxan (TXA-2), prostaglandin (PGE-2) dan prostasiklin (PGI-2). Hambatan dari COX-1 mengakibatkan prostaglandin menurun dan akan menurunkan ketahanan pada mukosa saluran pencernaan sehingga menurunkan produksi mukus dan peningkatan motilitas usus. Penurunan produksi mukus akan menyebabkan perlindungan mukosa pada usus berkurang. Peranan mukus dan sekresi bikarbonat merupakan faktor utama dalam pencegahan primer maupun sekunder lesi mukosa akut oleh indometasin. Selanjutnya terjadi pembengkakan disertai kerusakan sel epitel dan inflamasi. Pada jalur metabolismenya, indometasin mengalami reaksi *O-dimetilasi* dan *N-deasilasi* yang akan menghasilkan *desimetildeschlorobenzoil-indometasin* (DMBI) selanjutnya akan dioksidasi oleh sistem *myeloperoksidase* (MPO) yaitu enzim pengoksidasi yang terdapat pada neutrofil aktif dan H_2O_2 yaitu oksidan utama yang diproduksi oleh neutrofil teraktivasi membentuk metabolit reaktif imunokuinon. Metabolit imunokuinon dapat memicu pengaktifan neutrofil dan melepaskan sitokin dan kemokin seperti ROS (*Reactive Oxygen Species*). Adanya pengikatan ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang berlebih akan mengakibatkan keadaan stress oksidatif. Keadaan stress oksidatif di dalam jaringan akan menyebabkan oksigen reaktif yang terlepas dan terjadi ketidaksinambungan antara radikal bebas, dan antioksidan intrasel yang menyebabkan peroksidasi lipid yang mengakibatkan kerusakan pada epitel lambung.

Peningkatan ROS (*Reactive Oxygen Species*) berlebihan yang mengakibatkan stress oksidatif akan mengakibatkan fosforilasi dari inhibitor NF-kB (*Nuclear Factor kappa B*) dan peningkatan aktivasi NF-kB (*Nuclear Factor kappa B*) yang nantinya akan bermigrasi dalam nukleus dan menginisiasi sitokin proinflamasi dan akan memicu migrasi sel radang ke jaringan, salah satunya IL-6. Peningkatan produksi IL-6 akan mengakibatkan agregasi dan aktivasi neutrofil sehingga menyebabkan terjadinya inflamasi dan kerusakan jaringan pada lambung. Kandungan laktoperin dan lisosim dalam susu kuda sumbawa dapat mencegah dan membatasi migrasi neutrofil ke jaringan yang rusak sebagai agen inflamatori (anti radang). Inflamasi yang terjadi pada lambung meningkatkan kerusakan epitel, berpengaruh terhadap histopatologi mukosa dan submukosa lambung beserta jumlah infiltrasi sel radang.

3.2 Hipotesa Penelitian

1. Pemberian susu kuda sumbawa sebagai tindakan preventif dapat menurunkan ekspresi IL-6 organ lambung pada gangguan IBD (*Inflammatory Bowel Disease*) pada tikus putih (*Rattus norvegicus*).
2. Pemberian susu kuda sumbawa sebagai tindakan preventif dapat menurunkan kerusakan histopatologi lambung pada gangguan IBD (*Inflammatory Bowel Disease*) pada tikus putih (*Rattus norvegicus*).



BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Januari – Februari 2019 di Laboratorium Fisiologi Hewan, Fakultas Saintek UIN Maliki Malang; Laboratorium Biologi Molekuler, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), Universitas Brawijaya dan Laboratorium Patologi Anatomi “Kessima Medika” Malang.

4.2 Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain kandang tikus, botol minum tikus, tempat pakan tikus, sekam, masker, mikropipet, sarung tangan (*gloves*), *dissecting set*, *object glass*, *cover glass*, rak kaca objek, autoclave, timbangan, sonde, penyaring, magnetic stirrer, gelas ukur, timbangan digital, inkubator, tissue, alumunium foil, *blue tip*, *yellow tip*, sentrifugator, pot organ, *cover slip*, papan fiksasi, mikroskop cahaya (Olympus BX51), *waterbath*, *microtube* 1,5mL.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain tikus putih (*Rattus novergicus*) berjenis kelamin jantan galur Wistar dengan berat 120-150 gram, , susu kuda sumbawa, pakan, air minum, minyak jagung, formalin 10%, pewarnaan HE (*Hematoxyline Eosin*), aquades, xylol, PBS, parafin cair, antibodi IL-6, pewarna kromagen DAB (*Diamino Benzidine*), antibodi sekunder Goat Anti Rat berlabel biotin (*Biotinylated Rabbit Anti-Rat IgG Antibody*

4.3 Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan coba berupa tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar yang berumur 8-12 minggu dengan berat badan antara 150-200 gram. Aklimatisasi dilakukan selama tujuh hari agar tikus beradaptasi dengan kondisi lingkungan laboatorium. Estimasi sampel dihitung berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008):

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

Keterangan :

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

t : Jumlah perlakuan

$$5n - 5 \geq 15$$

n : Jumlah ulangan yang diperlukan

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan diatas maka untuk empat kelompok hewan coba diperlukan jumlah ulangan paling sedikit empat ekor dalam setiap ulangan kelompok sehingga dibutuhkan 20 ekor hewan coba.

