

**PENGARUH INTERMITTENT FASTING TERHADAP MIKROBIOTA
PADA INTESTINAL MENCIT PUTIH Balb/C JANTAN**

Karya Tulis Ilmiah Untuk Memenuhi Sebagian Syarat Memperoleh Derajat
Sarjana Kedokteran

PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER



Oleh :
Reinike Larasati Fajrin
15711207

Fakultas Kedokteran
Universitas Islam Indonesia
Yogyakarta
2019

**EFFECT OF INTERMITTENT FASTING ON THE MICROBIOTA IN
INTESTINAL WHITE Balb/C MALE MICE**

A Scientific Paper

As a Part of Requirements to Obtain Medical Scholar Degree

Undergraduate Program of Medicine



By :

Reinike Larasati Fajrin

15711207

FACULTY OF MEDICINE

UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA

YOGYAKARTA

2019

LEMBAR PENGESAHAN
KARYA TULIS ILMIAH
PENGARUH *INTERMITTENT FASTING* TERHADAP MIKROBIOTA
PADA INTESTINAL MENCIT PUTIH Balb/C JANTAN

Disusun dan diajukan oleh :

Reinike Larasati Fajrin

15711207

Telah diseminarkan pada tanggal :

14 Februari 2019

Disetujui oleh :

Pembimbing Utama,

dr. Irena Agustianingtyas, M. Sc

Ketua Prodi Pendidikan Dokter

Penguji,

dr. Ika Fidianingsih, M. Sc



dr. Umatul Khoiriyah, M.Med.Ed., Ph. D

Disahkan oleh:



Dekan Fakultas Kedokteran UII,

dr. Linda Ristic, M.Kes., Sp.PK

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR PENGESAHAN	i
DAFTAR ISI.....	iii
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR TABEL.....	vii
DAFTAR LAMPIRAN.....	vi
DAFTAR SINGKATAN.....	vii
HALAMAN PERNYATAAN.....	viii
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	ix
MOTTO.....	x
KATA PENGANTAR.....	xi
ABSTRAK.....	xiii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan masalah.....	2
1.3. Tujuan penelitian.....	2
1.4. Keaslian Penelitian.....	3
1.5. Manfaat penelitian.....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1. <i>Intermittent Fasting</i>	7
2.2. Intestinal.....	9
2.3. Mikroba Intestinal.....	10
2.4. Kerangka Teori.....	14
2.5. Kerangka Konsep.....	15
2.6. Hipotesis.....	16
BAB III METODE PENELITIAN.....	17
3.1. Rancangan Penelitian.....	17
3.2. Waktu dan tempat Penelitian.....	18

3.3.	Populasi dan Sampel Penelitian.....	18
3.4.	Variabel Penelitian dan Definisi Operasional.....	18
3.5.	Alur Penelitian	19
3.6.	Analisis Data.....	21
3.7.	Etika Penelitian.....	22
3.8.	Jadwal Penelitian.....	22
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....		23
4.1.	Hasil.....	23
4.2.	Pembahasan.....	27
4.3.	Keterbatasan penelitian.....	29
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....		30
5.1.	Simpulan.....	30
5.2.	Saran.....	30
DAFTAR PUSTAKA.....		31

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Efek puasa terhadap sistem kekebalan tubuh	8
Gambar 2. Intervensi <i>Intermittent Fasting</i> (IF)	9
Gambar 3. Mekanisme atrofi usus	11
Gambar 4. perbedaan signifikan luas mukosa usus ($p < 0,05$)	11
Gambar 5. Distribusi mikrobiota saluran pencernaan	12
Gambar 6. Mikroba Intestinal dan perannya.....	13
Gambar 7. Jumlah filum mikroba pada kolon saat puasa berkepanjangan	14
Gambar 8. Kerangka teori	16
Gambar 9. Kerangka konsep	17
Gambar 10. Satu Koloni.....	19
Gambar 11. Alur Penelitian.....	20
Gambar 12. Koloni bakteri pada cawan.....	25
Gambar 13. Menghitung koloni menggunakan aplikasi <i>Colony Counter</i>	25
Gambar 14. Rata-rata jumlah koloni AL dan IF.....	26

DAFTAR TABEL

	Halaman
<u>Tabel 1. Keaslian Penelitian</u>	4
<u>Tabel 2. Jadwal penelitian</u>	22
Tabel 3. Analisis Data Statistika Deskriptif	25
Tabel 4. TPC.....	26

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Alat dan Bahan	34
Lampiran 2. <i>Ethical Clearance</i>	37
Lampiran 3. <i>Colony Forming Unit</i>	38

DAFTAR SINGKATAN

ADF	: <i>Alternated-Day Fasting</i>
AL	: <i>Ad Libitum</i>
ALT	: Angka Lempeng Total
BP	: <i>Blood Pressure</i>
CFU	: <i>Colony Forming Unit</i>
CR	: <i>Caloric Restriction</i>
DR	: <i>Dietary Restriction</i>
HR	: <i>Heart Rate</i>
IF	: <i>Intermittent Fasting</i>
iNOS	: <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>
PCA	: <i>Plate Count Agar</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
TBUD	: Terlalu Banyak Untuk Dihitung
TPC	: <i>Total Plate Count</i>

HALAMAN PERNYATAAN

Saya yang Bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Reinike Larasati Fajrin

NIM : 15711207

Judul : Pengaruh *Intermittent Fasting* terhadap Mikrobiota pada
.....Intestinal Mencit Putih Balb/C Jantan

Pembimbing : dr. Irena Agustiningtyas M. Sc

Menyatakan bahwa

1. Karya Tulis Ilmiah (KTI) ini merupakan hasil sendiri dan bukan hasil plagiasi.
2. Pelaksanaan penelitian ini merupakan bagian dari penelitian payungan dengan judul “Aktivitas Makrofag Peritoneum pada Mencit Balb/C yang dipuaskan ” dengan peneliti utama dr. Ika Fidianingsih, M. Sc.
3. Hak publikasi penelitian ini ada pada dr. Ika Fidianingsih, M. Sc.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya tanpa paksaan atau tekanan dari siapapun. Saya bersedia bertanggung jawab secara hukum apabila terdapat hal-hal yang tidak benar dalam penelitian ini.

Yogyakarta, 14 Februari 2019

Reinike Larasati Fajrin

HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillahirabbil alamin, puji syukur saya panjatkan atas segala rahmat Allah Subhanahu Wa Ta'ala sehingga karya tulis ini dapat terselesaikan.

Karya tulis ini saya persembahkan spesial untuk kedua orangtua saya yang senantiasa memberi dukungan dalam bentuk apapun.

Bapak Budi Hartono da Ibu Sri Warsiyah

MOTTO

“Dan Aku tidak menciptakan jin dan manusia melainkan supaya mereka beribadah kepada-Ku.” (QS. Adz Dzariyat: 56)

Hidup ini terlalu singkat untuk mengejar sesuatu selain surga, jadikanlah dunia sebagai perantaranya.

“Ketahuilah, bahwa sesungguhnya kehidupan dunia ini hanyalah permainan dan suatu yang melalaikan, perhiasan dan bermegah-megah antara kamu serta berbangga-banggaan tentang banyaknya harta dan anak, seperti hujan yang tanam-tanamannya mengagumkan para petani; kemudian tanaman itu menjadi kering dan kamu lihat warnanya kuning kemudian menjadi hancur. Dan di akhirat (nanti) ada azab yang keras dan ampunan dari Allah serta keridhaan-Nya. Dan kehidupan dunia ini tidak lain hanyalah kesenangan yang menipu.” (QS. Al Hadid: 20)

KATA PENGANTAR



Assalamu'alaikum wr. wb.

Segala puji bagi Allah atas limpahan dan rahmat, karunia dan hidayahnya-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan karya tulis ilmiah yang berjudul “Pengaruh Intermittent Fasting terhadap Mikrobiota pada Mencit putih Balb/C Jantan”. Sholawat serta salam penulis sampaikan kepada Nabi Muhammad SAW, keluarga dan sahabat, serta pengikutnya hingga akhir zaman. Tersusunnya karya tulis ilmiah ini tidaklah lepas dari bantuan berbagai pihak dan penulis ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Ibunda Sri Warsiyah dan Ayahanda Budi selaku orang tua, serta adik-adikku Iqbal izudin al amin dan Gagah Pelangi Puspa Negara yang telah memberikan dukungan secara moril dan selalu memberikan dukungan dan doa terbesar untuk kesuksesan penulis.
2. dr. Linda Rosita, M.Kes, Sp.PK selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia yang telah memberikan penulis kesempatan menempuh studi di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia.
3. dr. Umatul Khoriyah, M.Med.Ed., Ph. D selaku Ketua Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia yang telah memberikan izin untuk melakukan kegiatan penelitian.
4. dr. Irena Agustiningtyas, M. Sc selaku pembimbing yang telah memberikan masukan dan arahan, waktu dan ilmu yang begitu berarti, serta kebaikan yang begitu banyak juga kesabaran untuk selalu membimbing penelitian saya.
5. dr. Ika Fidianingsih, M. Sc selaku penguji yang telah membantu dan memberikan izin untuk melakukan kegiatan penelitian

6. Bapak Afivudine sebagai Staf bagian mikrobiologi Riset Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia serta Bapak Yuli sebagai staf Laboratorium Gizi PAU Univesitas Gadjah Mada yang telah memberikan bantuan dalam menyelesaikan karya tulis ilmiah ini.
7. Teman-teman serta sahabat sejawat, Ratri Dwi Rahmawati, Dinda, Dewi, Apriyana, Ditha, Dhea dan Yanasta Yudo yang sudah sangat banyak memberikan masukan serta mendukung saya dalam menulis.
8. Seluruh pihak yang terlibat dalam penyusunan Karya Tulis Ilmiah ini.

Semoga Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan seluruh pihak yang telah membantu penyusunan Karya Tulis Ilmiah ini. Akhir kata penulis berharap semoga Karya Tulis Ilmiah ini dapat bermanfaat bagi semua pihak dan dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan. Aamiin.

Yogyakarta, Februari 2019

Penulis

Reinike Larasati Fajrin

PENGARUH *INTERMITTENT FASTING* TERHADAP MIKROBIOTA PADA INTESTINAL MENCIT PUTIH Balb/C

Fajrin, R.L.¹, Agustiningtyas, I.², Fidianingsih, I.³

¹Mahasiswa Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Islam

²Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia

³Departemen Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia

larasatif@gmail.com

INTISARI

Latar belakang : Diet yang tidak seimbang dan tidak sehat meningkatkan jumlah mikroba usus pro-inflamasi dan mendorong pertumbuhan patogen. Dengan adanya *intermittent fasting* maka akan terjadi penurunan jumlah mikrobiota akibat asupan diet yang dibatasi, sehingga mikrobiota akan tetap berada dalam kadar yang seimbang. Akibat penurunan mikrobiota usus, maka panen energi oleh bakteri akan menurun sehingga dapat mencegah terjadinya obesitas dan penyakit akibat obesitas.

Tujuan : Penelitian ini bertujuan untuk melihat mikrobiota intestinal mencit Balb/C jantan pada kelompok *intermittent fasting* dan kelompok kontrol.

Metode : Desain penelitian ini menggunakan pendekatan “*posttest only with group design*”. Mencit Balb/C berjumlah 12 ekor dibagi secara acak menjadi dua kelompok. Kelompok AL (*ad libitum*) dan kelompok IF (*Intermittent Fasting*). Feses dari intestinal mencit diencerkan 100X dan dikultur untuk dihitung koloninya.

Hasil : Setelah 56 hari puasa, pada kelompok AL densitas koloni terbanyak diperoleh pada pengenceran 10^{-2} yaitu sebanyak $4,14 \times 10^4$ sedangkan pada IF yaitu sebanyak $3,19 \times 10^4$.

Simpulan : Perlakuan *Intermittent Fasting* menurunkan angka koloni bakteri pada intestinal mencit Balb/C jantan. Penelitian selanjutnya sebaiknya juga melihat jenis koloni bakteri yang tumbuh.

Kata kunci: *Intermittent fasting, ad libitum, Mikrobiota intestinal, colony forming unit.*

EFFECT OF INTERMITTENT FASTING ON THE MICROBIOTA IN INTESTINAL WHITE Balb/C MALE MICE

Fajrin, R.L.¹, Agustiningtyas, I.², Fidianingsih, I.³

¹Mahasiswa Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Islam

²Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia

³Departemen Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia

larasatif@gmail.com

ABSTRACT

Background: An imbalance and un-healthy diet can increase the number of pro-inflammatory intestinal microbes and promotes pathogenic bacterial growth. Intermittent fasting may be able to decrease the total amount of microbiota due to restrictions in food intake, so the intestinal microbiota will remain in balance. As a result of the decrease in intestinal microbiota, the energy harvested by bacteria will decrease so that it can prevent obesity and obesity-related disease.

Objective: The aim of this study is to determine the intestinal microbiota in Balb/C mice between intermittent fasting groups and the control group.

Method: This study was the "post test only with group design". Twelve Balb / C mice were divided randomly into two groups. AL (ad libitum) and IF (Intermittent Fasting) groups. Feces from mice intestinal is diluted 100X and cultured to count the colonies.

Results: After 56 days of fasting, AL group has the highest colony density in 10^{-2} dilution with colony count results is $4,14 \times 10^4$, while the result in IF group is $3,19 \times 10^4$.

Conclusion: Intermittent Fasting can decrease the amount of bacterial colonies in intestinal male Balb/C mice. Next studies should also consider the types of bacterial colonies.

Keywords: Intermittent fasting, *ad libitum*, Intestinal Microbiota, colony forming unit.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1.Latar Belakang

Pada manusia, puasa dilakukan dengan tidak makan atau sedikitnya jumlah kalori makanan dan minuman untuk periode antara 12 jam sampai tiga minggu (Longo & Mattson, 2014). Terdapat tiga jenis puasa yang paling sering dipelajari, yaitu *Caloric Restriction* (CR), *Dietary Restriction* (DR) dan *Alternate-Day Fasting* (ADF). *Caloric Restriction* (CR) adalah pengurangan asupan kalori, biasanya sebesar 20-40% konsumsi *ad libitum* dan tetap mempertahankan asupan gizi yang memadai (Trepanowski *et al.*, 2011). Puasa jenis ini mengurangi morbiditas sejumlah penyakit, seperti penyakit autoimun, aterosklerosis, kardiomiopati kanker, diabetes, penyakit ginjal, penyakit neurodegeneratif, dan penyakit pernafasan. Hal ini dilakukan dengan menginduksi penurunan berat badan, menurunkan kadar trigliserida, kolesterol plasma, tekanan darah, sehingga mencegah atau menunda timbulnya penyakit terkait usia (Pallauf *et al.*, 2013). Selain itu, puasa seperti pada bulan ramadhan dapat menginduksi sistem kekebalan tubuh dan menunjukkan peningkatan fungsi sel T, penurunan inflamasi, dan dapat mempengaruhi reaksi imunologi kekebalan humoral (Khazaei, Bokaeian and Jalili, 2014).

