

repository.ub.ac.id

**PENGARUH PREVENTIF SUSU KUDA SUMBAWA
TERHADAP GAMBARAN HISTOPATOLOGI DAN
EKSPRESI TNF- α DUODENUM PADA TIKUS
PUTIH (*Rattus norvegicus*) MODEL *Inflammatory
Bowel Disease* (IBD) YANG DIINDUKSI
INDOMETASIN**

SKRIPSI

Oleh:
RAVI GHEVARI
155130101111041



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

repository.ub.ac.id

**PENGARUH PREVENTIF SUSU KUDA SUMBAWA
TERHADAP GAMBARAN HISTOPATOLOGI DAN
EKSPRESI TNF- α DUODENUM PADA TIKUS
PUTIH (*Rattus norvegicus*) MODEL *Inflammatory
Bowel Disease* (IBD) YANG DIINDUKSI
INDOMETASIN**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:
RAVI GHEVARI
155130101111041



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

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**PENGARUH PREVENTIF SUSU KUDA SUMBAWA TERHADAP
GAMBARAN HISTOPATOLOGI DAN EKSPRESI TNF- α
DUODENUM PADA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*)
MODEL *Inflammatory Bowel Disease* (IBD)
YANG DIINDUKSI INDOMETASIN**

**Oleh :
RAVI GHEVARI
NIM. 155130101111041**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 2 Mei 2019
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh
gelar Sarjana Kedokteran Hewan

Dosen Pembimbing I

Dosen Pembimbing II

Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS
NIP. 19520412 198002 1 001

drh. Nurina Titisari, M.Sc.
NIP. 19860122 201504 2 001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

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

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ravi Ghevari

NIM : 155130101111041

Program Studi : Pendidikan Kedokteran Hewan

Penulis Skripsi berjudul:

Pengaruh Preventif Susu Kuda Sumbawa Terhadap Gambaran Histopatologi dan Ekspresi TNF- α Duodenum Pada Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Model *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) Yang diinduksi 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 termaktub di isi dan 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, 2 Mei 2019
Yang menyatakan,

Ravi Ghevari
NIM. 155130101111041

**PENGARUH PREVENTIF SUSU KUDA SUMBAWA TERHADAP
GAMBARAN HISTOPATOLOGI DAN EKSPRESI TNF- α
DUODENUM PADA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*)
MODEL *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) YANG
DIINDUKSI INDOMETASIN**

ABSTRAK

Inflammatory bowel disease (IBD) merupakan penyakit yang diperkirakan melibatkan reaksi imun dalam tubuh terhadap saluran pencernaan termasuk duodenum. Salah satu faktor penyebab penyakit ini adalah konsumsi obat-obatan golongan NSAID seperti indometasin. Susu kuda Sumbawa adalah salah satu hasil *dairy farm* yang mengandung senyawa bioaktif seperti lisosim dan laktoferin yang berperan untuk antioksidan, antiinflamasi dan antimikroba dan memiliki kandungan Bakteri Asam Laktat (BAL) yang tinggi. Kandungan tersebut berpotensi dalam menekan ekspresi TNF- α serta mencegah kerusakan jaringan organ duodenum akibat penyakit IBD. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui pengaruh preventif susu kuda Sumbawa terhadap gambaran histopatologi dan ekspresi TNF- α duodenum pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) model *inflammatory bowel disease* (IBD) yang diinduksi indometasin. Dalam penelitian ini digunakan hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dibagi menjadi 5 kelompok dan masing-masing kelompok berisi 5 ekor. Kelompok K- merupakan kelompok tikus kontrol negatif, kelompok K+ merupakan kelompok tikus kontrol positif, kelompok P1 merupakan kelompok yang diberi susu kuda sumbawa 0,5 mL dan diinduksi indometasin 15 mg/KgBB, kelompok P2 merupakan kelompok yang diberi susu kuda sumbawa 1 mL dan diinduksi indometasin 15 mg/KgBB, dan kelompok P3 merupakan kelompok yang diberi susu kuda sumbawa 1,5 mL dan diinduksi indometasin 15 mg/KgBB. Ekspresi TNF- α dihitung menggunakan metode *flowcitometry* yang dianalisis dengan uji statistik *One Way ANOVA* menggunakan aplikasi SPSS 16.0 dan histopatologi duodenum menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 10x dan 40x. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian susu kuda Sumbawa berpengaruh sangat nyata ($P < 0.01$) terhadap penurunan ekspresi TNF- α pada kelompok P1, P2 dan P3 dan perbaikan gambaran histopatologi duodenum pada kelompok P1, P2 dan P3.

Kata kunci : *Inflammatory bowel disease*, Indometasin, Susu kuda Sumbawa, TNF- α , Duodenum

**THE PREVENTIVE EFFECT OF SUMBAWA HORSE MILK ON
HISTOPATHOLOGICAL REPRESENTATION AND EXPRESSION
OF TNF- α DUODENUM ON WHITE RATS (*Rattus norvegicus*)
MODEL *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) INDUCED
BY INDOMETHACIN**

ABSTRACT

Inflammatory bowel disease (IBD) is a disease which is involve immune reaction in the body against digestive tract including the duodenum. One of the factors that cause this disease is the consumption of NSAID drugs such as indomethacin. Sumbawa horse milk is one of the dairy farm products that contains bioactive compounds such as lysozyme and lactoferrin which is funcionate as an antioxidants, anti-inflammatory, antimicrobials, immunomodulator and contain high levels of Lactic Acid Bacterial (LAB). The content has the potential to suppress TNF- α expression and prevent duodenal tissue damage due to IBD disease. The aim of this research was to determine the preventive effect of Sumbawa horse milk on histopathological representation and expression of TNF- α duodenum on white rats (*Rattus norvegicus*) model of inflammatory bowel disease (IBD) induced by indomethacin. In this research used white rats (*Rattus norvegicus*) as an experimental animals which were divided into 5 groups and each group contained 5 rats. K- group is a group of negative control rats, K + group is a group of positive control rats, P1 group was the group given 0.5 mL of Sumbawa horse milk and induced with indomethacin 15 mg / KgBB, P2 group was the group given 1 mL of Sumbawa horse milk and induced with indomethacin 15 mg / KgBB, and the P3 group was the group given 1,5 mL Sumbawa horse milk and induced with indomethacin 15 mg / KgBB. TNF- α expression was calculated using flowcitometry method which was analyzed by One Way ANOVA statistical test using the SPSS 16.0 application and duodenal histopathology using a light microscope with 10x and 40x magnifications. The results of this research showed that appropriation of Sumbawa horse milk had a highly significant impact (P <0.01) to decrease TNF- α expression in groups P1, P2 and P3 and refinement in duodenal histopathology in groups P1, P2 and P3.

Keywords : Inflammatory bowel disease, Indomethacin, Sumbawa horse milk, TNF- α , Duodenum

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis ucapkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa, karena dengan karunia-Nya penulis dapat membuat Skripsi dengan judul **“Pengaruh Preventif Susu Kuda Sumbawa Terhadap Gambaran Histopatologi dan Ekspresi TNF- α Duodenum Pada Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Model Inflammatory Bowel Disease (IBD) Yang diinduksi Indometasin**” Maksud dan tujuan penulisan Skripsi ini untuk memenuhi tugas akhir. Penulis tidak lupa ucapkan terimakasih kepada:

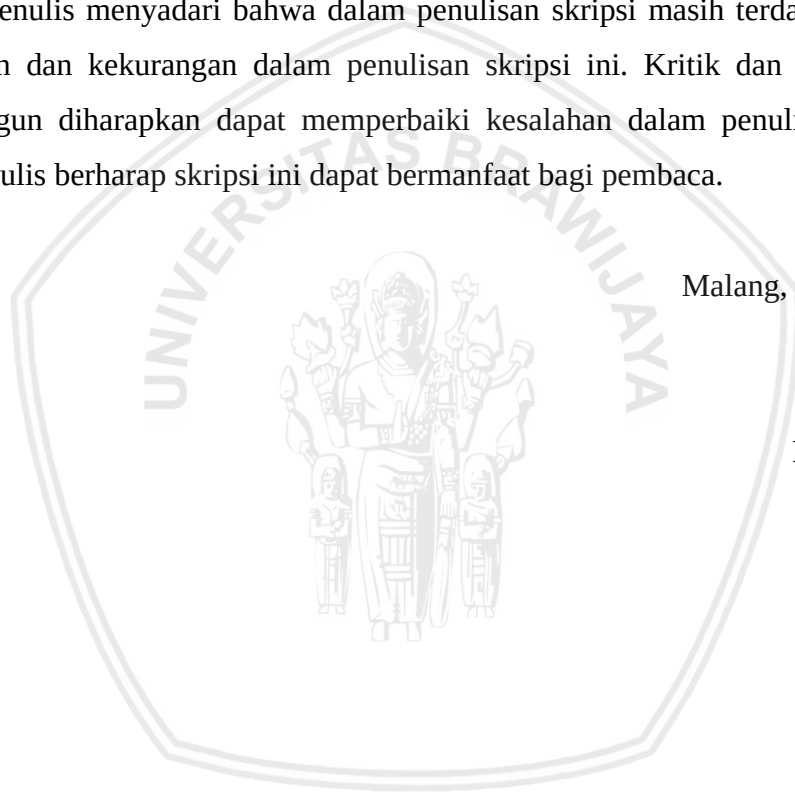
1. Kedua orang tua penulis ayahanda Yusharnovian dan ibunda Sri Setiawati yang senantiasa memberikan semangat serta do'a dan dukungan kepada penulis.
2. Kakak penulis Cynthia Anugrahaty yang senantiasa memberikan arahan dan masukan yang membangun kepada penulis.
3. Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
4. Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS selaku dosen pembimbing satu atas segala bantuan, kesempatan, nasihat, bimbingan, dan arahan yang diberikan kepada penulis.
5. drh. Nurina Titisari, M.Sc selaku dosen pembimbing dua atas segala bantuan, kesempatan, nasihat, bimbingan, dan arahan yang diberikan kepada penulis.
6. drh. Galuh Chandra Agustina, M.Si selaku dosen penguji satu yang telah memberikan saran dan kritik yang sangat membangun kepada penulis.
7. drh. Albiruni Haryo, M.Sc selaku dosen penguji dua yang telah memberikan saran dan kritik yang sangat membangun kepada penulis.
8. drh. Ahmad Fauzi, M.Sc selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan arahan dan masukan yang sangat membangun kepada penulis.
9. Theresa, Oktalita dan Ristia sebagai teman satu kelompok skripsi yang selalu membantu dan memberi semangat untuk menyelesaikan skripsi.

10. Sahabat kontrakan locals only fandi, adit, paringga, irfan, kama, yohanes, faris, waddran, hasan, very, liam dan cheppy yang selalu memberikan semangat dan hiburan agar tidak penat saat menyusun skripsi.
11. Keluarga Brachial Class 2015 dan teman-teman kedokteran hewan angkatan 2015.
12. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan karya tulis ini yang tidak mungkin penulis sebutkan satu per satu.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi masih terdapat banyak kesalahan dan kekurangan dalam penulisan skripsi ini. Kritik dan saran yang membangun diharapkan dapat memperbaiki kesalahan dalam penulisan. Akhir kata, penulis berharap skripsi ini dapat bermanfaat bagi pembaca.

Malang, 2 Mei 2019

Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xii
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	5
1.5 Manfaat	6
 BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 <i>Inflammatory Bowel Disease</i> (IBD)	7
2.1.1 Terapi	7
2.1.2 Patofisiologi IBD	8
2.1.3 Patomekanismen IBD oleh Indometasin	9
2.2 Indometasin	10
2.3 Hewan model	12
2.4 Duodenum	14
2.4.1 Mikroskopis Duodenum	16
2.5 Tumor Necrosis Faktor Alpha (TNF- α)	19
2.6 Susu Kuda Sumbawa	20
 BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN	
3.1 Kerangka Teori	22
3.2 Kerangka Konsep	23
3.3 Hipotesa Penelitian	25
 BAB 4 METODE PENELITIAN	
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	26
4.2 Materi Penelitian	26
4.2.1 Alat	26
4.2.2 Bahan	26
4.3 Tahapan Penelitian	27
4.4 Rancangan Penelitian	27

4.5 Variabel Penelitian	30
4.6 Prosedur Kerja.....	30
4.6.1 Persiapan Hewan Coba	30
4.6.2 Pemberian Susu Kuda Sumbawa	31
4.6.3 Induksi IBD dengan Indometasin.....	31
4.6.4 Isolasi Organ Duodenum	31
4.6.5 Pembuatan Preparat Histopatologi Duodenum	32
4.6.6 Pengukuran Ekspresi TNF- α dengan <i>Flowcitometry</i>	35
4.7 Analisa Data	36

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Preventif Susu Kuda Sumbawa Terhadap Ekspresi TNF- α Duodenum pada Tikus Putih (<i>Rattus Norvegicus</i>) Model <i>Inflammatory Bowel Disease</i> (IBD) yang diinduksi Indometasin	38
5.2 Pengaruh Preventif Susu Kuda Sumbawa Terhadap Gambaran Histopatologi Duodenum pada Tikus Putih (<i>Rattus Norvegicus</i>) Model <i>Inflammatory Bowel Disease</i> (IBD) yang diinduksi Indometasin	42

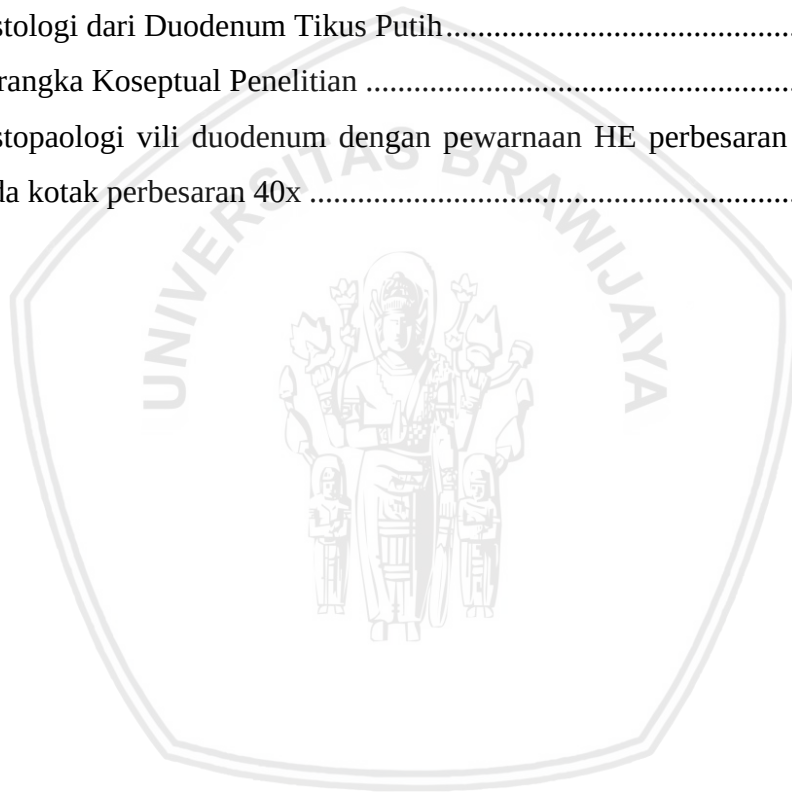
BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan	49
6.2 Saran.....	49

DAFTAR PUSTAKA	50
-----------------------------	-----------

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Metabolisme Indometasin	10
2.2 Tikus Putih (<i>Rattus novergicus</i>)	14
2.3 Bagian-Bagian dari Duodenum	15
2.4 Gambar Mikroskopis Duodenum Tikus	18
2.5 Histologi dari Duodenum Tikus Putih.....	18
3.1 Kerangka Koseptual Penelitian	22
5.1 Histopaologi vili duodenum dengan pewarnaan HE perbesaran 10x pada kotak perbesaran 40x	44



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Rancangan Penelitian “ <i>Two Ways Table</i> ”	29
4.2 ANOVA (<i>Analysis Of Variance</i>).....	29
5.1 Hasil Perhitungan ANOVA	39
5.2 Hasil Rata-rata Ekspresi TNF- α Organ Duodenum	39



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian	56
2. Pembuatan Preparat Gambaran Histopatologi Jaringan.....	57
3. Ekspresi TNF- α dengan <i>Flowcitometry</i>	58
4. Perhitungan Dosis Indometasin.....	59
5. Prosedur Pembuatan Preparat Histopatologi dengan Pewarnaan HE.....	60
6. Kode Etik Penelitian.....	61
7. Data Berat Badan Tikus Penelitian IBD.....	62
8. Hasil Analisis <i>Flowcitometry</i>	63
9. Hasil Statistika Analisa Ekspresi TNF- α	68
10. Uji Bakteri Asam Laktat dan Antioksidan Susu Kuda Sumbawa	74
11. Dokumentasi Penelitian.....	75

DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

Simbol/Singkatan	Keterangan
%	: Persen
°C	: Derajat Celcius
AINS	: Anti Inflamasi Non Steroid
BAL	: Bakteri Asam Laktat
BB	: Berat Badan
CD	: <i>Crohn Disease</i>
cm	: centimeter
COX	: <i>Cyclooxygenase</i>
dkk	: dan kawan-kawan
GALD	: <i>Gastro Intestinal Lymphoid Tissue</i>
HE	: <i>Hematoxyline-eosin</i>
IBD	: <i>Inflammatory Bowel Disease</i>
IFN γ	: <i>Interferon Gamma</i>
kD	: kilodalton
kg	: kilogram
mg	: miligram
ml	: mililiter
NSAID	: <i>Non Steroid Anti Inflamasi Drug</i>
PBS	: <i>Phosphate-buffered saline</i>
pH	: <i>Power Of Hydrogen</i>
TGF β	: <i>Transforming growth factor beta</i>
TNF α	: <i>Tumor necrosis factor alpha</i>
UC	: <i>Ulcerative Colitis</i>

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Inflammatory bowel disease (IBD) merupakan penyakit idiopatik, yang diperkirakan melibatkan reaksi imun dalam tubuh terhadap saluran pencernaan. Penyebab *Inflammatory bowel disease* (IBD) belum diketahui secara pasti (Defarges, 2016), tetapi menurut Sartor (2006) beberapa faktor penyebab diantaranya infeksi spesifik yang persisten, disbiosis (ratio abnormal daripada agen mikroba yang menguntungkan dan komensal yang merugikan), fungsi barier mukosa yang terganggu dan *clearance* mikroba yang terganggu. *Inflammatory bowel disease* terdiri dari dua tipe yaitu *ulcerative colitis* (UC) dan *crohn disease* (CD). Seperti namanya, *ulcerative colitis* terbatas pada kolon, sedangkan *crohn disease* (CD) mencakup semua segmen traktus gastrointestinal dari mulut sampai anus. Penyakit *Inflammatory bowel disease* (IBD) sering menyerang anjing dan kucing yang berusia tua. Penyakit ini secara tidak langsung diakibatkan oleh reaksi pada sistem imun hipersensitifitas yang tidak mampu membedakan antigen-antigen, termasuk bakteri saluran pencernaan dan pakan (Fitri, 2018). Gejala klinis penyakit *inflammatory bowel disease* diantaranya diare disertai darah, kotoran lembek, bloat (kembung), nyeri pada bagian abdomen, anemia, berat badan turun, demam, muntah, halitosis (bau nafas) dan dehidrasi (Fitri, 2018).