4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). RAL digunakan apabila ragam satuan percobaan yang digunakan homogen atau seragam. Hewan model dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan dan masing-masing 4 ulangan yaitu kelompok control negatif (K-), kelompok control positif (K+), kelompok perlakuan 1 (P1), kelompok perlakuan 2 (P2), kelompok perlakuan 3 (P3) pada **Tabel 4.1** :

Tabel 4.1. Kelompok Perlakuan pada Penelitian

| Perlakuan | Ulangan | | | |
|-----------------|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Kontrol negatif | Kontrol negatif tikus hanya diberikan pakan dan minum <i>ad libitum</i> tanpa diberikan susu kuda Sumbawa dan tanpa diinduksi indometasin | | | |
| Kontrol positif | Kontrol positif tikus diberikan pakan dan minum <i>ad libitum</i> tanpa pemberian susu kuda Sumbawa dan diinduksi indometasin dengan dosis 15mg/kgBB. | | | |
| Perlakuan 1 | Tikus tikus dilakukan pemberian susu kuda Sumbawa dengan dosis 0,5mL dengan sonde lambung serta diinduksi indometasin dengan dosis 15mg/kgBB. | | | |
| Perlakuan 2 | Tikus dilakukan pemberian susu kuda Sumbawa dengan dosis 1mL dengan sonde lambung serta diinduksi indometasin dengan dosis 15mg/kgBB | | | |
| Perlakuan 3 | Tikus dilakukan pemberian susu kuda Sumbawa dengan dosis 1,5mL dengan sonde lambung serta diinduksi indometasin dengan dosis 15mg/kgBB. | | | |

Tabel 4.2. ANOVA (*Analysis of Variance*)

| S.V | df | SS | MS | Fcalculated | F5% | F1% |
|-----------|---------|----------|-----|-------------------|------|------|
| Treatment | T-1 | SST | MST | $\frac{MST}{MSE}$ | 3.06 | 4.89 |
| Error | T (n-1) | SSE | MSE | | | |
| Total | Tn - 1 | SS total | | | | |

4.5 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

Variabel bebas : susu kuda Sumbawa dosis 0,5mL, 1mL, 1,5mL.

Variabel terikat : ekspresi IL-6 dan histopatologi lambung.

Variabel kontrol : homogenitas tikus meliputi jenis kelamin, berat badan, umur pakan dan kandang.

4.6 Tahapan Penelitian

- 1 Rancangan penelitian persiapan hewan coba aklimatisasi pada hari ke 1-7
- 2 Perlakuan preventif susu kuda Sumbawa dengan dosis 0,5mL/ekor, 1mL/ekor, dan 1,5mL/ekor dengan sonde lambung pada hari ke 8-14
- 3 Perlakuan pemberian indometasin per oral hingga kedalaman lambung secara sonde pada hari ke-15
- 4 Perlakuan pemberian susu kuda Sumbawa dengan dosis 0,5mL/ekor, 1mL/ekor, dan 1,5mL/ekor dengan sonde lambung dilanjutkan hari ke 16-21
- 5 Pengambilan dan pembuatan preparat histologi lambung
- 6 Ekspresi IL-6 dengan metode *flowcytometri*
- 7 Pengamatan preparat histopatologi lambung dengan pewarnaan *Haematoxylin eosin (HE)*
- 8 Analisis Data

4.7 Prosedur Kerja

4.7.1 Persiapan Hewan Coba

Penelitian ini menggunakan hewan coba berupa tikus putih. Tikus yang digunakan dalam penelitian ini yaitu spesies *Rattus novergicus* jantan strain *wistar* umur 8-12 minggu dengan berat badan berkisar antara 120-150 gram. Tikus diadaptasi dengan lingkungan selama tujuh hari sebelum digunakan dalam penelitian. Hewan coba diberikan pakan berbentuk pelet sebanyak 10% berat badan dua kali sehari dan minum secara *ad libitum* (Muliani, 2011). Tikus terdiri dari lima kelompok perlakuan dengan masing-masing kelompok

terdiri dari empat ekor tikus dalam satu kandang. Kandang tikus yang digunakan berbahan plastik dengan tutup kawat dan diberi alas berupa *underpad* untuk menjaga tingkat kelembapan. Pemeliharaan tikus dilakukan di Laboratorium farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada suasana tenang dan bebas polutan.

4.7.2 Pembuatan Hewan Model IBD

Hewan model IBD (*Inflammatory Bowel Disease*) pada penelitian ini diakukan dengan melakukan induksi dosis tunggal obat NSAID berupa indometasin. Dosis induksi IBD dengan indometasin yaitu 15mg/kgBB (Aulanni'am *et al.*, 2011). Pemberian indometasin pada penelitian ini dilakukan secara per oral menggunakan sonde lambung. Dosis indometasin yang diberikan pada setiap ekor tikus adalah 2,25mg/tikus. Indometasin sebelum diberikan pada tikus, harus dilakukan pengenceran dengan minyak jagung terlebih dahulu. Adapun pengenceran indometasin sebanyak 45mg dibutuhkan 4mLminyak jagung sebagai pelarutnya (Bures,2011). Perhitungan dosis indometasin dan minyak jagung yang diberikan secara per oral adalah sebagai berikut :

$$\text{Kebutuhan indometasin} : 15\text{mg/kgBB} \times 0,15\text{kg} = 2,25\text{mg/tikus.}$$

$$\text{Kebutuhan minyak jagung} : \frac{2,25 \text{ mg}}{45 \text{ mg}} \times 4\text{mL} = 0,2\text{mL/tikus.}$$

Campuran indometasin dengan minyak jagung dihomogenkan menggunakan vortex. Kemudian diinkubasi selama 24 jam. Hasil induksi dapat mengakibatkan kerusakan sel-sel pada daerah lambung sehingga menimbulkan IBD.

4.7.3 Pemberian susu kuda Sumbawa

Susu kuda Sumbawa diperoleh dari peternakan kuda yang terdapat di Kabupaten Dompu, Pulau Sumbawa, NTB (Nusa Tenggara Barat). Susu kuda Sumbawa yang diperoleh merupakan susu murni segar dengan tanggal pemerahan 31 Desember 2018. Susu kuda Sumbawa diberikan sebagai preventif satu kali dalam sehari dengan volume pemberian 0,5mL/ekor, 1mL/ekor, dan 1,5mL/ekor selama 7 hari lalu diinduksi indometasin dengan menggunakan sonde lambung lalu dilanjutkan pemberian susu kuda Sumbawa hingga hari ke-21 (Reni *et al.*, 2010).