Sistem imun salah satunya dipengaruhi oleh keragaman dan jumlah bakteri intestinal. Peningkatan jumlah bakteri baik misalnya *Lactobacillus* dapat menstimulasi sistem imun tubuh. Namun sebaliknya, peningkatan mikrobiota usus pada obesitas dapat meningkatkan permeabilitas intestinal sehingga menimbulkan peradangan sistemik. Hal ini menyebabkan timbulnya berbagai penyakit lain akibat obesitas. Sebaliknya, diduga puasa dapat mempengaruhi keragaman dan jumlah mikrobiota usus, namun demikian penelitian pada hewan coba masih kontroversial.

Penelitian yang dilakukan oleh Godínez-Victoria *et al.*, (2014), pada tikus dengan perlakuan *intermittent fasting* memiliki bakteri pada usus dan sistemik

yang lebih rendah dan tingkat sel plasma SIgA dan IgA yang lebih tinggi. Pada penelitian (Sonoyama *et al.*, 2009), hamster *syrian* yang hibernasi (dipuaskan) selama 2 minggu memiliki bakteri *Clostridia* (bakteri anaerob intestinal) yang lebih rendah. Namun bakteri baik seperti *Lactobacillus* jumlahnya meningkat pada tikus yang di beri perlakuan CR (Fraumene *et al.*, 2017). Puasa pada tikus selama 28 hari tidak menyebabkan perubahan bakteri pada cecum, meskipun pada binatang lain mengalami perubahan seperti pada ikan, kodok dan burung puyuh (Kohl *et al.*, 2018).

Ketidak seimbangan mikrobiota intestinal dapat menyebabkan berbagai macam penyakit pada gastrointestinal. Banyak faktor yang berperan dalam komposisi mikrobiota di saluran pencernaan, salah satunya adalah diet misalnya lemak jenuh dapat meningkatkan jumlah bakteri usus pro-inflamasi dengan merangsang pembentukan asam empedu taurin-konjugasi yang mendorong pertumbuhan patogen (Priyantoro *et al.*, 2015).

Oleh karena itu, dengan adanya *intermittent fasting* diharapkan akan terjadi penurunan jumlah mikrobiota patogen akibat asupan diet yang dibatasi, sehingga mikrobiota baik akan tetap melimpah dan menurunkan terhadap resiko penyakit akibat bakteri yang bisa menyebabkan penyakit.

1.2. Rumusan masalah

Bedasarkan latar belakang tersebut, didapatkan rumusan masalah sebagai berikut: Apakah ada perbedaan jumlah koloni mikrobiota pada intestinal mencit Balb/C jantan antara kelompok *intermittent fasting* dengan kelompok kontrol?

1.3. Tujuan penelitian

Untuk mengetahui perbedaan jumlah koloni mikrobiota pada intestinal mencit Balb/C jantan antara kelompok *intermittent fasting* dan kelompok kontrol.

1.4.Keaslian Penelitian

Tabel 1. Keaslian Penelitian

NO	Nama Peneliti	Metode	Tujuan	Hasil Penelitian
1.	Puasa Intermiten Meningkatkan jumlah Bakteri dan IgA Intestinal pada tikus yang terinfeksi <i>Salmonella typhimurium</i> (Godínez-Victoria <i>et al.</i> , 2014).	Mencit putih Balb/c berusia 8 minggu dengan jumlah sampel 24 dan dibagi menjadi dua sub grup dengan perlakuan <i>ad libitum</i> dan <i>intermittent fasting</i> . Perlakuan IF selama 12 minggu. Pada hari ke 33, mencit diberi infeksi <i>S. typhimurium</i> . Pada hari ke 7 post infeksi, mencit dikorbankan dan diambil sampel pelet pada kolon dan kemudian dilakukan	Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi efek dari puasa intermiten pada produksi IgA usus setelah infeksi <i>S. typhimurium</i> di duodenum dan pada resistensi terhadap infeksi <i>S. typhimurium</i> subletal pada tikus.	Hitung angka bakteri dalam pelet feses secara signifikan lebih rendah ($P < 0,001$) pada kelompok puasa intermiten dibandingkan kelompok <i>ad libitum</i> . Koloni yang membentuk sel <i>S. typhimurium</i> tidak ditemukan pada pelet.

	perhitungan bakteri dengan metode <i>plate count</i> .
2.	<p>Tanggapan yang unik dari mikrobiota usus pada puasa yang berkepanjangan: studi banding di lima kelas host vertebrata (Kohl <i>et al.</i>, 2018).</p> <p>Peneliti menggunakan sekuens gen 16S rRNA untuk mendokumentasikan perubahan mikrobiomi kolon dan sekum hewan yang mewakili lima kelas vertebrata pada empat titik waktu melalui puasa yang berkepanjangan: nila, kodok, tokek, burung puyuh, dan tikus. Puasa dibagi menjadi <i>early fasting</i>, <i>midle fasting</i> dan <i>late fasting (Prolonged fasting)</i>.</p> <p>Peneliti melakukan analisis komposisi mikrobiota feses tikus muda dan dewasa. 344</p>
	<p>Mengetahui perubahan mikrobiom hewan pada kolon yang diwakili lima kelas vertebrata melalui puasa yang berkepanjangan: nila, kodok, tokek, burung puyuh, dan tikus.</p> <p>Efek CR pada mikrobiota usus tikus dewasa dan tikus muda.</p>
	<p>Keanekaragaman mikroba pada <i>cecum</i> menurun pada ikan dan tidak menunjukkan adanya perubahan pada tikus. Perubahan dalam jumlah mikroba bervariasi di seluruh host. Ikan menunjukkan perubahan yang paling signifikan karena puasa, sementara tokek mempertahankan komunitas stabil selama 28 hari puasa.</p> <p>Secara khusus, <i>Lactobacillus</i> meningkat secara signifikan setelah 8 minggu perlakuan CR</p>

peningkatan tikus yang diberi pakan Lactobacillus dalam rendah lemak berdasarkan mikrobiota feses kondisi ad libitum (AL) atau tikus (Fraumene *et al.*, 2017) CR. Makanan untuk kelompok CR diberikan setiap malam pukul 1 melalui komputer dengan bantuan dispenser makanan otomatis.

dan kelimpahan relatifnya meningkat secara signifikan pada CR dibandingkan AL yang diberi makan setelah 36 minggu dilakukan intervensi diet.

Perbedaan terhadap penelitian peneliti : Tikus Balb/C diberi perlakuan *intermittent fasting*. *Intermittent fasting* dengan metode puasa daud yaitu puasa selang-seling. Masing-masing selama 14 jam dilakukan sampai 56 hari. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melihat angka kuman aerob pada intestinal mencit.

1.5. Manfaat penelitian

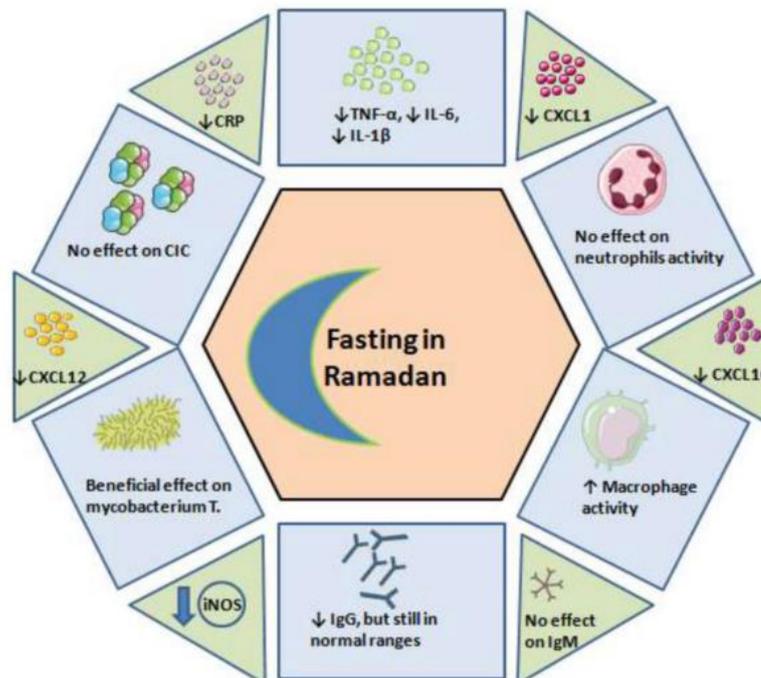
Hasil penelitian ini diharapkan akan menginformasikan bahwa melakukan (ibadah) puasa dapat meningkatkan kesehatan dan menurunkan resiko penyakit akibat diet ditinjau dari jumlah koloni mikrobiota.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Intermittent Fasting*

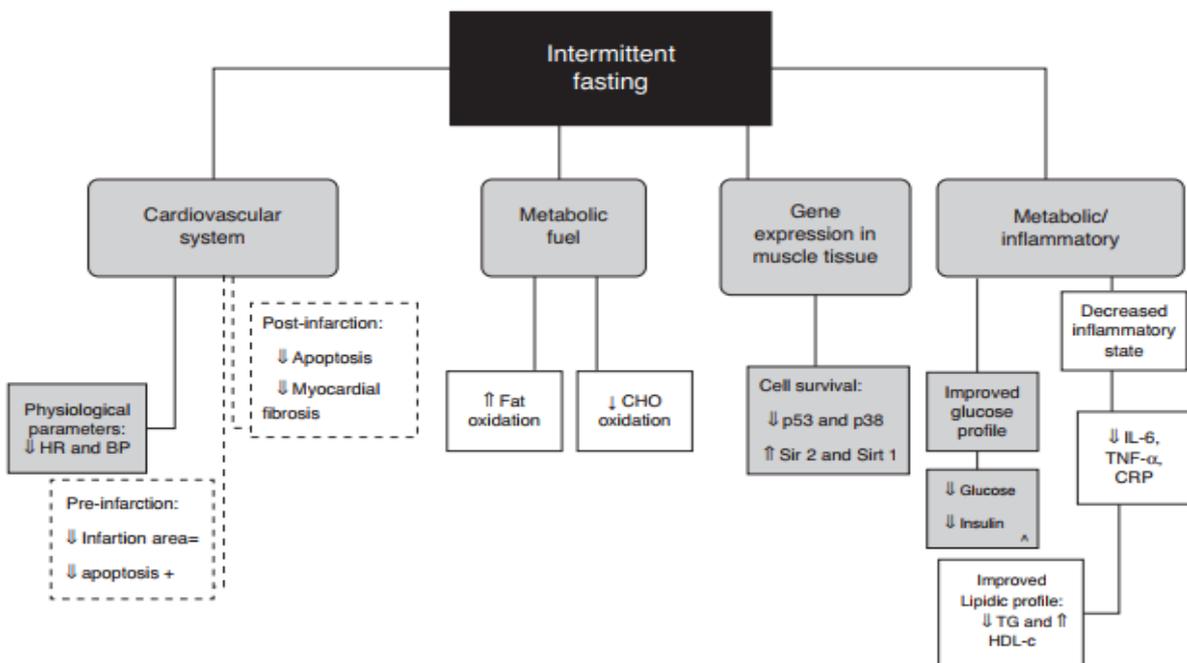
Puasa diartikan sebagai ibadah menahan diri atau berpantang makan, minum, dan segala hal yang membatalkannya, dimulai dari terbit fajar sampai terbenam matahari (Firmansyah, 2015). Sedangkan menurut Julianto and Muhopilah (2015), dalam Islam puasa (*shaum*) berarti menahan diri untuk tidak makan, minum, dan hubungan seksual sejak waktu subuh hingga magrib. Terdapat beberapa manfaat puasa terhadap kekebalan tubuh yaitu seperti pada CIC (*Complex Imune Circulante*); CRP (protein C-reaktif); CXCL (Kemokin) ; iNOS (sintase oksida nitrat) yang dapat diinduksi (Adawi *et al.*, 2017).



Gambar 1. Efek puasa pada sistem kekebalan tubuh (Adawi *et al.*, 2017)

Puasa selang (sehari tidak makan dan sehari bebas makan) disebut juga *intermittent fasting (IF)*; *alternated-day (ADF)*, *fasting every other day (EOD)* dan *dietary restriction (DR)* telah banyak diteliti baik pada hewan maupun manusia. Puasa pada manusia dan hewan adalah berbeda karena beberapa hewan memiliki sifat nokturnal, atau hewan yang mencari makan

dan aktif pada malam hari, sedangkan pada saat siang hewan akan lebih banyak beristirahat. Secara rutin, aktifitas harian dimulai senja hari hingga menjelang fajar (Anggara, Solihin & Manalu, 2015). Mencit merupakan hewan nokturnal. Selama periode tersebut, hewan nokturnal mengeksplorasi sumber pakan dan air, tempat berlindung, serta mengenali pasangan dan individu dari kelompok lain. Puasa pada hewan dilakukan pada saat hewan tersebut biasa melakukan makan dan minum. Beberapa penelitian telah membuktikan manfaat *intermittent fasting* dalam metabolisme yang ditunjukkan Gambar 2 : CHO, karbohidrat; HR, denyut jantung; BP, tekanan darah; TG, trigliserida; HDL-c, kolesterol lipoprotein densitas tinggi; CPR, protein C-reaktif; IL-6, interleukine 6. Kotak abu-abu terverifikasi pada penelitian manusia dan hewan (Reis *et al.*, 2013).



