

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Asma adalah penyakit inflamasi yang ditandai dengan hiperreaktivitas saluran pernafasan, bronkokonstriksi, dan hipersekresi mukus (Mukhopadhyay, *et al.*, 2006). Inflamasi yang diakibatkan oleh asma pada saluran pernafasan dapat mengaktifasi munculnya sitokin dan mediator inflamasi sehingga menghambat masuknya udara ke dalam tubuh dan menyebabkan gangguan pernafasan (Mitchell, *et al.*, 2010). Penyakit asma merupakan penyebab kematian ke-7 di Indonesia. Prevalensi penderita penyakit asma di Indonesia dari seluruh penduduk mengalami peningkatan, yaitu yang semula 4,2% menjadi 5,4% (Sundaru, 2006). Jumlah penderita asma di seluruh dunia berjumlah sekitar 300 juta orang dengan angka kematian sebesar 250.000 setiap tahun dan diperkirakan akan meningkat menjadi 400 juta orang pada tahun 2025 (Moorman, *et al.*, 2007; Amanda, 2012).

Penyakit asma juga merupakan penyakit umum yang menyerang pada hewan peliharaan di seluruh dunia, seperti kucing dan anjing. Penyakit asma ini dapat menyerang kucing di segala umur. Asma pada kucing biasa disebut dengan bronkhitis kronis, asma bronkhial, atau alergi bronkhitis (Little, 2003). Prevalensi kejadian penyakit asma ditemukan sebanyak 1% dari populasi kucing dewasa. Anjing dengan ras *Pomeranian* dan *Toy Poodle* dengan umur >8 tahun menurut Padrid (2010) merupakan hewan peliharaan yang sering mengalami penyakit asma. Gejala umum yang paling sering muncul pada kucing dan anjing yang menderita asma adalah batuk dan bersin. Selain gejala batuk dan bersin, penyakit asma pada hewan juga diikuti dengan peradangan dalam jangka waktu yang lama.

Asma juga diketahui ditemukan pada hewan besar selain pada hewan peliharaan, namun informasi masalah terkait belum banyak beredar.

Penyakit asma yang terjadi pada hewan peliharaan dapat dikaitkan dengan beberapa gangguan rongga mulut, salah satunya adalah *gingivitis* akibat penumpukan plak pada gigi. Penumpukan plak sisa makanan ini mengandung banyak bakteri anaerob Gram-negatif, seperti *Porphyromonas gingivalis*. Plak sisa makanan yang tidak rutin dibersihkan akan menyebabkan infeksi bakteri pada rongga mulut dan dapat masuk melalui pembuluh darah menuju organ saluran pernafasan. Lipopolisakarida bakteri *Porphyromonas gingivalis* merupakan endotoksin yang dapat menyebabkan gangguan saluran pernafasan dan memperparah kejadian asma pada hewan peliharaan (Nitawati, *et al.*, 2014; Darveau, *et al.*, 2002).

Lipopolisakarida bakteri *Porphyromonas gingivalis* yang terhirup atau masuk ke dalam tubuh mampu mengaktifasi sel inflamatori di dalam saluran pernafasan, seperti leukosit, makrofag, dan sel mast. Sel inflamatori tersebut dapat memproduksi sitokin proinflamatori, seperti *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α). Sitokin proinflamatori ini dapat menstimulasi munculnya histamin dan protease. Protease yang memiliki aktivitas proteolitik dapat mengubah profil protein yang dapat dilihat dengan teknik elektroforesis dan merusak sel epitel bronkiolus (Sunetha, *et al.*, 2011).

Pengobatan penyakit asma pada saat ini banyak menggunakan obat kimiawi. Namun, obat kimiawi memiliki banyak efek samping yang dapat merugikan penderita jika digunakan secara terus-menerus (Anonim, 2009). Efek samping yang terlalu banyak disebabkan oleh obat kimiawi dapat dikurangi dengan

penggunaan terapi obat herbal berdasarkan kandungan bioaktifnya. Salah satu tanaman yang dapat digunakan untuk obat herbal, adalah putri malu (*Mimosa pudica* Linn.). Ekstrak daun putri malu menurut Kumar, *et al.* (2012) dapat digunakan untuk terapi beberapa penyakit karena kandungan zat antioksidannya, yaitu flavonoid. Flavonoid sebagai antioksidan akan menangkap radikal bebas sehingga dapat mencegah suatu penyakit menjadi lebih parah dengan cara menyumbangkan satu atau lebih elektron pada radikal bebas. Flavonoid sebagai terapi asma belum banyak dipelajari. Berdasarkan penjelasan di atas, penelitian ini mempelajari terapi asma berdasarkan aktivitas antioksidan dari ekstrak air daun putri malu yang ditunjukkan dengan ekspresi *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α) pada organ paru-paru dan profil pita protein serum tikus (*Rattus norvegicus*) hewan model asma.

1.2 Rumusan Masalah

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

- 1) Apakah terdapat penurunan ekspresi *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α) organ paru-paru pada hewan tikus (*Rattus norvegicus*) model asma yang mendapat terapi ekstrak air daun putri malu (*Mimosa pudica* Linn.)?
- 2) Apakah terdapat perbedaan profil pita protein serum hewan tikus (*Rattus norvegicus*) model asma yang mendapat terapi ekstrak air daun putri malu (*Mimosa pudica* Linn.)?

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini adalah:

- 1) Tikus (*Rattus norvegicus*) betina strain Wistar diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan percobaan (UPHP) UGM Yogyakarta dengan umur 8-12 minggu dan berat badan antara 150-250 gram. Penggunaan hewan coba dalam penelitian ini telah memperoleh sertifikat laik etik oleh Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya dengan No. 208-KEP-UB (Lampiran 1).
- 2) Pembuatan hewan model tikus asma menggunakan *ovalbumin* (OVA) dengan dosis 1 mg/ml yang diberikan dengan cara injeksi intraperitoneal dan inhalasi serta induksi lipopolisakarida (LPS) PG LPS 1435/1450 (*Astarte Biologics*) yang didapatkan dari bakteri *Porphyromonas gingivalis* secara intrasulkular dengan dosis 1 µg/ml (Utomo, 2012).
- 3) Tanaman putri malu (*Mimosa pudica* Linn.) yang telah dibuat ekstrak air berasal dari lapangan FISIP Universitas Brawijaya dengan dosis 500 mg dan 1000 mg diberikan selama 14 hari sebagai terapi asma dan telah dilakukan pengujian identifikasi taksonomi tanaman di Laboratorium Taksonomi, Struktur dan Perkembangan Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya (Lampiran 2).
- 4) Variabel yang diamati yakni ekspresi TNF- α organ paru-paru dengan metode imunohistokimia (IHK) dan dihitung menggunakan *software Axiovision*, serta profil pita protein serum tikus (*Rattus norvegicus*) dengan SDS-PAGE.