Penyakit *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) terjadinya diawali dengan aktivasi sel T mukosa dan makrofag yang mengalami peningkatan

ekspresi kemudian sebagai pencetus inflamasi dapat merangsang produksi sitokin pro-inflamasi seperti TNF α , IL-6, IL-18 dan IL-1 β . Sitokin pro-inflamasi tersebut dapat meningkatkan produksi radikal bebas yang berlebih. Radikal bebas yang berlebih dapat menimbulkan terjadinya stres oksidatif. (Hardman, 2001). *Kasus infamatory bowel disease* dapat disebabkan karena penggunaan obat golongan NSAID, pada penelitian ini dibuat hewan model *inflammatory bowel disease* yang diinduksi obat golongan NSAID seperti indometasin. Pemberian obat indometasin akan memberikan efek kerusakan pada saluran pencernaan dan saluran pencernaan termasuk duodenum akan mengalami inflamasi.

Indometasin merupakan obat golongan non steroid anti inflamasi yang memiliki sifat mampu mengurangi nyeri, demam dengan inflamasi, dan yang disertai dengan gangguan inflamasi nyeri lainnya, akan tetapi indometasin jika digunakan dalam jangka panjang akan memberikan resiko toksisitas saluran cerna yang besar (Fajriani, 2008). Menurut Lanas dan Scarpignato (2006) pemberian obat-obatan NSAID seperti indometasin dapat menyebabkan inflamasi berupa kerusakan vili dan mukosa di usus. Proses terjadinya inflamasi dimediasi oleh histamin, prostaglandin, eicosanoid, leukotiren dan sitokin. Menurut Roman (2009) proses terjadinya inflamasi dimulai dengan kerusakan jaringan akibat stimulus yang menyebabkan pecahnya sel mast diikuti dengan pelepasan mediator inflamasi, dilanjutkan dengan terjadinya vasodilatasi yang kemudian menyebabkan migrasi sel leukosit. Kerusakan saluran pencernaan seperti duodenum yang disebabkan

oleh indometasin akan menyebabkan inflamasi yang ditandai dengan adanya infiltrasi sel-sel inflamasi seperti neutrofil dan makrofag, serta kerusakan vili dan epitel pada duodenum (Mitchell *and* Cotran, 2003), sehingga diperlukan bahan alternatif yang dapat mencegah dan mengurangi efek dari inflamasi penyakit *inflammatory bowel disease* (IBD).

Alternatif bahan yang dapat digunakan untuk mengurangi efek inflamasi dan mencegah penyakit *inflammatory bowel disease* dengan menggunakan hasil *dairy farm*, salah satu hasil *dairy farm* yaitu susu kuda Sumbawa. Susu kuda Sumbawa memiliki kandungan senyawa bioaktif dan Bakteri Asam Laktat (BAL). Fungsi dari senyawa bioaktif sebagai antioksidan, antiinflamasi, antimikrobal, antihipertensi, antikolesterol, sitomodulator dan imunomodulator. Menurut Severin dan Wenshui (2005) susu kuda mempunyai komponen aktif sebagai pangan kesehatan dan obat (*nutraceuticals*) karena kaya akan nutrisi yang berpengaruh terhadap aktivitas biologis, diantaranya pencegahan dan pengobatan penyakit diare, penyerapan mineral yang kurang sempurna dan immunodefisiensi. Selain itu, *whey* protein susu kuda Sumbawa mengandung laktoferin, laktoperoksidase, lisozim dan immunoglobulin. Laktoferin pada susu kuda berpotensi menurunkan proses inflamasi yang akan menghambat pengeluaran sitokin proinflamasi seperti TNF- α dan berfungsi sebagai antioksidan. Lisosim pada susu kuda memiliki aktifitas antibakteri, kemampuan lisosim dalam membatasi migrasi neutrofil ke jaringan yang rusak memberikan

kemungkinan untuk menggunakan lisosim sebagai agen antiinflamatori (Yuniati dan Sahara, 2012).

Berdasarkan latar belakang diatas, mengingat fungsi susu kuda Sumbawa dapat mengurangi efek inflamasi, berperan sebagai antiinflamasi, antioksidan dan imunomodulator sehingga penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh preventif susu kuda Sumbawa secara *in vivo* dalam mencegah dan mengurangi efek inflamasi pada duodenum yang diinduksi indometasin dilihat dari gambaran histopatologi dan ekspresi TNF- α .

1.2 Rumusan Masalah

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

1. Bagaimana pengaruh preventif susu kuda Sumbawa terhadap gambaran histopatologi pada organ duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) model IBD hasil induksi Indometasin?
2. Bagaimana pengaruh preventif susu kuda Sumbawa terhadap ekspresi TNF- α pada organ duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) model IBD hasil induksi Indometasin?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang sudah diuraikan, maka penelitian dibatasi oleh beberapa permasalahan sebagai berikut :

1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar, umur 8-12 minggu dengan berat badan tikus 150-200 gram. Penggunaan hewan coba telah lolos sertifikat laik etik dari komisi etik penelitian Universitas Brawijaya (KEP-UB).
2. Pembuatan hewan model IBD dilakukan dengan induksi indometasin dengan dosis 15 mg/kgBB yang diberikan satu kali secara peroral dengan menggunakan sonde lambung (Aulanni'am, 2012).
3. Susu kuda Sumbawa yang digunakan dalam penelitian ini diambil langsung dari peternakan kuda di Sumbawa, NTB.
4. Terapi preventif susu kuda Sumbawa diberikan dengan dosis 0,5 mL, 1 mL dan 1,5 mL/ BB selama 13 hari secara sonde lambung
5. Variabel yang diamati pada penelitian ini adalah gambaran histopatologi organ duodenum dengan pewarnaan HE dan ekspresi TNF- α dengan metode *flowcitometry*.

1.4 Tujuan

Berdasarkan latar belakang yang sudah diuraikan, maka tujuan dari penelitian ini sebagai berikut :

1. Mengetahui potensi terapi preventif susu kuda Sumbawa pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) model IBD yang diamati dari gambaran histopatologi organ duodenum.

2. Mengetahui potensi terapi preventif susu kuda Sumbawa pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) model IBD yang diamati dari ekspresi TNF- α organ duodenum.

1.5 Manfaat

Adapun manfaat yang diharapkan oleh penulis dari penelitian ini sebagai berikut :

1. Penelitian ini dapat digunakan sebagai kajian ilmiah pengaruh preventif susu kuda Sumbawa terhadap gambaran histopatologi dan ekspresi TNF- α duodenum pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) model IBD yang diinduksi indometasin.
2. Penelitian ini dapat digunakan sebagai literatur pengaruh pemberian susu kuda Sumbawa sebagai alternatif pencegahan IBD dalam dunia kedokteran hewan.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Inflammatory Bowel Disease (IBD)*

Inflammatory Bowel Disease (IBD) menggambarkan kondisi peradangan saluran cerna kronik dan idiopatik. Secara umum dibagi atas *ulcerative colitis (UC)* dan *crohn disease (CD)*. Etiopatogenesis IBD belum sepenuhnya diketahui. Faktor genetik dan lingkungan dalam saluran cerna seperti perubahan bakteri usus dan peningkatan permeabilitas epitel saluran cerna diduga berperan dalam gangguan imunitas saluran cerna yang berujung pada kerusakan saluran cerna (Kuhbacher, 2007). Menurut Sartor (2006) walaupun etiologi sebenarnya tidak pasti, ada penelitian yang memperkirakan teori etiologi IBD, yaitu infeksi spesifik yang persisten, disbiosis (ratio abnormal daripada agen mikroba yang menguntungkan dan komensal yang merugikan), fungsi barrier mukosa yang terganggu dan *clearance* mikroba yang terganggu.

2.1.1 Terapi

Tujuan terapi pada IBD (*Inflammatory Bowel Disease*) adalah mengurangi proses inflamasi, mencegah komplikasi dan mencegah relaps atau perburukan penyakit, memperbaiki status nutrisi dan kualitas hidup. Tujuan terapi medikamentosa adalah untuk mengendalikan proses inflamasi, menghilangkan gejala klinis, mencegah komplikasi, mencegah dan mengurangi relaps, dengan obat aminosalisilat, kortikosteroid, imunomodulator, anti-tumor nekrosis

faktor, anti-inflamasi (NSAIDs), dan antibiotik. Tidak hanya dengan terapi obat, namun akhir-akhir ini banyak penelitian mengenai pemberian probiotik dan prebiotik pada penyakit IBD (*Inflammatory Bowel Disease*). Probiotik dapat mengubah flora traktus gastrointestinal dengan mekanisme kompetitif, menghasilkan zat antimikroba, atau mempengaruhi respon kekebalan lokal. Ada juga yang mengatakan bahwa interaksi probiotik dengan sel epitel dapat mempercepat penyembuhan proses inflamasi. Efek prebiotik dapat ditingkatkan dengan pemberian prebiotik yang dapat merangsang pertumbuhan probiotik (Hyams, 2004).

2.1.2 Patofisiologi *Inflammatory Bowel Disease*

Patofisiologi penyakit *inflammatory bowel disease* adalah inflamasi pada mukosa traktus intestinal menyebabkan ulserasi, edema, perdarahan, kemudian hilangnya air dan elektrolit. Banyak mediator inflamasi yang telah diidentifikasi pada IBD, dimana mediator-mediator ini memiliki peran penting pada patologi dan karakteristik klinik penyakit IBD. Sitokin yang dikeluarkan oleh makrofag karena respon berbagai rangsangan antigenik, berikatan dengan reseptor-reseptor yang berbeda, kemudian menghasilkan efek-efek autokrin, parakrin, dan endokrin. Sitokin juga akan mendiferensiasikan limfosit menjadi berbagai tipe sel T. Sel T helper tipe 1 berhubungan dengan *crohn disease* sedangkan sel T helper tipe 2 berhubungan dengan *ulcerative colitis*. Respon imun inilah yang akan

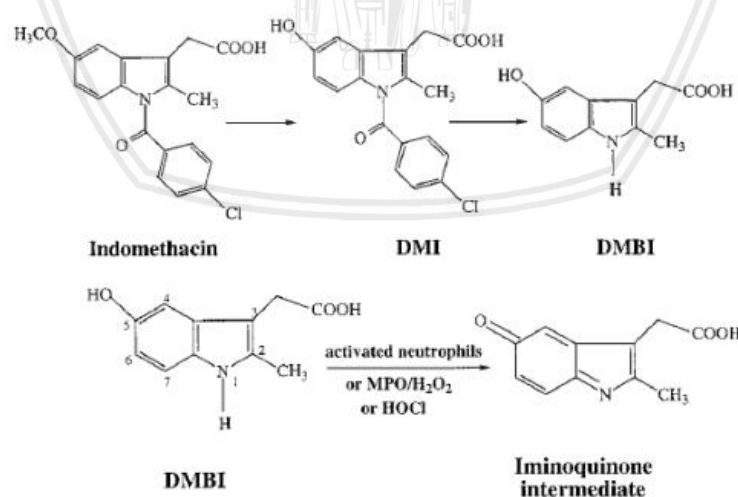
merusak mukosa intestinal dan menyebabkan proses inflamasi yang kronis (Sartor, 2006).

2.1.3 Patomekanisme IBD oleh Indometasin

Indometasin berkerja menghambat COX-1 dan COX-2, tetapi dianggap lebih efektif menghambat COX-1. Penghambatan COX-1 oleh indometasin akan menyebabkan kerusakan mukosa saluran cerna yang disertai pelepasan mediator-mediator kimia (mediator inflamasi), salah satunya adalah prostaglandin (Handoko, 2013). Produksi prostaglandin akan meningkat apabila sel mengalami kerusakan. Prostaglandin mempunyai banyak efek, termasuk diantaranya adalah eritema, vasodilatasi, peningkatan aliran darah lokal, menyebabkan sensitasi reseptor rasa nyeri terhadap stimulasi mekanik dan kimiawi. Prostaglandin bertanggung jawab bagi sebagian besar dari gejala peradangan (Wilmana dan Gans, 2007). Peradangan yang diakibatkan oleh efek indometasin akan meningkatkan rekrutmen dan retensi makrofag efektor, neutrofil, dan sel T ke dalam intestinal yang terinflamasi dan *terjadilah inflammatory bowel disease*. Sel-sel tersebut akan diaktivasi dan dikeluarkan sitokin-sitokin proinflamasi seperti TNF- α . Akumulasi sel efektor ini dikarenakan meningkatnya rekrutmen dan menurunnya apoptosis seluler (Sartor, 2006).

2.2 Indometasin

Indometasin merupakan golongan obat antiinflamasi non-steroid (OAINS). Obat antiinflamasi nonsteroid memiliki aktivitas antiinflamasi, analgesik dan antipiretik. Prinsip efek terapeutik obat AINS yaitu kemampuannya dalam menghambat produksi prostaglandin. Enzim pertama yang berperan dalam pembentukan prostaglandin yaitu siklooksigenase (COX). Enzim ini terdapat dalam dua bentuk yaitu siklooksigenase-1 (COX-1) dan siklooksigenase-2 (COX-2). COX-1 dapat ditemukan dalam kebanyakan sel dan jaringan normal dalam tubuh. COX-1 akan menghasilkan prostaglandin yang memelihara fungsi organ tubuh, melindungi integritas mukosa saluran pencernaan dan menghasilkan tromboksan derivat platelet yang berperan dalam agregrasi platelet dan vasokonstriksi (Brunton *et al.*, 2006).



Gambar 2.1 Metabolisme Indometasin. (Sholichah dkk., 2012)

Indometasin merupakan turunan indol metilat yang memiliki efek analgesik perifer maupun sentral. Dalam distribusinya, indometasin ini sangat

cepat diserap oleh saluran pencernaan. Pada **Gambar 2.1.** jalur metabolisme indometasin mengalami reaksi O-dimetilasi dan N-deasilasi. Masing-masing produk reaksi menghasilkan *desmethylo-methacin* (DMII), *desclorobenzoylindomethacin* (DBI) dan DMBI. DMBI selanjutnya akan dioksidasi oleh sistem myeloperoxidase (MPO) yaitu enzim pengoksidasi yang terdapat pada neutrofil aktif dan H_2O_2 atau HOCL yaitu oksidan utama yang diproduksi oleh neutrofil teraktivasi membentuk metabolit reaktif imunokuinon (Ju and Uetrecht, 1998). Metabolit imunokuinon yang cukup reaktif ini akan memicu pengaktifan neutrofil dan melepaskan sitokin dan kemokin seperti ROS sehingga dapat terjadi stress oksidatif (Sholichah dkk., 2012). Indometasin dapat mengurangi pembentukan prostaglandin dengan menghambat siklooksigenase (COX) secara non selektif. Penghambatan terhadap enzim siklooksigenase dapat menghambat produksi prostaglandin, menurunkan produksi mukus dan peningkatan motilitas usus. Penurunan produksi mukus tersebut akan menyebabkan perlindungan mukosa pada usus berkurang. Selain itu indometasin akan menghambat fosforilasi oksidatif ATP (Adenosin Triphospat) di mitokondria. Fosforilasi oksidatif adalah proses pembentukan ATP (Adenosin Triphospat) di dalam sel. Penghambatan fosforilasi oksidatif ATP (Adenosin Triphospat) tersebut akan mengakibatkan apoptosis pada sel. Sel yang mengalami apoptosis akan menghasilkan ROS (*Reactive Oxygen Species*). Adanya peningkatan ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang berlebihan akan mengakibatkan keadaan stress oksidatif. Keadaan stress oksidatif di dalam jaringan akan menyebabkan peroksidasi

lipid sehingga akan mengakibatkan kerusakan pada epitel saluran pencernaan (Takeuchi *et al.*, 2003).

Absorpsi indometasin setelah pemberian secara oral cukup baik yaitu 92-99% terikat pada protein plasma dengan waktu paruh plasma kira-kira 2-4 jam. Dimana metabolisme indometasin terjadi di hati serta diekskresi dalam bentuk asalnya maupun dari metabolit melalui urin dan empedu. Efek samping dari indometasin pada saluran cerna berupa nyeri pada abdomen, diare, perdarahan saluran cerna dan pankreatitis. Indometasin juga dapat mengakibatkan agranulositosis, anemia aplastik dan trombositopenia serta vasokonstriksi pembuluh koroner (Corwin, 2008).

2.3 Hewan Model Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Hewan percobaan atau hewan model laboratorium adalah hewan yang sengaja dipelihara dan ditenakan untuk dipakai sebagai hewan model guna mempelajari dan mengembangkan berbagai macam bidang ilmu dalam skala penelitian atau pengamatan laboratorik. Penggunaan hewan percobaan untuk penelitian banyak dilakukan di bidang fisiologis, farmakologi, biokimia, patologi dan komparatif zoologi. Di bidang ilmu kedokteran hewan selain untuk penelitian hewan percobaan juga sering digunakan sebagai keperluan diagnostik. Berbagai jenis hewan yang umum digunakan sebagai hewan percobaan yaitu mencit, tikus, marmut, kelinci, hamster, unggas, kambing, sapi, kerbau, kuda dan simpanse (Malole dan Pramono, 1989).

Tikus sebagai hewan omnivora (pemakan segala) biasanya mau mengkonsumsi semua makanan yang dapat dimakan manusia. Kebutuhan pakan bagi seekor tikus setiap harinya kurang lebih sebanyak 10% dari bobot tubuhnya, jika pakan tersebut berupa pakan kering. Hal ini dapat pula ditingkatkan sampai 15% dari bobot tubuhnya jika pakan yang dikonsumsi berupa pakan basah. Kebutuhan minum seekor tikus setiap hari kira-kira 15-30 ml air. Jumlah ini dapat berkurang jika pakan yang dikonsumsi sudah mengandung banyak air (Priyambodo, 2007). Tingkat konsumsi dipengaruhi oleh temperatur kandang, kelembaban, kesehatan dan kualitas makanan itu sendiri.

Menurut Krinke (2000) klasifikasi Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordata
Class	: Mammalia
Order	: Rodentia
Family	: Muridae
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>



Gambar 2.2 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) (*The Conversation*, 2013)

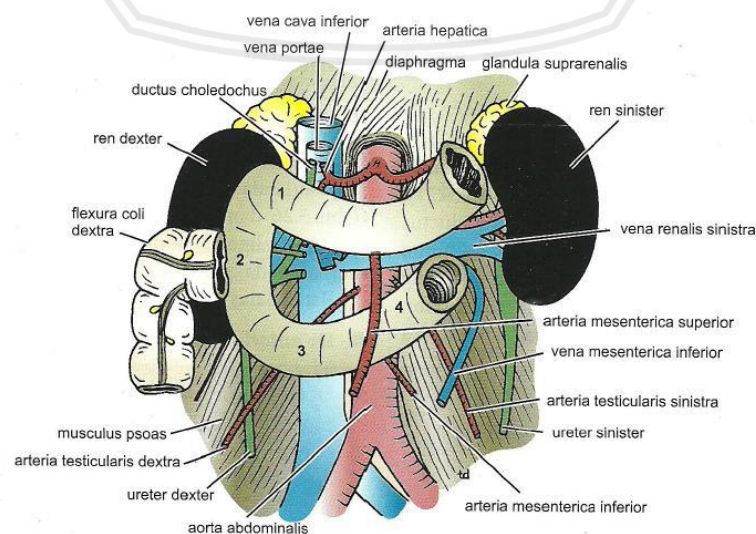
Tikus putih strain Wistar memiliki karakteristik yaitu kepala lebar, telinga memanjang dan ukuran ekor yang panjang dibanding ukuran tubuhnya. Tikus Wistar termasuk ke dalam tikus albino yang masuk dalam spesies *Rattus norvegicus*, yang pertama kali dikembangkan oleh institut Wistar pada tahun 1906 untuk kepentingan penelitian biologi dan kesehatan (Alexandru, 2011). Wolfenshon and Lloyd (2013) menyatakan bahwa berat tikus putih jantan dewasa yaitu 450-520 gram sedangkan berat tikus betina 250-300 gram. Tikus jantan lebih berat dibanding tikus betina pada semua kelompok umur serta terjadinya perubahan bobot organ (ginjal, hati, paru dan limpa), nilai hematologi, nilai biokimia darah (AST dan ALT) seiring dengan bertambahnya umur tikus (Marice dan Sulistyowati, 2011).