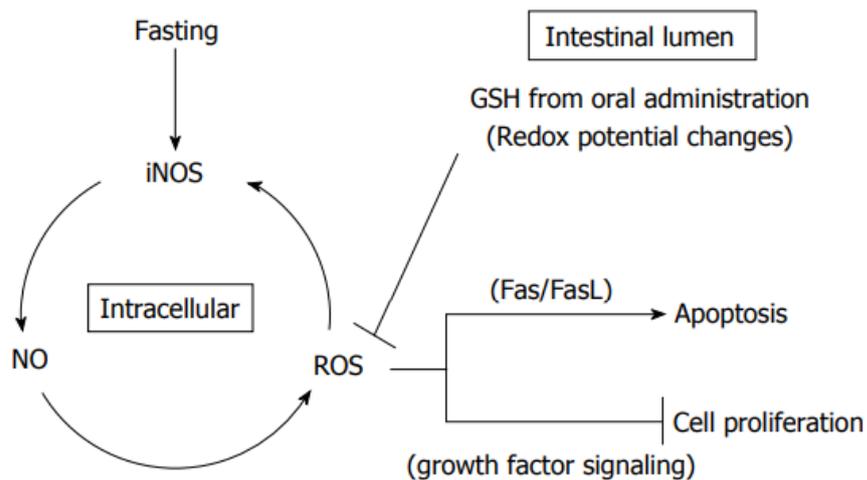
Gambar 2. Intervensi *Intermittent Fasting* (IF) (Reis *et al.*, 2013).

Menurut Campos-Rodríguez *et al.* (2016), manfaat lain dari *intermittent fasting* yang tidak ada pada *caloric restriction* adalah : (1) pemeliharaan berat badan karena mekanisme kompensasi peningkatan asupan kalori pada hari-hari diperbolehkan makan, (2) mengurangi kadar glukosa serum dan insulin, disertai dengan peningkatan resistensi neuron terhadap stres eksitotoksik.

2.2.Intestinal

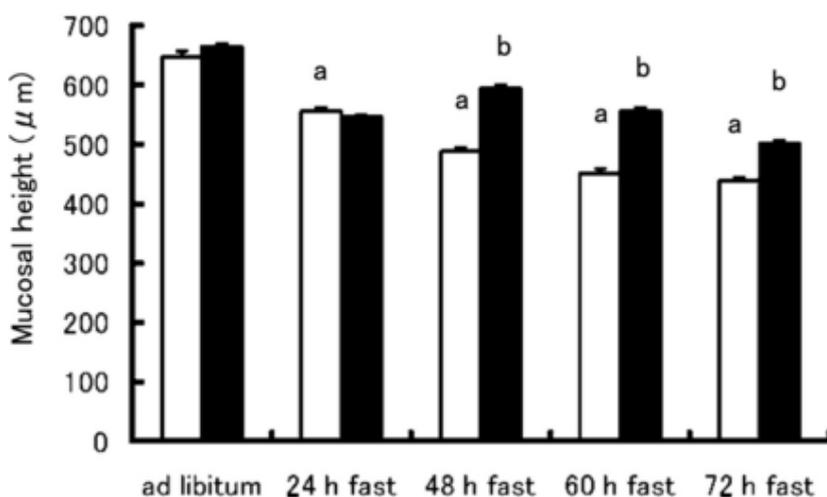
Usus halus merupakan tempat di mana sebagian besar pencernaan dan penyerapan berlangsung. Usus halus terbentang antara lambung dan usus besar yang terdiri atas tiga bagian yaitu, duodenum, jejunum, ileum. Sekresi di dalam usus halus tidak mengandung enzim pencernaan apapun. Kelenjar eksokrin yang berada di dalam lumen usus mensekresikan 1,5 liter larutan cair garam dan mukus yang disebut “sucus enterikus”. Sekresi tersebut akan meningkat dalam kondisi setelah makan. Pada permukaan lumen usus, terdapat tonjolan-tonjolan seperti rambut yang disebut sebagai mikrovilus yang membentuk *brush border*. Di dalam membran *brush border* terdapat enzim-enzim penting terkait pencernaan, seperti enterokinase, disakaridase, dan aminopeptidase (Sherwood, 2014).

Beberapa penelitian menunjukkan pada saat puasa maka akan mengakibatkan atrofi pada mukosa usus. Penelitian yang dilakukan oleh Ito *et al.* (2018), menunjukkan bahwa puasa menginduksi apoptosis yang dimediasi oleh iNOS (*inducible Nitric Oxide Synthase*) dan didukung oleh peningkatan kadar nitrit jaringan. ROS (*Reactive Oxygen Species*) dimediasi IFN- γ dapat menyebabkan apoptosis usus melalui jalur kematian tipe 1.



Gambar 3. Mekanisme atrofi usus.

Pengaturan apoptosis mukosa jejunum pada atrofi intestinal (Gambar 3) yang diinduksi puasa, dimediasi melalui stres oksidatif. Puasa menyebabkan peningkatan produksi NO dan ROS sebagai mediator apoptosis setelah elevasi ekspresi iNOS (Uchida *et al.*, 2017). Intervensi puasa yang diberikan adalah 24, 48, 60 dan 72 jam.

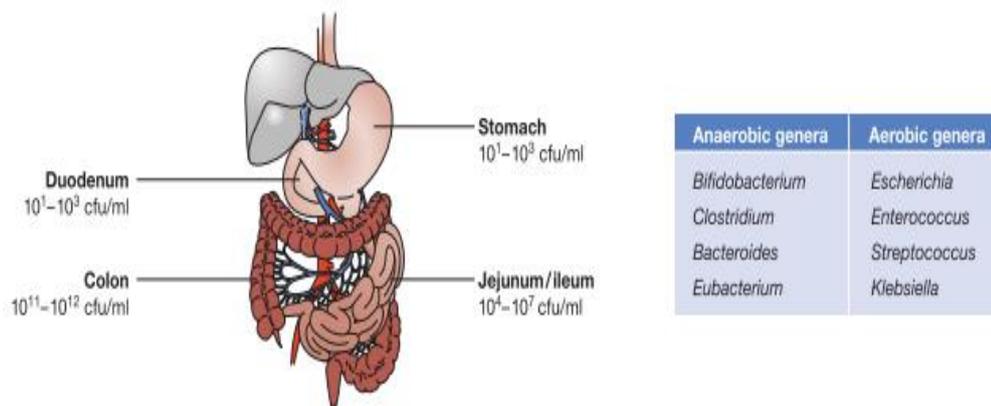


Gambar 4. Perbedaan hasil yang signifikan usus ($P < 0.05$).

2.3. Mikrobiota Intestinal

Di dalam saluran cerna terdapat berbagai macam mikroorganisme termasuk bakteri, *archae*, *eukaryote*, dan virus. Mikroorganisme tersebut juga dapat disebut mikroba atau organisme yang berukuran kecil. Sekumpulan mikroorganisme tersebut disebut sebagai mikrobiota yang masing-masing memiliki peran penting terhadap fisiologi manusia, perkembangan sistem imun, dan pencernaan. Terdapat

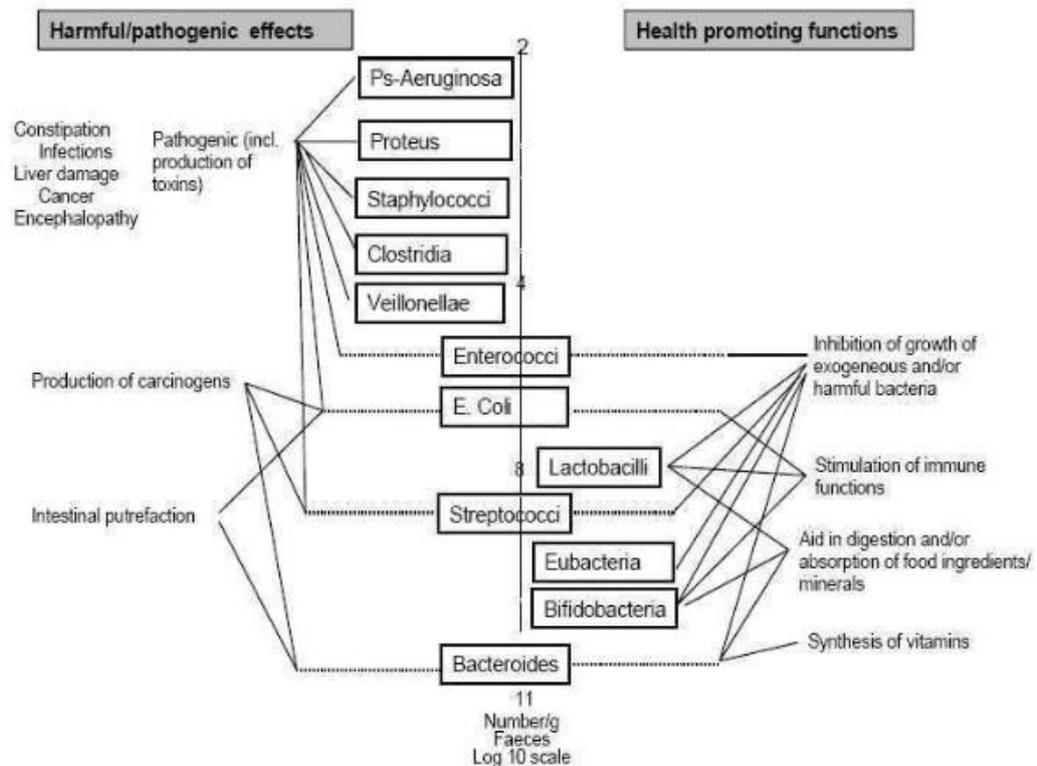
istilah lain lagi yaitu mikrobioma yang merupakan seluruh mikroba yang hidup di tubuh manusia, hewan, tumbuhan, dan sebagainya. Mikrobioma yang berasosiasi dengan manusia disebut mikrobiota namun, penggunaan kata mikrobioma dan mikrobiota sering digunakan bersamaan di beberapa jurnal. Penelitian ini menggunakan istilah mikrobiota untuk koloni mikroba yang ada di intestinal. Beberapa mikrobiota tersebut berperan penting dalam melindungi permukaan saluran pencernaan. Tetapi, beberapa diantaranya adalah patogen potensial yang bisa menjadi sumber infeksi dan sepsis dalam beberapa keadaan (Guarner and Malagelada, 2003). Mikrobiota normal saluran pencernaan didominasi oleh bakteri anaerobik, terdapat kurang lebih 500-1000 spesies mikrobiota yang hanya terdiri dari beberapa phyla bakteri (Priyantoro *et al.*, 2015). Secara keseluruhan kelompok bakteri dominan dalam mikrobiota adalah gram positif *Firmicutes* dan gram negatif *Bacteroidetes* (Singh *et al.*, 2017). Jurnal lain menyebutkan populasi mikrobiota usus didominasi oleh lima filum bakteri yaitu *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* dan satu *Archae*, yaitu *Euryarchaeota*. Sulitnya meneliti mikrobiota usus pada subjek yang sehat menyebabkan belum terdapat definisi mengenai komposisi normal (eubiosis) mikrobiota usus secara pasti.



Gambar 5. Distribusi mikrobiota saluran pencernaan (Hara & Shanahan, 2006).

Pada saluran intestinal bagian atas, terdapat lebih sedikit bakteri dibandingkan dengan usus besar. Penyebab sedikitnya bakteri diakibatkan oleh terdapat sedikitnya asam, empedu dan sekresi pankreas yang membunuh

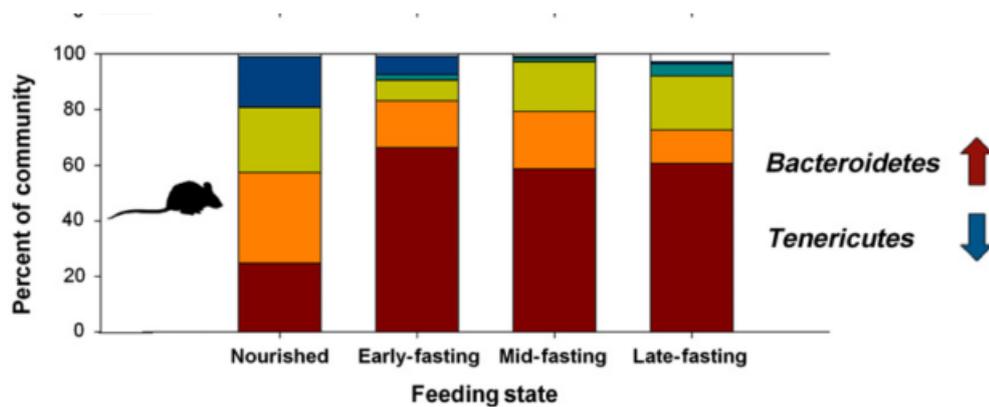
kebanyakan mikroorganisme yang tertelan, dan karena aktivitas motorik fasik yang mendorong ke arah akhir ileum, yang menghambat kolonisasi bakteri yang stabil di dalam lumen. Distribusi mikrobiota saluran pencernaan dapat dilihat pada gambar 5.



Gambar 6. Mikroba saluran pencernaan dan perannya (Azhar, 2009).

Mikroflora di saluran kolon tersebut berupa (1) bakteri menguntungkan (misalnya *Bifidobacteria*, *Lactobacillus*, *Eubacteria*), (2) bakteri yang merugikan (misalnya, *Aeruginosa*, *Clostridia*, *Staphylococci*), (3) bakteri yang mempunyai sifat keduanya *Bacteroides*, *E. Coli*, *Streptococci*, dan *Enterococci* (Azhar, 2009). Keberadaan bakteri menguntungkan di kolon sangat penting dipertahankan karena mempunyai efek diantaranya memperbaiki sistem imun, mempertinggi pencernaan dan penyerapan, mensintesa vitamin, menekan pertumbuhan bakteri patogen, menurunkan kolesterol darah. Terdapat istilah bakteri probiotik, bakteri tersebut merupakan bakteri yang bisa didapat dari luar dan sekarang sudah tersedia dalam bentuk serbuk atau minuman. Bakteri probiotik sangat baik untuk pencernaan karena dapat menekan pertumbuhan bakteri patogen, contoh bakteri probiotik adalah *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbruekii subsp.*

bulgaricus). Mikroflora lainnya adalah *Bifidobacteria* (*B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. longum*, *B. breve* dan *B. infantis*), dan *Streptococcus* (*S. thermophilus*, *S. lactis*), akan tetapi *Bifidobacteria* dan *Streptococcus* dapat berpotensi menjadi patogen juga. Selain itu, terdapat juga prebiotik yang merupakan senyawa yang berasal dari tumbuhan, contohnya adalah inulin yang dapat meningkatkan pertumbuhan bakteri probiotik. Kombinasi antara keduanya adalah sinbiotik.