1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka tujuan dari penelitian ini adalah:

- 1) Untuk mengetahui penurunan ekspresi *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α) organ paru-paru pada hewan tikus (*Rattus norvegicus*) model asma yang mendapat terapi ekstrak air daun putri malu (*Mimosa pudica* Linn.)
- 2) Untuk mengetahui perbedaan profil pita protein serum hewan tikus (*Rattus norvegicus*) model asma yang mendapat terapi ekstrak air daun putri malu (*Mimosa pudica* Linn.)

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk mengetahui tingkat kesembuhan asma berdasarkan ekspresi TNF- α organ paru-paru dan perbedaan profil pita protein pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) asma mendapat terapi ekstrak air daun putri malu (*Mimosa pudica* Linn.) serta sebagai sumber informasi pemanfaatan bahan herbal untuk terapi asma.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

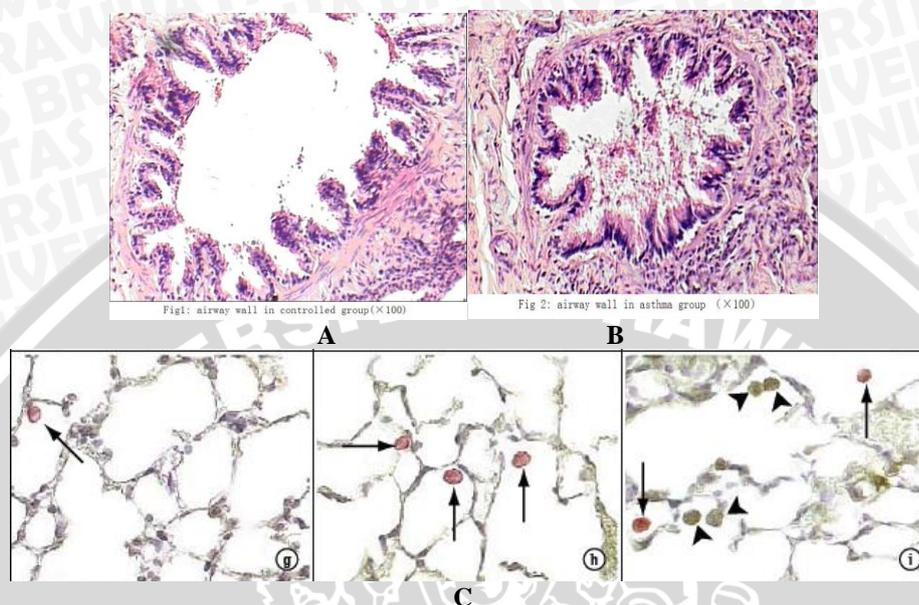
2.1 Asma

Asma adalah suatu penyakit inflamasi saluran pernafasan kronis yang ditandai dengan perubahan struktur saluran pernafasan dan adanya infiltrasi eosinofil, makrofag, sel mast, limfosit T, dan sitokin (Wu, S.M., *et al.*, 2012). Perubahan struktur saluran pernafasan dan inflamasi kronik dapat ditimbulkan oleh paparan kronik alergen. Inflamasi kronik pada penyakit asma dapat meningkatkan hiperresponsivitas dan hiperreaktivitas bronkus (Barlianto, dkk., 2009).

Hiperresponsivitas bronkus yang diakibatkan oleh respon inflamasi asma memiliki ciri khas, yaitu infiltrasi sel eosinofil dan limfosit T disertai dengan pelepasan epitel bronkus. Sel mast banyak ditemui pada saluran pernafasan, terutama pada epitel bronkus dan dinding alveolus. Sel mast memproduksi beberapa mediator inflamasi, antara lain histamin, leukotrien, dan sitokin (IL-4, IL-5) (Busse & Lemanske, 2001).

Alergen yang masuk ke dalam lumen saluran pernafasan akan difagositosis oleh makrofag yang diaktivasi IgE. Makrofag akan mengeluarkan mediator inflamasi seperti prostaglandin, *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α), *Interleukin-1* (IL-1), dan *Reactive Oxygen Species* (ROS). Mediator dan sel-sel inflamatori yang teraktivasi akan berkumpul dan menyumbat saluran pernafasan. Infiltrasi sel eosinofil yang melepaskan *basic protein* akan menyebabkan kerusakan epitel saluran pernafasan dan edema

mukosa saluran pernafasan seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.1 (Meiyanti & Mulia, 2000).



Gambar 2.1 Gambaran histologi bronkiolus normal (A); Gambaran histopatologi asma pada bronkiolus (B); Gambaran imunohistokimia TNF- α pada makrofag alveolar organ paru-paru (C) (sumber: Wu, *et al.*, 2012)

2.2 Penyakit Asma pada Hewan

Penyakit saluran pernafasan bawah sangat umum menyerang hewan peliharaan, terutama kucing, salah satunya adalah asma. Kucing dengan ras *Siamese* dan hewan berjenis kelamin betina lebih sering terkena asma. Asma pada kucing ditandai dengan bronkokonstriksi reversibel dan inflamasi saluran pernafasan eosinofilik (Reinero, 2011). Asma pada hewan tidak pernah menunjukkan gejala patognomonis dan tidak ada cara diagnosa yang khusus untuk penyakit ini. Namun, gejala klinis umum yang ditunjukkan ketika hewan asma, antara lain bersin, batuk, dan sesak nafas (Padrid, 2009).

Asma pada hewan sering terjadi karena reaksi imun terhadap alergen atau zat kimia tertentu, serta perubahan struktur cabang trakeo-bronkial (Bay

&Johnson, 2004). Penanganan untuk hewan yang terkena asma, antara lain mengurangi inflamasi saluran pernafasan, mengurangi hiperreaktivitas dan bronkokonstriksi, memperbaiki saluran pernafasan, dan menghilangkan penyebab penyakit asma. Obat yang biasa digunakan oleh hewan dengan penyakit asma adalah glukokortikoid untuk mengurangi inflamasi saluran pernafasan dan bronkodilator untuk mengurangi bronkokonstriksi dan membuka saluran pernafasan (Byers & Dhupa, 2005).

2.3 Ovalbumin dan Lipopolisakarida

Ovalbumin (OVA) yang berasal dari telur ayam sering digunakan untuk induksi kuat pada inflamasi alergi pulmonari hewan coba (Kumar, *et al.*, 2008). Ovalbumin adalah molekul monomer, fosfoglikoprotein globular dengan berat molekul 44,5 kDa, memiliki titik isoelektrik 4,5, tersusun dari 385 asam amino, dan bersifat hidrofobik. Ovalbumin terdiri dari 3,5% karbohidrat dan dapat terdenaturasi oleh paparan suhu panas (Alleoni, 2006). Ovalbumin yang masuk ke dalam saluran pernafasan akan berikatan dengan sel dendritik dan makrofag alveolar. Ikatan antara alergen tersebut akan dipresentasikan kepada sel B dan sel T kemudian meningkatkan respon IgE sehingga terjadi inflamasi (Carol & Yao, 2011).