4.7.4 Isolasi Organ Lambung

Setelah dilakukan perlakuan, hewan coba dilakukan euthanasia. Hal ini bertujuan untuk mengoleksi organ agar dapat melihat efek terapi. Metode euthanasia yang digunakan dengan teknik *dislocation os occipitale*. Teknik dilakukan dengan menahan pertemuan antara os occipital dan os atlas, kemudian dilakukan gerakan menarik sehingga keduanya terpisah. Teknik euthanasia ini dinilai efektif dan efisien.

Setelah dilakukan proses euthanasia, hewan coba dilentangkan pada papan seksi. Posisi hewan coba yaitu *dorsoventral* yang bertujuan memudahkan pengambilan organ lambung . kemudian diakukan insisi pada area *abdomen* sehingga *cavum abdomen* terbuka. Setelah itu, fiksasi organ lambung menggunakan pinset dan diisolasi dicuci dengan NaCl fisiologis kemudian dimasukan dalam pot organ yang berisi netral formalin 10%.

4.7.5 Pembuatan Preparat Histopatologi Lambung

Organ lambung yang telah difiksasi menggunakan larutan *Buffer Neutral Formalin* atau BNF 10% lalu dilakukan *trimming* organ dan dimasukkan ke dalam *cassette tissue* dari plastik. Tahap selanjutnya dilakukan proses dehidrasi alkohol menggunakan konsentrasi alkohol yang bertingkat yaitu alkohol 70 %, 80 %, 90 %, alkohol absolut I, alkohol absolut II, kemudian dilakukan penjernihan menggunakan xylol I dan xylol II. Proses pencetakan atau parafinisasi dilakukan menggunakan parafin I dan parafin II. Sediaan dimasukkan ke dalam alat pencetak yang berisi parafin setengah volume dan sedian diletakkan ke arah vertikal dan horizontal sehingga potongan melintang melekat pada dasar parafin. Setelah mulai membeku, parafin ditambahkan kembali hingga alat pencetak penuh dan dibiarkan sampai parafin mengeras. Blok-blok parafin kemudian dipotong tipis setebal 5 mikrometer dengan menggunakan mikrotom. Hasil potongan yang berbentuk pita (*ribbon*) tersebut dibentangkan di atas air hangat yang bersuhu 46°C dan langsung diangkat yang berguna untuk meregangkan potongan agar tidak berlipat atau menghilangkan lipatan akibat dari pemotongan. Sediaan tersebut kemudian diangkat dan diletakkan di atas gelas objek dan dikeringkan semalam dalam inkubator bersuhu 60°C sehingga dapat dilakukan pewarnaan Hematoksilen-Eosin (HE) untuk melihat sel radang (Febram, dkk., 2010).

4.7.6 Ekspresi IL-6

Pada ekspresi IL-6 yaitu dengan metode *Flowcytometry* untuk menganalisis jenis-jenis sel. Sel dilabel dengan flurosen, dilewatkan elah sempit dan ditembak sinar. *Flowcytometry* merupakan teknologi yang secara simultan mampu mengitung dan mengkarakterisasi berbagai macam sifat fisika dari partikel tunggal. *Flowcytometry* dapat menganalisis suspensi partikel atau sel. Tahap awal dengan diambil lambung tikus, dicuci dan direndam dalam PBS kemudian organ digerus dengan pangkal sputit baru pada kurang lebih 5 mL PBS. Disaring dengan wire dan dimasukan ke propilen 15 mL hingga volum tertentu. Dihomogenkan dengan disentrifus dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit dengan suhu 10°C kemudian dibuang supernatan hasil sentrifugasi hingga terdapat pelet yang kemudian di resuspensi dengan PBS 1 mL dan dipipeting. Hasil suspense di bagi ke beberapa microtube 1,5 mL sesuai dengan jumlah kebutuhan jenis kombinasi pewarnaan yang telah diisi PBS $\pm 0,5$ mL, @50 μ L. Suspensi tersebut di sentrifus dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit dengan suhu 10°C kemudian dibuang supernatan hasil sentrifugasi hingga terdapat pelet yang kemudian dilakukan pewarnaan intraseluler untuk mengetahui ekspresi IL-6 dengan menambahkan larutan fiksatif sebanyak 50 μ L, kemudian diinkubasi selama 20 menit dengan suhu 4°C pada ruang gelap. Ditambahkan larutan permeabilitas (1X) sebanyak 500 μ L kemudian dilakukan homogenisasi dengan di sentrifus kecepatan 2500 rpm selama 5 menit dengan suhu 10°C kemudian dibuang supernatan hasil sentrifugasi hingga terdapat pelet yang

kemudian dilakukan penambahan 50 μL larutan antibody spesifik pada sel palet dan diinkubasi selama 20 menit pada suhu 4°C pada ruang gelap. Setelah inkubasi selesai, ditambahkan $\pm 400 \mu\text{L}$ PBS dan dipindahkan ke kuvet *flowcytometri* untuk dianalisis.

4.8 Analisis Data

Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekspresi IL-6 dan histopatologi organ lambung. Analisis data ekspresi IL-6 dilakukan secara kuantitatif menggunakan *software flowcytometri* dan gambaran histopatologi dengan bantuan mikroskop cahaya (Olympus BX51) dengan perbesaran 100x dan 400x dianalisis deskriptif. Selanjutnya dilakukan analisis secara kuantitatif menggunakan uji ANOVA (*Analysis of Variance*) satu arah dengan tingkat kepercayaan 95% untuk kemudian dilanjutkan dengan uji BNJ (Beda Nyata Jujur) untuk mengetahui hasil yang paling berbeda nyata (Kusriningrum, 2008).