Gambar 7. Jumlah filum mikroba pada kolon saat puasa berkepanjangan (Kohl *et al.*, 2018).

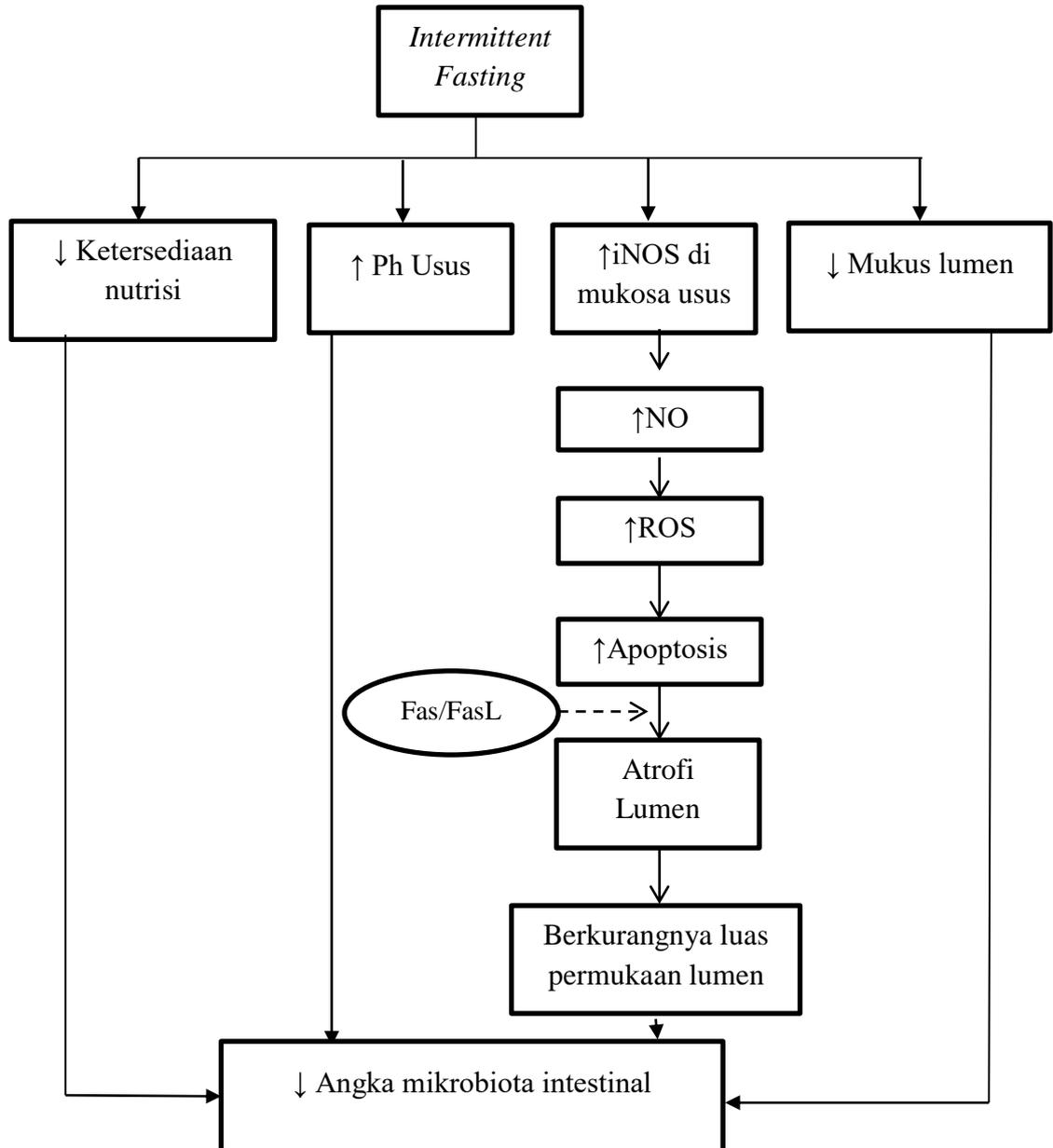
Pada penelitian Kohl *et al.*, (2018), jumlah filum mikroba di kolon pada titik waktu yang berbeda selama puasa yang berkepanjangan (*prolonged fasting* = 28 hari) (Gambar 6) menunjukkan panah berwarna (panah ke atas dan panah ke bawah) merupakan perubahan signifikan mikroba sebagai hasil dari puasa. Menurut Kohl *et al.*, (2018), Perubahan tingkat bakteri terjadi diakibatkan oleh pertama, puasa merupakan 'krisis energi' bagi mikroorganisme karena berkurangnya ketersediaan nutrisi. Kedua, banyak hewan mengurangi ukuran usus mereka sebagai respons terhadap puasa sehingga menghasilkan 'krisis tempat tinggal' untuk mikrobiota. Selain itu, hewan yang dipuasakan menghasilkan lebih sedikit lendir pada lapisan usus dibandingkan dengan hewan yang diberi pakan. Perubahan ini dapat mengubah keragaman mikroba karena beberapa mikroorganisme usus berkembang pada mukus yang dihasilkan di lumen usus. Pada saat berpuasa, pH usus cenderung lebih tinggi dibandingkan saat tidak berpuasa. Terakhir, banyak hewan puasa mengurangi ukuran usus mereka yang

mengakibatkan 'krisis tempat tinggal' untuk mikroorganisme yang akhirnya dapat meningkatnya persaingan untuk mendapatkan tempat tinggal.

Perubahan komposisi dan fungsi metabolisme mikrobiota usus pada individu obesitas dapat memungkinkan "*obese microbiota*" untuk memanen lebih banyak energi dari makanan daripada "*Lean microbiota*" dan dengan demikian mempengaruhi penyerapan energi bersih, pengeluaran, dan penyimpanan (Patterson *et al.*, 2015). Pernyataan yang sama juga diungkapkan oleh Conlon & Bird (2015), pada manusia dan model hewan dengan obesitas, terjadi pergeseran populasi mikroba usus, dengan peningkatan *Firmicutes* dan penurunan *Bacteroidetes*, yang berpotensi menyebabkan adipositas melalui panen energi yang lebih besar. *Firmicutes* merupakan filum yang jenis bakterinya adalah *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Mycoplasma*, dan *clostridium*. Beberapa bakteri tersebut bersifat baik, contohnya adalah *Lactobacillus*, sedangkan yang lain merupakan bakteri patogen dan yang memiliki sifat keduanya. Selain itu, perubahan mikrobiota usus terkait obesitas dapat mengubah permeabilitas dan translokasi bakteri untuk meningkatkan peradangan sistemik, yang merupakan ciri khas obesitas dan penyakit terkait obesitas. Perlakuan EODF (*Every Other Day Fasting*) atau sama seperti IF, menghasilkan pergeseran komposisi mikrobiota usus yang menyebabkan peningkatan produk fermentasi asetat dan laktat dan pada regresi ekspresi monokarboksilat transporter 1 pada sel *beige* (sel imatur pada jaringan lemak putih) (Gavrilova *et al.*, 2017)

2.4. Kerangka Teori

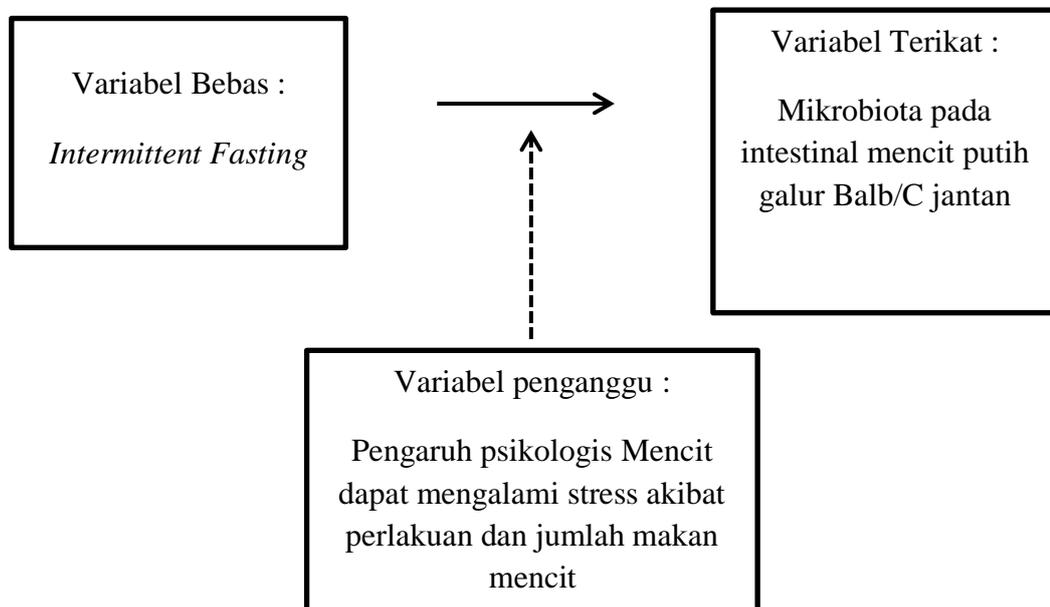
Berdasarkan tinjauan pustaka tersebut didapatkan kerangka teori sebagai berikut:



Gambar 8. Kerangka teori.

2.5. Kerangka Konsep

Berdasarkan tinjauan pustaka dan kerangka teori maka dapat dirumuskan kerangka konsep sebagai berikut:



Gambar 9. Kerangka konsep

2.6. Hipotesis

H0 : Tidak ada perbedaan jumlah koloni mikrobiota pada intestinal mencit Balb/C jantan antara kelompok *intermittent fasting* dengan kelompok kontrol.

H1 : Terdapat penurunan jumlah koloni mikrobiota pada intestinal mencit Balb/C jantan antara kelompok *intermittent fasting* dengan kelompok kontrol.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan penelitian

Penelitian yang digunakan adalah penelitian analitik eksperimental Laboratorium, dengan pendekatan “*posttest only with group design*”.

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium hewan coba Fakultas Kedokteran dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta. Penelitian dimulai dari November 2017 hingga Februari 2018.

3.3. Populasi dan Sampel Penelitian

3.3.1. Sampel penelitian

Pada penelitian ini, sampel yang diambil adalah mencit putih galur Balb/C jantan yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

A. Kriteria inklusi :

- a. Mencit putih galur Balb/C keturunan murni
- b. Jenis kelamin jantan
- c. Umur 8-10 minggu
- d. Berat badan 18-30 gram
- e. Belum pernah digunakan untuk penelitian
- f. Sehat dan tidak cacat (Tidak ada abnormalitas anatomis yang tampak).

B. Kriteria eksklusi :

- a. Sakit (gerakan tidak aktif) selama masa adaptasi 7 hari
- b. Mencit menunjukkan perilaku yang tidak normal (nampak lemah, tidak lincah atau terlihat sakit, nampak agresif) selama penelitian berlangsung
- c. Mati selama perlakuan berlangsung.

3.3.2. Besar Sampel

Rumus berdasarkan Charan & Kantharia (2013), dapat digunakan jika E kurang dari 10 maka menambahkan lebih banyak hewan dan meningkatkan peluang mendapatkan hasil yang lebih signifikan, tetapi jika lebih dari 20 maka

menambahkan lebih banyak hewan tidak akan meningkatkan peluang mendapatkan hasil yang signifikan (terlalu banyak dan terlalu lama untuk diteliti). E dapat diukur dengan rumus berikut: sebanyak ekor, yang terdiri dari 7 ekor kelompok AL, 7 ekor kelompok IF dan 6 ekor.

$E = \text{Total Jumlah Mencit} - \text{Total Jumlah Kelompok}$

$E = 14 - 2$

$E = 12$

12 dibagi 2 kelompok: Tiap kelompok masing-masing 6. Maka sampel minimal yang diperlukan adalah 6.

3.3.3. Pembagian Kelompok

Subjek pada penelitian ini dibagi menjadi 2 kelompok secara random dan diberi perlakuan puasa selama 56 hari:

- A. Kelompok AL (kontrol) terdiri dari 6 ekor mencit putih Balb/C normal yang tidak dilakukan restriksi diet atau *intermittent fasting* (diberi makan normal *ad libitum*).
- B. Kelompok IF (perlakuan) terdiri dari 6 ekor mencit putih Balb/C dengan diet *ad libitum* AIN93 yang direstriksi diet dengan cara *intermittent fasting*.

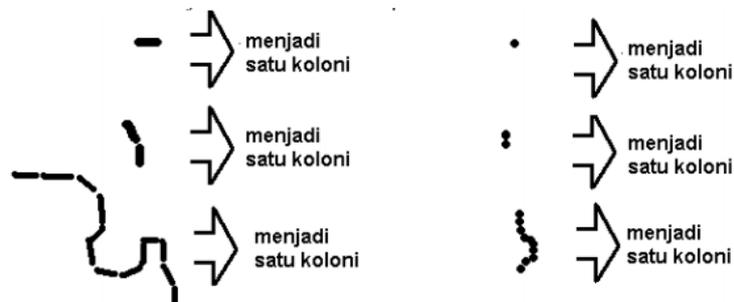
3.4. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

3.4.1. Variabel bebas

- a. Kelompok *intermittent fasting* (IF)/ puasa adalah pembatasan makan selama 14 jam (dari jam 17.00-07.00) pada hari pertama, dan pada hari kedua diberi makan secara *ad libitum* dan selanjutnya diulang secara selang seling selama 56 hari. Pada hari berikutnya diberi makan dan minum secara *ad libitum* dan dilakukan begitu seterusnya secara selang-seling. Skala pengukuran adalah kategorik.
- b. Kelompok kontrol adalah kelompok yang tidak diberi perlakuan intervensi dan diberi pakan AIN93 serta minum secara *ad libitum* selama 56 hari. Skala pengukuran adalah kategorik.

3.4.2. Variable terikat

Angka mikrobiota aerob adalah jumlah koloni per-plate yang dihitung yaitu antara 30 s/d 300 cfu (*colony form unit*). Koloni besar, kecil, menjalar dianggap satu bakteri. Skala pengukuran adalah numerik.



Gambar 10. Koloni besar menjalar dianggap satu koloni

3.4.3. Variabel Pengganggu

Pengaruh psikologis mencit dapat mengalami stress akibat perlakuan, dan keadaan tersebut dapat mempengaruhi hasil penelitian. Dalam penelitian ini, adanya pengaruh psikologis tidak dapat dikendalikan sepenuhnya, namun dilakukan upaya untuk mengurangi kemungkinan terjadinya stress dengan dilakukan adaptasi sebelum percobaan dan pemisahan subjek penelitian dalam kandang yang terpisah. Selain itu, jumlah *intake* makanan yang diberikan secara *ad libitum*.