Lipopolisakarida (LPS) merupakan salah satu bagian penyusun dinding sel bakteri Gram negatif, salah satunya adalah bakteri *Porphyromonas gingivalis*. Lipopolisakarida memiliki berat molekul >100.000 Dalton. Lipopolisakarida dibagi menjadi tiga bagian penting, yaitu (1) lipid A yang terdiri dari gugusan oligosakarida kasar; (2) rantai sisi antigen-O dimana

melekat secara kovalen dengan molekul lainnya; dan (3) komponen hidrofobik yang terdiri dari fosfat diglukosamin dengan lima atau enam rantai asil lemak dan terletak di bagian terluar membran (Kim, 2007).

Induksi endotoksin lipopolisakarida (LPS) mengaktifasi proses fagositosis oleh makrofag. Makrofag yang telah diinduksi oleh lipopolisakarida akan mengeluarkan mediator seperti TNF- α dan interleukin, tromboksan, dan *Reactive Oxygen Species* (ROS). Mediator inflamasi yang disekresikan setelah proses fagositosis akan meningkatkan proses inflamasi saluran pernafasan, seperti bronkokonstriksi (Seehase, *et al.*, 2012).

2.4 Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF- α)

Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF- α) merupakan sitokin yang bekerja pada saat terjadi respon inflamasi akut terhadap mikroba. Sitokin ini dikeluarkan oleh makrofag dari proses fagositosis. TNF- α sangat berperan penting dalam regulasi respon alergi. TNF- α merupakan salah satu sitokin yang disekresikan setelah memicu munculnya IgE pada sensitisasi alergi di jaringan paru-paru.

Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF- α) diketahui memiliki peran dalam inflamasi saluran pernafasan sebagai stimulasi fagositosis neutrofil dan degranulasi, munculnya eosinofil, dan produksi sitokin lain, seperti IL-1 dan IL-6 pada tempat inflamasi terjadi (Mukhopadhyay, *et al.*, 2006). Ekspresi TNF- α yang meningkat di dalam jaringan dapat dipergunakan sebagai indikasi adanya inflamasi serta tingkat keparahan asma.

Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF- α) berperan dalam meningkatkan neutrofil dan monosit pada daerah inflamasi untuk memfagositosis mikroba, memacu apoptosis sel-sel inflamasi, dan vasokonstriksi pembuluh darah. TNF- α secara biologis dapat meningkatkan katabolisme jaringan, sehingga terjadi perubahan patologik di dalam saluran pernafasan (Hadiwidjaja, 2004). TNF- α memiliki peran ganda, yaitu jika pada kadar yang tepat akan memberikan perlindungan dan penyembuhan, sedangkan pada kadar berlebihan akan menginduksi lebih banyak sel-sel inflamatori sehingga menyebabkan kerusakan jaringan yang sangat berat dan fatal (Irawati, 2014).

2.5 Tikus (*Rattus norvegicus*) Hewan Model Asma

Hewan model asma adalah suatu alat bantu yang tidak dilarang untuk digunakan sebagai alat pembelajaran tentang keseluruhan sistem imunitas dan pernapasan. Akkoc (2010) mengungkapkan bahwa hewan model asma telah digunakan lebih dari 100 tahun lamanya. Proses observasi pada hewan dan manusia harus dilakukan secara teliti. Hewan coba tikus sangat ideal untuk indentifikasi dan uji coba mekanisme yang menghubungkan perkembangan fenotip asma karena kemiripan struktur anatomi organ saluran pernafasannya (Gambar 2.2).

Hewan model berguna untuk mempelajari mekanisme mediator atau proses inflamasi seperti perubahan struktur jaringan saluran pernafasan, perbaikan struktur jaringan, dan pembatasan aliran saluran pernafasan. *Rattus norvegicus* adalah subjek hewan eksperimental yang paling sering digunakan untuk penelitian bidang biomedik. Hal ini bertujuan untuk mengetahui

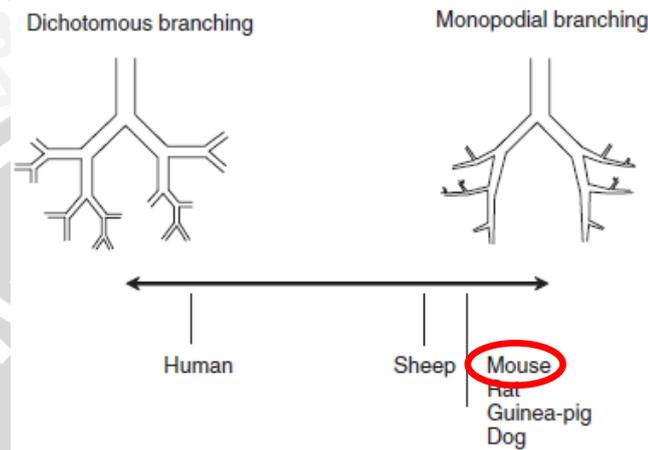
hubungan suatu penyakit dengan terapi obat-obatan pada tingkat seluler dan molekuler dalam studi asma manusia dan hewan peliharaan (Balcombe, 2006; Touma & Palme, 2005).

Sistem klasifikasi daun *Rattus norvegicus* menurut Balcombe (2006) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Subfilum	: Vertebrata
Kelas	: Mamalia
Subkelas	: Theria
Ordo	: Rodensia
Subordo	: Sciurognathi
Famili	: Muridae
Subfamili	: Murinae
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>R. norvegicus</i>

Pembuatan hewan model asma dari tikus (*Rattus norvegicus*) memerlukan sensitisasi alergen yaitu OVA. Ovalbumin (OVA) yang berasal dari telur ayam sering digunakan untuk induksi kuat pada inflamasi alergi pulmonari pada tikus (Kumar, *et al.*, 2008). Sensitisasi OVA akan memberikan respon imun alergi dalam tubuh hewan model. Selain itu, paparan antigen mikroba seperti lipopolisakarida (LPS) dari bakteri Gram negatif dalam jumlah tertentu dapat menginduksi respon Th2 dan Th1. Th2 pada proses inflamasi asma akan mengaktifasi IgE dan eosinofil untuk

mensintesis sel-sel mediator dan sitokin (Kim, 2007). *Rattus norvegicus* sangat sesuai untuk dijadikan hewan model asma berdasarkan kemampuan produksi IgE spesifik alergi dan derajat inflamasi saluran pernafasan (Akkoc, 2010).