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Ekspresi IL-6 pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diberi Susu Kuda Sumbawa dan di Induksi Indometasin

Hasil penelitian ini pada ekspresi IL-6 pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) model *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) yang diinduksi indometasin diukur menggunakan metode *Flowcytometri* dengan sampel berupa organ lambung yang telah dilabel menggunakan antibodi intraseluler IL-6. Hasil uji *Flowcytometri* yang dianalisis kuantitatif menggunakan *Software BD Cellquest ProTM*, aplikasi *Microsoft exel* dan *software statistical package for the social science (SPSS) for windows 16* dengan Uji *One Way ANOVA*. Perhitungan statistika secara lengkap pada penelitian ini dapat dilihat pada **Lampiran 10**.

Tabel 5.1 ANOVA (*Analysis of Variance*) Ekspresi IL-6

| S.V | df | SS | MS | F _{calculated} | F _{5%} | F _{1%} |
|-----------|----|---------|---------|-------------------------|-----------------|-----------------|
| Treatment | 4 | 739.765 | 184.941 | 23.857 | 3.06 | 4.89 |
| Error | 15 | 116.282 | 7.752 | | | |
| Total | 19 | 856.047 | | | | |

Data uji *One Way ANOVA* (**Tabel 5.1**) disajikan dalam tingkat kepercayaan 95% menunjukkan hasil pengaruh yang sangat berbeda nyata karena Fhit (23.857) > F tabel 1% (4.89), maka dapat disimpulkan bahwa diantara perlakuan terdapat perbedaan sangat nyata ($P<0.01$) terhadap ekspresi IL-6.

Berdasarkan statistika dilakukan uji normalitas dan homogenitas (**Lampiran 10**) menunjukkan bahwa data terdistribusi normal dan homogen. Hasil tersebut menunjukkan adanya pengaruh preventif yang diberikan pada lambung tikus model *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) berdasarkan ekspresi IL-6. Uji lanjutan dilakukan yaitu uji Benar Nyata Jujur (BNJ) atau uji *Tukey* dan menunjukkan perbedaan rata-rata yang signifikan (**Lampiran 10**) dapat dilihat dalam **Tabel 5.2**.

Tabel 5.2 Tabel rata-rata ekspresi interleukin 6 (IL-6) organ lambung tikus putih (*Rattus Norvegicus*)

| Perlakuan | Rata-rata Ekspresi IL-6 (% gated) ± SD | Peningkatan (%) | Penurunan (%) |
|-----------|---|--------------------|------------------|
| K- | 19,4925±4,33 ^a | - | - |
| K+ | 36,0475±1,535 ^c | 45,92% | - |
| P1 | 31,57±1,489 ^{bc} | - | 12,42% |
| P2 | 28,3525±2,464 ^b | - | 21,35% |
| P3 | 21,98±3,0596 ^a | - | 39,02% |

Keterangan : notasi a, b, c menunjukkan perbedaan yang signifikan antar kelompok.

Hasil uji *Tukey* terlihat perbedaan notasi yang ditunjukkan pada **Tabel 5.1** dapat diperoleh informasi bahwa ekspresi IL-6 organ lambung tikus putih (*Rattus norvegicus*) model IBD yang diinduksi dengan indometasin pada kelompok kontrol negatif (K-) menunjukkan hasil yang berbeda nyata dengan kelompok kontrol positif (K+), kelompok P1 dan kelompok P2 namun menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata dengan kelompok P3. Hal ini disebabkan karena pada keadaan normal sitokin proinflamasi diproduksi tubuh untuk mempertahankan kondisi hemeostatis dalam

sistem imunitas. IL-6 merupakan sitokin proinflamasi yang diproduksi oleh makrofag dan hampir terdapat di semua jaringan didalam tubuh walaupun dalam jumlah sedikit (Erica *et al.*, 2000).

Kelompok kontrol positif (K+) menunjukkan hasil yang berbeda nyata dengan kelompok kontrol negatif (K-), kelompok P2, dan kelompok P3, namun menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata dengan kelompok P1. Hasil pada penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Riyansyah *et al* (2015), yang menyatakan bahwa administrasi indometasin dosis 15mg/kgBB secara per oral pada tikus dapat menyebabkan iritasi dan kerusakan pada mukosa lambung, sehingga dapat memicu ekspresi IL-6 sebagai sitokin pro-inflamasi akibat induksi NSAIDS yaitu indometasin yang menghambat pembentukan COX-1 yang merusak kinerja mitokondria dalam sel sehingga mengganggu siklus posforilasi oksidatif yang menyebabkan gangguan transfer electron pada molekul oksigen dapat memicu terjadinya inflamasi (Takeuchi *et al.*,2003). Hal ini memicu pembentukan ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang berlebih akan menstimulasi pengaktifan NF-kB yang merupakan faktor transkripsi dalam mengatur ekspresi sel-sel sitokin pro-inflamasi seperti IL-6 (Aulanni'am *et al.*, 2012).