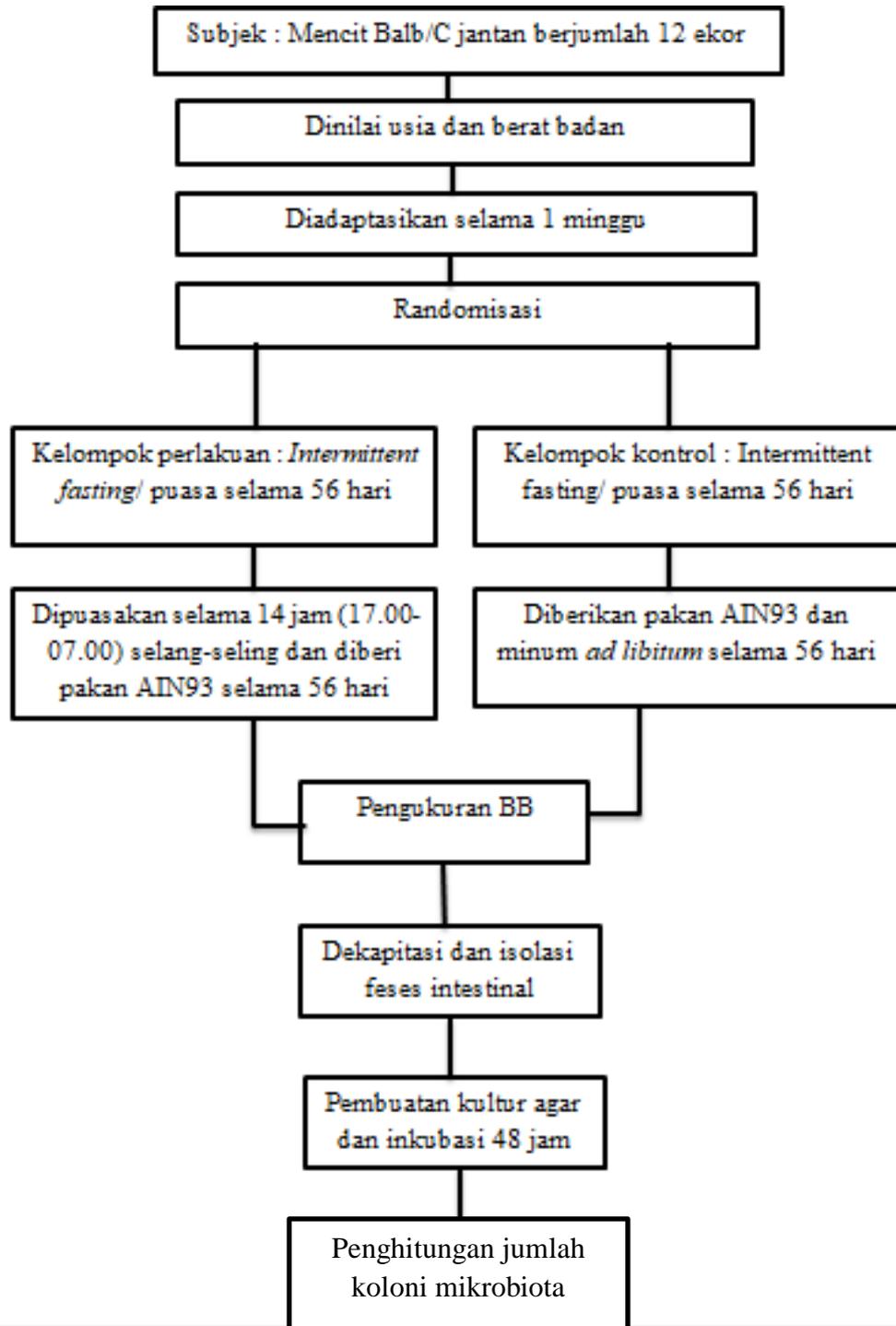
3.5. Alur Penelitian

3.5.1. Pelaksanaan Penelitian

12 ekor mencit dilakukan adaptasi selama satu minggu, kemudian dilakukan randomisasi dan dibagi dalam dua kelompok. Kelompok pertama adalah kelompok IF yang diberi perlakuan *intermittent fasting* selama 56 hari. Kelompok kedua adalah kelompok AL yang dijadikan sebagai kelompok kontrol. Setelah diberi perlakuan selama 56 hari kemudian dilakukan dekapitasi. Mencit diambil organ intestinalnya pada bagian ileum dan dilakukan pemijatan sampai feses keluar dan kemudian ditimbang. Dilakukan pengenceran feses 100 kali dan 1000 kali dan masing-masing hasil pengenceran dibuat kultur pada agar biakan. Setelah melewati masa inkubasi pada suhu 48° C dalam waktu 48 jam, dilakukan perhitungan bakteri menggunakan *colony counter*.

3.5.2. Bagan Alur Penelitian

Secara singkat alur penelitian dapat digambarkan sebagai berikut :



Gambar 11. Alur penelitian

3.6. Analisis Data

- 3.6.1. Untuk melihat perbedaan angka kuman pada mencit putih galur Balb/C jantan antara kelompok, yaitu dengan cara menghitung angka kuman.
- 3.6.2. Untuk meningkatkan validitas data yang didapatkan, peneliti melakukan *blind* pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang akan dihitung rerata angka kuman, sehingga peneliti tidak dapat mengetahui antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.
- 3.6.3. Menghitung koloni mikrobiota menggunakan alat serta *software Colony Counter*. Data yang didapatkan dianalisis secara deskriptif. Peneliti akan mendapatkan data deskriptif (menghitung *mean* dan yang lainnya) menggunakan program komputer SPSS. Hasil hitung pada *colony counter* akan dimasukkan ke dalam rumus analisis TPC (*Total Plate Count*) dengan satuan CFU/ml = Koloni Bakteri yang Tumbuh x Jumlah yang Diambil (ml) x Tingkat Pengenceran (Cappucino dan Sherman, 2011).

3.7. Etika Penelitian

Mengajukan persetujuan kepada Komite Etik penelitian kedokteran dan kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia. Sebelum dilakukan pengambilan organ, tikus dilakukan dekapitasi dipastikan apakah tikus sudah mati dengan memeriksa nadi tikus. Setelah selesai mengambil bagian organ pada tikus, kemudian tikus dikuburkan dengan layak.

3.8. Jadwal Penelitian

Tabel 2. Jadwal penelitian

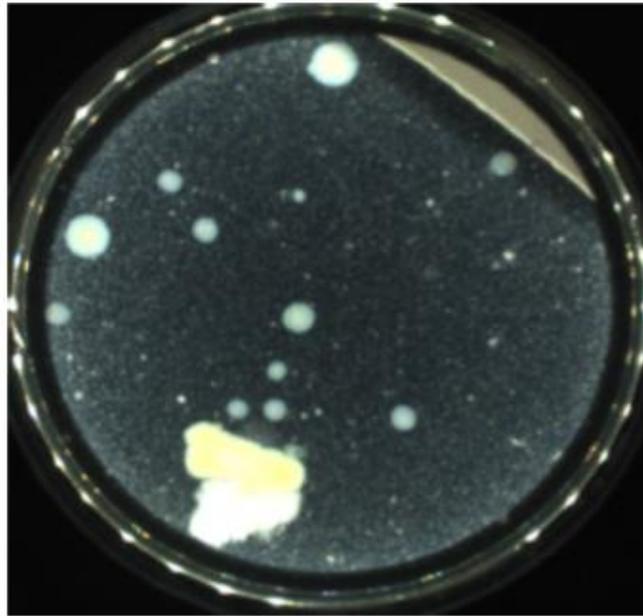
No	Kegiatan	Bulan															
		I				II				III				IV			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1	Pembuatan Proposal	■	■	■	■												
2	Perlakuan					■	■	■	■	■	■	■	■				
3	Pemeriksaan angka kuman aerob													■			
4	Analisis penghitungan angka kuman														■		
5	Penyusunan Laporan															■	■

BAB IV

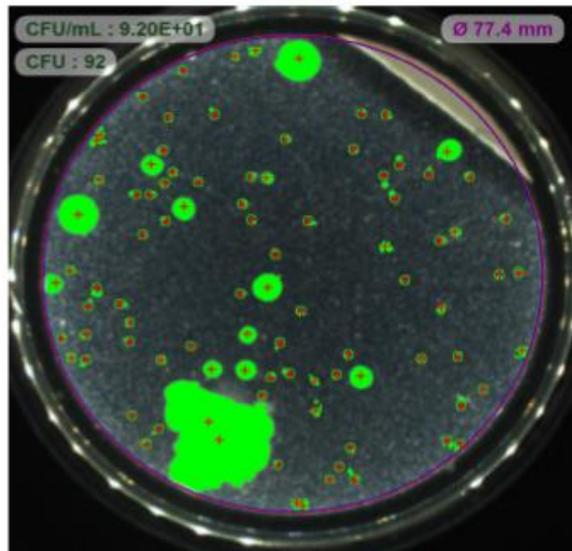
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Penelitian

Penelitian yang dilakukan dengan mengambil jumlah sampel sesuai dengan rumus yang didapatkan. Jumlah dua belas ekor mencit putih Balb/C jantan dibagi menjadi dua kelompok, yaitu kelompok kontrol dan kelompok yang diberi perlakuan puasa selang-seling atau *Intermittent Fasting*. Penelitian ini membandingkan dua kelompok dengan perlakuan berbeda. Setelah dilakukan dekapitasi, dilakukan pembedahan steril pada abdomen mencit kemudian dilakukan pengambilan organ intestinal dan feses dikeluarkan dengan cara mengurut sepanjang intestinal. Feses ditimbang dan dilakukan pengenceran 100 sampai 1000 kali. Feses yang sudah dilakukan pengenceran dimasukkan ke dalam agar PCA pada cawan dan diinkubasikan pada suhu 37° C selama 48 jam. Pada penelitian ini, dilakukan perhitungan pada pengenceran 100 kali saja karena pada dalam cawan pengenceran 1000 kali hasil koloni yang tumbuh tidak begitu jelas dan sulit dihitung. Bila pada tingkat pengenceran yang lebih tinggi didapat jumlah koloni lebih besar dari dua kali jumlah koloni pada pengenceran dibawahnya, maka dipilih tingkat pengenceran terendah. Pada gambar 10 terlihat adanya pertumbuhan koloni berbentuk lingkaran dengan berbagai ukuran besar dan kecil. Satu lingkaran atau bentuk yang terlihat memisahkan diri (tidak menyambung) sudah mewakili satu koloni. Peneliti tidak melakukan pemeriksaan tentang jenis bakteri. Pada agar PCA juga terdapat banyak titik-titik kecil yang tersebar merata, akan tetapi peneliti hanya menghitung koloni yang sudah diberi tanda hijau oleh alat *colony counter*.



Gambar 12. Koloni bakteri yang tumbuh pada cawan.



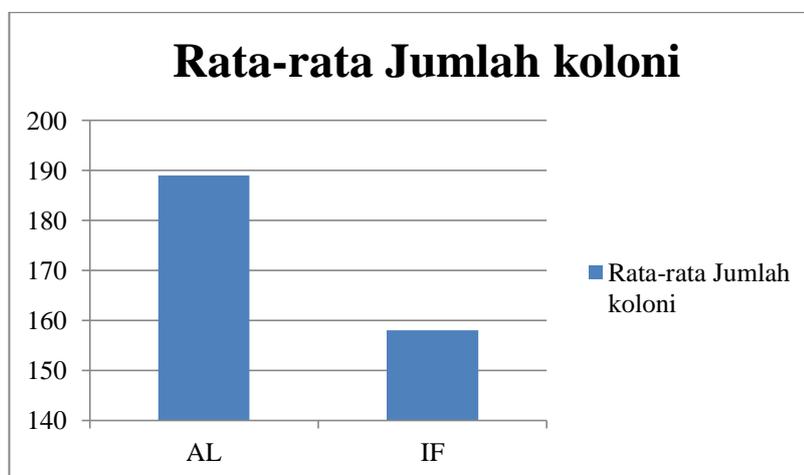
Gambar 13. Menghitung koloni menggunakan aplikasi *Colony Counter*.

Perhitungan koloni dilakukan dengan menggunakan *software Colony Counter* pada cawan agar PCA. Prinsip dari metode hitungan cawan adalah menumbuhkan sel-sel mikroba yang masih hidup pada suatu atau beberapa media sehingga sel tersebut berkembang biak dan membentuk koloni-koloni

yang dapat dilihat langsung dengan mata telanjang tanpa menggunakan mikroskop, dan koloni dapat dihitung menggunakan *colony counter*. Dari hasil uji deskriptif yang dilakukan menggunakan Software SPSS, ditemukan hasil pada tabel 3.

Tabel 3. Analisis Data Statistika Deskriptif.

Analisis Data Statistika Deskriptif	Hasil	
	AL	IF
Mean	188,83	158,33
Median	136,00	175,50
Variasi	23156,567	11917,467
Standar Deviasi	152,173	109,167
Minimum	21	25
Maximum	414	319
Range	393	294



Gambar 14. Hasil yang diperoleh setelah dihitung rata-rata jumlah koloni bakteri pada cawan.

Tiap-tiap plate dari pengenceran berbeda dihitung jumlah koloninya dengan mengalikan pengenceran akan diperoleh angka jumlah kuman bakteri per 1 gram/ 1ml sampel yang diperiksa. Jumlah bakteri yang ada dalam setiap 1 ml sampel adalah berbanding terbalik dengan pengenceran. Jumlah bakteri yang tumbuh selanjutnya dikalkulasikan dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

CFU/ml = Koloni Bakteri yang Tumbuh x Jumlah yang Diambil (ml) x Tingkat Pengenceran (Cappucino dan Sherman, 2011).

Tabel 4. *Total Plate Count* (TPC) atau Angka Lempeng Total (ALT) yang dihitung berdasarkan rumus dengan satuan *Colony Forming Unit* (CFU).