2.4 Duodenum

Intestinum merupakan salah satu organ sistem pencernaan. Fungsi saluran pencernaan yaitu mencerna dan memecah makanan menjadi lebih kecil dan sederhana sehingga dapat diserap oleh sirkulasi tubuh guna menunjang kehidupan organisme. Secara makroskopis usus halus dibagi

menjadi tiga bagian yaitu duodenum, jejunum dan ileum. Ketiga bagian ini pada dasarnya memiliki struktur histologi yang hampir sama. Lapisan-lapisan penyusun dinding usus halus mulai dari dalam ke luar lumen usus terdiri dari tunika mukosa, tunika submukosa, tunika muskularis dan tunika serosa (Eurell dan Frappier, 2013).

Duodenum dibagi menjadi empat bagian yang tersusun secara berurutan. Bagian pertama dimulai dari akhir pilorus lambung lalu berjalan keatas dan belakang hingga setinggi vertebrae lumbalis II, bagian kedua yang berjalan vertikal ke bawah di depan hilum renale dextrum di sisi kanan vertebrae lumbalis II dan III, bagian ketiga yang berjalan horizontal lalu melintas di depan columna vertebralis dan berjalan menyusuri sisi bawah caput pancreatis dan bagian ke empat yang berjalan ke atas lalu ke kiri hingga mencapai flexura duodenojejunalis, yang tetap pada posisinya karena ditahan oleh ligamentum treitz (Snell, 2012). Bagian-bagian duodenum dapat dilihat pada **Gambar 2.3**.



Gambar 2.3. Bagian-Bagian Dari Duodenum. (Snell, 2012)

Organ duodenum merupakan tahap akhir dari proses penyerapan makanan yang terjadi didalam organ pencernaan. Pertistiwa yang terjadi pada organ duodenum antara lain pencernaan makanan, penyerapan nutrisi dan sekresi endokrin (Junqueir, 2008). Menurut Michael (2006) Fungsi utama dari duodenum adalah absrobsi, walaupun memiliki ukuran yang paling pendek dibanding intestinum lainnya, area permukaan duodenum sangat luas karena mukosanya berlipat dengan vili yang bisa dilihat secara mikroskopik.

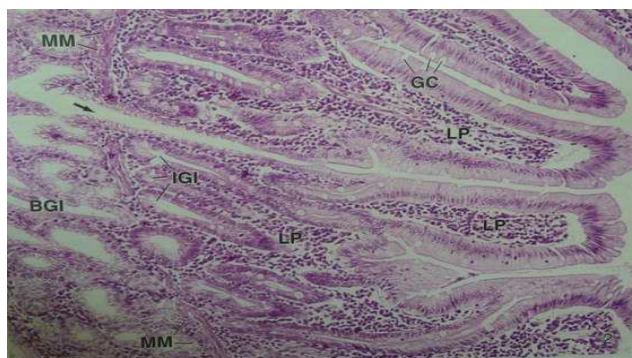
Selain itu didalam organ duodenum juga terjadi pencernaan karbohidrat, lemak dan protein menjadi zat yang lebih sederhana oleh bantuan enzim dari pankreas. Untuk mencerna lemak dibutuhkan garam empedu untuk mengemulsinya, prosesnya terjadi ketika lemak yang bersentuhan dengan mukosa duodenum menyebabkan kontraksi kandung empedu yang diperantarai oleh kerja kolesistokinin yang merupakan hasil sekresi dari mukosa duodenum (Puspita dan Putra, 2014).

2.4.1 Mikroskopis Duodenum

Struktur mikroskopis duodenum dengan bagian usus halus lainnya, yakni jejunum dan ileum memiliki karakteristik yang mirip. Dimana struktur mukosa dan submukosa duodenum membentuk kerutan-kerutan yang disebut plicae circulares dan pada mukosanya sendiri terdapat penonjolan-penonjolan berbentuk seperti daun yang disebut vili. Vili-vili duodenum tersusun atas sel absroptif atau enterosit dan sel goblet, yang keseluruhannya tersusun secara kolumnar. Sel absroptif ini memiliki fungsi menyerap molekul nutrisi yang berasal

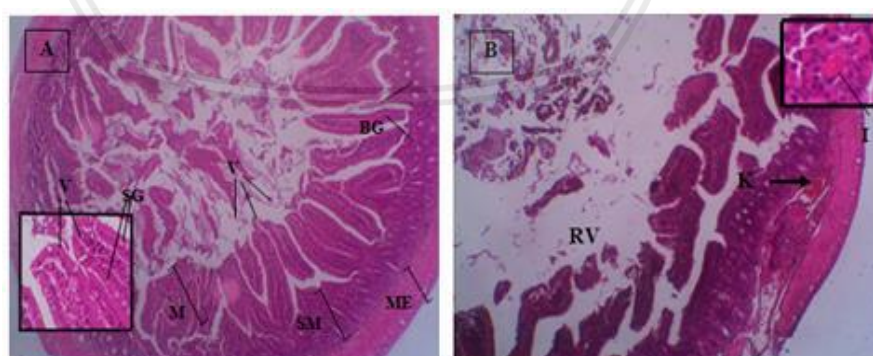
dari proses pencernaan, sedangkan sel goblet berfungsi untuk menghasilkan musin glikoprotein yang akan melumasi dan melindungi lapisan usus. Sel goblet ini jarang dijumpai dalam duodenum dan lebih banyak dijumpai pada bagian usus halus lainnya (Mescher, 2012).

Vili-vili pada usus halus ini, diantaranya terdapat suatu muara yang berasal dari kelenjar tubular, yang disebut kriptus lieberkuhn. Pada epitel dari kriptus ini, selain terdiri dari sel absorptif dan sel goblet, juga dijumpai sel paneth yang berperan dalam imunitas alami, sel enteroendokrin yang menghasilkan berbagai peptida yang memiliki berbagai fungsi dan sel punca. Dibawah lapisan epitel duodenum terdapat lamina propia yang terdiri atas jaringan ikat longgar. Lapisan mucularis mucosae yang berfungsi dalam menimbulkan pergerakan-pergerakan pada vili maupun plicae circulares guna proses pencernaan. Pada lapisan submukosa duodenum terdapat kelenjar brunner yang menghasilkan produk basa yang dapat menetralkan kimus yang baru saja masuk dari dalam lambung. Lapisan muskularis terdiri atas lapisan luar yang sirkular dan lapisan dalam yang longitudinal. Lapisan terluar dari duodenum adalah lapisan serosa tipis yang disertai dengan mesotel (Mescher, 2012). Histologi duodenum dapat dilihat pada **Gambar 2.4**.



Gambar 2.4. Histologi dari duodenum Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) dengan pewarnaan HE. Keterangan, GC = goblet cell, LP = Lamina Propria, BGI = Brunner's Gland, MM = Muscularis Mucosa (Ross *et al.*, 2003)

Penggunaan obat-obatan AINS seperti indometasin dapat menyebabkan kerusakan mukosa epitel duodenum. Menurut Aryani dkk (2017) *inflammatory bowel disease* yang diinduksi indometasin akan menyebabkan kerusakan pada duodenum yang ditandai dengan adanya ruptur vili, kongesti dibagian luar mukus layer dan inflamasi yang disebabkan oleh infiltrasi dari sel *inflammatory* dan makrofag. Gambaran mikroskopik duodenum akibat paparan indometasin 15 mg/KgBB dapat dilihat pada **Gambar 2.5**.



Gambar 2.5. Gambar Mikroskopik Duodenum Tikus (Perbesaran 40x). Keterangan: (A) duodenum normal; (B) duodenum yang diinduksi oleh indometasin 15 mg/kg; (ER) erosi; (K) kongesti; (RV) ruptur vili; (I) inflamasi; (ME) muskulus eksternal; (SM) sub mukosa; (M) mukosa; (V) vili; (SG) sel goblet; (BG) brunner gland (Aryani dkk., 2017).

2.5 Tumor Nekrosis Faktor Alpha (TNF- α)

Tumor nekrosis faktor alpha (TNF- α) merupakan sitokin utama pada respon inflamasi akut terhadap benda asing yang masuk kedalam tubuh. Infeksi yang berat dapat memicu produksi TNF dalam jumlah besar yang menimbulkan reaksi sistemik. TNF disebut TNF- α atas dasar historis dan untuk membedakannya dari TNF- β atau limfotoksin. Sumber utama TNF- α ialah fagosit mononuklear dan sel T yang diaktifkan antigen, sel NK dan sel mast. Lipopolisakarida merupakan rangsangan poten terhadap makrofag untuk mengekresi TNF, IFN- γ yang diproduksi sel T dan sel NK juga merangsang makrofag antara lain meningkatkan sintesis TNF (Baratawidjaya, 2010). Cruse *and* Lewis (2004) menyatakan bahwa Tumor Nekrosis Factor (TNF- α) berperan pada respons inflamasi akut. Pada kadar rendah, TNF bekerja terhadap leukosit dan endotel, dan menginduksi inflamasi akut. Pada kadar sedang, TNF berperan dalam inflamasi sistemik. Pada kadar tinggi, TNF- α berperan dalam peradangan, penyembuhan luka, remodelling jaringan dan dapat menginduksi syok septik dan cachexia.

TNF- α mempunyai beberapa fungsi dalam proses inflamasi, yaitu dapat meningkatkan peran pro trombotik dan merangsang molekul adhesi dari sel leukosit serta menginduksi sel endotel, berperan dalam mengatur aktivitas makrofag dan respon imun dalam jaringan dengan merangsang faktor pertumbuhan dan sitokin lain, berfungsi sebagai regulator dari hematopoetik serta komitogen untuk sel T dan sel B serta aktivitas sel neutrofil dan makrofag (Soeroso, 2007). Menurut Rifa'i (2010) Tumor Nekrosis Faktor

(TNF- α) bermanfaat bagi organisme. Hal ini sangat penting, baik dalam kekebalan bawaan dan berperan terhadap respon awal patogen dan mempromosikan Th1 kekebalan. Inflamasi adalah sebagian besar proses yang bermanfaat, misalnya dalam penyembuhan luka dan penyembuhan tumor. Tumor Nekrosis Faktor (TNF- α) juga penting dalam induksi respon fase akut dalam mengatur metabolisme energi.

2.6 Susu Kuda Sumbawa

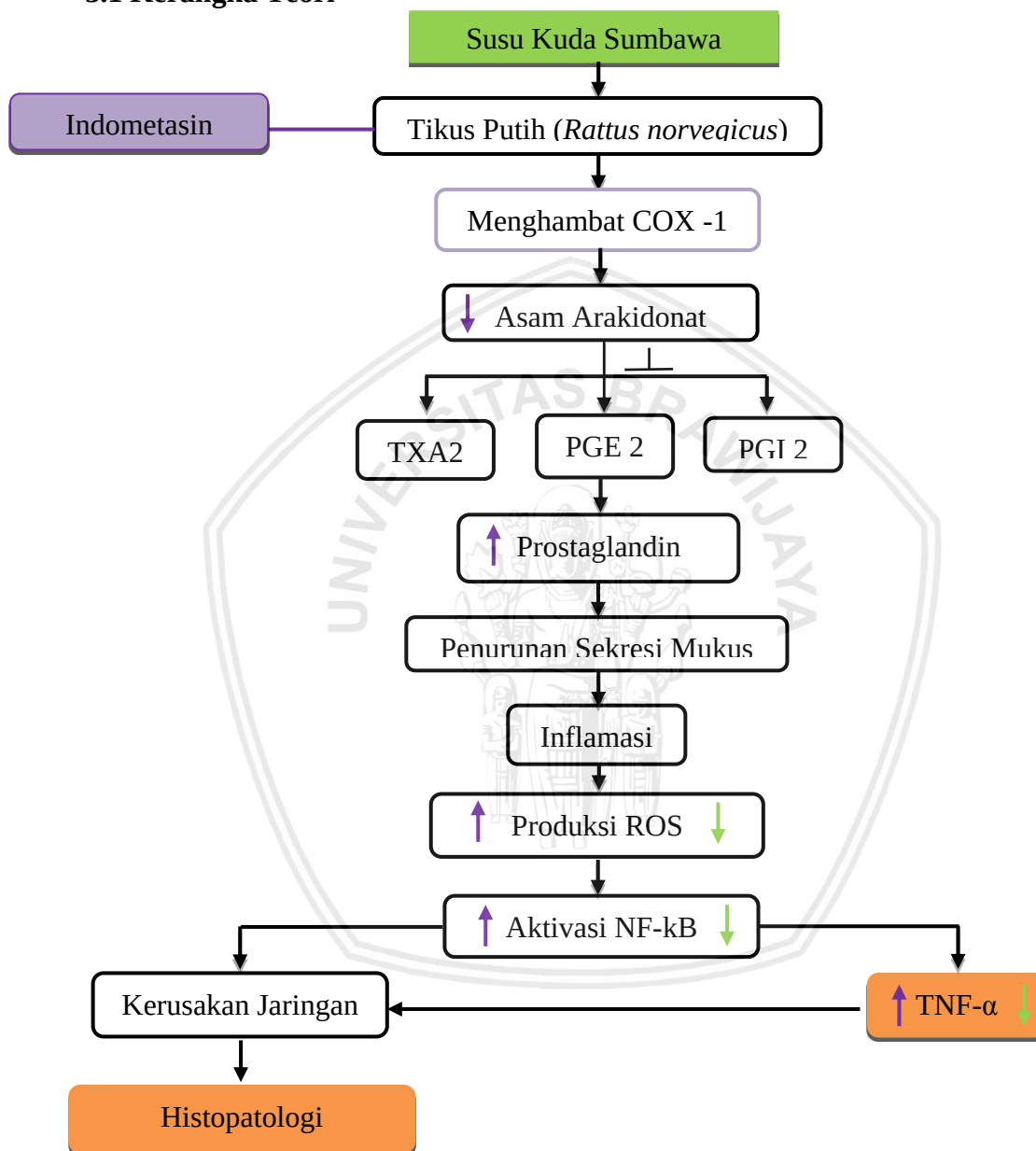
Susu kuda Sumbawa merupakan salah satu jenis susu hasil pemerahan kuda yang dilepas di padang rumput di Nusa Tenggara Barat, khususnya di Kabupaten Dompu, Bima dan Sumbawa. Susu kuda Sumbawa di pasaran dikenal dengan nama susu kuda liar yang banyak mempunyai berbagai efek menyehatkan (Rijatmiko, 2003). Menurut Infovet (2009) bahwa susu kuda Sumbawa mempunyai keistimewaan yaitu tidak mengalami penggumpalan dan kerusakan meskipun tidak dipasteurisasi dan tanpa diberi bahan pengawet apapun, serta tahan disimpan pada suhu kamar sampai 5 bulan. Sifat ini memberi petunjuk bahwa dalam susu kuda Sumbawa terkandung zat yang dapat menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri yang diduga senyawa antimikroba alami. Pada umumnya susu segar selain susu kuda akan mengalami kerusakan atau pembusukan dan tidak dapat dikonsumsi lagi apabila disimpan lebih dari 6 jam pada suhu kamar. Hal ini menunjukkan adanya suatu senyawa anti pembusukan di dalam susu kuda tersebut yang ada

hubungannya dengan bakteri pembentuk asam yang biasa disebut dengan bakteri asam laktat (BAL) (Riyadh, 2003).

Komposisi zat gizi susu kuda Sumbawa hampir sama dengan susu lainnya, seperti susu sapi dan kambing mengandung protein, karbohidrat, laktosa, lemak, kalsium dan mineral seperti kalium dan magnesium. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Yuniati dan Sahara (2012) menunjukkan kandungan protein pada susu kuda Sumbawa 1,92 g%, kadar lemak 1,58g% dan memiliki pH 4. Susu kuda Sumbawa juga memiliki bioaktif protein yang mengandung zat bioaktif dengan berat molekul yang rendah yaitu antara 14.400 kD (Lisosim) dan 21.000 kD (anti tripsin). Lisosim memiliki aktivitas antibakterial. Enzim ini berfungsi dalam kaitannya dengan laktoferin dan imunoglobulin A (IgA). Lisosim efektif terhadap *Escherichia coli* bila bekerja sama dengan IgA yang juga banyak terdapat pada susu, dengan demikian risiko sakit perut atau diare akibat mengonsumsi susu kuda dapat dikurangi. Kemampuan lisosim dalam membatasi migrasi neutrofil ke jaringan yang rusak memberikan kemungkinan untuk menggunakan lisosim sebagai agen antiinflamatori (antiradang). Sedangkan enzim tripsin yang ada dalam usus dimana fungsinya sebagai pemecah protein akan dihambat oleh faktor antitripsin agar imunoglobulin pelindung tidak akan dipecah oleh tripsin (Yuniati dan Sahara, 2012).

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN

3.1 Kerangka Teori

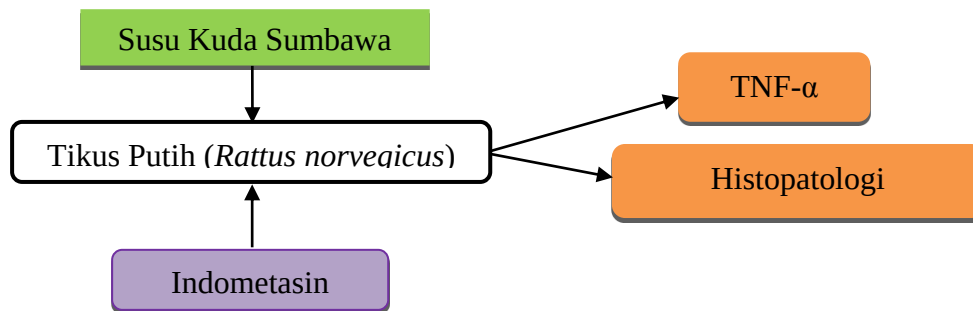


Gambar 3.1. Kerangka Konseptual Penelitian.

Ketengan :

- | | |
|--------------------------------|------------------------------------|
| ↓ : Pengaruh Induksi Susu Kuda | Orange box : Variabel yang diamati |
| ↕ : Efek Induksi Indometasin | Green box : Preventif susu kuda |
| ⊥ : Menghambat | Purple box : Induksi Indometasin |

3.2 Kerangka Konsep



Hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) diberi susu kuda Sumbawa yang memiliki kandungan senyawa bioaktif (lisosim, laktoferin), Bakteri Asam Laktat (BAL) dan mengandung 11 jenis asam amino (esensial dan non esensial) dan 12 jenis asam lemak (jenuh dan tak jenuh). Senyawa bioaktif susu kuda Sumbawa berfungsi sebagai antioksidan, antiinflamasi, antibakteri dan imunomodulator. Laktoferin pada susu kuda Sumbawa berpotensi mencegah kerusakan saluran pencernaan yang diakibatkan indometasin dengan mengikat Fe dan menghambat pengeluaran sitokin proinflamasi seperti TNF- α , IL-6 dan IL-1 β dan terbukti sebagai antioksidan. kandungan Bakteri Asam Laktat (BAL) pada susu kuda Sumbawa mampu meningkatkan fungsi barier imunologik mukosa usus dan memperbaiki keseimbangan mikroorganisme dalam usus, melalui kemampuannya untuk memodulasi mukosa, aktivitas imun sistemik dan fungsi epitel. Senyawa lisosim susu kuda Sumbawa memiliki aktifitas antibakteri, kemampuan senyawa lisosim dalam membatasi migrasi neutrofil ke jaringan yang rusak memberikan kemungkinan menggunakan senyawa lisosim sebagai agen inflamatori.