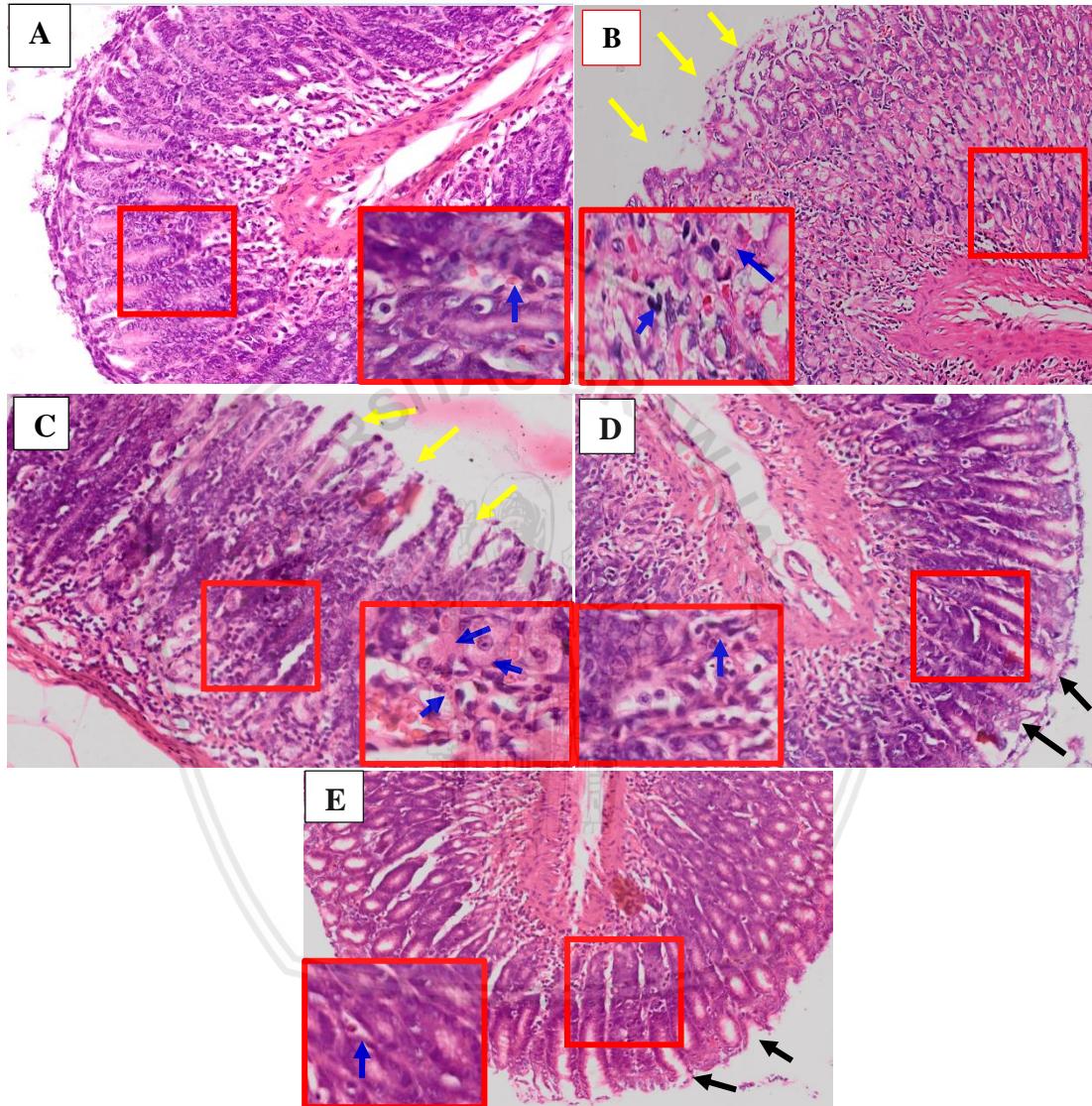
Kelompok P2 dan P3 menunjukkan hasil yang berbeda nyata dengan kelompok positif (K+). Hal ini menunjukkan dengan pemberian preventif susu kuda Sumbawa yang memiliki kandungan bioaktif yaitu lisozim dan laktoperin dapat mencegah adanya sitokin pro-inflamasi yaitu ekspresi IL-6 pada IBD dan berfungsi sebagai antioksidan, antiinflamasi dan antibakteri. Lisozim merupakan senyawa protein yang memiliki kemampuan dalam mencegah migrasi neutrofil ke jaringan yang rusak sebagai agen

antiinflamatori. Kadar laktoferin susu kuda berperan untuk pengikat Fe di saluran pencernaan dan menekan adanya radikal hidroksil untuk mencegah adanya kerusaakan membran (Uniacke-Lowe *et al.* 2010). Selain itu, susu kuda Sumbawa memiliki kandungan bakteri asam laktat yang tinggi yaitu sekitar $6,7 \times 10^6$ cfu/mL dan antioksidan 933,86 mg/mL (**Lampiran 2**).

Kelompok P1 menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata dengan kelompok positif (K+). Hal ini menunjukkan dengan pemberian preventif susu kuda Sumbawa dosis 0,5mL per ekor, lisozim dan laktoferin dalam susu kuda Sumbawa belum mampu mencegah adanya inflamasi atau ekspresi (IL-6).

Analisa stastika pada ekspresi IL-6 organ lambung pemberian susu kuda Sumbawa dengan volume pemberian 1mL per ekor dan dosis 1,5mL per ekor mampu mencegah terjadinya inflamasi pada lambung yang dapat dilihat dari perbedaan notasi dan penurunan ekspresi IL-6 dari kontrol positif, namun pemberian susu kuda Sumbawa dosis 1,5mL per ekor merupakan dosis yang paling optimal untuk menurunkan ekspresi IL-6.

5.2 Pengaruh Pemberian Susu Kuda Sumbawa terhadap Perubahan Histopatologi Organ Lambung Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Model IBD (Inflammatory Bowel Disease) yang Diinduksi Indometasin



Gambar 5.2 Histopatologi mukosa lambung tikus putih (*Rattus norvegicus*) (sediaan lambung ; potongan melintang; pewarnaan HE. Pembesaran 100x).

Keterangan : (A) Tikus kontrol negatif; (B) Tikus kontrol positif; (C) Tikus P1 dosis 0,5mL per ekor; (D) Tikus P2 dosis 1mL per ekor; (E) Tikus P3 dosis 1,5mL per ekor; () perbesaran 400x ; () erosi epitel mukosa lambung; () infiltrasi sel neutrofil; () perbaikan sel epitel.