Gambar 2.2 Skema perbedaan bentuk organ paru-paru manusia dan tikus (*Rattus norvegicus*). (sumber: Balcombe, 2006)

2.6 Tanaman Putri Malu (*Mimosa pudica* Linn.)

Tanaman Putri Malu dengan nama latin *Mimosa pudica* Linn. adalah tanaman asli dari Amerika Selatan dan Amerika Tengah. Tanaman ini banyak ditemukan di daerah beriklim tropis dan subtropis seperti India dan Asia. Sistem klasifikasi daun *Mimosa pudica* Linn. menurut Sunetha, *et al.* (2011) adalah sebagai berikut:

- Kingdom : Plantae
- Divisi : Magnoliophyta
- Kelas : Magnoliopsida
- Ordo : Fabales
- Famili : Fabaceae
- Subfamili : Mimosoideae

Genus : *Mimosa*

Spesies : *M. pudica* Linn.

Mimosa pudica Linn. (Gambar 2.3) menyebar dibawah semak belukar kecil atau tumbuhan berkayu dengan tinggi 50-90 cm. Batangnya diselubungi oleh duri-duri. Daunnya tipe bipilatum, setiap tangkai berisi 2-4 daun, setiap daunnya terdiri dari 10-20 pasang daun-daun kecil. Bunga berwarna merah muda dengan bentuk bulat. Pelindung bijinya kecil, bonggol berwarna dan diselubungi oleh rambut sedangkan bijinya terdiri dari 3-5 buah. Akarnya memiliki 6-8 lapisan pada sel luarnya. Korteks selnya terdiri dari tanin dan kristal kalsium oksalat. Bunganya tumbuh saat bulan Agustus sampai Oktober (Raven, *et al.*, 2005).

Mimosa pudica Linn. sangat berguna digunakan untuk terapi anti-hiperglikemi, anti diare, dan anti-konvulsan. Daun dan akarnya berguna untuk pengobatan fistula dan bisul (Malone, 1996). *Mimosa pudica* Linn. digunakan untuk terapi penyakit kulit yang disebabkan oleh kerusakan secara serius atau permanen, seperti nyeri luka bakar, selain itu disentri, gangguan vagina dan uterus, inflamasi, asma, *leucoderma*, dan penyakit darah (Sunetha,*et al.*, 2011).



Gambar 2.3 *Mimosa pudica* Linn. (Azmi, *et al.*, 2011)

Tanaman ini paling banyak mengandung tanin, steroid, triterpenes, alkaloid, glikosida, flavonoid, c-glikosida, flavon (Adikari, 2003) (Tabel 2.1). Selain itu, ekstrak metanol dari daun-daun *M. pudica* Linn. menunjukkan senyawa bioaktif seperti terpenoid, quinin, fenol, saponin, dan komarin (Gandhiraja, *et al.*, 2009). Flavonoid yang terkandung dalam tanaman *Mimosa pudica* Linn. dapat berfungsi sebagai antioksidan. Flavonoid dapat menghambat sekresi mediator inflamasi, seperti TNF- α , IL-1, IL-6, dan IL-8 sehingga terjadi penurunan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan perbaikan jaringan inflamasi.

Tabel 2.1 Hasil tes fitokemikal ekstrak etanol dari *Mimosa pudica* Linn. (Tamiliarasi & Ananthi, 2012)

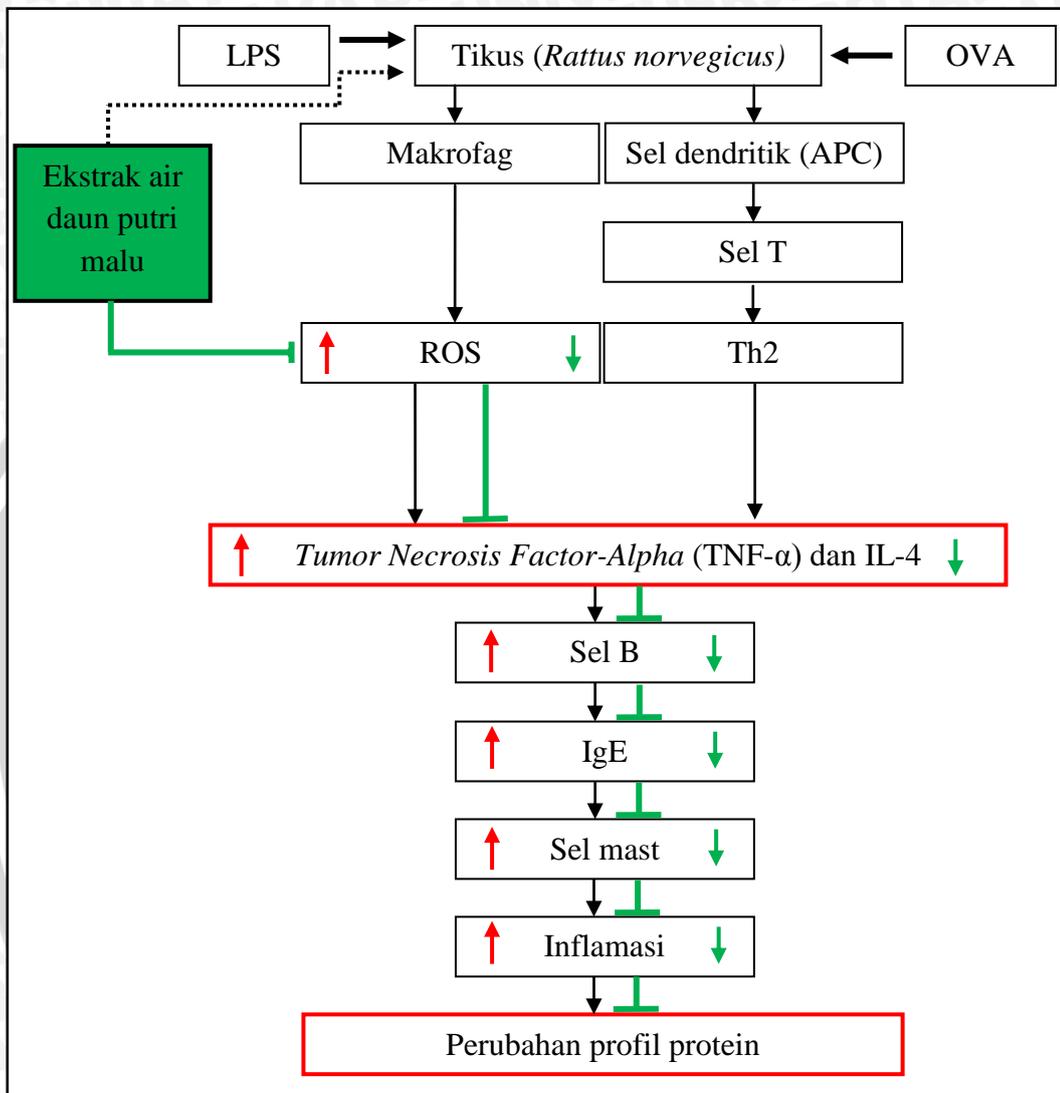
SI. No	Test	Ekstrak Etanol dari <i>Mimosa pudica</i> Linn.
1	Alkaloid	+
2	Glikosida	+
3	Terpenoid	-
4	Karbohidrat	+
5	Protein	+
6	Steroid	+
7	Flavonoid	+
8	Fenol	+
9	Tanin	-
10	Quinon	-
11	Saponin	-