Induksi indometasin pada tikus putih (*Rattus novergicus*) dapat menyebabkan *inflammatory bowel disease* (IBD). Indometasin akan menghambat enzim siklooksigenase yang terdiri dari isoenzim COX-1 dan COX-2 yang akan terjadinya hambatan pada prostaglandin. Kedua isoform ini mengkatalisir perubahan asam arakhidonat menjadi endoperoxidase (termasuk di dalamnya prostaglandin). COX-1 menjaga permukaan mukosa lambung tetap utuh dengan mencegah pembentukan asam lambung, meningkatkan produksi bikarbonat dan mucus. Hambatan dari COX-1 mengakibatkan prostaglandin menurun dan hal ini akan mengakibatkan ketahanan mukosa saluran pencernaan termasuk duodenum menurun. Ketahanan mukosa saluran pencernaan ditentukan oleh faktor-faktor defensif yang terdiri dari lapisan pre epitel, epitel dan sub epitel. Peranan mukus dan sekresi bikarbonat merupakan faktor utama dalam pencegahan primer maupun sekunder lesi mukosa akut oleh indometasin. Selanjutnya akan terjadi pembengkakan yang disertai kerusakan sel epitel dan inflamasi. Kerusakan sel-sel duodenum akan menyebabkan terjadinya peningkatan molekul radikal bebas seperti H_2O , O_2^- dan OH^- . Oksigen reaktif yang sudah terlepas menyebabkan ketidaksinambungan antara radikal bebas dan antioksidan intrasel, sehingga akan memicu timbulnya stress oksidatif dalam tubuh yang menyebabkan peningkatan *Reactive Oxygen Spesies* (ROS). Stress oksidatif akan memicu fosforilasi inhibitor NF- κ B dan aktivasi NF- κ B yang nantinya akan bermigrasi dalam nukleus dan mengaktifkan lebih banyak makrofag lainnya. Makrofag akan mengaktifasi sitokin pro inflamasi, salah

satunya TNF- α . Peningkatan produksi TNF- α akan mengakibatkan agregasi dan aktivasi neutrofil sehingga menyebabkan terjadinya inflamasi dan kerusakan jaringan pada duodenum. Kandungan pada susu kuda Sumbawa akan mengikat Fe dalam tubuh tikus ketika diinduksi indometasin, jika Fe terikat senyawa H₂O₂ yang akan diubah menjadi OH⁻ oleh indometasin akan dicegah sehingga kerusakan pada duodenum akan terhambat dan susu kuda Sumbawa akan meningkatkan fungsi barier imunologik mukosa duodenum tikus, menghambat peningkatan produk sitokin pro inflamasi, membatasi migrasi neutrofil ke jaringan yang rusak dan menekan inflamasi, sehingga kandungan susu kuda Sumbawa akan mencegah kerusakan saluran pencernaan dan mengurangi efek inflamasi. Kerusakan dan inflamasi yang terjadi pada duodenum akan meningkatkan kerusakan epitel, yang berpengaruh terhadap histopatologi mukosa duodenum.

3.3 Hipotesa Penelitian

Hipotesis penelitian ini adalah pemberian susu kuda Sumbawa sebagai preventif dapat mencegah dan mengurangi efek inflamasi penyakit *inflammatory bowel disease* pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang ditandai dengan penurunan ekspresi TNF- α dan mencegah kerusakan organ duodenum.

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Januari 2019-Februari 2019 di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Patologi Anatomi Kessima Medika Malang, Laboratorium Biomolekuler Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya dan Laboratorium Fisiologi Hewan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Malang.

4.2 Materi Penelitian

4.2.1 Alat

Peralatan yang akan digunakan dalam penelitian ini, antara lain kandang tikus, botol minum tikus, tempat pakan tikus, sekam, *underpad*, masker, *glove*, mikropipet, sonde, *disecting set*, *cover glass*, objek glass, rak kaca objek, autoclave, timbangan, penyaring karet, inkubator, timbangan digital, gelas ukur, kapas, alumunium foil, *blue tip*, *yellow tip*, pH meter digital, sentrifugator, papan fiksasi, pot organ, waterbat, *microtube* 1,3 mL, mikroskop cahaya (Olympus BX51).

4.2.2 Bahan

Bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini antara lain tikus putih (*Rattus norvegicus*) berjenis kelamin jantan galur Wistar dengan berat 150-200 gram, pakan, air minum, minyak jagung,

formalin, pewarnaan HE (*Hematoxylin Eosin*), aquades, parafin, xylol, parafin cair, PBS, antibodi TNF- α , pewarnaan kromagen DAB (Diamino Benzidine), antibodi sekunder Goat Anti Rat berlabel biotin.

4.3 Tahapan Penelitian

1. Rancangan penelitian dan persiapan hewan coba.
2. Perlakuan preventif susu kuda sumbawa yang diberikan kepada tikus dengan volume 0,5 mL, 1 mL dan 1,5 mL dengan sonde lambung.
3. Perlakuan pemberian indometasin per oral hingga kedalaman lambung secara sonde.
4. Pengambilan dan pembuatan preparat histologi duodenum
5. Ekspresi TNF- α dengan metode *flowcytometry*
6. Pengamatan preparat histopatologi duodenum dengan pewarnaan HE (*Hematoxylin Eosin*).
7. Analisis data.

4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Berdasarkan desain kelompok penelitian yang menggunakan 5 kelompok perlakuan, maka jumlah ulangan untuk masing-masing kelompok perlakuan adalah sebagai berikut, menurut Kusriyningrum (2008) :

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

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

Keterangan :

p : jumlah kelompok hewan coba

n : jumlah ulangan yang diperlukan

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan yang sudah dilakukan di atas, maka untuk lima kelompok hewan coba diperlukan jumlah ulangan paling sedikit empat kali dalam setiap kelompok, sehingga dibutuhkan 20 ekor hewan coba yang akan dilakukan penelitian.

Hewan coba dalam penelitian ini dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan yaitu :

1. Kelompok 1 (Kontrol negatif) adalah tikus yang tidak diberikan susu kuda dan tidak diinduksi indometasin.
2. Kelompok 2 (Kontrol positif) adalah tikus yang tidak diberikan susu kuda sumbawa, tetapi diinduksi indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB.
3. Kelompok 3 (Preventif 1) adalah tikus yang diberikan susu kuda sumbawa dengan volume 0,5 mL dan dilakukan induksi indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB.
4. Kelompok 4 (Preventif 2) adalah tikus yang diberikan susu kuda sumbawa dengan volume 1 mL dan dilakukan induksi indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB.
5. Kelompok 5 (Preventif 3) adalah tikus yang diberikan susu kuda sumbawa dengan volume 1,5 mL dan dilakukan induksi indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB.

Tabel 4.1. Rancangan Penelitian “Two Ways Table”

Perlakuan	Ulangan				Total	Rata-rata
	1	2	3	4		
K-						
K+						
P1						
P2						
P3						

Tabel 4.2. ANOVA (Analysis of Variance)

S.V.	df ^x	SS	MS ^x	F ^{xxx} Calc	F5%	F1%
Treatment	4	SST	MST	$\frac{MST}{MSE}$	3,06	4,89
Error	15	SSE	MSE			
Total	19					

Keterangan :

x). d.f Treatment $= t - 1 = 5 - 1 = 4$

d.f total $= nt - 1 = 20 - 1 = 19$

d.f error $= \text{df total} - \text{df varietas} = 19 - 4 = 15$

xx). MS Treatment $= \frac{ss \text{ varietas}}{df \text{ varietas}}$

MS error $= \frac{ss \text{ error}}{df \text{ error}}$

xxx). F Calculated $= \frac{MS \text{ varietas}}{MS \text{ error}}$

4.5 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

Variabel bebas : Susu kuda sumbawa volume 0,5 mL, 1 mL dan 1,5 mL.

Variabel terikat : Ekspresi TNF- α dan perubahan histopatologi duodenum.

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

4.6 Prosedur Kerja

4.6.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah 24 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan yang berumur 8-12 minggu dengan berat rata-rata 200 gram. Sebelum masuk ke tahap perlakuan, seluruh hewan coba terlebih dahulu di aklimatisasi selama 7 hari. Setiap tikus di tempatkan dalam kandang yang berbeda. Penimbangan berat badan tikus dilakukan setelah aklimatisasi. Keadaan selama aklimatisasi dan perlakuan dikontrol pada kisaran lingkungan yang tetap dengan tujuan agar hewan uji mampu beradaptasi dengan kondisi yang akan ditempati selama percobaan. Selama percobaan suhu ruangan berkisar antara 23°C-27°C. Makanan yang diberikan berupa pelet sebanyak 10% BB/hari dan minum yang diberikan berupa air jernih yang diberikan secara ad libitum.

4.6.2 Pemberian Susu Kuda Sumbawa

Susu kuda Sumbawa diperoleh dari peternakan kuda yang terdapat di Sumbawa, Nusa Tenggara Timur. Susu kuda Sumbawa diberikan sebagai preventif satu kali dalam sehari dengan dosis 0,5 mL, 1 mL dan 1,5 mL selama 13 hari dengan menggunakan sonde lambung (Reni dkk., 2011).

4.6.3 Induksi IBD dengan Indometasin

Hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) dikelompokkan menjadi 5 kelompok perlakuan dengan masing-masing kelompok berjumlah 4 ekor. Menurut Aulanni'am (2012) indometasin diinduksikan secara per oral menggunakan sonde lambung dengan dosis 15mg/kg BB tikus. Dosis indometasin yang diberikan pada setiap ekor tikus sebanyak 3 mg/200g tikus. Indometasin sebelum diberikan pada tikus harus dilakukan pengenceran dengan minyak jagung terlebih dahulu. Pengenceran indometasin sebanyak 45 mg dibutuhkan 4 mL minyak jagung sebagai pelarutnya (Bures, 2011).

Perhitungan dosis indometasin dan minyak jagung yang diberikan per oral adalah sebagai berikut (misal BB tikus 200g) :

Kebutuhan Indometasin : $15 \text{ mg/kg BB} \times 0,2 \text{ kg} = 3 \text{ mg}$

Kebutuhan minyak jagung : $3 \text{ mg}/45 \text{ mg} \times 4 \text{ mL} = 0,26 \text{ mL/tikus}$

Campuran indometasin dengan minyak jagung dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*.

4.6.4 Isolasi Organ Duodenum

Setelah dilakukan perlakuan, hewan coba tikus dilakukan euthanasia. Dilakukannya euthanasia bertujuan untuk mengoleksi organ agar dapat melihat efek preventif yang dihasilkan dari susu kuda Sumbawa. Metode yang digunakan yaitu teknik dislokasi os. occipitale. Teknik ini dilakukan dengan menahan pertemuan antara os. occipitale dan os. atlas, kemudian dilakukan gerakan menarik menggunakan tangan sehingga keduanya terpisah. Teknik euthanasia ini dinilai efektif dan efisien.

Setelah dilakukan euthanasia, hewan coba tikus putih diposisikan dorsoventral pada papan lilin. Posisi dorsoventral bertujuan untuk memudahkan pengambilan organ duodenum. Kemudian dilakukan insisi pada area abdomen sehingga cavum abdomen terbuka, setelah itu dikoleksi organ duodenum dan diisolasi dicuci dengan NaCl fisiologis kemudian dimasukkan ke dalam pot organ yang berisi formalin 10% agar organ tetap awet.

4.6.5 Pembuatan Preparat Histopatologi Duodenum

Organ duodenum yang sudah difiksasi dalam larutan formalin 10% kemudian dibuat preparat histopatologi. Pembuatan preparat histopatologi terdiri dari fiksasi, dehidrasi, penjernihan (*clearing*),

infiltrasi, *embedding*, *blocking*, pemotongan (*mounting*) dan penempelan di *object glass* serta pewarnaan (Perceka, 2012).

1. Fiksasi

Organ duodenum difiksasi dalam larutan Buffer Neutral Formalin (BNF) 10% minimal 48 jam hingga mengeras. Sampel organ yang terfiksasi dengan sempurna ditrimming setebal kurang lebih 0.5 cm. potongan kemudian dimasukkan dalam *tissue cassette* untuk dimasukkan dalam *tissue processor automatis*.

2. Dehidrasi

Proses dehidrasi ini dimaksudkan untuk menarik air dari jaringan dan mencegah terjadinya pengerutan organ duodenum. Dehidrasi dilakukan dengan cara merendam sampel dalam larutan alkohol dengan konsentrasi bertingkat (70%, 80%, 90%, 95% dan alkohol absolute). Proses perendaman pada masing-masing konsentrasi alkohol dilakukan selama 2 jam. Proses dehidrasi dilakukan dengan menggunakan mesin otomatis yaitu *automatic tissue processor*.

3. Clearing

Untuk melakukan penjernihan, jaringan dipindahkan dari alkohol absolut ke larutan penjernihan, yaitu xylol I selama 20 menit dan xylol II selama 30 menit.

4. Infiltrasi

Infiltrasi adalah proses pengisian paraffin ke dalam pori-pori jaringan. Pengisian pori-pori ini dimaksudkan untuk mengeraskan jaringan agar mudah dipotong dengan pisau mikrotom.

5. *Embedding* dan *Blocking*

Embedding atau *blocking* adalah proses penanaman jaringan dalam blok paraffin. Proses *embedding* dilakukan dengan menggunakan alat *tissue embedding console*.

6. *Sectioning*

Sectioning adalah proses pemotongan jaringan dengan menggunakan mikrotom dengan ketebalan 4-5 μm . pemotongan dilakukan dengan alat *rotary microtome spencer*. Sediaan kemudian diletakan pada gelas objek dan disimpan dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam.

7. Pewarnaan Hematoxyllin-Eosin

Sebelum melakukan pewarnaan, preparat duodenum dilakukan dideparafinisasi dengan larutan xylol I dan xylol II selama 2 menit. Kemudian dilakukan proses rehidrasi dengan cara mencelupkan preparat duodenum ke dalam alkohol bertingkat (alkohol absolut, alkohol 95%, alkohol 80%). Perendaman dalam alkohol 95% dan 80% dilakukan selama 1 menit. Kemudian preparat duodenum dicuci dengan air yang mengalir. Kemudian

preparat duodenum diwarnai dengan pewarna mayer's hematoxyllin dengan tahapan sebagai berikut :

- a) Preparat direndam dalam larutan mayer's hematoxyllin selama 8 menit
- b) Dicuci dengan air mengalir selama 30 detik
- c) Dichelupkan ke dalam larutan lithium carbonat selama 15-30 detik
- d) Dicuci dengan air mengalir selama 2 menit
- e) Preparat direndam dalam larutan Eosin selama 2-3 menit
- f) Cuci dengan air mengalir selama 30-60 detik
- g) Preparat dicelupkan kedalam larutan alkohol 95% dan alkohol absolut sebanyak 10 kali celupan, absolute II Selma 5 menit, xylol I selama satu menit dan xylol II selama dua menit.

8. *Mounting*

Setelah tahapan pewarnaan, sediaan ditetesi entellan dan ditutup oleh *cover glass*.

4.6.6 Pengukuran Ekspresi TNF- α dengan *Flowcytometry*

Organ duodenum yang sudah diisolasi, selanjutnya dilakukan penggerusan dengan pangkal spuit pada 5 mL PBS. Kemudian disaring dengan *wire* dan dimasukkan ke propilen 15 mL hingga volume tertentu. Setelah itu homogenat disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit dengan suhu 10⁰C. Supernatan hasil sentrifugasi dibuang dan menyisakan peletnya. Selanjutnya

pelet diresuspensi dengan PBS 1 mL dengan cara *pipeting*. Hasil suspensi dibagi ke beberapa microtube 1,5 mL yang telah berisi 0,5 mL PBS setiap microtube sebanyak 50 μ L. Lalu dihitung sel hasil isolasi. Suspensi lalu di sentrifugasi kembali dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit dengan suhu 10⁰C. Hasil dari sentrifugasi diambil bagian peletnya kemudian diwarnai dengan ditambahkan larutan fiksatif sebanyak 50 μ L, lalu diinkubasi selama 20 menit dengan suhu 4⁰C pada ruang gelap. Setelah itu ditambahkan larutan permeabilitas (*Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer*) sebanyak 500 μ L, kemudian dihomogenisasi, dan disentrifugasi lagi dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit dengan suhu 10⁰C. Setelah didapatkan pelet ditambahkan antibodi spesifik pada sel sebanyak 50 μ L, kemudian diinkubasi selama 20 menit dengan suhu 4⁰C pada ruang gelap, lalu ditambahkan PBS 400 μ L, lalu dimasukkan ke dalam kuvet *flowcytometry* untuk dirunning (Wisudanti, 2017).

4.7 Analisa Data

Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekspresi TNF- α dan histopatologi duodenum. Analisis data ekspresi TNF- α dilakukan secara kuantitatif menggunakan *software flowcytometry* dan selanjutnya hasil ekspresi TNF- α dilakukan analisis menggunakan aplikasi *microsoft excel* dan *SPSS for windows* dengan metode analisis statistik ragam *one way ANOVA*

(*Analysis of Variance*) dengan tingkat kepercayaan 95% ($P < 0,05$), kemudian dilanjutkan dengan uji BNJ (Beda Nyata Jujur) untuk mengetahui hasil yang paling berbeda nyata dan gambaran histopatologi diamati dengan bantuan mikroskop cahaya (Olympus BX51) dengan perbesaran 100x dan 400x dianalisis secara deskriptif (Kusriningrum, 2008).



BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Preventif Susu Kuda Sumbawa Terhadap Ekspresi TNF- α Duodenum pada Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Model *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) yang diinduksi Indometasin

Metode *flowcytometry* dapat digunakan untuk mengamati pengaruh preventif susu kuda sumbawa terhadap ekspresi TNF- α duodenum pada tikus putih model *inflammatory bowel disease* yang diinduksi indometasin. Metode *flowcytometry* menunjukkan adanya ekspresi TNF- α pada organ duodenum menggunakan sinar fluoresen yang dipancarkan oleh fluorokrom yang digunakan untuk mewarnai sel. Sinyal-sinyal itu dikonversikan menjadi angka digital dan diperlihatkan pada suatu histogram yang dapat dianalisis untuk mengetahui jumlah ekspresi TNF- α duodenum. Hasil histogram TNF- α dapat dilihat pada **lampiran 8**. Pengamatan ekspresi TNF- α duodenum dilakukan pada semua kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol positif (K+), kelompok kontrol negatif (K-), kelompok tikus yang diberikan preventif susu kuda Sumbawa volume 0,5 mL (P1), kelompok tikus yang diberikan preventif susu kuda Sumbawa volume 1 mL (P2), dan kelompok tikus yang diberikan preventif susu kuda Sumbawa volume 1,5 mL (P3).

Hasil ekspresi TNF- α organ duodenum dianalisa secara kuantitatif menggunakan aplikasi *microsoft excel* dan *SPSS for windows* dengan metode analisis statistik ragam *one way ANOVA* yang dilanjutkan dengan uji beda nyata jujur dengan $\alpha=0,01$ jika terdapat perbedaan antar kelompok yang signifikan. Hasil menunjukkan bahwa susu kuda Sumbawa dapat menurunkan kadar TNF- α organ duodenum pada tikus putih model *inflammatory bowel*

disease yang diinduksi indometasin. Hasil tersebut dapat dilihat pada **Tabel 5.1** dan **Tabel 5.2**.

Tabel 5.1. Hasil Perhitungan ANOVA Ekspresi TNF- α Organ Duodenum

S.V.	df ^x	SS	MS ^x	F ^{xxx} Cale	F5%	F1%
Treatment	4	3448,703	862,176	25,815	3,06	4,89
Error	15	500,979	33,399			
Total	19	3949,681				

Keterangan : Fhitung > Ftabel, maka pada perlakuan menunjukkan adanya perbedaan nyata ($p < 0,01$) dengan $\alpha = 5\%$.