Gambaran histologi lambung dengan pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE) (**Gambar 5.2**). Berdasarkan pengamatan pada gambar preparat lambung kelompok kontrol negatif (tikus sehat) (**Gambar 5.2. A**) menunjukkan pada bagian lapisan tunika mukosa terlihat adanya epitel kolumnar simplek dengan bentukan gastric pit dan gastric gland yang masih tertata dan berjajar rapi dengan bentuk silindris simplek. Hal ini sesuai dengan pendapat Puspitasari (2008), bahwa lapisan mukosa banyak mengandung mitokondria dan granula untuk memproduksi enzim pepsinogen, sedangkan sel parietal bersifat asidofilik karena sel ini memproduksi HCL atau asam lambung. Terlihat juga masih adanya sel neutrofil dalam jumlah sedikit yang masih normal karena neutrofil memiliki peran untuk melawan agen-agen asing yang bersifat patogen.

Berbeda dengan gambaran histopatologi pada kelompok kontrol positif (**Gambar 5.2. B**) yang menunjukkan kerusakan sel yang berat pada lapisan lamina propria tunika mukosa lambung. Pada gambaran histopatologi terlihat adanya erosi pada epitel yang disertai infiltrasi sel radang (neutrofil) jika dibandingkan dengan kontrol negatif. Erosi yang terjadi pada mukosa lambung sebagai efek dari adanya radikal bebas yang menstimulasi sel darah putih menuju sel mukosa lambung. Sel darah putih akan menghasilkan H_2O_2 untuk membunuh beberapa jenis bakteri dan jamur serta untuk pertumbuhan sel, namun tidak menyerang sasaran spesifik, sehingga juga akan menyerang asam lemak tidak jenuh ganda dari membran sel,

organel sel, atau DNA, sehingga dapat menyebabkan kerusakan struktur dan fungsi sel (Puspitasari, 2008).

Gambaran histopatologi pada kelompok perlakuan 1 (**Gambar 5.2. C**) dengan pemberian preventif susu kuda Sumbawa dosis 0,5mL per ekor tidak berbeda jauh dengan gambaran kelompok kontrol positif (**Gambar 5.2. B**) terlihat adanya erosi pada epitel sel mukosa lambung dan masih terlihat adanya infiltrasi sel radang walaupun tidak sebanyak kelompok kontrol positif. Pada kelompok perlakuan 2 (**Gambar 5.2. D**) dengan preventif susu kuda Sumbawa dosis 1mL per ekor menunjukkan bahwa susu kuda Sumbawa dapat mencegah adanya inflamasi dilihat adanya pengurangan erosi dari sel epitel lamina propria tunika mukosa lambung dan berkurangnya sel radang bila dibandingkan dengan kelompok perlakuan 1 (**Gambar 5.2. C**). Pada kelompok perlakuan 3 (**Gambar 5.2. E**) dengan preventif susu kuda Sumbawa dosis 1,5mL per ekor menunjukkan bahwa susu kuda Sumbawa dapat mencegah adanya inflamasi dilihat adanya pengurangan erosi dari sel epitel lamina propria tunika mukosa lambung dan berkurangnya sel radang bila dibandingkan dengan kelompok perlakuan 1 (**Gambar 5.2. C**) dan pada kelompok perlakuan 2 (**Gambar 5.2. D**).

Berdasarkan hasil pengamatan pada perlakuan preventif susu kuda Sumbawa dosis 1,5mL per ekor merupakan dosis yang paling optimum dalam mencegah efek yang ditimbulkan akibat indometasin. Hal ini menunjukan bahwa pada kelompok P3 dengan dosis 1,5mL per ekor merupakan dosis yang efektif untuk penurunan ekspresi IL-6, mencegah adanya erosi epitel dan infiltrasi sel radang.

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

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

1. Pemberian preventif susu kuda Sumbawa pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) model *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) hasil induksi indometasin dapat mencegah ekspresi IL-6 organ lambung dengan dosis terbaik 1,5mL.
2. Pemberian preventif susu kuda Sumbawa pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) model *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) hasil induksi indometasin dapat mencegah perubahan histopatologi organ lambung dengan dosis terbaik 1,5mL.

6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk preventif *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) menggunakan susu kuda Sumbawa pada organ kolon agar dapat mengetahui efek preventif pada seluruh saluran pencernaan.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahluwalia, B., Moraes, L., Magnusson, M.K. 2018. Immunopathogenesis of Inflammatory Bowel Disease and Mechanisms of Biological Therapies. Department of Microbiology and Immunology. Sweden. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. Vol 53, No 4, 379-389.
- Arnelia. 2002. *Fitokimia, Komponen Ajaib Cegah PJK, Diabetes Mellitus dan Kangker*. Agromedia Jakarta.
- Aryani .D, E., Aulanni'am., Anisa, Agri K., Purwatiningsih, Wawid. 2017. *Profile Histopathology Analysis of Gastric, Duodenum, Ileum, and Colon of Inflammatory Bowel Disease (IBD) Rat Model*. Advances in Health Sciences Research (AHSR), volume 5.
- Aulannia'am ., A.Roosdiana and N.L. Rahmah. 2012. The Potency of *Sargassum duplicatum* Bory Extract on Inflammatory Bowel Disease (IBD) in *Rattus Norvegicus*. *Journal of Life Sciences* 6 : 144-154.
- Aulanni'am, Roosdiana, A., Rahmah, N.L., Tjaniadi P, Lesmana M, Subekti D. 2003. Antimicrobial Resistance of Bacterial Pathogens Associated with Diarrheal Patients in Indonesia. *Am J Trop Med Hyg*. 68(6): 666-10.
- Bachrudin, Z., Astuti, dan Y.S. Dewi. 2000. *Isolasi dan seleksi mikroba penghasil laktat dan aplikasinya pada fermentasi*. Limbah Industri Tahu. Prosiding Seminar Nasional Industri Enzim dan Bioteknologi. Mikrobiologi Enzim dan Bioteknologi
- Barker , H.J., Lindsey, R.J. 1979. *The Laboratory Rat Volume I Biology and Disease*. Academic Press. New York.
- Bures, J, J. Pejchal, J.Kvetina, A. Tichy, S.Rejchrt, M. Kunes and M. Kopacova. 2011. Morphometric analysis of the porcine gastrointestinal tract in a 10-day high-dose indomethacin administration with or without probiotic bacteria *Escherichia coli* Nissle 1917. *Human and Experimental Toxicology*. 30(12) 1955– 1962.
- Brown, R. H., and J.F, Hardisty. 1990. *Pathology of The Fischer Rat. Reference and Atlas*.