(+) Indikasi terdapat senyawa (-) Indikasi tidak ada senyawa



BAB III KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan:

- : Induksi
- : Patomekanisme
- ↓ : Penurunan
- ⊥ : Menghambat
- ↑ : Peningkatan
- ⋯→ : Terapi
- ⊥ : Variabel bebas
- : Variabel tergantung

Asma adalah suatu penyakit inflamasi saluran pernafasan kronis yang melibatkan beberapa sitokin dan mediator inflamasi diakibatkan adanya sensitisasi alergi. Pembuatan hewan coba model asma dengan sensitisasi alergi, seperti OVA dan LPS akan menimbulkan rasa gatal dan hidung tersumbat yang ditandai dengan hewan menggaruk bagian nasal. Alergen yang masuk ke dalam saluran pernafasan akan ditangkap oleh *Antigen Presenting Cell* (APC), yaitu sel dendritik dan makrofag. Alergen ini akan dipresentasikan kepada sel T, kemudian sel Th2 (*T-helper*2) akan teraktivasi dan menghasilkan sitokin, yaitu IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13.

Proses fagositosis alergen oleh makrofag dapat meningkatkan konsumsi O₂ dan menghasilkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) serta sitokin proinflamasi *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α). *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang dihasilkan akan merangsang produksi NO (*Nitric Oxide*) dan jaringan paru-paru mengalami kondisi stres oksidatif. Kondisi stres oksidatif dapat meningkatkan proses oksidasi di dalam jaringan paru-paru tersebut (Padrid, 2010).

Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF- α) dan interleukin-4 (IL-4) yang dihasilkan oleh sel makrofag dan Th2 ini dapat mengaktivasi sel B yang kemudian akan meningkatkan produksi imunoglobulin-E (IgE). Imunoglobulin-E (IgE) akan menstimulasi terjadinya degranulasi sel mast. Hasil dari degranulasi sel mast adalah protease dan histamin yang dapat memicu gejala hipersensitivitas pada asma. Aktivitas proteolitik dari protease akan menyebabkan inflamasi dan kerusakan protein penyusun utama membran sel jaringan paru-paru. Hal tersebut mengakibatkan kerusakan sel epitel bronkiolus, hiperplasia dan hipertrofi sel otot polos, serta hipersekresi mukus (Sunetha, *et al.*, 2011).

Kandungan flavonoid yang tinggi dalam ekstrak air daun putri malu (*Mimosa pudica* Linn.) berperan sebagai antioksidan dan mencegah aktivasi radikal bebas, serta menekan produksi sitokin proinflamasi *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α) dan interleukin-4 (IL-4). Radikal bebas akan dinetralisasi oleh flavonoid dengan cara mendonorkan atom hidrogennya, sehingga terjadi penurunan produksi ROS dan sitokin proinflamasi. Penurunan produksi sitokin proinflamasi *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF) dan *Reactive Oxygen Species* (ROS) akan dapat menghambat aktivitas sel inflamatori untuk menghasilkan mediator inflamasi dan menurunkan aktivitas proteolitik dari protease, sehingga memberikan dampak perbaikan jaringan saluran pernafasan dan perubahan profil pita protein serum (Lafuente, *et al.*, 2009).

3.2 Hipotesis Penelitian

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

- 1) terdapat penurunan ekspresi *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α) organ paru-paru hewan tikus (*Rattus norvegicus*) model asma yang mendapat terapi ekstrak air daun Putri Malu (*Mimosa pudica* Linn.)
- 2) terdapat perbedaan profil pita protein serum hewan tikus (*Rattus norvegicus*) model asma yang mendapat terapi ekstrak air daun Putri Malu (*Mimosa pudica* Linn.)

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September 2013-Oktober 2014 di Laboratorium Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain spuit 1 cc, spuit 3 cc, kandang tikus, *sectio set*, cawan petri, sonde lambung, sarung tangan, timbangan analitik, pH meter, *water bath*, termometer, pembakar bunsen, pipet tetes, *beaker glass*, erlenmeyer, mortar, masker, *mikrotube* 1,5 ml, *falcon* 15 ml dan 50 ml, mikropipet 20 μ l, 200 μ l, dan 1000 μ l, *blue tip*, *yellow tip*, freezer -80°C, aluminium foil, kapas, kertas label, *sentrifuge* 4°C, *freezer* 4°C, tabung reaksi, *magnetic stirrer*, sendok erlenmeyer, seperangkat alat elektroforesis (SDS-PAGE), baki/nampan, kotak penyimpanan gel, kamera digital, *Omron CompAir Compressor Nebulizer* tipe NU-017, dan mikroskop Olympus BX51.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*), ovalbumin (OVA) *chicken* (Serva), Al(OH)₃, PBS (*Phophat Buffer Saline*), NaCl fisiologis, LPS_{1435/1449} (*Astarte Biologics*) dari bakteri *Porphyromonas gingivalis*, daun putri malu (*Mimosa pudica* Linn.), tris-EGTA (TEG) *buffer* (0.05 M Tris, 2.5 mM EGTA), H₂O₂ 1.5%, *Tris-buffered saline* (TBS: 0.05 M Tris, pH 7.4, 0.15 M NaCl), *Goat anti rat biotin labeled*, *anti Rat TNF- α* , *Streptavidin-biotin-peroxidase complex*, *alkaline phosphatase substrat*

(chromagen NBT), aquadest, *stacking gel* 5% (akrilamid 30%, Tris HCl 1.5 M pH 6.8, dH₂O, SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) 10%, APS (*Ammonium Persulfat*) 10%, TEMED (*Tetra Ethylene Diamine*); *separating gel* 12.5% dengan komposisi meliputi akrilamid 30%, Tris HCl 1.5 M pH 8.8, dH₂O, SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) 10%, APS (*Ammonium Persulfat*) 10%, TEMED (*Tetra Ethylene Diamine*), RSB (*Reducing Sampel Buffer*) dengan perbandingan 1:1 (RSB: sampel), marker PRO-STAINTM, *staining solution (commasie blue)*, *destaining solution* (metanol, asam asetat, aquades), *running buffer*, dan es batu.