Tabel 5.2. Hasil Rata-rata Ekspresi TNF- α Organ Duodenum

Perlakuan	Rata-rata (%)	Ekspresi TNF- α	
		Peningkatan (%)	Penurunan (%)
K-	35,155 $\pm$ 1,878 ^a		
K+	74,935 $\pm$ 8,822 ^c	113,15	
P1 (0,5 mL)	59,182 $\pm$ 2,473 ^b		21,02
P2 (1 mL)	53,967 $\pm$ 7,023 ^b		27,98
P3 (1,5 mL)	47,517 $\pm$ 5,494 ^{ab}		36,58

Keterangan : Notasi yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang sangat signifikan $p < 0,01$

Ekspresi TNF- α organ duodenum pada kelompok kontrol negatif menunjukkan rata-rata 35,155% (**Tabel 5.2**) merupakan standar yang digunakan untuk menentukan adanya peningkatan ekspresi TNF- α organ duodenum yang terjadi pada kelompok tikus IBD. Kelompok kontrol negatif akan tetap menunjukkan ekspresi TNF- α karena pada kondisi normal, TNF- α diproduksi oleh tubuh sebagai produk hasil metabolisme tubuh yang normal untuk mempertahankan kondisi homeostasis dalam sistem imunitas dan sebagai regulator dari hematopoetik (Soeroso, 2007).

Ekspresi TNF- α pada kelompok kontrol positif menunjukkan rata-rata sebanyak 74,935%. Hasil analisis menunjukkan bahwa kelompok kontrol positif berbeda nyata secara signifikan ($p < 0,01$) dengan kelompok kontrol negatif. Peningkatan ekspresi TNF- α tersebut dikarenakan pemberian obat indometasin dengan dosis 15 mg/KgBB yang dapat menyebabkan inflamasi. Menurut Sholichah dkk (2012) metabolisme obat indometasin didalam tubuh akan menghasilkan metabolit imunokuinon yang cukup reaktif, dimana metabolit imunokuinon ini akan memicu pengaktifan neutrofil dan melepaskan sitokin dan kemokin seperti ROS sehingga dapat terjadi stress oksidatif. Peningkatan ROS tersebut dapat mengaktivasi NF-kB sehingga dapat memicu pelepasan sitokin proinflamasi seperti TNF- α dari mukosa duodenum. Pelepasan TNF- α akan mengakibatkan agregrasi dan aktivasi neutrofil sehingga menyebabkan terjadinya inflamasi. Menurut Parameswaran dan Patial (2010) bahwa sitokin proinflamasi TNF- α merupakan faktor utama dalam penyakit inflamasi kronis (*Crohn Disease*). TNF- α berperan penting dalam merancang kaskade sitokin dalam banyak penyakit inflamasi dan berperan sebagai master-regulator produksi sitokin inflamasi.

Hasil analisis menunjukkan bahwa tikus yang diberikan preventif susu kuda Sumbawa kelompok (P1, P2, P3) berbeda nyata secara signifikan ($p < 0,01$) terhadap tikus kontrol positif. Hal ini ditunjukkan dengan rendahnya ekspresi TNF- α kelompok perlakuan terhadap kontrol positif. Persentase ekspresi TNF- α yang paling rendah pada kelompok perlakuan tikus dengan volume pemberian 1,5 mL/hari (P3) kemudian kelompok perlakuan tikus

dengan volume pemberian 1 mL/hari (P2) dan kelompok tikus dengan volume pemberian 0,5 mL/hari (P1) (**Tabel 5.1**). Kelompok tikus P1 dan kelompok tikus P2 yang menghasilkan ekspresi TNF- α yang lebih rendah secara signifikan daripada tikus kontrol negatif. Hal ini dapat dikarenakan pemberian volume susu kuda sumbawa yang diberikan terhadap tikus P1 dan P2 kurang mampu meningkatkan respon imun seluler dibandingkan dengan kelompok tikus P3. Kelompok tikus P3 tidak mengalami perbedaan signifikan terhadap kontrol negatif, sehingga kelompok tikus P3 pemberian susu kuda Sumbawa volume 1,5 mL/hari terbukti mampu mencegah peningkatan ekspresi TNF- α lebih baik terhadap penyakit *inflammatory bowel disease*. Rendahnya ekspresi TNF- α pada kelompok tikus P1, P2 dan P3 dapat terjadi karena adanya kandungan senyawa bioaktif dan kandungan bakteri asam laktat sebanyak $6,7 \times 10^6$ CFU/mL (**Lampiran 10**).

Kandungan senyawa bioaktif diantaranya lisosim dan laktoferin yang berfungsi sebagai antioksidan, antiinflamasi, antibakteri dan imunomodulator. Serta susu kuda Sumbawa memiliki kandungan bakteri asam laktat (BAL). Menurut Hermawati (2005) dan Reni dkk. (2010) susu kuda Sumbawa mengandung komponen laktoferin yang mampu menghambat proses *respiratory burst*. Laktoferin adalah protein pengikat metal yang berfungsi sebagai *metal-chelator* (Nagasako *et al.*, 1993). Hambatan yang terjadi pada proses *respiratory burst* dapat menghambat produk sitokin proinflamasi. Kandungan bakteri asam laktat (probiotik) dalam susu kuda Sumbawa mampu memberikan pengaruh yang positif pada kesehatan.

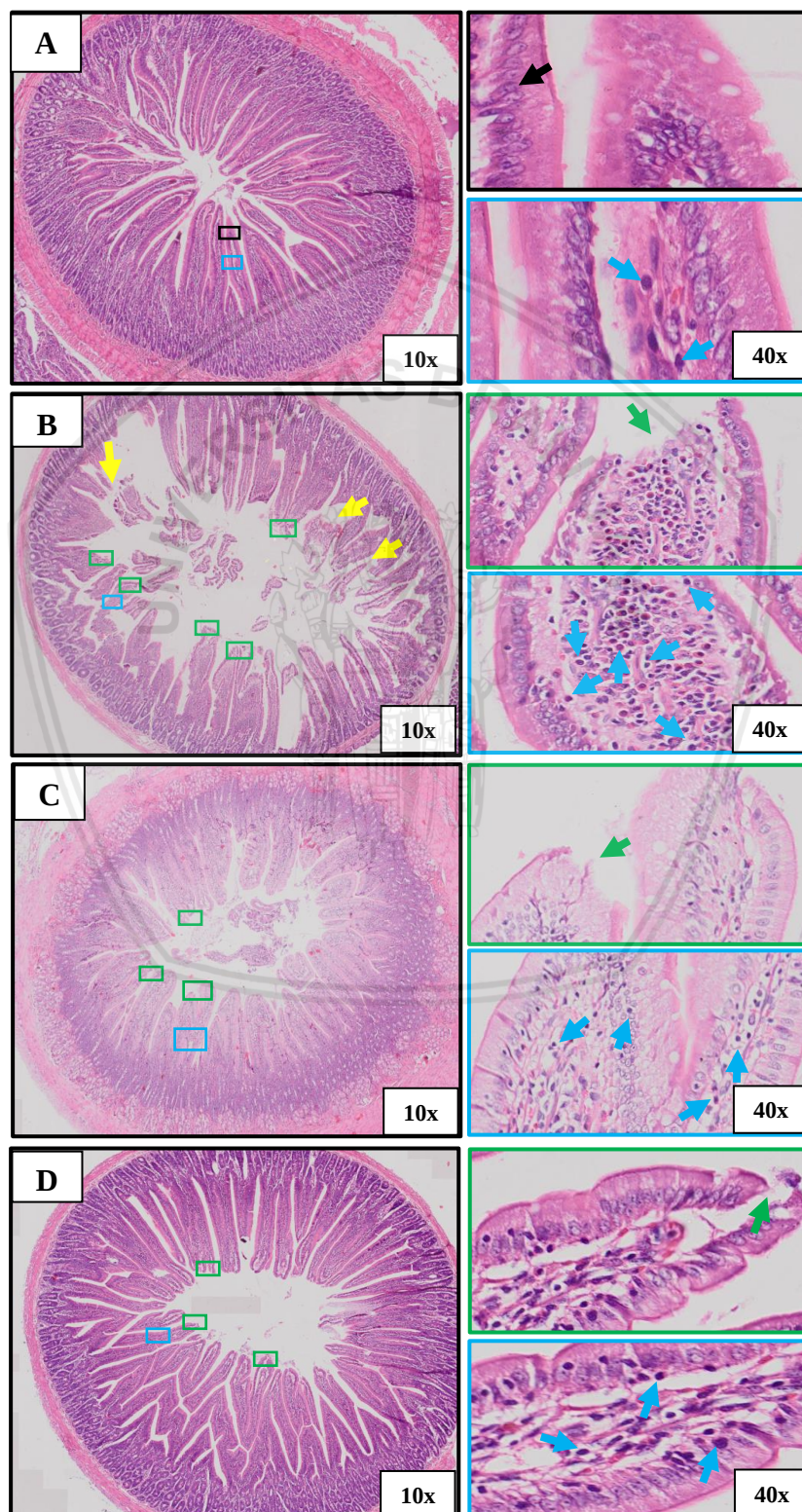
Menurut Diding dkk. (2008) probiotik mampu meningkatkan fungsi barrier imunologik mukosa usus melalui pengeluaran mikrobial patogenik, memulihkan permeabilitas permukaan mukosa usus ke arah normal pada penyakit alergi atau inflamasi, dan menurunkan produk sitokin pro-inflamasi.

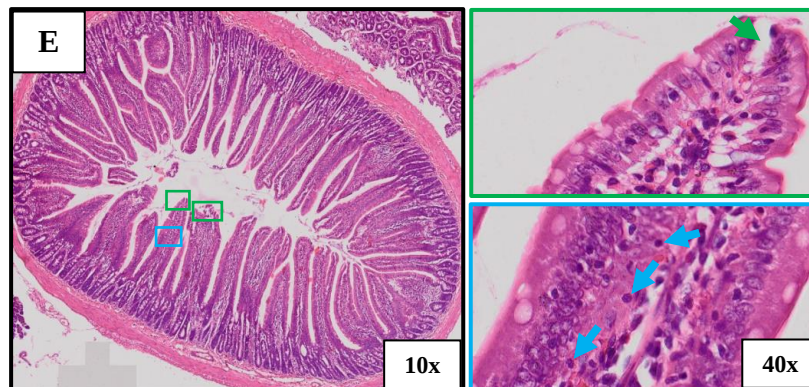
Berdasarkan hasil uraian dan analisa statistik uji *one way* ANNOVA dan uji beda nyata jujur dapat disimpulkan bahwa penggunaan susu kuda Sumbawa sebagai preventif mampu mencegah peningkatan ekspresi TNF- α pada tikus model *inflammatory bowel disease*, dan volume pemberian susu kuda Sumbawa sebanyak 1,5 mL lebih efektif digunakan sebagai preventif karena menunjukkan hasil ekspresi TNF- α tidak berbeda nyata dengan kelompok tikus sehat.

5.2 Pengaruh Preventif Susu Kuda Sumbawa Terhadap Gambaran Histopatologi Duodenum pada Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Model *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) yang diinduksi Indometasin

Gambaran histopatologi duodenum tikus putih pada penelitian ini merupakan salah satu parameter yang digunakan untuk mengukur keberhasilan preventif susu kuda Sumbawa terhadap penyakit *inflammatory bowel disease*. Pada susunan histologi duodenum terdiri atas lapisan mukosa, lapisan submukosa, lapisan muskularis dan lapisan serosa. Perubahan yang terjadi pada duodenum tikus yang diinduksi indometasin dapat dilihat pada bagian lapisan mukosa yang ditandai dengan adanya infiltrasi sel radang, kerusakan pada vili dan erosi sel epitel. Pengaruh preventif pemberian susu

kuda Sumbawa ditunjukkan dengan rendahnya infiltrasi sel radang dan hambatan kerusakan pada mukosa duodenum (**Gambar 5.1**).





Gambar 5.1. Histopatologi vili duodenum dengan pewarnaan HE perbesaran 10x dan perbesaran 40x.

Keterangan : (A) kontrol negatif; (B) kontrol positif; (C) preventif susu kuda Sumbawa volume 0,5 mL; (D) preventif susu kuda Sumbawa volume 1 mL; (E) preventif susu kuda Sumbawa volume 1,5 mL; (▲) epitel kolumner; (➡) infiltrasi sel radang; (➡) erosi epitel; (⚡) ruptur vili.

Hasil gambaran histopatologi duodenum dengan pewarnaan HE pada tikus putih kelompok kontrol negatif (**Gambar 5.1**) menunjukkan gambaran vili dalam keadaan normal, lapisan sel epitelial terdapat sel epitel kolumner simplek dan sel goblet yang berada diantara sel epitel dengan posisi yang baik. Hal ini menunjukkan bahwa kontinuitas sel mukosa duodenum sehat, berbeda dengan kelompok kontrol positif (**Gambar 5.1**) yaitu duodenum tikus model *inflammatory bowel disease*. Hasil gambaran histopatologi terlihat vili mengalami pemendekan dan pelebaran, terjadi erosi sel epitel, ruptur vili dan terdapat sel radang pada lamina propia. Hal ini sesuai dengan penelitian Aulanni'am dkk. (2011) dan Suryawinata (2010) yang menyatakan bahwa vili pada mukosa duodenum yang terpapar indometasin akan terlihat memendek dan melebar, mengalami kerusakan ditandai dengan adanya ulserasi, erosi sel epitel dan infiltrasi sel radang. Gulwani (2012) menyatakan bahwa bentuk

vili saluran pencernaan normalnya yaitu panjang dan memiliki banyak lipatan. Hal ini membuktikan bahwa paparan indometasin dengan dosis 15 mg/kgBB dapat merusak struktur histologis saluran pencernaan seperti duodenum.

Pemberian indometasin akan menyebabkan terhambatnya enzim siklooksigenase (COX) terutama COX-1. Penghambatan COX-1 oleh indometasin akan menyebabkan kerusakan mukosa saluran cerna (Handoko, 2013). Kerusakan saluran cerna dapat terjadi karena turunnya sintesis prostaglandin yang berfungsi meningkatkan sekresi mukus untuk melindungi barier mukosa duodenum (Philipson *et al.*, 2008). Apabila perlindungan terhadap mukosa duodenum menurun, dapat mempermudah terjadinya inflamasi. Inflamasi yang diakibatkan oleh efek indometasin akan meningkatkan rekrutmen dan retensi makrofag efektor, neutrofil, dan sel T ke dalam intestinal yang terinflamasi dan akan terjadi *inflammatory bowel disease*. Sel-sel tersebut akan diaktivasi dan dikeluarkan oleh sitokin proinflamasi seperti TNF- α . Akumulasi sel efektor ini dikarenakan meningkatnya rekrutmen dan menurunnya apoptosis seluler (Sartor, 2006).

Pada kelompok preventif susu kuda Sumbawa volume pemberian 0,5 mL/ekor (P1) dan volume pemberian 1 mL/ekor (P2) terlihat adanya hambatan kerusakan pada organ duodenum. Gambaran duodenum pada kelompok P1 dan kelompok P2 mengalami kerusakan yang ditandai dengan adanya erosi sel epitel, tetapi kerusakan tidak terlalu parah

dibanding dengan kontrol positif (**Gambar 5.1**). Bentuk dan ukuran vili mendekati kelompok kontrol negatif dan lamina propia terlihat adanya infiltrasi sel radang dalam jumlah sedikit dibandingkan dengan kontrol positif. Gambaran histopatologi duodenum pada kelompok preventif susu kuda Sumbawa volume pemberian 1,5 mL/ekor (P3) menunjukkan adanya penghambatan kerusakan epitel. Hal itu ditunjukkan dengan jumlah erosi epitel yang lebih sedikit dan memperlihatkan struktur vili mendekati kontrol negatif (**Gambar 5.1**). Infiltrasi sel radang pada kelompok P3 lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Adanya hambatan kerusakan duodenum dan rendahnya infiltrasi sel radang yang terjadi pada kelompok P1, P2, dan P3 dibanding kontrol positif dikarenakan susu kuda Sumbawa memiliki senyawa bioaktif yang berperan sebagai antioksidan, antiinflamasi, antimikrobia dan imunomodulator.

Kandungan bakteri asam laktat (probiotik) yang terdapat di susu kuda Sumbawa dapat berperan dalam meningkatkan barier mukosa duodenum. Diding dkk. (2008) menyatakan probiotik (terutama bakteri asam laktat) mampu meningkatkan fungsi barier imunologik mukosa usus melalui pengeluaran mikrobial patogenik, memulihkan permeabilitas permukaan mukosa usus ke arah normal pada penyakit alergi atau inflamasi, dan menurunkan produk sitokin pro-inflamasi. Hal tersebut didukung oleh Boyle and Tang (2006) yang menyatakan bahwa probiotik dapat berfungsi sebagai *immunomodulating* agen, meningkatkan imunitas ketika imunitas sedang dalam perkembangan atau lemah, dan sebagai

buffer reaksi yang berlebihan seperti alergi dan *inflammatory bowel disease*.

Bakteri asam laktat yang berperan sebagai probiotik memiliki kemampuan sebagai aktivator yang kuat untuk sistem imun alami karena mempunyai molekul yang spesifik pada dinding sel. Dinding sel BAL tersusun atas *peptidoglycan*, *polysaccharide* dan *lipoteichoic acid*. Spesifik reseptor pada *peptidoglycan* mempengaruhi limfosit atau makrofag yang dikenali oleh reseptor makrofag *toll like receptor* (TLR). *Toll like receptor* menjembatani sistem imunitas alami ke sistem adaptif dengan menginduksi berbagai molekul efektor dan ko-stimulator. Dalam perannya tersebut, TLR mampu menginduksi respon imun ke arah Th1 maupun T regulasi. Sinyal dari TLR dapat mengaktifkan respon imun non spesifik, dengan cara merangsang produksi berbagai protein penting yang terdapat pada makrofag. *Toll like receptor* (TLR) terutama mengenali sejumlah besar patogen yang berhubungan dengan PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) (Roitt *et al.* 2001).

Kandungan senyawa laktoferin yang terdapat pada susu kuda Sumbawa dapat mengikat Fe yang berfungsi menghambat *respiratory burst*. Hal ini ditunjukkan oleh hasil penelitian Reni dkk. (2010) bahwa susu kuda Sumbawa dengan dosis 1 mL/hari dapat menurunkan kemampuan neutrofil dalam mengsekresikan ROI (*Reactive Oxygen Intermediates*). Sehingga akan terjadi hambatan pada tubuh tikus untuk memicu timbulnya stress oksidatif yang akan menyebabkan inflamasi dan

kerusakan saluran pencernaan. Adanya pencegahan kerusakan pada duodenum yang ditandai sedikit adanya erosi epitel, rupture vili, adanya bentuk vili yang mendekati kontrol negatif, dan rendahnya jumlah ekspresi TNF- α duodenum yang terjadi pada kelompok P1, P2, dan P3 dibanding kontrol positif (**Gambar 5.1**) dikarenakan adanya peningkatan fungsi barier imunologik mukosa duodenum dan hambatan pada Tumor Necrosis Factor (TNF- α) oleh senyawa bioaktif dan bakteri asam laktat (BAL) yang terdapat pada susu kuda Sumbawa, sehingga jumlah sel radang kelompok P1, P2, dan P3 lebih rendah dibanding kontrol positif.

Berdasarkan gambaran histopatologi organ duodenum pada preventif susu kuda Sumbawa dengan volume pemberian 0,5 mL/ekor, 1 mL/ekor dan 1,5 mL/ekor dapat menghambat kerusakan organ duodenum dan mengurangi efek inflamasi, tetapi volume pemberian 1,5 mL/ekor menunjukkan volume terbaik yang mampu memberikan pengaruh preventif yang maksimal dengan menunjukkan gambaran vili duodenum yang menyerupai normal dengan adanya penghambatan erosi epitel dan rendahnya infiltrasi sel radang.

BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa :

1. Pemberian preventif susu kuda Sumbawa volume 0,5 mL/hari, 1 mL/hari dan 1,5 mL/hari dapat mencegah inflamasi berdasarkan rendahnya ekspresi TNF- α pada organ duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) model IBD hasil induksi Indometasin dibandingkan kontrol positif. Volume pemberian terbaik adalah 1,5 mL/hari.
2. Pemberian preventif susu kuda Sumbawa volume 0,5 mL/hari, 1 mL/hari dan 1,5 mL/hari dapat mencegah kerusakan mukosa duodenum berdasarkan gambaran histopatologi pada organ duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) model IBD hasil induksi Indometasin dibandingkan kontrol positif. Volume pemberian terbaik adalah 1,5 mL/hari.

6.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai susu kuda Sumbawa terhadap penyakit *inflammatory bowel disease* dengan parameter penelitian yang berbeda sesuai dengan kerusakan saluran pencernaan yang diakibatkan oleh penyakit *inflammatory bowel disease*.

DAFTAR PUSTAKA

- Alexandru, I. 2011. Experimental Use of Animal in Reasearch Spa. *Balneo-Research Journal*. Vol. 2, Nr. 1. <http://bioclima.ro/J225eng.pdf>. [Diakses pada 23 Oktober 2018].
- Aryani, D.E., Aulanni'am., Anisa, A.L., dan Purwatiningsih, W. 2017. Profile Histopatology Analysis of Gastric, Duodenum, Ileum, and Colon of Inflammatory Bowel Disease (IBD) Rat Model. *Advances in Health Sciences Research (AHSR)*, volume 5. Atlantis Press.
- Aulannia'am., Anna, R. and Rahmah, N.L. 2012. The Potency of Sargassum duplicatum Bory Extract on Inflammatory Bowel Disease (IBD) in Rattus Norvegicus. *Journal of Life Sciences* 6 : 144-154.
- Baratawidjaya, K.G., dan Rengganis, I. 2010. *Imunologi Dasar* (Edisi ke 9). Jakarta: FKUI. p. 226
- Boyle, R.J and Tang, ML 2006. *The role of probiotics in the management of allergic disease*. Clin Exp Allergy.36(5):568-76
- Brunton, L., K, Parker., D, Blumenthal., and L, Buxton. 2008. Goodman & Gilman's *Manual of Pharmacology and Therapeutic*. NewYork: McGrawHill. DOI: 10.1036/0071443436.
- Bures, 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.
- Corwin, E.J. 2008. *Buku Saku Patofisiologi*. Edisi ke 3. EGC. Jakarta. h.235.
- Cruse, J., and R.E, Lewis. 2004. *Atlas Immunology Second Edition*. United States of America : CRC Press LLC.
- Defarges, A. 2016. Inflammatory bowel disease in small animals. *Merck veterinary manual*. Merck Sharp & Dohme Corp.: USA.
- Diding, H.P., E. Listyaningsih dan AA. Subijanto. 2008. Pengaruh Probiotik Terhadap gambaran Histologis Mukosa Usus pada Mencit Bal/C Model Alergi. *Jurnal Kedokteran Yarsi*. 16(1):006-012.
- Eurell, J.A., and Frappier, B. L. 2006. *Dellmann's Textbook of Veterinary Histology* 6 th Edition. Blackwell Publishing. USA. Pp. 194-198.

- Fajriani. 2008. Pemberian Obat-Obatan Anti Inflamasi Non Steroid (AINS) pada Anak. *Indonesian Journal of Dentistry*. 15(3): 200-4.
- Fedorack, R.N and `Madsen, K.L. 2004. *Probiotics as Modulators of the Gut Flora*. Br J Nutr. 88-Suppl 1:S39-49.
- Fitri, W. 2018. *Inflammatory Bowel Disease pada Pet Animal*. Kumpulan Artikel Kesehatan Hewan. SemVet Jakarta.
- Gulwani H. 2012. *Small Bowel (Small Intestine) Normal Histology*. Pathology Outlines.Com.Inc. [Diakses pada tanggal 11 Maret 2019).
- Handoko, T. 2013. *Pengaruh Terapi Ekstrak Etanol Akar Seledri (Apium groveolens) terhadap Aktifitas Protease dan Gambaran Histopatologi Jejenum Tikus (Rattus norvegicus) Model IBD (Inflammatory Bowel Disease Hasil Induksi Indometasin*. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Hardman, J.G., Limbrid L.E., and Gilman, A.G. 2001. Analgesic-Antipyretic and Antiinflammatory agents and drugs employed in treatment of gout. In : Roberts, L.J. and Morrow, J.D. eds. *Goodman and Gillman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 10th edition. New York : Mc Graw Hill Companies. p: 687-691, 706.
- Hermawati. 2005. Kajian aktivitas dan karakterisasi senyawa antimikroba dari susu kuda Sumbawa. *Jurnal Veteriner*. 9(2): 52-59.
- Hyams, J. 2004. *Inflammatory Bowel Disease*. Richard EB, Robert MK, Hal BJ, editor. Nelson Texbook of Pediatrics. Edisi ke-17. Philadelphia: Saunders. Hal 1248-1255.
- Infovet. 2009. *Majalah Peternakan Dan Kesehatan Hewan*. Jakarta: 104.
- JuC., and J.P. Uetrecht. 1998. *Oxidation of a Metabolite of Indomethacin (desmethyldeschlorobenzoylindomethacin) to Reactive Intermediates by Activates Neutrophils, Hypochlorous Acid, and The Myeloperoxidase System*. Drug Metabolism and Disposition. 26(7): 676-680.
- Junqueira, L.C. 2008. *Basic Histology: Text and Atlas*, 10 ed. Penerbit buku Kedokteran EGC. Jakarta. Hal: 311.
- Krinke, G. J. 2000. *The Handbook of Experimental Animals The Laboratory Rat*. Academy Press, New York. Pp. 45-50, 295-296.

- Kuhbacher T, Folsch, U.R. 2007. *Practical guidelines for the treatment of inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol ; 13(8): 1149 – 55.
- Kusriningrum. 2008. *Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap*. Surabaya: Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Tamboli.
- Lanas, A., and C. Scarpignato. 2006. Microbial Flora in NSAID-induced intestinal Damage: *A Role of Antibiotics*. Digestions ; 73 (Suppl) : 1149-1455.
- Malole, M.B.M., dan C. S. Pramono. 1989. *Penggunaan Hewan-hewan Percobaan Laboratorium*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Marice, S., dan Sulistyowati, T. 2011. Perubahan Nilai Hematologi, Biokimia Darah, Bobot Organ dan Bobot Badan Tikus Putih pada Umur Berbeda. Pusat Penelitian dan Pengembangan Biomedis dan Farmasi Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. *Journal Veteriner*. Vol. 12 No. 1: 58-64.
- Mescher, A.L. 2012. *Histologi dasar junqueira teks dan atlas*. Edisi ke-11. Jakarta: EGC.
- Michael, N.J. 2006. alih bahasa: Surapsari, J., editor: Safitri, A. *At a glance: farmakologi medis* ed 5. Jakarta: Erlangga.
- Mitchell, R.N., and Cotran, R.S. 2003. *Acute and chronic inflammation*. Dalam S. L. Robbins and V. Kumar, Robbins Basic Pathology. 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders. pp33- 59.
- Nagasako, Y.H., Saito, Y., Tamura, S., Shimamura and Tomita, M. 1993. Iron binding properties of bovine lactoferrin in iron rich solution. *Journal of Dairy Science*. 76(7): 1876-1881.
- Parameswaran, N and Patial, S. 2010. *Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages*. Crit. Rev. Eukaryot. 20, 87–103.
- Perceka, M.L. 2012. *Analisis Deskriptif Kemunduran Mutu Kulit Ikan Bandeng (Chanos Chanos) Selama Penyimpanan Suhu Chilling Melalui Pengamatan Histologis* [Skripsi]. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Philipson, M., Johanson, MEV., Henriksnas, J., Petersson, J., and Gendler, SJ. 2008. *The gastric mucus layers: constituents and regulation of*

- accumulation*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol ; 295:G806-G812.
- Priyambodo, S. 2007. *Pengendalian Hama Tikus Terpadu*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Puspita, E.C., dan Putra, F.E. 2014. *Pengaruh Pemberian Metanil Yellow Peroral Dosis Bertingkat Selama 30 Hari terhadap Gambaran Histopatologi Duodenum Mencit BALB/c* [Thesis]. Faculty of Medicine Diponegoro University.
- Reni, S., Sumarno., dan 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.
- Rifa'i, M. 2010. *Autoimun dan Bioregulator*. Malang: UB Press.
- Rijatmiko, D. 2003. *Pengaruh susu kuda sumbawa terhadap pertumbuhan Mycobacterium tuberculosis secara in vitro*. [Thesis]. Institut Pertanian Bogor . Bogor.
- Riyadh, S. 2003. *Menyingkap Tabir Susu Kuda Liar Sumbawa*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Rohman, A. 2009. *Kromatografi Untuk Analisis Obat*. Graha Ilmu. Yogyakarta. Hal 1-2, 5, 45, 53.
- Roitt, I., Brostoff, J., and Male, D. 2001. *Immunology*. 6th edition. London: Harcourt Publisher Ltd.
- Ross, M.H., Gordon I.K., and Wojciech, P. 2003. *Histology a Text and Atlas 4th Edition*. United State of America.
- Sartor, R.B. 2006. *Mechanism of Disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis*. NCP Gast Hep. 3(7):390-407.
- Severin, S and X, Wenshui. 2005. *Milk Biologically Active Components as Nutraceuticals: Review*. Critical 20. Review Food Science Nutrition.; 45(7): 645-656.
- Sholichah, N.A., Aulanni'am., dan Mahdi, C. 2012. Efek Terapi Ekstrak Air Daun Kedondong (*Lannea coromandelica*) terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) dan Aktivitas Protease pada Ileum Tikus

Putih (*Rattus novergicus*) Inflammatory Bowel Disease Akibat Paparan Indometasin. *Veterinaria Medika*. Vol. 5 No. 3.

Snell, R. 2012. *Dalam Clinical Anatomy for Medical Students* ed 6 Terjemahan. Hartanto H ed. 7 (hal. 223-226). Jakarta: EGC.

Soeroso, A. 2007. *Sitokin Oftalmologi Indonesia*. 5:171-80.

Suryawinata, K. 2010. Penyakit Crohn-diagnosis histopatologi pasca operasi dengan indikasi apendisitis akut. *Damianus Journal of Medicine*. Vol 9 no.1.

Takeuchi, K., Kato, S., and Amagase, K. 2010. Prostaglandin EP receptors involved in modulating gastrointestinal mucosal integrity. *J Pharmacol Sci* 114:248-261.

The Conversation. 2013. *Animals in Research: Rats*. Theconversation.com/animals-in-research-rats-16634. [Diakses pada tanggal 20 November 2018].

Valle, D.J. 2005. *Peptic Ulcer Disease and Related Disorders*. Harrison's Principle Internal Medicine 16th Edition, McGraw Hill : 1746-1762.

Wilmana, F.P., and Gans, S. 2007. *Analgesik-Antipiretik Analgesik AntiInflamasi Non Steroid dan Obat Gangguan Sendi lainnya* dalam Gunawan, G.S., Setiabudy, R., Nafrialdi dan Elysabeth, Farmakologi dan Terapi, Edisi 4, 230-233. Universitas Indonesia. Jakarta.

Wisudanti, D.D. 2017. Efek Kefir terhadap Respons Imun Sukarelawan Sehat Secara in vitro. *Journal of Agromedicine and Medical Sciences*. Vol. 3 : (2) 28-34.

Wolfensohn, S., dan Lloyd, M. 2013. *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare*, 4th ed. Wiley-Blackwell, West Sussex, 234.

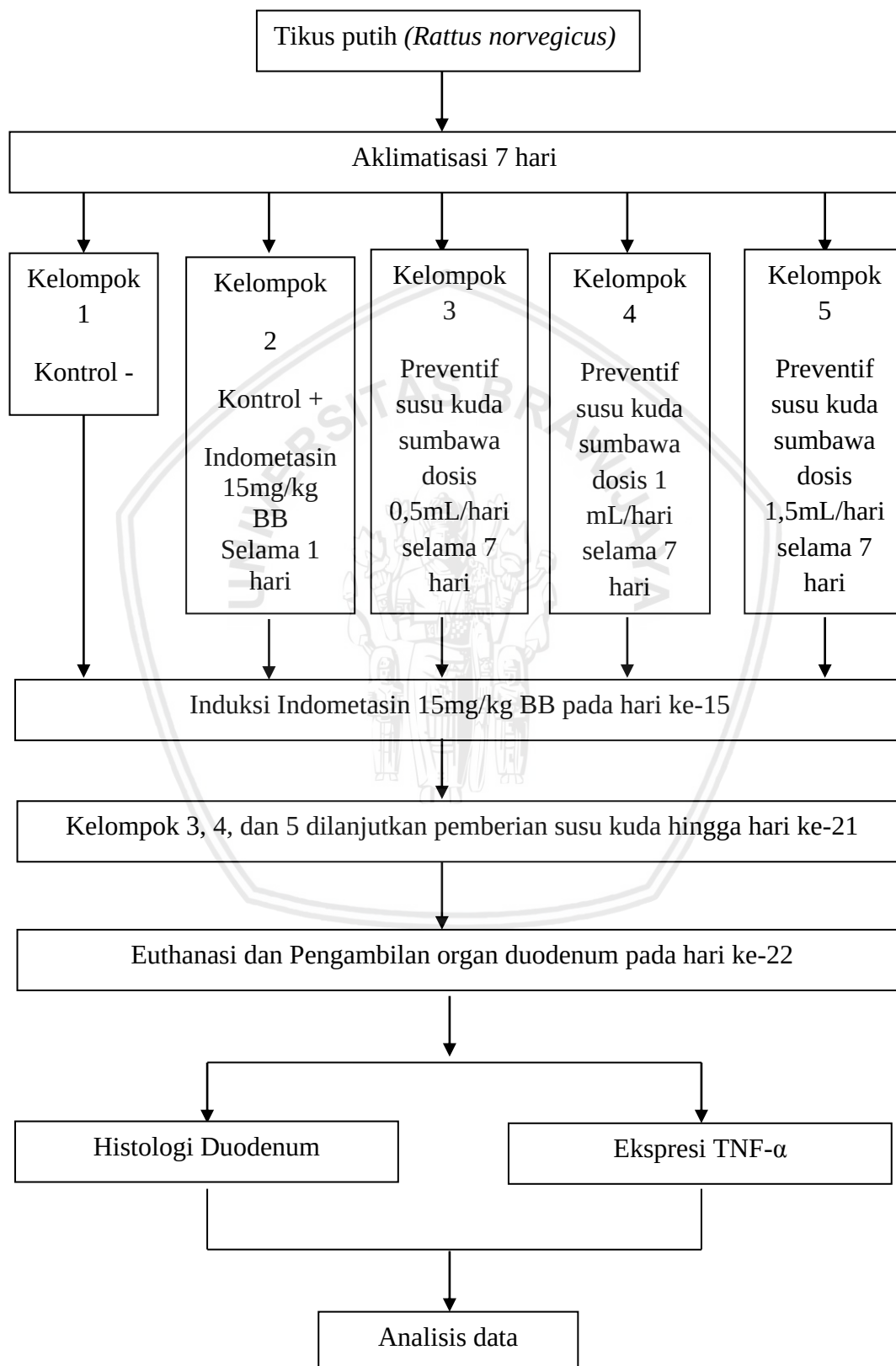
Yuniati, H. dan Sahara, E. 2012. *Komponen Bioaktif Protein Dan Lemak Dalam Susu Kuda Liar*. Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan.

Zheng, W. and Wang, S.Y. 2009. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *J.Agric.Food Chem*. 49 (11) : 5165-70. ACS Publications. Washington D.C.



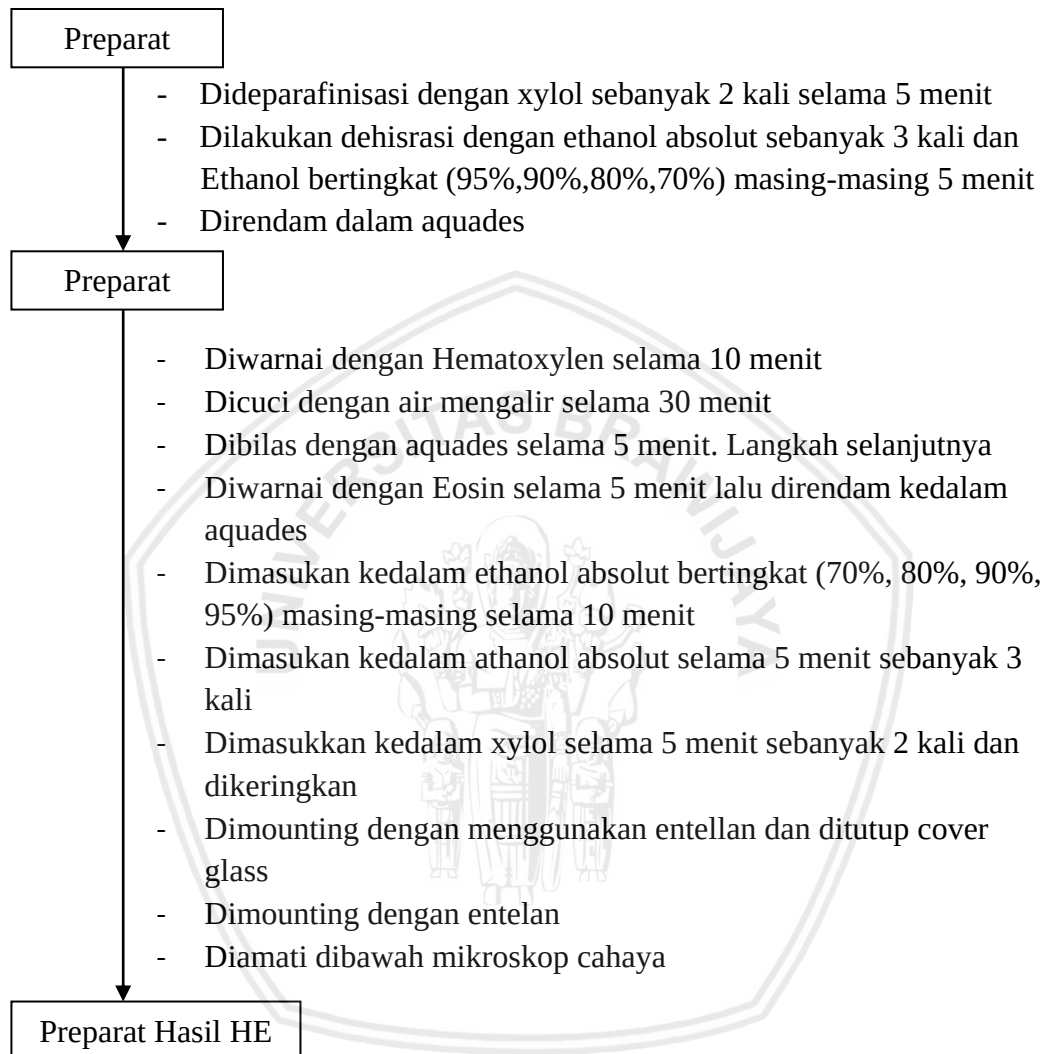
LAMPIRAN

Lampiran 1. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian



Lampiran 2. Pembuatan Preparat Gambaran Histopatologi Jaringan

Pewarnaan Hematoxylin-Eosin



Lampiran 3. Ekspresi TNF- α dengan Flowcitometri

Mencit

- Dislokasi
- Dibedah
- Diambil duodenum
- Dicuci & direndam dalam PBS
- Digerus duodenum dengan pangkal spuit baru pada $\pm$ 5 ml PBS
- Dibilas dengan 2-3 ml PBS
- Disaring dgn wire & dimasukkan ke propilen 15 ml, hingga volume tertentu