Faktor pengenceran	Feses Mencit	Jumlah angka kuman feses Intestinal mencit putih Balb/C <i>Ad libitum</i> (CFU/gram)	Feses mencit	Jumlah angka kuman feses Intestinal mencit putih Balb/C <i>Intermittent Fasting</i> (CFU/gram)
10^{-2}	AL 1	$4,14 \times 10^4$	IF 1	$2,09 \times 10^4$
10^{-2}	AL 2	$3,34 \times 10^4$	IF 2	$1,65 \times 10^4$
10^{-2}	AL 3	$1,15 \times 10^4$	IF 3	$0,46 \times 10^4$
10^{-2}	AL 4	$0,92 \times 10^4$	IF 4	$1,86 \times 10^4$
10^{-2}	AL 5	$0,21 \times 10^4$	IF 5	$0,25 \times 10^4$
10^{-2}	AL 6	$1,57 \times 10^4$	IF 6	$3,19 \times 10^4$

Penghitungan koloni bakteri dilakukan dengan mengamati semua koloni yang tumbuh pada permukaan media agar yang digunakan pada penelitian. Faktor pengenceran 10^{-2} yang dilakukan pada feses mencit AL 5 dan IF 5 jumlah koloni tiap sampel tidak mencapai batas minimum yang mana batas minimumnya ialah 30 cfu/g, sedangkan pada mencit AL 1, AL 2 dan IF 6 jumlah koloni tiap sampel melebihi ambang batas maksimum standar penghitungan analisis *total plate count*, yang mana batas maksimumnya ialah 300 CFU/g. Berdasarkan hasil pengujian menggunakan metode TPC, pada kelompok AL densitas terbanyak diperoleh pada pengenceran 10^{-2} yaitu sebanyak $4,14 \times 10^4$ sedangkan pada IF yaitu sebanyak $3,19 \times 10^4$. Pada kelompok AL yang memiliki densitas terendah adalah $0,21 \times 10^4$ dan pada IF adalah $0,25 \times 10^4$.

4.2. Pembahasan

Penghitungan koloni bakteri pada *colony counter* bertujuan untuk menghitung jumlah koloni yang di kultur pada agar. Koloni bakteri didapatkan dari hasil kultur feses mencit dengan perlakuan *ad libitum* dan *intermittent fasting*. Setelah dilakukan penghitungan dan hasil diolah menggunakan rumus kemudian

dibuat dalam suatu grafik batang dan terlihat tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara koloni bakteri mencit AL dan mencit IF, akan tetapi AL tetap memiliki angka koloni yang lebih tinggi dibandingkan IF. TPC (*Total Plate Count*) atau ALT (*Angka Lempeng Total*) adalah penghitungan jumlah koloni bakteri pada cawan petri. Semua pekerjaan dilakukan secara aseptik untuk mencegah kontaminasi yang tidak diinginkan. Secara teori, semua sel dalam koloni berasal dari satu bakteri sehingga sekelompok koloni akan identik secara genetik (Sanders, 2012).

Pada penelitian ini, jumlah rata-rata koloni bakteri sampel AL dan IF tidak jauh berbeda. Hasilnya adalah jumlah rata-rata yang lebih besar pada kelompok AL dari pada kelompok IF. Penelitian ini sejalan dengan yang penelitian Kohl *et al.*, (2018), pada *prolonged fasting* 6 jam sehari selama 28 hari, Ikan menunjukkan penurunan bakteri pada *cecum* yang paling signifikan karena puasa, sedangkan pada tikus tidak mengalami perubahan mikrobiota pada *cecum*. Hal ini berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Godínez-Victoria *et al.*, (2014), setelah *intermittent fasting* selama 12 minggu, dilakukan penghitungan dengan metode *plate count* terlihat perbedaan yang sangat menonjol. Jumlah bakteri dalam pelet feses secara signifikan lebih rendah ($P < 0,001$) pada kelompok puasa intermiten dibandingkan kelompok *ad libitum*. Penelitian yang dilakuakn oleh Godínez-Victoria *et al.*, (2014) sejalan dengan Fraumene *et al.* (2017), setelah hewan uji diberi perlakuan CR, terlihat AL memiliki mikrobiota usus yang lebih melimpah dibanding CR.

Perbedaan hasil yang tidak bermakna pada penelitian ini bisa diakibatkan karena lama puasa yang berbeda. Penelitian Godínez-Victoria *et al.*, (2014) memiliki hari puasa yang lebih panjang yaitu 12 minggu yang dilakukan selama 12 jam sehari dan pada penelitian Fraumene *et al.* (2017) memiliki lama perlakuan CR 36 minggu. Hal ini lah yang bisa menyebabkan perubahan mikrobiota intestinal yang lebih menonjol. Selain itu, densitas bakteri sangat dipengaruhi oleh faktor fisik dan kimiawi tempat bakteri tersebut hidup, diantaranya adalah faktor suhu, pH, dan salinitas habitat bakteri (Lizayana *et al.*, 2016). Pemanasan berulang pada agar PCA juga akan mengubah unsur pada agar

PCA sehingga pertumbuhan bakteri dapat terganggu. Meskipun hasil hitung koloni AL dan IF tidak jauh berbeda, IF tetap memiliki angka koloni yang lebih sedikit dibandingkan AL, penelitian ini sesuai dengan penelitian Godínez-Victoria *et al.*, (2014) dan Fraumene *et al.* (2017).

Bakteri pada intestinal sebaiknya tetap harus lebih sedikit agar dapat menurunkan panen energi yang lebih besar sehingga penyakit obesitas dapat dicegah. Bakteri baik harus lebih melimpah dibanding bakteri patogen. Bakteri baik seperti *Lactobacillus* meningkat secara signifikan setelah 8 minggu perlakuan CR dibandingkan dengan perlakuan AL (Fraumene *et al.*, 2017). Telah diketahui bahwa *Lactobacillus* merupakan bakteri baik yang sangat membantu dalam pencernaan makanan terutama vitamin, menghambat pertumbuhan bakteri jahat, menstimulasi sistem imun dan membantu penyerapan mineral di usus. Selain itu, mikrobiota juga didominasi oleh *Fusobacteri* yang diketahui sebagai penghasil butirir. Pada mamalia butirir adalah asam lemak rantai pendek penting yang diproduksi di usus besar. Efek utama butirir pada saluran usus manusia meliputi penyerapan ion, proliferasi sel dan diferensiasi, regulasi kekebalan tubuh, dan merupakan agen antiinflamasi yang penting. Penelitian Godínez-Victoria *et al.*, (2014) juga mendapatkan adanya peningkatan produksi SIgA *intinal* setelah puasa. SigA dapat berfungsi untuk pembersihan bakteri dan secara bersamaan mengurangi translokasi bakteri ke organ sistemik.

Bakteri aerob intestinal yang dapat bersifat patogen adalah *E. coli*. Pada keadaan normal sebenarnya hanya merupakan sebagian kecil dari mikrobiota usus, namun bakteri tersebut juga dapat memproduksi karsinogen. Beberapa bakteri aerob lain seperti *Enterobacteriaceae*, *Viridans streptococci*, *VRE*, dan *C. difficile* memiliki potensi untuk menjadi patogen. *P. aeruginosa* dikenal dapat memproduksi toksin dan membuat kerusakan hepar hingga kanker serta bakteri tersebut tidak memiliki peran pada fisiologis tubuh manusia. Kemampuan bakteri aerob yang dapat masuk ke dalam sistem pembuluh darah yang kaya oksigen dapat memicu terjadinya infeksi karena bakteri. Apabila terdapat penurunan bakteri aerob yang berpotensi sebagai patogen akibat dari perlakuan *intermittent fasting* maka dapat mencegah terjadinya penyakit-penyakit akibat *bakteri* jenis

patogen tersebut dan *intermittent fasting* terbukti dapat menjaga tubuh agar tetap sehat. *intermittent fasting* pada individu obesitas dapat menurunkan asupan lemak jenuh sehingga dapat menurunkan bakteri pro-inflamasi seperti *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Vibrio cholera*, *Escherichia coli* (*E. coli*) dan *Bacteroides fragilis* (Azhar, 2009). Sebaliknya, akibat penurunan bakteri akan menurunkan juga panen energi yang lebih besar dan mencegah terjadinya obesitas

Berdasarkan pembahasan di atas *Intermittent Fasting* terbukti memiliki beragam manfaat jika ditinjau dari mikrobiota intestinal. Oleh karena itu, dengan adanya *intermittent fasting* akan terjadi penurunan jumlah mikrobiota patogen akibat asupan diet yang dibatasi, sehingga mikrobiota baik akan tetap melimpah dan menurunkan resiko penyakit akibat bakteri patogen maupun obesitas.

4.3. Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan dari penelitian ini adalah jumlah sampel yang digunakan hanya 12 ekor tikus sehingga dapat menurunkan validitas hasil. Pemanasan agar PCA yang terlalu lama sehingga dapat menurunkan unsur-unsur penting untuk pertumbuhan mikroorganisme dan mengubah pH pada agar PCA. Keterbatasan peneliti yang terakhir adalah kurangnya variasi lain dalam variabel bebas dan hanya melihat jumlah koloni, tidak pada jenis bakteri yang ada di dalam koloni tersebut. Kemampuan peneliti dalam menghitung koloni menggunakan *software colony counter* juga masih terbatas.

BAB V

SIMPULAN DAN SARAN

5.1. Simpulan

Terdapat penurunan jumlah koloni mikrobiota pada mencit putih Balb/C jantan dengan perlakuan *Intermittent Fasting* setelah dilakukan perhitungan koloni dengan metode TPC.

5.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian di atas dapat dilakukan penelitian lebih lanjut yaitu penelitian dengan menggunakan berbagai tingkat pengenceran hingga pada tingkat pengenceran yang lebih tinggi sehingga didapatkan data yang lebih bervariasi dan meningkatkan validitas. Tingkat ketelitian dan aseptik harus lebih ditekankan agar hasil yang didapatkan sesuai dan menghindari terjadinya bias. Jumlah sampel dan variasi dari sampel disarankan untuk lebih banyak lagi. Identifikasi jenis bakteri sangat perlu dilakukan karena untuk mengetahui jenis bakteri yang paling banyak pada perlakuan *intermittent fasting* adalah patogen atau non patogen sehingga didapatkan kesimpulan yang lebih rinci tentang manfaat yang dihasilkan dari *intermittent fasting*. (Sukmawati. Hardianti, 2018) (Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma, 2016)(Nelce Mailoa, Marthina Tapotubun and Matruty, 2017)

DAFTAR PUSTAKA

- Adawi, M. *et al.* (2017) 'Ramadan fasting exerts immunomodulatory effects: Insights from a systematic review', *Frontiers in Immunology*, 8(NOV). doi: 10.3389/fimmu.2017.01144.
- Andrea, Z. (2015) 'Intermittent Fasting and Human Metabolic Health', *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. Academy of Nutrition and Dietetics, 115(8), pp. 1203–1212. doi: 10.1016/j.jand.2015.02.018.
- Anggara, A. W., Solihin, D. D. and Manalu, W. (2015) 'Ethogram perilaku alami individu tikus sawah (*rattus argentiventer* Robinson and Kloss , 1916) dalam laboratorium ethogram of natural behavior of ricefield rat (*rattus argentiventer* Robinson and Kloss , 1916) in laboratory', 24(02), pp. 95–108.
- Azhar, M. (2009) 'Inulin sebagai prebiotik', *Sainstek*, XII, No. I.
- Campos-Rodríguez, R. *et al.* (2016) 'Intermittent fasting favored the resolution of *Salmonella typhimurium* infection in middle-aged BALB/c mice', *Age*, 38(1), pp. 1–17. doi: 10.1007/s11357-016-9876-3.
- Cappucino JG dan Sherman N. 2011. *Microbiology a Laboratory Manual* Ed.9. San Francisco: Benjamin Cummings.
- Charan, J. and Kantharia, N. (2013) 'How to calculate sample size in animal studies?', *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 4(4), p. 303. doi: 10.4103/0976-500X.119726.
- Conlon, M. A. and Bird, A. R. (2015) 'The Impact of Diet and Lifestyle on Gut Microbiota and Human Health', pp. 17–44. doi: 10.3390/nu7010017.
- Dewar, M. L. *et al.* (2014) 'Influence of Fasting during Moulting on the Faecal Microbiota of Penguins', 9(6). doi: 10.1371/journal.pone.0099996.
- Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma (2016) *Panduan Praktikum Mikrobiologi 2016*.
- Fatimah, S. (2017) 'Pemeriksaan Angka Kuman Pada Daging Ayam Dengan Pemberian Parutan Rimpang Lengkuas Putih (*Alpinia Galanga* Linn Swartz)', 6(1), pp. 1–3.
- Firmansyah, M. A. (2015) 'Pengaruh Puasa Ramadhan pada Beberapa Kondisi Kesehatan', 42(7), pp. 510–515.
- Fraumene, C. *et al.* (2017) 'Caloric restriction promotes rapid expansion and long-lasting increase of *Lactobacillus* in the rat fecal microbiota', 0976(September). doi: 10.1080/19490976.2017.1371894.
- Gavrilova, O. *et al.* (2017) 'Intermittent Fasting Promotes White Adipose Browning and Decreases Obesity by Shaping the Gut Microbiota Intermittent Fasting Promotes White Adipose Browning and Decreases Obesity by Shaping the Gut Microbiota', *Cell Metabolism*. Elsevier Inc., 26(4), p. 672–685.e4. doi: 10.1016/j.cmet.2017.08.019.
- Godínez-Victoria, M. *et al.* (2014) 'Intermittent fasting promotes bacterial clearance and intestinal IgA production in *Salmonella typhimurium*-infected mice', *Scandinavian Journal of Immunology*, 79(5), pp. 315–324. doi: 10.1111/sji.12163.