4.3 Tahapan Penelitian

1. Rancangan penelitian dan persiapan hewan coba
2. Sensitisasi alergi
3. Injeksi lipopolisakarida (LPS)
4. Terapi dengan ekstrak air daun putri malu (*Mimosa pudica* Linn.)
5. Isolasi organ paru-paru
6. Pembuatan dan pengamatan preparat imunohistokimia TNF- α
7. Pengambilan serum hewan coba
8. Pengamatan profil pita protein dari serum hewan coba dengan SDS-PAGE
9. Analisis data

4.4 Prosedur Kerja

4.4.1 Rancangan Penelitian dan Persiapan Hewan Coba

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan coba dibagi menjadi 4 (empat) kelompok, yaitu kelompok 1 (satu) terdiri dari tikus yang tidak diberi perlakuan (kontrol negatif), kelompok 2 (dua) terdiri dari tikus yang diberi perlakuan ovalbumin (OVA) dan lipopolisakarida (LPS) (kontrol positif), kelompok 3 (tiga) terdiri dari tikus yang diberi perlakuan OVA + LPS + ekstrak air daun putri malu (*Mimosa pudica* Linn.) dengan dosis 500 mg/kg BB, sedangkan kelompok 4 (empat) terdiri dari tikus yang diberi perlakuan OVA + LPS + ekstrak air daun putri malu (*Mimosa pudica* Linn.) dengan dosis 1000 mg/kg BB. Setiap kelompok terdiri dari 5 (lima) ekor tikus (*Rattus norvegicus*). Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah:

Variabel bebas : dosis ekstrak air daun Putri Malu (*Mimosa pudica* Linn.)

Variabel tergantung : ekspresi TNF- α organ paru-paru dan profil pita protein serum tikus

Variabel kendali : tikus strain *Wistar* betina dengan umur sama

Sampel penelitian yang digunakan adalah hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) betina dari strain *Wistar* berumur 8-12 minggu. Berat badan tikus yang digunakan kurang lebih 150-250 gram. Kemudian, hewan coba diaklimatisasi selama 7 (tujuh) hari dengan pemberian pakan berupa ransum basal pada semua tikus. Komposisi ransum basal disusun berdasarkan standar *Association of Analytical Communities* (AOAC) (2005), yaitu mengandung karbohidrat, protein, lemak, mineral, vitamin, dan air. Estimasi besar sampel

dihitung berdasarkan rumus (Montgomery & Kowalsky, 2011; Kusriningrum, 2008):

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

$$4(n-1) \geq 15$$

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 19/4$$

$$n \geq 4.75$$

$$n \geq 5$$

Keterangan

t = jumlah kelompok hewan coba

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk 4 (empat) kelompok hewan coba diperlukan jumlah ulangan paling sedikit 5 (lima) kali dalam setiap kelompok sehingga dibutuhkan 20 ekor hewan coba.

Tikus dikandangkan dalam kandang yang berukuran 17.5 x 23.75 x 17.5 cm. Kandang terbuat dari *stainless steel*. Kandang tikus berlokasi pada tempat yang bebas dari suara ribut dan terjaga dari asap serta polutan lainnya. Lantai kandang mudah dibersihkan dan disanitasi. Suhu optimal ruangan untuk tikus adalah 22-24° C dan kelembaban udara 50-60% dengan ventilasi yang cukup (namun tidak ada jendela terbuka).

4.4.2 Induksi Asma

4.4.2.1 Tatalaksana Sensitisasi Alergi

Sensitisasi alergi pada tikus dilakukan pada hari ke-1 dan ke-14 berdasarkan tatalaksana yang dilakukan oleh Utomo (2012), yaitu dengan injeksi ovalbumin (Sigma-Aldrich) 10 $\mu\text{g/ml}$ secara intraperitoneal yang diemulsi dengan 1,5 mg AlOH_3 dalam 200 μL PBS (*Phosphate Buffer Saline*). Sensitisasi OVA pada tikus juga dilakukan secara inhalasi pada hari ke-21 dengan dosis 1 mg/ml dalam NaCl fisiologis selama 20 menit. Tikus dimasukkan ke dalam tabung transparan yang dihubungkan dengan *Omron CompAir Compressor Nebulizer*.

4.4.2.2 Tatalaksana Injeksi Lipopolisakarida (LPS)

Induksi lipopolisakarida dilakukan melalui injeksi intrasulkuler pada sulkus gingiva molar rahang atas kiri tikus dengan dosis 1 $\mu\text{g/ml}$ (Utomo, 2012). Lipopolisakarida (LPS) yang digunakan adalah LPS_{1435/1449} yang berasal dari bakteri *Porphyromonas gingivalis* (*Astarte Biologics*) yang berguna sebagai agen infeksi rongga mulut dan modulator respon imun. Injeksi LPS intrasulkuler dilakukan selama dua hari berturut-turut pada hari ke-10 dan ke-11 sebelum injeksi OVA II. Hal ini dilakukan untuk memperparah kejadian alergi yang disebabkan oleh injeksi OVA.

4.4.3 Terapi dengan Ekstrak air Daun Putri Malu (*Mimosa pudica* Linn.)

Menurut Vikram, *et al.* (2012) dosis ekstrak air daun putri malu (*Mimosa pudica* Linn.) yang dianjurkan adalah 250-2000 mg/kg BB tikus.

Dalam penelitian ini, dosis yang digunakan untuk kelompok tikus terapi I adalah 500 mg/kg BB dan kelompok tikus terapi II adalah 1000 mg/kg BB.

Metode ekstraksi yang digunakan adalah ekstraksi air dengan perebusan. Daun putri malu yang telah dikeringkan dengan bantuan sinar matahari secara tidak langsung, kemudian ditimbang dengan berat 500 mg dan 1000 mg, setelah itu diremas hingga sedikit hancur. Daun putri malu yang sedikit hancur dimasukkan aquades sebanyak 100 ml ke dalam gelas beker. Gelas beker yang berisi daun putri malu diletakkan di atas penangas air dan direbus dengan suhu 70-80°C hingga larutan menyusut 10 ml untuk masing-masing dosis. Perhitungan dosis dapat dilihat pada Lampiran 6.

Larutan ekstrak air daun putri malu 10 ml dengan dosis 500 mg/kg BB dan 1000 mg/kg BB diberikan kepada kelompok tikus terapi I dan II. Masing-masing tikus diberikan sebanyak 2 ml ekstrak air daun putri malu secara sonde lambung. Pemberian ekstrak air daun putri malu ini dilakukan selama 14 hari (2 minggu).

4.4.4 Pembedahan Hewan Coba

4.4.4.1 Pembedahan Hewan Coba untuk Isolasi Organ Paru-paru

(Amin, *et al.*, 2009)

Tikus kelompok negatif dan kelompok positif pada hari ke-21, setelah 30 menit pemberian inhalasi OVA isolasi organ paru-paru dilakukan. Dislokasi bagian leher (dislokasi servikalis), kemudian diinsisi bagian kulit bagian perut hingga terlihat organ-organ pencernaan. Tikus kemudian diinsisi bagian thorax hingga terlihat organ paru-paru lalu diambil

organ paru-paru. Organ paru-paru yang telah diambil lalu dibersihkan dengan larutan NaCl fisiologis 0,9% kemudian direndam dengan larutan *Phosphat Buffer Saline* (PBS) pH 7,4 dan disimpan di dalam *freezer*, serta *Paraformaldehyde Acid* (PFA) 10% disimpan dalam suhu ruang.