Homogenat

- Disentrifugasi 2500 rpm, 5', 10°C
- Buang supernatan hasil sentrifugasi

Pelet

- Diresuspensi dgn PBS 1 ml
- Dipipeting

Suspensi

- Dibagi ke beberapa microtube 1,5 ml (sesuai jumlah kebutuhan jenis kombinasi pewarnaan) yang telah berisi $\pm$ 0,5 ml PBS, @ 50 μ l
- Disentrifugasi 2500 rpm, 5', 10°C
- Buang supernatan hasil sentrifugasi

Pelet

- Pewarnaan ekstraseluler
 1. Dilakukan dengan menambahkan 50 μ l larutan antibodi spesifik pada sel (pellet)
 2. Diinkubasi dengan selama 20' pada 4°C, ruang gelap, ditambahkan PBS 400 μ l dan dipindahkan ke kuvet u/ analisis flow cytometry
- Pewarnaan intraseluler
 1. Ditambahkan larutan fiksatif (fixation buffer, cat.#420801 [Biolegend]) sebanyak 50 μ l
 2. Diinkubasi dengan selama 20' pada 4°C, ruang gelap
 3. Ditambahkan larutan permeabilitas (1X) (Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer (10X), cat.#421002 [Biolegend]) sebanyak 500 μ l, homogenisasi
 4. Disentrifugasi 2500 rpm, 5', 10°C. Supernatan dibuang

Pelet

5. Dilakukan penambahan 50 μ l larutan antibodi spesifik pada sel(pelet)
6. Diinkubasi dengan selama 20' pada 4°C, ruang gelap
- Ditambahkan $\pm$ 400 μ l PBS
- Dipindahkan ke kuvet flowcytometry

Analisis

Flow Cytometry

Lampiran 4. Perhitungan Dosis Indometasin

Dosis yang diberikan yaitu 15 mg/kgBB (Aulani'am, 2012). Dengan rata-rata berat badan tikus adalah 200 gram, sehingga kebutuhan indometasin per ekor tikus yaitu :

$$\begin{aligned}\text{Dosis indometasin per ekor tikus} &= 15 \text{ mg/kgBB} \times 0,2 \text{ kg} \\ &= 3 \text{ mg/ekor}\end{aligned}$$

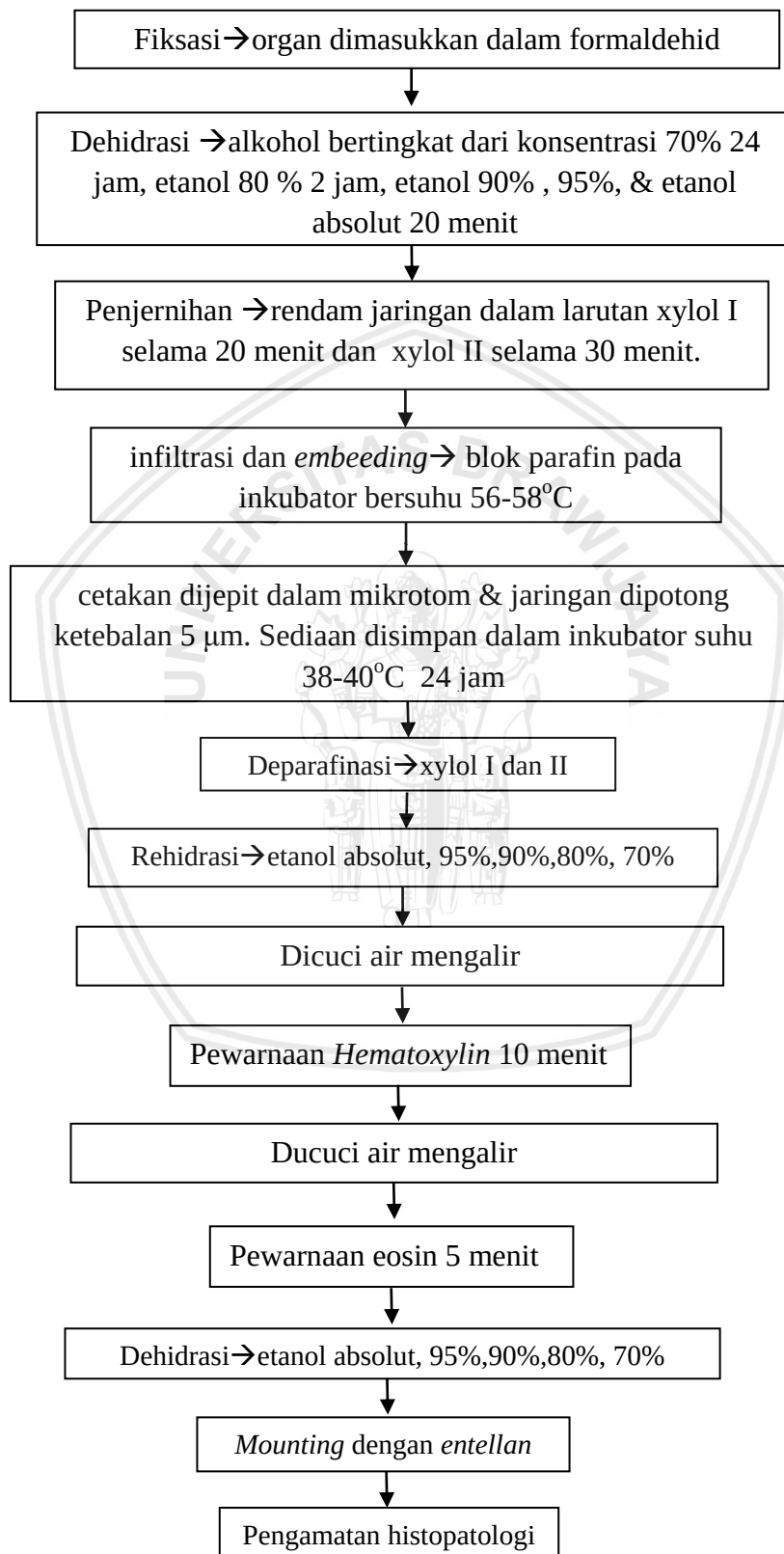
$$\begin{aligned}\text{Dosis indometasin untuk 20 ekor tikus} &= 20 \text{ ekor} \times 3 \text{ mg/ekor} \\ &= 60 \text{ mg/ 20ekor}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Pengenceran minyak jagung per ekor tikus} &= \frac{3 \text{ mg}}{45 \text{ mg}} \times 4 \text{ mL} \\ &= 0,26 \text{ mL/ ekor}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Pengenceran minyak jagung 20 ekor tikus} &= \frac{60 \text{ mg}}{45 \text{ mg}} \times 4 \text{ mL} \\ &= 5,3 \text{ mL/ 20 ekor}\end{aligned}$$

Jadi, dosis indometasin total yang diperlukan untuk 20 ekor tikus yaitu sebanyak 45mg dengan pengenceran minyak jagung yang diperlukan yaitu 4 mL. Induksi indometasin dengan pengenceran minyak jagung yaitu 0,2 mL/ ekor.

Lampiran 5. Prosedur Pembuatan Preparat Histopatologi dengan Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin (HE)



Lampiran 6. Kode Etik Penelitian

61



**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARANCE"**

No: 1046-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 : SUSU KUDA SUMBAWA SEBAGAI EFEK PREVENTIF
PADA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) MODEL IBD
(INFLAMMATORY BOWEL DISEASE) HASIL INDUKSI
INDOMETASIN TERHADAP JUMLAH SEL RADANG
DAN TNF- α

PENELITI : RAVI GHEVARI

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 8 Januari 2019
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya


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



Lampiran 7. Data berat badan tikus penelitian IBD

Kelompok Perlakuan	Berat Badan Tikus (gram)				
	H+1	H+7	H+15	H+17	H+21
K- (Kontrol Negatif)	138,9	140,2	162,5	170,9	174,1
	137,1	139,4	157,2	158,8	160,2
	128,6	134,9	158,9	168,1	172,9
	145,5	150,9	167,3	176,4	180,2
K+ (Kontrol Positif)	210,7	243,7	230,3	228,1	228,9
	170	187,4	221,5	200,8	225,1
	145,3	156	168,9	170,9	166,0
	150,6	158,5	170,5	148,5	156,7
P1	140	156	168,9	170,9	174,2
	145,3	148,5	157,9	158	139,5
	137,7	158,5	170,9	156,7	167,2
	186,3	197,9	207,2	201,2	177,2
P2	195,5	200,6	212,4	206,9	216,2
	186,2	189,1	198,9	192,9	189,8
	157,4	172,2	197,8	184,2	205,2
	180	194,1	186,4	182,8	190,7
P3	200	203,3	217,6	221,3	226
	171,3	191,5	201,4	194,3	192,8
	148,2	172,5	190,7	183,8	186,9
	191,2	196,7	204,1	204,7	186,9

Keterangan:

H+1 : Hari pertama aklimatisasi

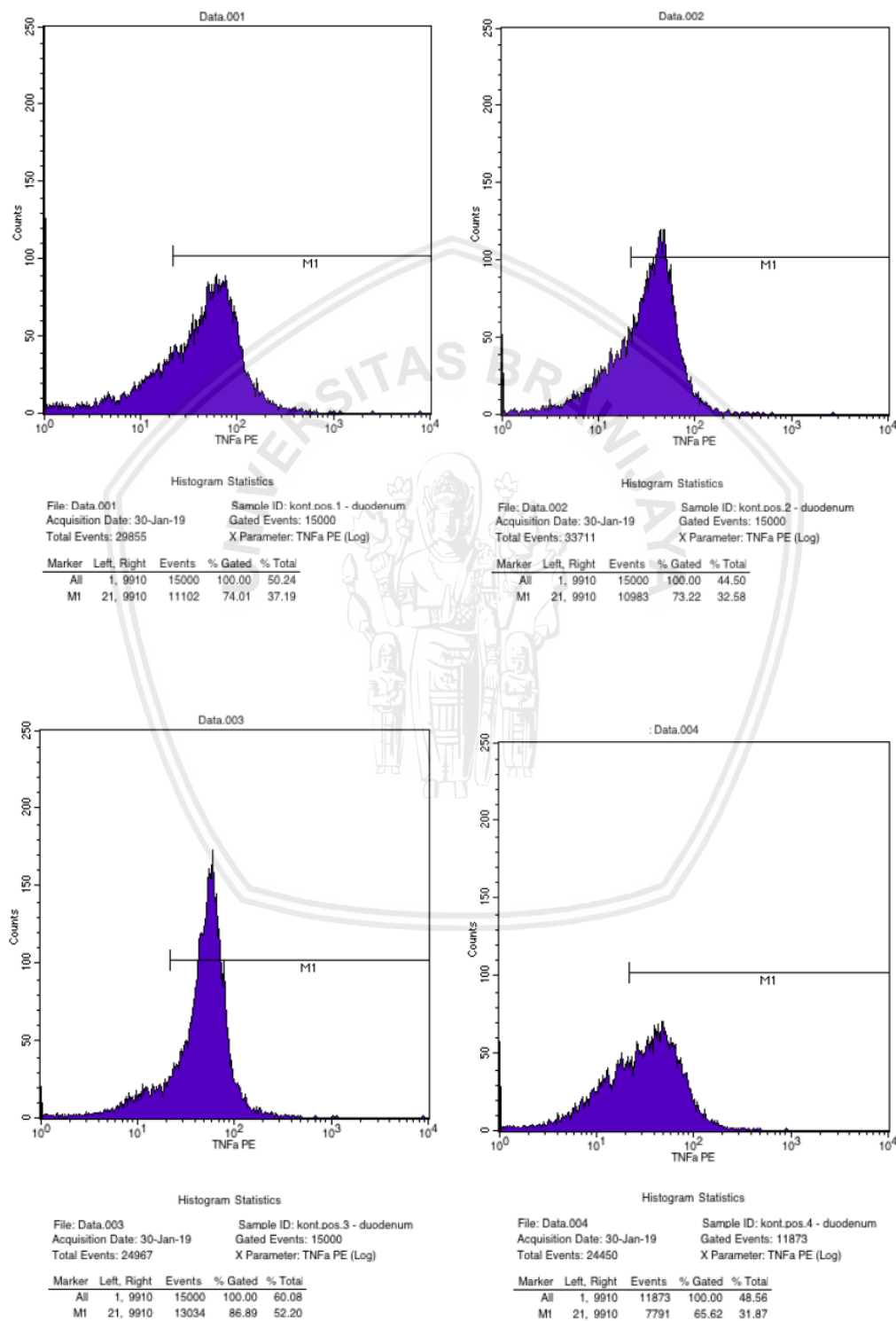
H+7 : Hari ketujuh aklimatisasi, sebelum pemberian preventif susu kuda sumbawa

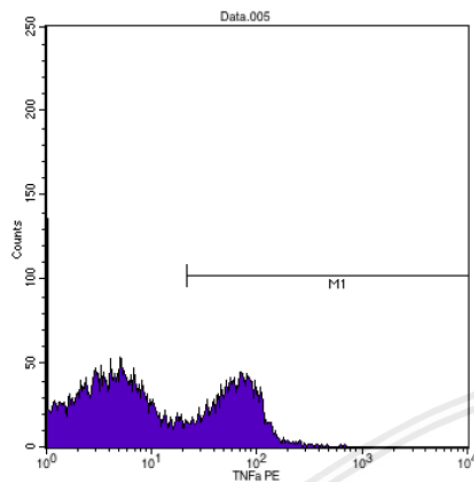
H+15 : Hari induksi indometasin, setelah pemberian susu kuda sumbawa 7 hari

H+17 : Hari kedua setelah induksi indometasin

H+21 : Hari ketujuh setelah induksi indometasin dan pemberian susu kuda sumbawa 7 hari

Lampiran 8. Hasil Analisis *Flowcitometry*

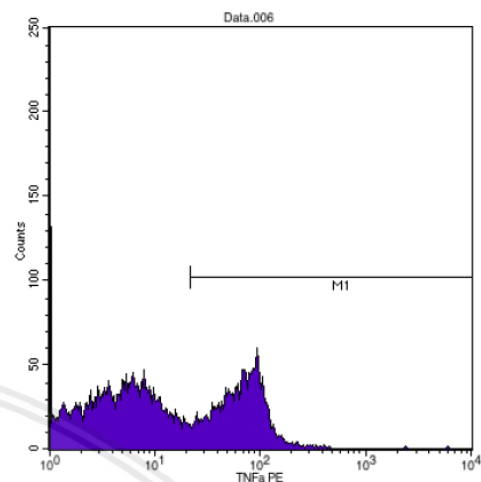




Histogram Statistics

File: Data.005 Sample ID: kont.neg.1 - duodenum
Acquisition Date: 30-Jan-19 Gated Events: 15000
Total Events: 26438 X Parameter: TNFa PE (Log)

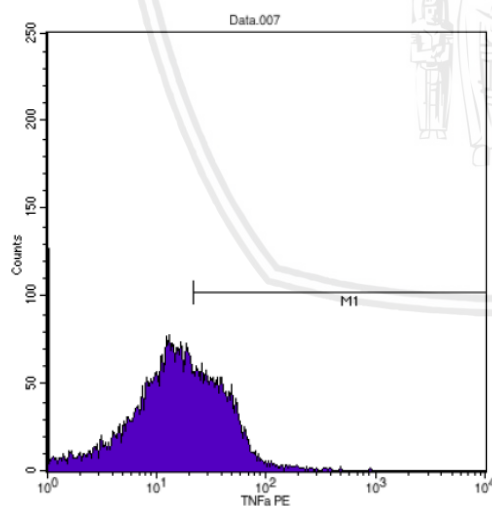
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	15000	100.00	56.74
M1	21, 9910	4910	32.73	18.57



Histogram Statistics

File: Data.006 Sample ID: kont.neg.2 - duodenum
Acquisition Date: 30-Jan-19 Gated Events: 15000
Total Events: 28842 X Parameter: TNFa PE (Log)

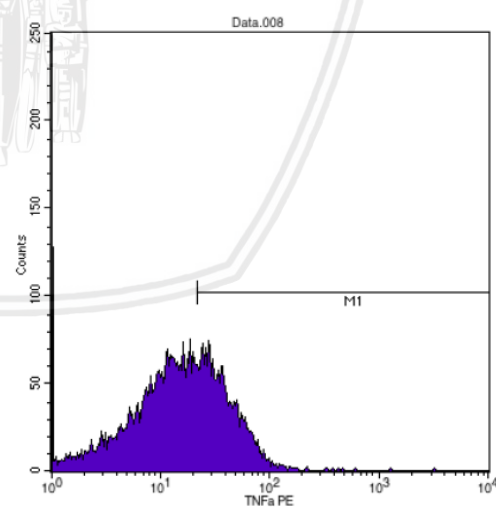
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	15000	100.00	52.01
M1	21, 9910	5214	34.76	18.08



Histogram Statistics

File: Data.007 Sample ID: kont.neg.3 - duodenum
Acquisition Date: 30-Jan-19 Gated Events: 15000
Total Events: 32909 X Parameter: TNFa PE (Log)

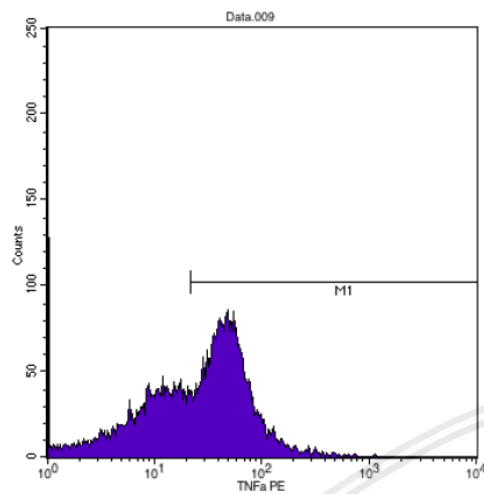
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	15000	100.00	45.58
M1	21, 9910	5405	36.03	16.42



Histogram Statistics

File: Data.008 Sample ID: kont.neg.4 - duodenum
Acquisition Date: 30-Jan-19 Gated Events: 15000
Total Events: 33449 X Parameter: TNFa PE (Log)

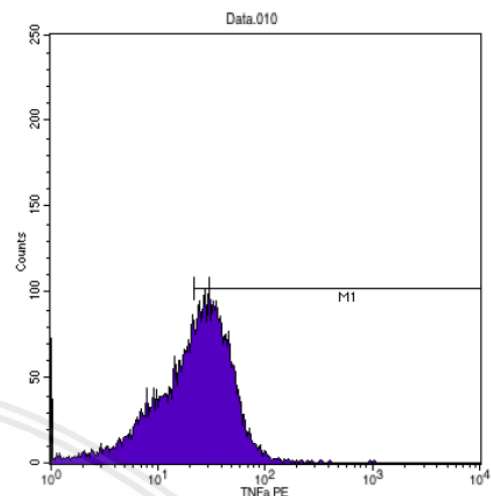
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	15000	100.00	44.84
M1	21, 9910	5565	37.10	16.64



Histogram Statistics

File: Data.009 Sample ID: P1.1 - duodenum
Acquisition Date: 30-Jan-19 Gated Events: 15000
Total Events: 27181 X Parameter: TNFa PE (Log)

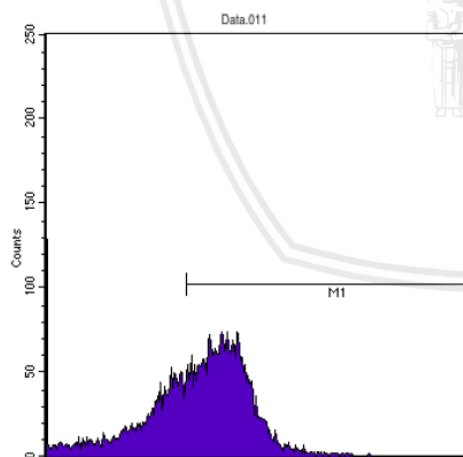
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	15000	100.00	55.19
M1	21, 9910	8979	59.86	33.03