- Guarner, F. and Malagelada, J. (2003) 'Gut flora in health and disease', *The Lancet*, 360, pp. 512–519.
- Hara, A. M. O. and Shanahan, F. (2006) 'The gut flora as a forgotten organ', 7(7). doi: 10.1038/sj.embor.7400731.
- Ito, J. *et al.* (2018) 'Fasting-induced intestinal apoptosis is mediated by inducible nitric oxide synthase and interferon- γ in rat', pp. 916–926. doi: 10.1152/ajpgi.00429.2009.
- Julianto, V. and Muhopilah, P. (2015) 'Hubungan puasa dan tingkat regulasi kemarahan', *Psymphatic*, 2(1), pp. 32–40.
- Khazaei, H. A., Bokaeian, M. and Jalili, A. (2014) 'The Effect of Fasting on the Immune System of Athletes during Holly Ramadan', *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences Journal homepage: www.zjrms.ir ZJRMS*, 16(6), pp. 44–46.
- Kohl, K. D. *et al.* (2018) 'Unique and Shared responses of the gut microbiota to prolonged fasting: a comparative study across five classes of vertebrate hosts', *Federation of European Microbiological Societies*, 90(January), pp. 883–894. doi: 10.1111/1574-6941.12442.
- Lizayana *et al.* (2016) 'Densitas Bakteri pada Limbah Cair Pasar Tradisional', *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Pendidikan Biologi*, 1(1), pp. 95–106.
- Longo, V. D. and Mattson, M. P. (2014) 'Fasting: Molecular mechanisms and clinical applications', *Cell Metabolism*. doi: 10.1016/j.cmet.2013.12.008.
- Nelce Mailoa, M., Marthina Tapotubun, A. and Matruty, T. E. A. A. (2017) 'Analysis Total Plate Counte (TPC) on Fresh Steak Tuna Applications Edible Coating Caulerpa sp during Stored at Chilling Temperature', *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 89(1). doi: 10.1088/1755-1315/89/1/012014.
- Pallauf, K. *et al.* (2013) 'Nutrition and healthy ageing: Calorie restriction or polyphenol-rich "mediterrAsian" diet?', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013. doi: 10.1155/2013/707421.
- Patterson, R. E. *et al.* (2015) 'Intermittent Fasting and Human Metabolic Health', *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 115(8), pp. 1203–1212. doi: 10.1016/j.jand.2015.02.018.INTERMITTENT.
- Patterson, R. E. and Sears, D. D. (2017) 'Metabolic Effects of Intermittent Fasting'.
- Priyantoro, S. T. *et al.* (2015) 'Peranan Gut Mikrobiota dalam Patogenesis Inflammatory Bowel Disease dan Pendekatan Terapi Probiotik', 42(6), pp. 467–470.
- Quigley, E. M. M. (2013) 'Gut bacteria in health and disease', *Gastroenterology and Hepatology*, 9(9), pp. 560–569. doi: 10.1007/s00244-004-0230-x.
- Reis, F. *et al.* (2013) 'Review article Effects of intermittent fasting on metabolism in men &', *REV ASSOC MED BRAS*, 9(2), pp. 167–173.
- Sanders, E. R. (2012) 'Aseptic Laboratory Techniques: Plating Methods', *Journal of Visualized Experiments*, (63), pp. 1–18. doi: 10.3791/3064.
- Sherwood, L. (2014) *No Title Fisiologi manusia : dari sel ke sistem*. 8th edn. Jakarta: EGC.
- Singh, R. K. *et al.* (2017) 'Influence of diet on the gut microbiome and

- implications for human health', *Journal of Translational Medicine*. BioMed Central, pp. 1–17. doi: 10.1186/s12967-017-1175-y.
- Sonoyama, K. *et al.* (2009) 'Response of gut microbiota to fasting and hibernation in Syrian hamsters', *Applied and Environmental Microbiology*, 75(20), pp. 6451–6456. doi: 10.1128/AEM.00692-09.
- Sudarmono, P. P. *et al.* (2016) 'Mikrobioma : Pemahaman Baru tentang Peran Mikroorganisme dalam Kehidupan Manusia', 4(2). doi: 10.23886/ejki.4.6291.71-5.
- Sukmawati, Hardianti, F. (2018) 'Analisis Total Plate Count (TPC) Mikroba pada Ikan Asin Kakap di Kota Sorong Papua Barat', *Jurnal Biodjati*, 3(1).
- Trepanowski, J. F. *et al.* (2011) 'Impact of caloric and dietary restriction regimens on markers of health and longevity in humans and animals: A summary of available findings', *Nutrition Journal*, 10(1), pp. 1–13. doi: 10.1186/1475-2891-10-107.
- Uchida, H. *et al.* (2017) 'Protective effects of oral glutathione on fasting-induced intestinal atrophy through oxidative stress', 23(36), pp. 6650–6664. doi: 10.3748/wjg.v23.i36.6650.

Lampiran 1. Alat dan Bahan

ALAT-ALAT :

1. Timbangan, kemampuan sampai 300 gram.
2. Labu erlenmeyer yang berskala.
3. Pipet takar 1 cc, 10 cc.
4. Petrie dish Ø 9-10 cm.
5. Lampu spiritus atau lampu gas.
6. Dot karet (bulb/spin).
7. Colony counter.
8. Inkubator 37° C dan 55° C.

MEDIA DAN REAGENSIA

1. Plate Count agar/ *Glucose Yeast Extract Agar*.
2. Quarter Strength Ringer Solotio, air garam, 0,85%.

CARA PEMERIKSAAN

1. Pengenceran sampel

A. Pengenceran sampel padat :

- a. Labu erlenmeyer steril yang berskala ditimbang.
- b. Sampel diambil secara steril, dimasukkan kedalam labu Erlenmeyer steril tersebut, ditimbang sebanyak 10 gram sampel.
- c. Ditambah pelarut sampai 100 cc, kocok baik-baik, pengenceran 10 X
- d. Ambil 1 cc masuk tabung steril yang sudah berisi 9 cc pelarut, kocok baik-baik, pengenceran 100 X
- e. Ambil 1 cc masuk tabung steril yang sudah berisi 9 cc pelarut, kocok baik-baik, pengenceran 100 X
- f. Begitu seterusnya sampai diperoleh pengenceran yang diperlukan

B. Pengenceran cair :

- a. Sampel diambil dengan pipet takar sebanyak 10 cc, masuk labu erlenmeyer steril yang berskala.
- b. Tambahkan pelarut sampai 100 cc, kocok baik-baik, pengenceran 10 X.
- c. Pengenceran seterusnya lihat pada sampel padat.

2. Penuangan media Plate Count agar :

- a. Masing-masing pengenceran sampel diambil 1 cc, dimasukan masing-masing ke dalam *petrie dish* steril yang sudah diberi tanda nol, sampel, pengenceran dan tanggal pelaksanaan pemeriksaan.
- b. Untuk mengetest sterilitas alat, reagensia, ruangan dan cara kerjanya, perlu dibuat *plate control* yaitu *petrie dish* diisi pelarut sebanyak 1 cc.
- c. Kemudian kepada masing-masing *petrie dish* yang sudah berisi sampel dan *plate control* dituangi *Plate Count Agar* suhu 45-50° C sebanyak 15-20 cc.
- d. Diamkan diatas meja sampai agar-agar nya membeku.
- e. Kumpulkan, dibalik, diinkubasi 37° C 48 jam.

3. Perhitungan Koloni :

- a. Idealnya jumlah koloni untuk setiap plate yang boleh untuk dihitung yaitu 30 s/d cfu (*colony form unit*).
- b. Koloni besar, kecil, menjalar dianggap berasal dari satu bakteri.
- c. Perhitungan dapat dilakukan secara manual dengan memberi tanda titik dengan spidol pada *petrie dish* bagi koloni yang sudah dihitung. Dapat pula digunakan *colony counter*.
- d. Tiap-tiap plate dari pengenceran berbeda dihitung jumlah koloninya.
- e. Dengan mengkalikan pengencerannya akan diperoleh angka/jumlah kuman/bakteri per 1 gram/1 cc sampel yang diperiksa.

4. Contoh perhitungan dan pelaporan :

Perhitungan koloni pada plate, misalnya diperoleh angka :

Plate nomor	Pengenceran	Jumlah koloni	Angka kuman/ gram-cc
1	1 X	465	-
2	10 X	271	2700
3	100 X	39	3800
4	1000 X	8	-
Kontrol	1 X	1	-

Pelaporan : Angka kuman / *Total plate count* (TPC) untuk sampel yang diperiksa :

CFU/ml = Koloni Bakteri yang Tumbuh x Jumlah yang Diambil (ml) x Tingkat Pengenceran (Cappucino dan Sherman, 2011).

CATATAN :

1. Untuk menghitung bakteri spora, sampel yang sudah diencerkan 10 X dididihkan 10 menit, kemudian diencerkan dan dikerjakan seperti tersebut di atas.
2. Cara ini dipakai hanya untuk menghitung jumlah bakteri yang hidup saja.
3. Jumlah koloni pada *plate control* digunakan untuk mengurangi jumlah bakteri per gram/cc. Jumlah koloni *plate control* tidak boleh lebih dari 5.

Lampiran 2. Ethical Clearance



UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN
KOMITE ETIK PENELITIAN KEDOKTERAN DAN KESEHATAN

Sekretariat : Jl. Kaliurang Km. 14,5 YOGYAKARTA 55584
Telp. (0274) 898444 ext. 2060 Fax. (0274) 898444 ext. 2007; E-mail : ke.fkuii@yahoo.co.id

Nomor : 48 /Ka.Kom.Et/70/KE/IV/2018

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK

ETHICAL APPROVAL

Komite Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran dan kesehatan, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul :

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Islamic University of Indonesia, with regards of the protection of human rights and welfare in medical and health research, has carefully reviewed the research protocol entitled :

"AKTIVITAS MAKROFAG PERITONEUM, STRES OKSIDATIF, GAMBARAN HISTOLOGI ORGAN, DAN FLORA NORMAL PADA MENCIT BALB-C YANG DIPUASAKAN"

Peneliti Utama : dr. Ika Fidiansih, M.Sc
Principal Investigator

Nama Institusi : Program Studi Pendidikan Dokter FK UII
Name of the Institution

Nomor Amandemen : 01/A/Amandemen/IV/2018
Number of the Amendment

dan telah menyetujui protokol amandemen tersebut diatas.
and approved the above-mentioned amendment protocol.



Yogyakarta, 10 April 2018

Ketua
Chairman

Prof. Dr. Drs. Widyatun Lestariyana, Apt

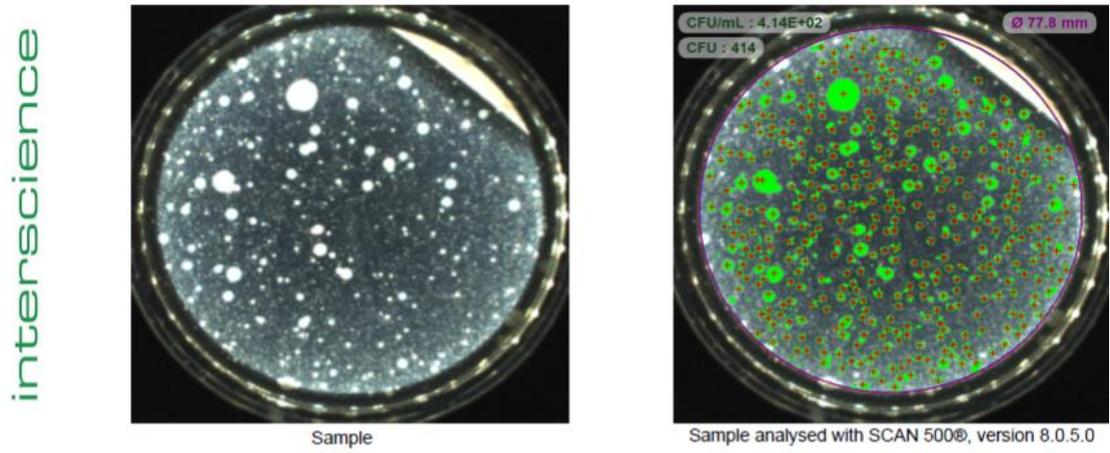
*Ethical Approval berlaku satu tahun dari tanggal persetujuan

**Peneliti berkewajiban

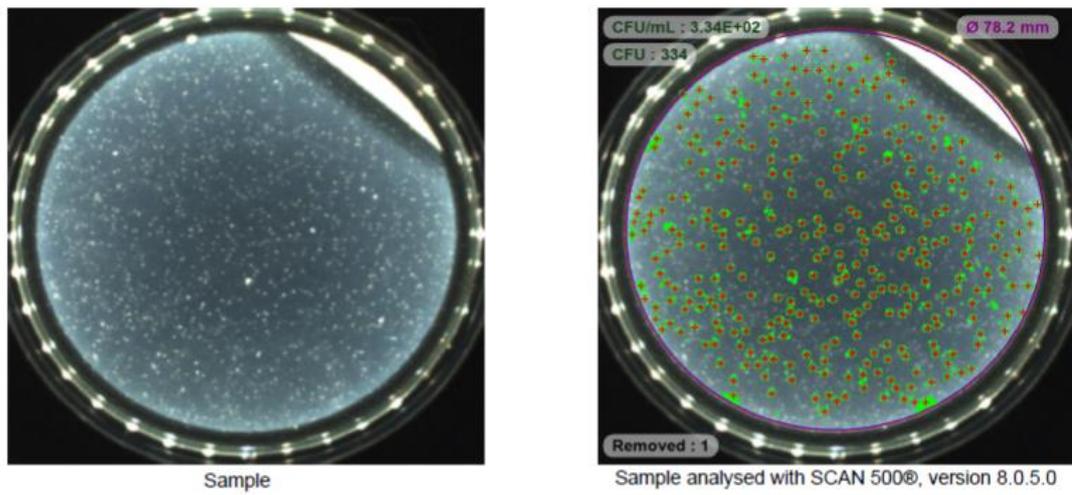
1. Menjaga kerahasiaan identitas subyek penelitian
2. Memberitahukan status penelitian apabila :
 - a. Setelah masa berlakunya keterangan lolos kaji etik, penelitian masih belum selesai, dalam hal ini ethical clearance harus diperpanjang
 - b. Penelitian berhenti di tangan jalan
3. Melaporkan kejadian serius yang tidak diinginkan (serious adverse events)
4. Peneliti tidak boleh melakukan tindakan apapun pada subyek sebelum penelitian lolos kaji etik dan informed consent