4.4.4.2 Pembedahan Hewan Coba untuk Pengambilan Serum Darah (Sirois, 2011)

Pengambilan darah pada tikus kelompok kontrol negatif dilakukan pada hari ke-21. Kelompok tikus kontrol positif dilakukan pengambilan darah 20 menit setelah inhalasi OVA pada hari ke-21. Kelompok tikus terapi dosis I dan II pengambilan darah dilakukan pada hari ke-35 setelah 14 hari (2 minggu) dilakukan terapi. Tikus dieuthanasi dengan cara dislokasi servikalis (leher). Tikus diletakkan secara dorso ventral (terlentang) lalu kulit bagian perut diinsisi hingga terlihat organ pencernaan. Bagian thorax tikus diinsisi hingga terlihat organ jantung.

Darah di dalam jantung tikus diambil secara intrakardial dengan *sputit* 3 cc sebanyak 3 ml. Darah tikus yang telah diambil ditampung dalam *vacutainer* dan didiamkan selama 3-4 jam. Darah yang telah didiamkan disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Serum darah yang diperoleh diambil dengan menggunakan pipet dan dimasukkan dalam *mikrotube* dan disimpan dalam *freezer* -4°C.

4.4.5 Pembuatan dan Pengamatan Preparat Imunohistokimia *Tumor*

Necrosis Factor-Alpha (TNF- α)

Preparat paru-paru difiksasi dalam larutan *Paraformaldehyde* (PFA) 10% lalu direndam dalam larutan ethanol dengan konsentrasi 70% minimal selama 24 jam dan dilanjutkan dengan ethanol 80% selama 2 jam. Preparat paru-paru kemudian direndam dalam ethanol absolut selama 30 menit masing-masing dalam botol yang berbeda sebanyak 3 kali. Preparat paru-paru lalu direndam dalam xilol sebanyak 2 kali masing-masing selama 30 menit dan dimasukkan dalam inkubator (56-58°C). Preparat paru-paru tersebut direndam dalam xilol lalu direndam dalam parafin sebanyak 3 kali lalu proses *embedding* organ paru-paru dicelupkan pada parafin cair yang telah dituang dalam wadah. Kemudian parafin akan memadat dan organ paru-paru berada dalam blok parafin.

Obyek gelas yang ditandai dengan kikir dan direndam dalam alkohol 70% paling kurang dalam 1 malam. Kemudian obyek gelas tersebut dikeringkan dan dihindarkan dari debu, lalu dicelupkan selama 30 detik dalam 0,05% gelatin hangat yang dilarutkan aquabides. Gelatin 0,5% sebanyak 30 mL digunakan untuk 30 obyek gelas. Obyek gelas dikeringkan dalam ruang tertutup dan dapat digunakan setelah 2 hari kemudian.

Jaringan organ paru-paru dalam blok parafin dimasukkan ke penjepit mikrotom dan diiris dengan ketebalan yang diinginkan adalah 4-6 μm . Irisan tersebut diambil dengan pinset dan dimasukkan ke dalam aquades pada suhu ruang. Hal ini dilakukan untuk membuka lipatan irisan yang mungkin terjadi pada preparat. Hasil irisan dipindahkan dengan jarum bertangkai ke dalam air

hangat (38-40°) untuk meluruskan kerutan halus. Irisan yang terentang sempurna diambil dengan gelas obyek. Potongan terpilih dikeringkan dan diletakkan di atas piring panas (38-40°) sampai preparat menjadi kering. Preparat yang telah kering disimpan dalam inkubator (38-40°) selama 24 jam. Preparat dicelup secara berurutan dalam xilol sebanyak 2 kali, alkohol bertingkat (100%, 90%, 80%, 70%, 30%) dan aquades. Preparat yang telah dicelupkan ke dalam xilol dicuci dengan PBS (pH 7,4) selama 3x5 menit. Preparat tersebut direndam dalam larutan H₂O₂ 3% selama 5-10 menit dan lalu dicuci dengan PBS (pH 7,4) selama 3x5 menit. Preparat tersebut direndam dalam *Bovine Serum Albumin* (BSA) 1% atau *Normal Goat Serum* (NGS) 1% (dilarutkan dalam PBS) selama 10-30 menit pada suhu ruang dan dicuci dengan PBS (pH 7,4) selama 3x5 menit. Preparat yang telah siap ditetesi dengan antibodi primer *Rat Anti TNF-α* selama 1 jam pada suhu ruang dan dicuci dengan PBS (pH 7,4) selama 3x5 menit. Preparat yang telah dicuci lalu ditetesi antibodi sekunder *Goat Anti-Rat biotin labeled* selama 1 jam pada suhu ruang dan dicuci dengan PBS (pH 7,4) selama 3x5 menit. Preparat tersebut kemudian ditambah *Strep Avidin-Horseradish Peroxidase* (SA-HRP) selama 30-60 menit pada suhu ruang dan dicuci dengan PBS (pH 7,4) selama 3x5 menit. Preparat paru-paru kemudian dilakukan *counterstain* dengan Hematoksilin selama 5 menit pada suhu ruang dan dicuci dengan aquades selama 3x5 menit. Preparat paru-paru tersebut kemudian dilakukan *mounting* dengan *entellan* dan pengamatan preparat dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya pada pembesaran 400x. Preparat positif mengekspresikan TNF-α apabila terdapat warna coklat pada preparat.

4.4.6 Identifikasi Profil Pita Protein Serum Hewan Model Asma dengan Metode SDS-PAGE (Zakaria, dkk, 2009)

Serum yang telah dibekukan, dicairkan (*thawing*) terlebih dahulu, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Setelah itu, serum ini diidentifikasi dan dikarakterisasi dengan elektroforesis (SDS-PAGE). Prosedur isolasi protein diawali dengan mengambil serum sebanyak 30 μ l dan dimasukkan ke dalam *mikrotube*. Serum yang di dalam *mikrotube* ditambahkan PBST-PMSF lima kali volume serum dan divortex selama 5 menit. Sampel yang telah divortex lalu disonikasi selama 10 menit, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 15 menit. Sampel tersebut diambil supernatannya dan diberi ethanol absolut 1:1, lalu didiamkan selama 24 jam. Sampel tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 15 menit, dibuang ethanol absolut dan dikering anginkan hingga bau ethanol hilang. Sampel protein yang telah dikering anginkan diberi Tris-HCl 20 mM pH 6,8 dengan volume 1:1 kemudian disimpan di dalam *freezer* 4°C.