CCFA (Chron's & Colitis Foundation of America). 2013. Diet, Nutrition, and Inflammatory Bowel Disease. *National Office 733 Third Avenue Suite 510 New York.*

Ciftci, Osman., Murat, Olcay Disli and Timurkan, Necati. 2012. *Protective effects of protocatechuic acid on TCDD-induced oxidative and histopathological damage in the heart tissue of rats.* Toxicology and Industrial Health 29(9) 806-811. Department of Pharmaceutical Toxicology, University of Inonu, Turkey.

Economou M, Filis G, Tsianou Z, Alamanos J, Kogevinas A, Masalas K, Petrou A, Tsianos EV. 2007b. Crohn's disease incidence evolution in North-Western Greece is not associations Variants. *World J Gastroenterol.* 13: 5116-5120.

Elias, R, J., Decker E,A. 2008. Antiodant Activity of Proteins and Peptides. *Food Sci Nutr.* 48:430-441.

Erica, S.B., A.D. Henn, H.L.Gurtoo, R.M. Wollman, J.L. Alderfer, E.Mihich. M.J. A Novel Tumor Necrosis Factoralpha Inhibitory Protein, TIP-B1. *International Journal of Immunopharmacology* 22(12):1137-42

Frappier B. 1998. Digestive System. *Textbook of Veterinary Histology.* Fifth Edition. Dellmann HD, Eurell JA, editor. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. Pp: 179-183.

Febram, B., I. Wientarsih dan B. Pontjo. 2010. Activity Of Ambon Banana (*Musa Paradisiaca Var. Sapientum*) Stem Extract In Ointment Formulation On The Wound Healing Process Of Mice Skin (*Mus Musculus Albinus*). *Majalah Obat Tradisional* 15(3):121-137.

Ganong, W. F. 2001. Gastrointestinal Function. *Review of Medical Physiology* Edisi 21. Singapore: McGraw Hill Medical Publishing p. 467-513.

Gartner L and JL. Hiatt. 2001. *Colour Textbook of Histology. Second Edition.* Philadelphia: W. B Saunders Company. Pp: 383-396.

Guyton AC, Hall JE. 1997. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran.* Ed ke-9. Setiawan, Tengadi, Santoso, penerjemah; Setiawan, editor. Jakarta: EGC. Terjemahan dari: *Textbook of Medical Physiology.* Hal: 589-608.

- Hermawati, D., Sudarwanto, M., Soekarto, S.T., Zakaria, F.R. 2004. Aktivitas Antimikroba pada Susu Kuda Sumbawa. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. Vol. XV. No. 1 Th 2004.
- Hermawati, Diana. 2005. *Kajian Aktivitas dan Karakterisasi Senyawa Antimikroba dari Susu Kuda Sumbawa*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Hetazawa, Ryo. 2006. *Roles of Endogeneus Prostaglandin and CyclooxygenaseIsozymes in Healing of Indometasin Induces Small Intestinal Lesions in Rat*.
- Junqueira L.C., 2004. Persiapan Jaringan untuk Pemeriksaan mikroskopik. *Histology Dasar: teks dan atlas. Edisi 10*. Jakarta : EGC. 3 – 5.
- Katzung B.G. 1998. *Farmakologi Dasar dan Klinik*. Edisi VI. Jakarta: EGC.
- Klien, A., and Eliakin, R. 2013. Non Steroidal Anti-Inflammatory Drug and Inflammatory Bowel Disease. *Pharmaceuticals*: 1084-1092.
- Kusumawati. 2004. *Bersahabat dengan Hewan Coba*. Yogyakarta : UGM Press.
- Kusriningrum. 2008. *Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap*. Surabaya: Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Tamboli, 2007.
- Korpacka, M., K. Neubauer and M. Matusiewicz. 2009. Platelet-Derived Growth Factor-BB Reflects Clinical, Inflammatory and Angiogenic Disease Activity and Oxidative Stress in *Inflammatory Bowel Disease*. *Clinical Biochemistry*. 42:602-1609.
- Lakshmi, S,V., Kutala V,k. 2009. Oxidative Stress in Cardiovascular Disease. *Indian J Biochem Biophys*. 46(6):421-440.
- Maley, K. and L.Komasara. 2003. *VET 120 Introduction to Lab Animal Science, Valmacer*.<<http://www.medaille.edu/vmacer>; http://www.medaile.edu/vmacer/120_lab_rodentlab1.html> [Diakses pada tanggal 22 Maret 2018].
- Mark. 2005. *The Laboratory Rat*. Jakarta: Akademi Press.

- Martin, W. A. 2004. *Rat Models of Skin Wound*. Eight Edition. Ganon University. WCB WMC. Brown Publishers. Pp. 279-281.
- McFarland, L.V. 2008. State-of-the Art of Irritable Bowel Syndrome and Inflammatory Bowel Disease Reasearch in 2008. *World Journal of Gasstroenterology*. 14 (17): 2625 2629.
- Muliani, H. 2011. *Pertumbuhan Mencit (Mus musculus L.) Setelah Pemberian Biji Jarak Pagar (Jatropha curcas L.)*. Semarang: Jurusan Biologi F. MIPA UNDIP. Buletin Anatomi dan Fisiologi Vol. XIX, No. 1
- Morrow, J.D., and L.J. Robets. 2001. *Analgesic-antipyretic and Antiinflammastory Agents and Drug Employrd in the Treatment Gout*. In: Hardman JG, editors. *Goodman and Gilman's The Pharmacologycal of Therapeutics*. 10th ed. New York, McGraw-Hill, 687-731.
- Paraskevas, C., Greenhough, A., Smartt, H.J.M., Moore, A.E., Robert, H.R., Williams, A.C., et al. 2009. The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis*. 3(3): 377-86.
- Park, YW. 2009. *Bioactive Components in Milk and Dairy Product*. US. Wiley.
- Pearce, E.C. 2006. *Anatomy and Physiology for Nurses*. Penerjemah : Handoyo, S,Y. dan Mohamad, K. (2008). *Anatomi dan Fisiologi untuk Paramedis*. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama. Hal 185-188.
- Phelan M., Aherne A. 2009. Casein-derived Bioactive Peptides. Biological Effect, Industrial Uses, Safety Aspects and Regultory Status. *Int Dairy J*. 19:643-654.
- Puspitasari, D.A. 2008. *Gambaran Histopatologi Lambung Tikus Putih (Rattus novergicus) Akibat Pemberian Asam Asetil Salisilat*. Institut Pertanian Bogor.
- Podolsky, D.K. 2002. Inflammatory Bowel Disease. *N Engl J Med*. 347 (6): 417-429.