Lampiran 3. Colony Forming Unit

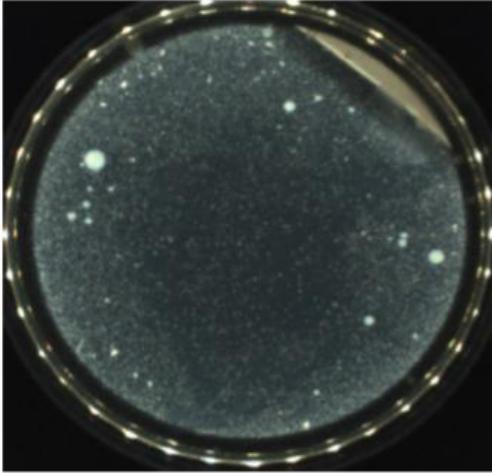
AL-1



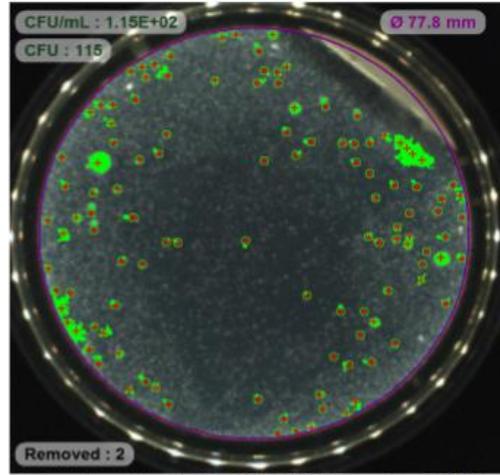
AL-2



AL-3

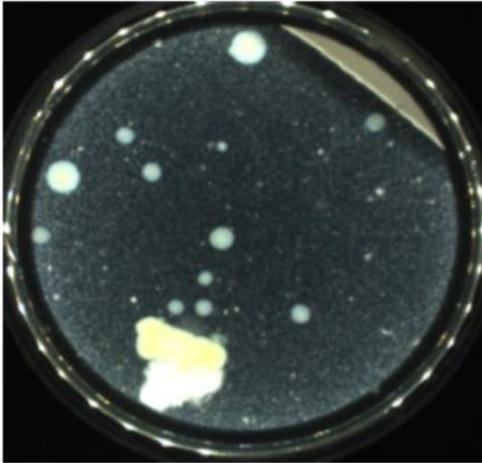


Sample

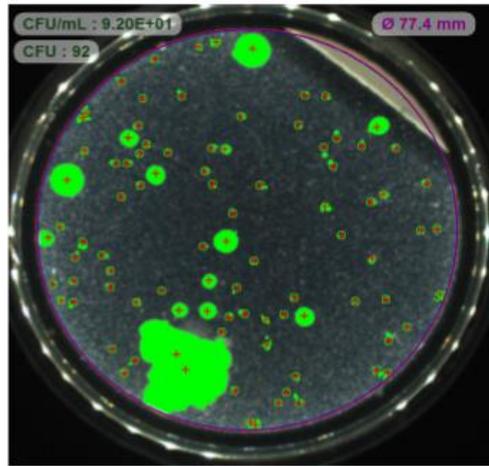


Sample analysed with SCAN 500®, version 8.0.5.0

AL-4

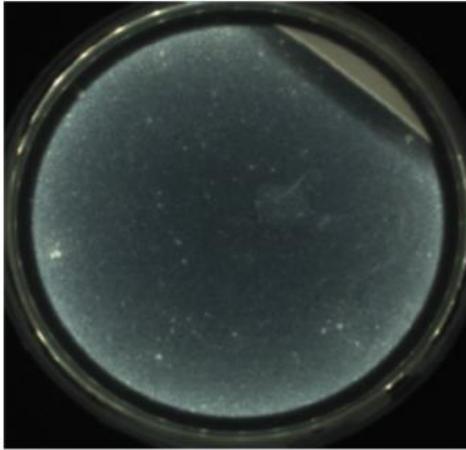


Sample

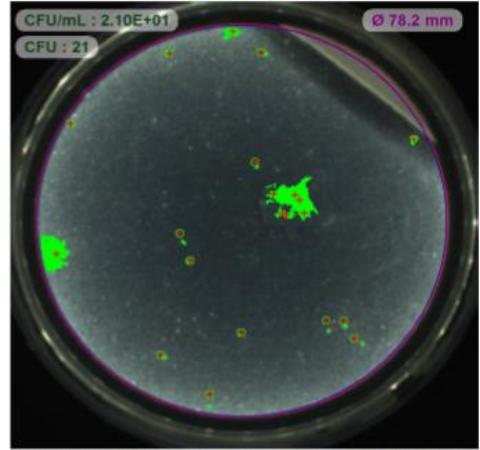


Sample analysed with SCAN 500®, version 8.0.5.0

AL-5

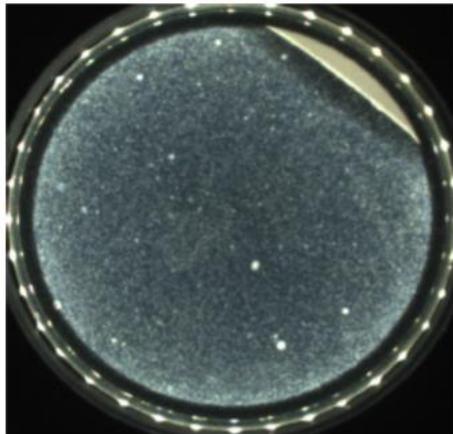


Sample

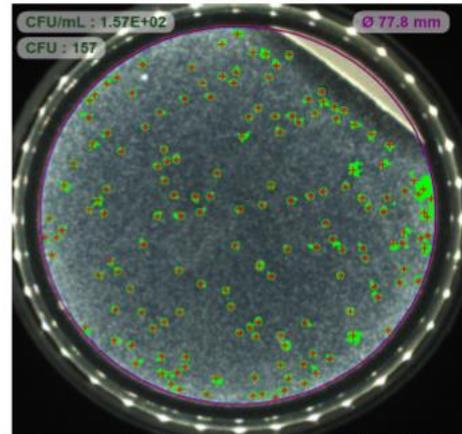


Sample analysed with SCAN 5000, version 8.0.5.0

AL-6

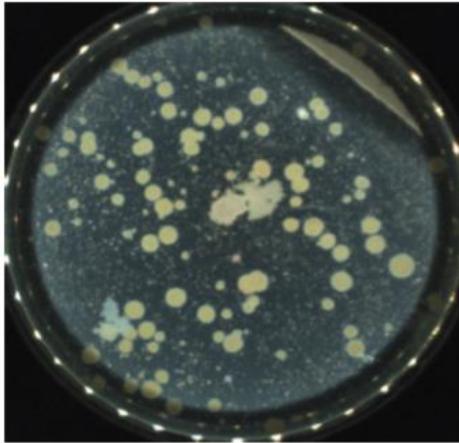


Sample

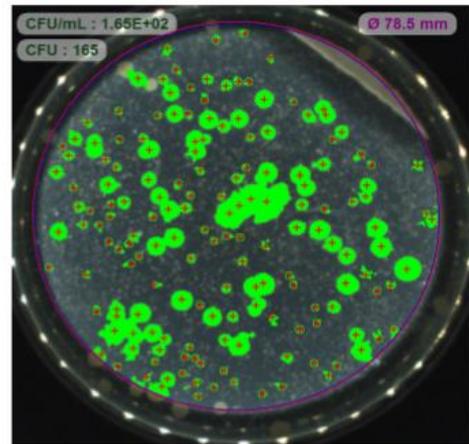


Sample analysed with SCAN 5000, version 8.0.5.0

IF-1

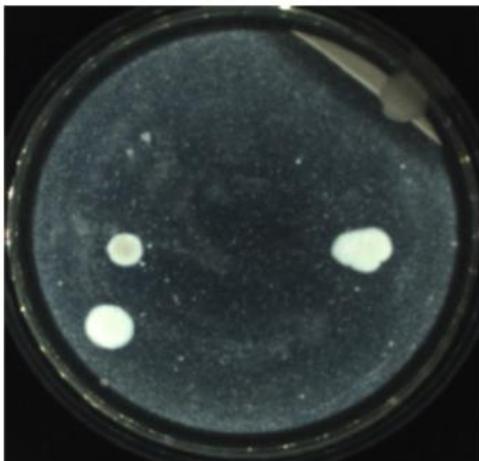


Sample

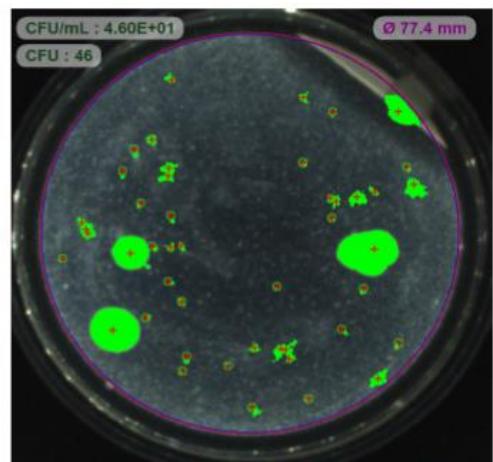


Sample analysed with SCAN 500®, version 8.0.5.0

IF- 2

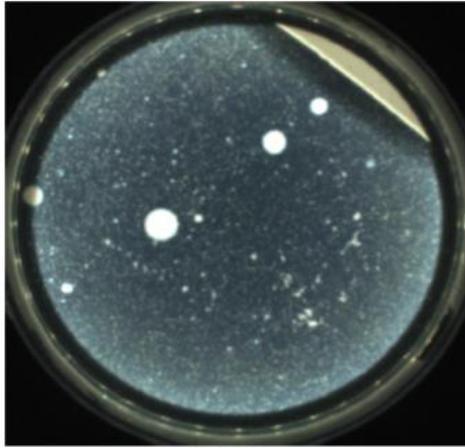


Sample

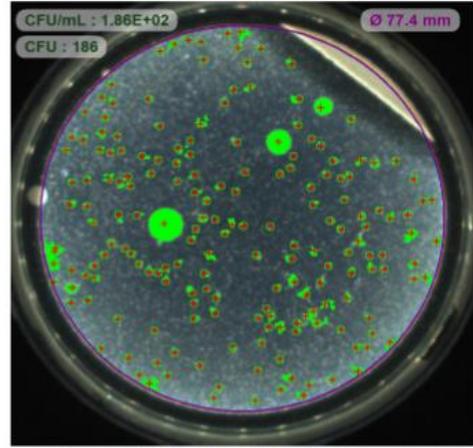


Sample analysed with SCAN 500®, version 8.0.5.0

IF-3

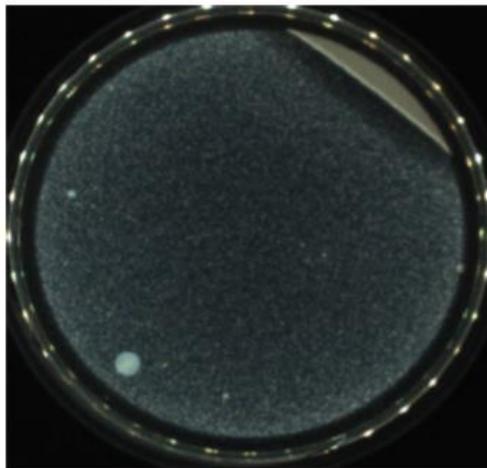


Sample

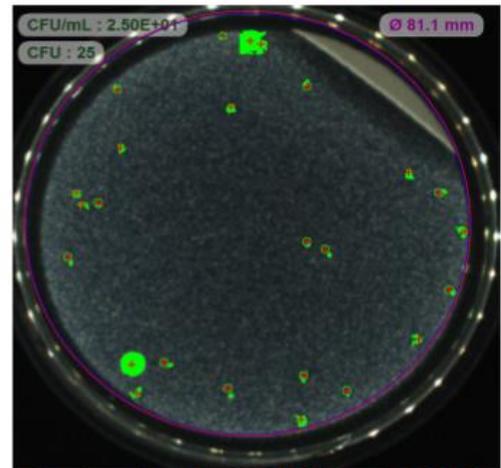


Sample analysed with SCAN 500®, version 8.0.5.0

IF-4

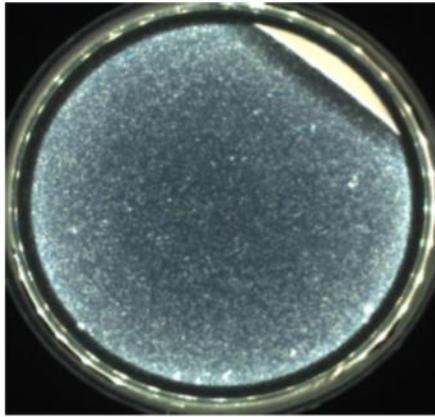


Sample

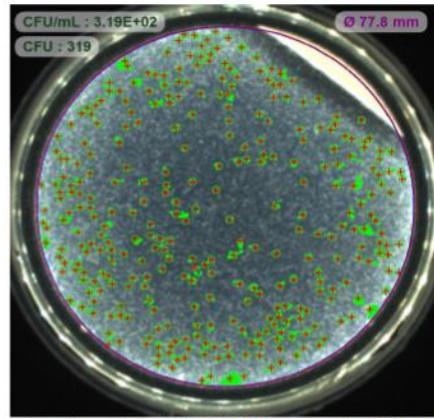


Sample analysed with SCAN 500®, version 8.0.5.0

IF- 5

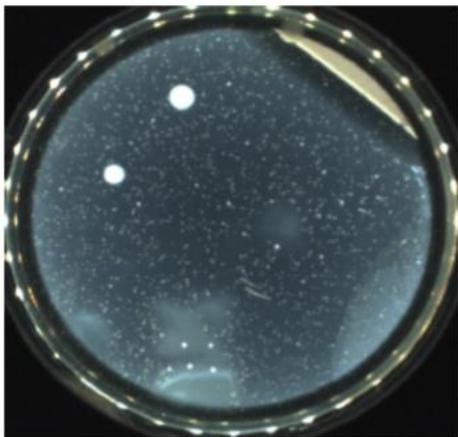


Sample

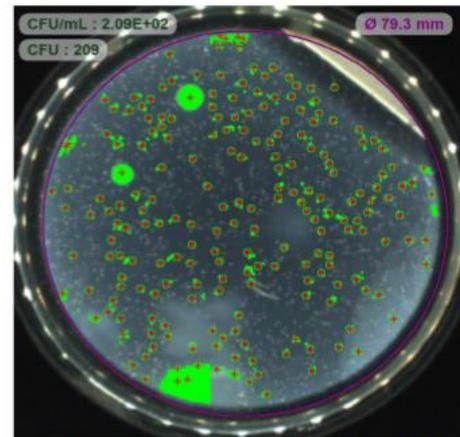


Sample analysed with SCAN 500®, version 8.0.5.0

IF- 6



Sample



Sample analysed with SCAN 500®, version 8.0.5.0