Histogram Statistics

File: Data.010 Sample ID: P1.2 - duodenum
Acquisition Date: 30-Jan-19 Gated Events: 15000
Total Events: 24497 X Parameter: TNFa PE (Log)

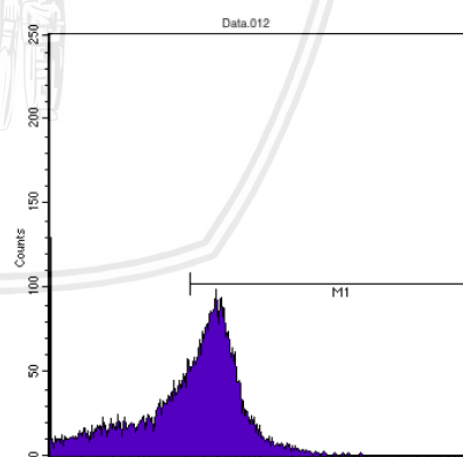
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	15000	100.00	61.23
M1	21, 9910	8440	56.27	34.45



Histogram Statistics

File: Data.011 Sample ID: P1.3 - duodenum
Acquisition Date: 30-Jan-19 Gated Events: 15000
Total Events: 30037 X Parameter: TNFa PE (Log)

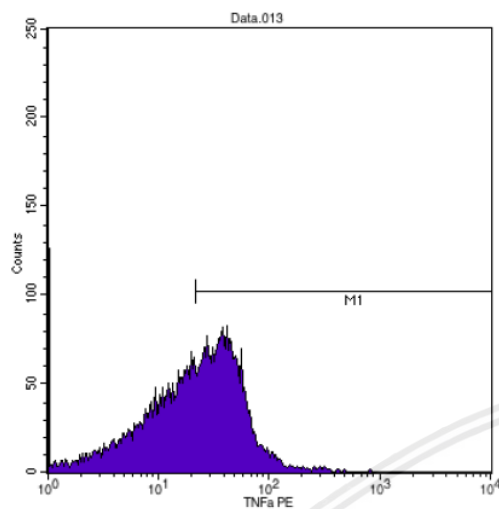
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	15000	100.00	49.94
M1	21, 9910	9324	62.16	31.04



Histogram Statistics

File: Data.012 Sample ID: P1.4 - duodenum
Acquisition Date: 30-Jan-19 Gated Events: 15000
Total Events: 26868 X Parameter: TNFa PE (Log)

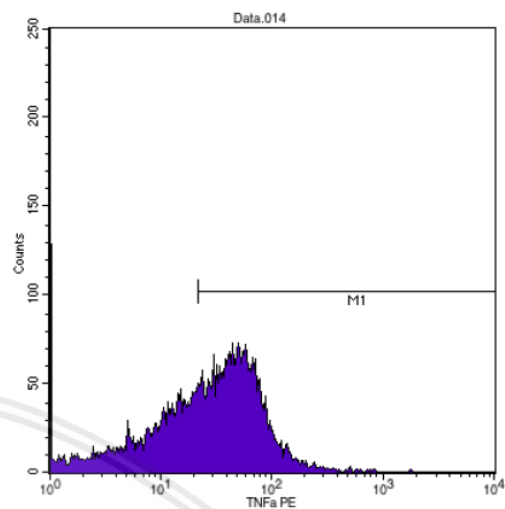
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	15000	100.00	55.83
M1	21, 9910	8766	58.44	32.63



Histogram Statistics

File: Data.013 Sample ID: P2.1 - duodenum
Acquisition Date: 30-Jan-19 Gated Events: 15000
Total Events: 25634 X Parameter: TNFa PE (Log)

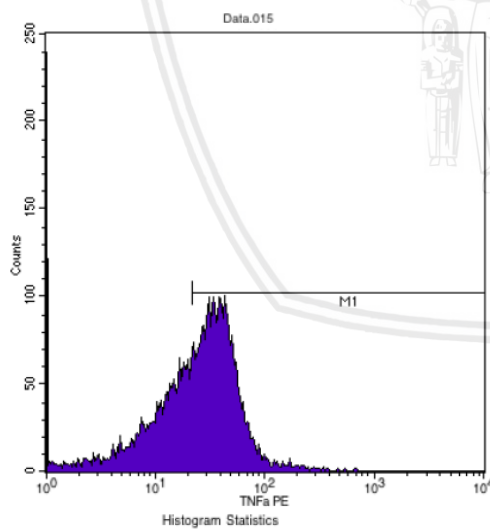
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	15000	100.00	58.52
M1	21, 9910	7970	53.13	31.09



Histogram Statistics

File: Data.014 Sample ID: P2.2 - duodenum
Acquisition Date: 30-Jan-19 Gated Events: 15000
Total Events: 26889 X Parameter: TNFa PE (Log)

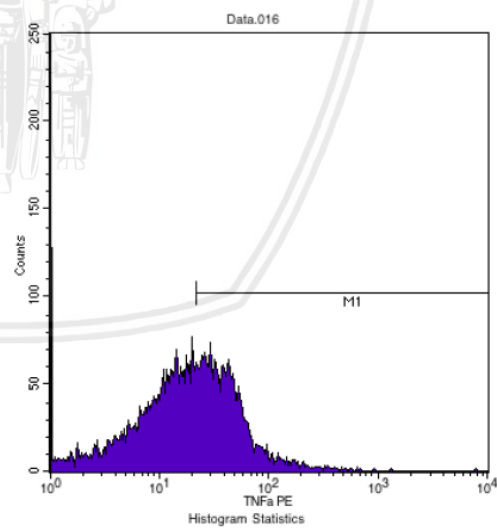
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	15000	100.00	55.78
M1	21, 9910	8754	58.36	32.56



Histogram Statistics

File: Data.015 Sample ID: P2.3 - duodenum
Acquisition Date: 30-Jan-19 Gated Events: 15000
Total Events: 32310 X Parameter: TNFa PE (Log)

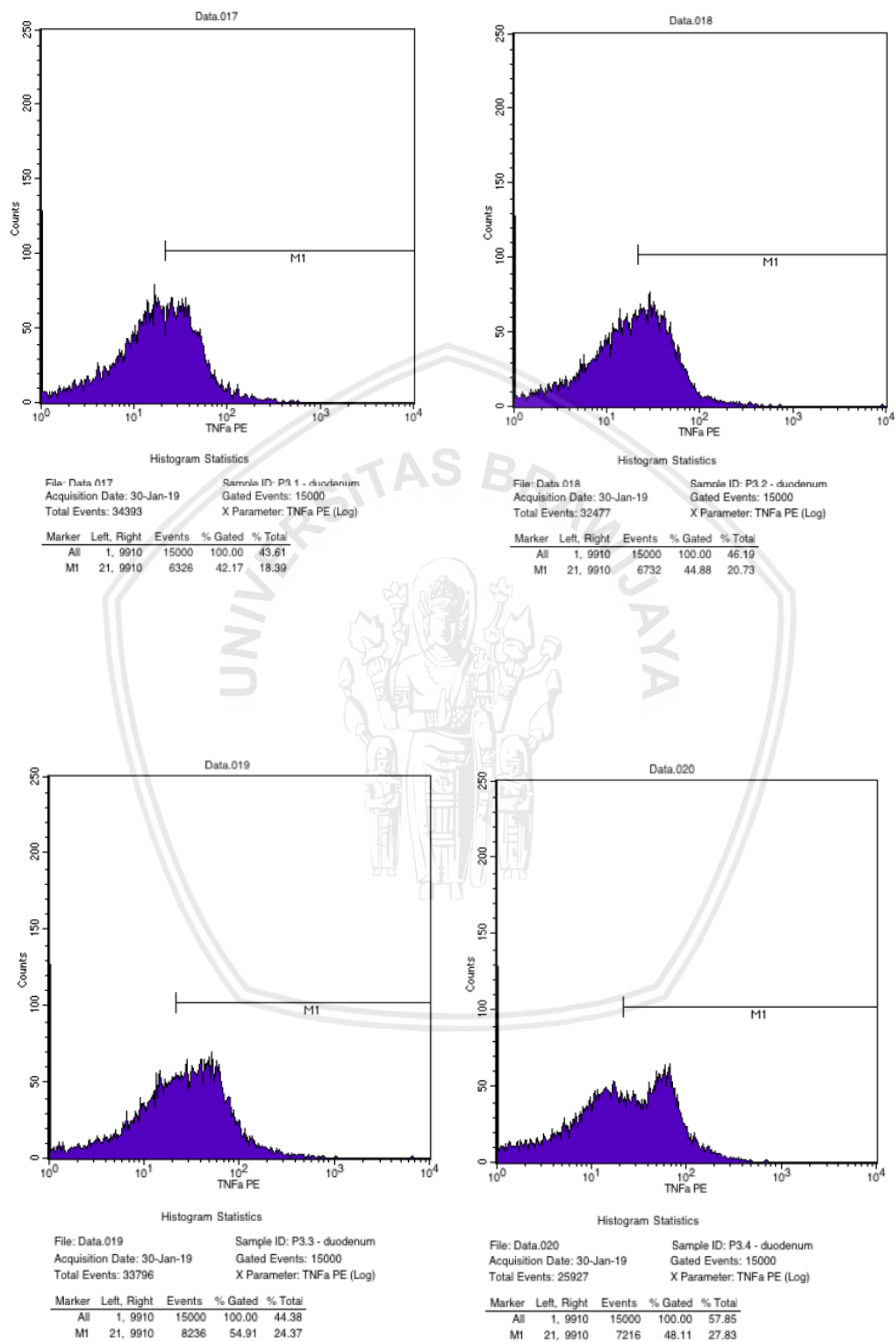
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	15000	100.00	46.43
M1	21, 9910	8999	59.99	27.85



Histogram Statistics

File: Data.016 Sample ID: P2.4 - duodenum
Acquisition Date: 30-Jan-19 Gated Events: 15000
Total Events: 35081 X Parameter: TNFa PE (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	15000	100.00	42.76
M1	21, 9910	6658	44.39	18.98



Lampiran 9. Hasil Statistika Analisa Ekspresi TNF- α

9.1 Uji Normalitas

Tests of Normality							
kelompok		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
ekspresi_TNF_alpha	kontrol +	.292	4	.	.932	4	.605
	kontrol -	.179	4	.	.976	4	.880
	perlakuan 1	.142	4	.	1.000	4	.999
	perlakuan 2	.234	4	.	.908	4	.471
	perlakuan 3	.207	4	.	.954	4	.739

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

9.2 Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Ekspresi_TNF_alpha

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.486	4	15	.256

Tes ini bertujuan menguji berlaku tidaknya asumsi ANOVA, yaitu apakah kelima sampel mempunyai varian yang sama dan untuk mengetahui apakah asumsi kelima kelompok sampel mempunyai varian yang sama (homogen) dapat diterima, sebelumnya perlu dipersiapkan hipotesis tentang hal tersebut.

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 0.256 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.

9.3 Uji One Way ANNOVA

Descriptives

ekspresi_TNF_alpha

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
kontrol +	4	74.9350	8.82210	4.41105	60.8971	88.9729	65.62	86.89
kontrol -	4	35.1550	1.87841	.93921	32.1660	38.1440	32.73	37.10
perlakuan 1	4	59.1825	2.47376	1.23688	55.2462	63.1188	56.27	62.16
perlakuan 2	4	53.9675	7.02364	3.51182	42.7913	65.1437	44.39	59.99
perlakuan 3	4	47.5175	5.49401	2.74700	38.7753	56.2597	42.17	54.91
Total	20	54.1515	14.41797	3.22396	47.4037	60.8993	32.73	86.89

ANOVA

ekspresi_TNF_alpha

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3448.703	4	862.176	25.815	.000
Within Groups	500.979	15	33.399		
Total	3949.681	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 ekspresi TNF- α dengan preventif susu kuda Sumbawa yang berbeda (sama)

H_1 = ada perbedaan ekspresi TNF- α dengan preventif susu kuda Sumbawa 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 > 0.01 maka H_0 diterima

Jika signifikan atau probabilitas < 0.01 maka H_0 ditolak

Berdasarkan hasil yang diperoleh pada uji ANOVA, nilai probabilitas adalah $0.000 < 0.01$ dengan taraf kepercayaan 95%. Dengan demikian hipotesis awal (H_0) ditolak. Hal ini menunjukkan bahwa ada perbedaan ekspresi TNF- α dengan preventif susu kuda Sumbawa yang berbeda. Pemberian susu kuda Sumbawa yang berbeda mempunyai pengaruh terhadap ekspresi TNF- α . Karena hasil analisis ANOVA menunjukkan adanya perbedaan ekspresi TNF- α pada setiap kelompok perlakuan, maka dilanjutkan dengan *Posthoc Test* dengan mengetahui uji *Tukey* atau *BNJ* (Benar Nyata Jujur) untuk mengetahui adanya perbedaan yang signifikan dari ekspresi TNF- α dengan pemberian susu kuda Sumbawa

9.4 Uji Beda Nyata Jujur

Multiple Comparisons

ekspresi_TNF_alpha Tukey

HSD

(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	99% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol +	kontrol -	39.78000*	4.08648	.000	27.1613	52.3987
	perlakuan 1	15.75250*	4.08648	.012	3.1338	28.3712
	perlakuan 2	20.96750*	4.08648	.001	8.3488	33.5862
	perlakuan 3	27.41750*	4.08648	.000	14.7988	40.0362
kontrol -	kontrol +	-39.78000*	4.08648	.000	-52.3987	-27.1613
	perlakuan 1	-24.02750*	4.08648	.000	-36.6462	-11.4088
	perlakuan 2	-18.81250*	4.08648	.003	-31.4312	-6.1938
	perlakuan 3	-12.36250	4.08648	.056	-24.9812	.2562
perlakuan 1	kontrol +	-15.75250*	4.08648	.012	-28.3712	-3.1338
	kontrol -	24.02750*	4.08648	.000	11.4088	36.6462
	perlakuan 2	5.21500	4.08648	.709	-7.4037	17.8337
	perlakuan 3	11.66500	4.08648	.077	-.9537	24.2837
perlakuan 2	kontrol +	-20.96750*	4.08648	.001	-33.5862	-8.3488
	kontrol -	18.81250*	4.08648	.003	6.1938	31.4312
	perlakuan 1	-5.21500	4.08648	.709	-17.8337	7.4037
	perlakuan 3	6.45000	4.08648	.532	-6.1687	19.0687
perlakuan 3	kontrol +	-27.41750*	4.08648	.000	-40.0362	-14.7988
	kontrol -	12.36250	4.08648	.056	-.2562	24.9812
	perlakuan 1	-11.66500	4.08648	.077	-24.2837	.9537
	perlakuan 2	-6.45000	4.08648	.532	-19.0687	6.1687

*. The mean difference is significant at the 0.01 level.

ekspresi_TNF_alpha

Tukey HSD

kelompok	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
kontrol -	4	35.1550		
perlakuan 3	4	47.5175	47.5175	
perlakuan 2	4		53.9675	
perlakuan 1	4		59.1825	
kontrol +	4			74.9350
Sig.		.056	.077	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Hasil Uji *Tukey* menunjukkan adanya tanda (*) yang artinya terdapat perbedaan signifikan pada rata-rata nilai tengah perlakuan, dengan kata lain bahwa ketiga volume pemberian memberikan pengaruh terhadap ekspresi TNF- α pada setiap perlakuan.

9.5 Perhitungan Persentase Peningkatan dan Penurunan antar Perlakuan

Peningkatan terhadap kelompok perlakuan K- (Kontrol Negatif)

- Kelompok Perlakuan K+ (Kontrol Positif)

$$\frac{\text{Rataan Kontrol Positif} - \text{Rataan Kontrol Negatif}}{\text{Rataan Kontrol Negatif}} \times 100\%$$

$$= \frac{74,935 - 35,155}{35,155} \times 100\%$$

$$= 113,15 \%$$

Penurunan terhadap kelompok perlakuan K+ (Kontrol Positif)

- Kelompok Perlakuan 1 (0,5mL susu kuda Sumbawa)

$$\begin{aligned} & \frac{\text{Rataan Kontrol Positif} - \text{Rataan Perlakuan 1}}{\text{Rataan Kontrol positif}} \times 100\% \\ &= \frac{74,935 - 59,182}{74,935} \times 100\% \\ &= 21,02\% \end{aligned}$$

- Kelompok Perlakuan 2 (1mL susu kuda Sumbawa)

$$\begin{aligned} & \frac{\text{Rataan Kontrol Positif} - \text{Rataan Perlakuan 1}}{\text{Rataan Kontrol positif}} \times 100\% \\ &= \frac{74,935 - 53,967}{74,935} \times 100\% \\ &= 27,98\% \end{aligned}$$

- Kelompok Perlakuan 1 (0,5mL susu kuda Sumbawa)

$$\begin{aligned} & \frac{\text{Rataan Kontrol Positif} - \text{Rataan Perlakuan 1}}{\text{Rataan Kontrol positif}} \times 100\% \\ &= \frac{74,935 - 47,517}{74,935} \times 100\% \\ &= 36,58\% \end{aligned}$$

Lampiran 10. Uji Bakteri Asam Laktat dan Antioksidan susu kuda Sumbawa



LABORATORIUM PENGUJIAN MUTU DAN KEAMANAN PANGAN
(TESTING LABORATORY OF FOOD QUALITY AND FOOD SAFETY)
JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
Jl. Veteran, Malang 65145, Telp. (0341) 573358
E-mail : labujipangan_thpub@yahoo.com

KEPADA : Theresa Lidya Pramesti
FKH - UB
MALANG

LAPORAN HASIL UJI
REPORT OF ANALYSIS

Nomor / Number : 0122/THP/LAB/2019
Nomor Analisis / Analysis Number : 0122
Tanggal penerbitan / Date of issue : 08 Februari 2019
Yang bertanda tangan di bawah ini menerangkan, bahwa hasil pengujian
The undersigned ratifies that examination
Dari contoh / of the sample (s) : **SUSU KUDA SUMBAWA**

Untuk analisis / For analysis :
Keterangan contoh / Description of sample :
Diambil dari / Taken from :
Oleh / By :
Tanggal penerimaan contoh / Received : 15 Januari 2019
Tanggal pelaksanaan analisis / Date of analysis : 15 Januari 2019
Hasil adalah sebagai berikut / Resulted as follows :

KODE	HASIL
TOTAL BAL (CFU/ml)	$6,7 \times 10^6$
ANTIOKSIDAN IC50 (mg/ml)	933,86

HASIL PENGUJIAN INI HANYA BERLAKU UNTUK CONTOH-CONTOH TERSEBUT DI ATAS. PENGAMBIL CONTOH BERTANGGUNG JAWAB ATAS KEBENARAN TANDING BARANG

Ketua



Dr. Widya Dwi Rukmi P., STP, MP
NIP. 19700504 199903 2 002

Lampiran 11. Dokumentasi Penelitian

No	Foto Dokumentasi	Keterangan
1		Susu kuda Sumbawa didapatkan dari peternakan kuda di Kabupaten Dompu, Nusa Tenggara Barat
2		Aklimatisasi tikus dilakukan selama 7 hari, dengan pemberian pakan dan minum ad libitum
3		Pemberian susu kuda Sumbawa selama 14 hari dengan metode sonde lambung
4		Pembuatan indometasin dengan pelarut minyak jagung

5		Pasca induksi indometasin 15 mg/kgBB. Feses berwarna hitam dan lembek disertai diare
6		Nekropsi dan pengambilan organ duodenum
7		Organ dimasukkan kedalam pot organ untuk dilakukan pengujian <i>flowcitometry</i> dan pembuatan histopatologi duodenum