- Prusakiewcz, J., Andrew S., Lawrence J. 2004. Molecular Basis of the Time Dependent Inhibition of Cyclooxygenase by Indometasin. *Biochemistry*. Vol 43: 15439-15445 DOI:10. Vol 318(2) : 691-699.
- Reni, S., Sumarno., Widjajanto, E., 2011. Susu Kuda Sumbawa Meningkatkan Respon Imun Seluler Makrofag Peritoneal Mencit terhadap Salmonella typhimurium. Jurusan Gizi Politeknik Kesehatan Mataram. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, Vol. XXVI, No. 1.
- Riyansyah, Yudha, Lanny Mulqie dan Ratu C. 2015. Uji Aktifitas Antiinflamasi Ekstrak Ethanol Daun Ubi Jalar Ungu Terhadap Tikus Wistar Jantan. *Prosiding Penelitian SPESIA Unisba*. Hal:630-636.
- Rosyidah, Q. 2007. *Karakterisasi Dispersi Padat Indometasin- PEG 8000*. UNAIR. Surabaya.
- Saputro, Muhammad. 2016. *Profil Protein, Aktivitas Antioksidan dan Inhibitor ACE dari Susu Kuda dan Hidrolisisnya*. IPB: Bogor.
- Strus, M., Gosiewski., Fyderek,K K., Adamski, P. 2009. A Role of Hydrogen Peroxide Producing Commensal Bacteria Present in Colon of Adolescents with Inflammatory Bowel Disease in perpetuation of the Inflammatory Process. *Journal of Physiology and Pharmacology* 60 (6):49-54.
- Sujaya, Nengah., Ramona, Yan., Widarini, Ni Putu., Suariani, Ni Putu. 2008. Isolasi Karakterisasi Bakteri Asam Laktat dari Susu Kuda Sumbawa. *Jurnal Veteriner Vol 9. No.2* :52-59.
- Sujaya, Nengah., Ramona, Yan., Widarini, Ni Putu., Suariani, Ni Putu. 2012. Eksopolisakarida dari *Lactobacillus* sp. Isolat Susu Kuda Sumbawa dan Potensinya sebagai Prebiotik. *Jurnal Veteriner Vol. 13 No. 2:* 136-144.
- Suksamran, S., Suwannapoch, E. 2003. *Antimycrobacterial Activity of Prenylated Xantones From the Fruits of Garcinia Mangostana*, *Chem, Pharm. Bull* 51, 857-859
- Takeuchi, K., A. Tanaka, R. Ohno and A. Yokota. 2003. Role of COX Inhibition in Pathogenesis of NSAID-Induced Small Intestinal Damage. *Research article*. Kyoto Pharmaceutical University. Kyoto. *Healing: A Review. Wound Repair and Regeneration*. 6(12): 591-599.

- Talley, A., H. Araki., S. Hase., Y. Komoike, and T. Koji. 2004. Up-regulation of COX-2 by Inhibition of COX-1 in the Rat: a Key to NSAID-induced Gastric Injury. *Aliment Pharmacol Ther*; 16 Suppt 2: 90-101.
- Tjay, Tan Hoan., and Kirana Raharja. 2007. *Obat-obat Penting. Khasiat Penggunaan dan Efek-efek Sampingnya*. Edisi 6. Jakarta Gramedia.
- Tonnesen, M. G., Feng X., Clark R. A. F. Angiogenesis in Wound Healing. *JID Symposium Proceedings*. 2007; 5(1): 40-46.
- Uniacke-Lowe, T., Fox, P.F. 2010. Equine Milk Proteins : Chemistry, Structure, and Nutritional Signification. *Int Dairy J*: 20:609-629
- Volkmann M., J.M. Steiner, G. T. Fosgate, J. Zentek, S. Hartmann, and B. Kohn. 2017. Chronic Diarrhea in Dogs- Rostroprospective Study in 136 Cases. *J Vet Intern Med*. Vol 3 (2) : 121-126.
- Washabau R.J .2008. *Summary of Findings and Reports of the WSAVA Gastrointestinal Standardization Group. The 33rd WSAVA Congress*. Dublin. 20-24. 08. 2008,pp. 60-62.
- Wolfensohn, S. and M. Lloyd. 2003. *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare 3rd ed*. Blackwell Publishing Ltd. Oxford.
- Xavier, R.J. and D.K. Podolsky 2007. Unravelling The Patogenesis of *Inflammatory Bowel Disease*. *Nature*. 448 (7152): 427-434.
- Young, Barbara, Philip and Geraldine. 2013. Wheater's Functional Histology : A Text and Colour Atlas. USA. ELSEVIER.
- Yoshida, R., and Y. Ogawa. 2000. *Oxidative Stress Induced by 2,3,7,8-TCDD: An Application of Oxidative Stress Markers to Cancer Risk Assessment of Dioxins*. Indust. Health. Journal. 38: 5-14.