Prosedur SDS-PAGE diawali dengan pembuatan *running gel* yang akan dimasukkan ke dalam pelat kaca dan ketika sudah mengeras akan diberikan *stacking gel*. *Running gel* terbuat dari campuran Acrylamid, Tris, SDS 0,8%, TEMED, APS, dan aquades steril dalam gelas beker. Isolasi protein serum yang telah dibuat, diambil sebanyak 15 μ l kemudian tambahkan RSB dengan perbandingan 1:1 kemudian direbus pada suhu 100°C selama 5 menit. Isolasi protein serum diambil 30 μ l dan dimasukkan ke dalam sumuran yang terletak *running gel* lalu dilakukan *running* pada *chamber* yang telah diisi oleh cairan *buffer running* dengan tegangan 200 volt selama 45 menit. Setelah selesai

running, gel diambil dan dimasukkan ke dalam wadah yang berisi *staining* yang berfungsi untuk memberikan warna yang lebih jelas pada hasil *running* isolasi protein serum tersebut. Staining terbuat dari methanol 125 ml, asam asetat 3,7 ml, dan aquades steril 100 ml. Setelah gel terendam, kemudian digoyang di atas *shaker* selama 30 menit. Dilakukan pencucian ulang menggunakan *destaining* selama 30 menit pula. Kemudian pita protein akan muncul lalu diukur mobilitas (R_f) molekul protein dalam gel poliakrilamid (mengandung SDS) berdasarkan kurva standar BM protein standar. BM protein ditentukan dengan membandingkan mobilitasnya terhadap serangkaian protein standar dengan BM yang telah diketahui (*marker*). Pengukuran *Retardation Factor* (R_f) mengikuti rumus:

$$R_f = \frac{\text{jarak pergerakan proteindaritempatawal (cm)}}{\text{jarak pergerakan warnadaritempatawal (cm)}}$$

Nilai R_f yang terhitung di plot pada sumbu X dan nilai log BM di plot pada sumbu Y. Grafik yang didapatkan berupa grafik linier dengan persamaan garis $Y = -ax + b$. Dari persamaan ini R_f dan BM protein yang akan dicari diplotkan sehingga diketahui nilai BM protein.

4.5 Analisis Data

Variabel yang diamati dalam penelitian ini meliputi ekspresi TNF- α jaringan paru-paru secara kuantitatif dan perbedaan berat molekul serum protein profil pita protein secara semi kuantitatif menggunakan SDS-PAGE. Data kuantitatif yang diperoleh dari hasil perlakuan dihitung dan dianalisis dengan analisis ragam ANOVA, apabila terdapat perbedaan nyata, uji dilanjutkan dengan perbandingan berganda uji *Tukey* atau Beda Nyata Jujur (BNJ) $\alpha = 5\%$.



BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

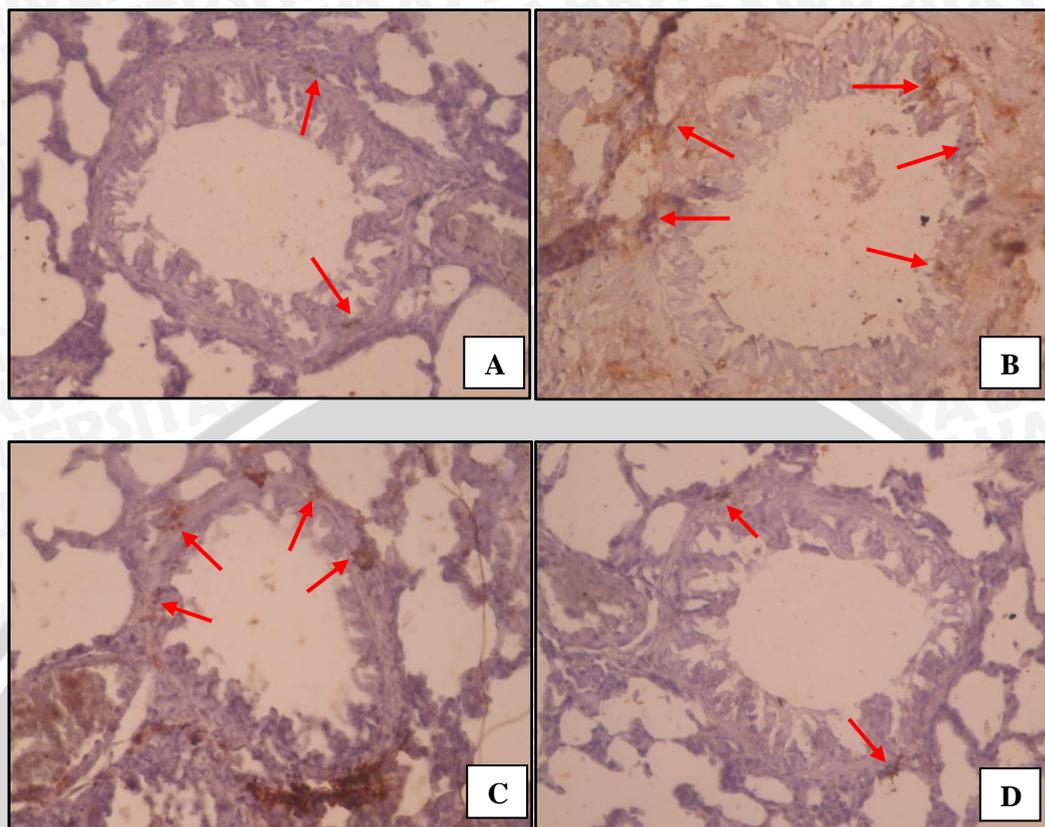
5.1 Ekspresi *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α) pada Paru Hewan Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Asma dengan Terapi Ekstrak Air Daun Putri Malu (*Mimosa pudica* Linn.)

Pengamatan ekspresi *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α) pada paru tikus (*Rattus norvegicus*) model asma dengan terapi ekstrak air daun putri malu (*Mimosa pudica* Linn.) pada Gambar 5.1 ditunjukkan oleh warna kecokelatan akibat ikatan antigen-antibodi pada jaringan organ paru tikus model asma. Antibodi primer yang digunakan berikatan dengan TNF- α di dalam jaringan. Jumlah antigen pada jaringan yang diikat oleh antibodi sangat mempengaruhi terang-gelap warna ekspresi, semakin banyak antigen yang diikat maka akan semakin gelap warna ekspresi yang ditunjukkan, begitu pula sebaliknya (Sugito, 2008; Atik, dkk., 2012).

Tabel 5.1 Perbandingan Ekspresi *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α) pada Organ Paru Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Asma dengan Terapi Ekstrak Air Daun Putri Malu (*Mimosa pudica* Linn.)

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Ekspresi TNF- α	Peningkatan Ekspresi TNF- α terhadap Negatif (%)	Penurunan Ekspresi TNF- α terhadap Positif (%)
Negatif	0,458 \pm 0,088 ^a	-	-
Asma	2,848 \pm 0,413 ^c	521,8	-
Terapi 500 mg/kg BB	1,509 \pm 0,329 ^b	-	47,1
Terapi 1000 mg/kg BB	0,795 \pm 0,580 ^a	-	72,1

Keterangan : perbedaan notasi (a,b,c) menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar perlakuan terhadap ekspresi TNF- α ($p < 0,05$)



Gambar 5.1 Ekspresi *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) pada organ paru tikus (*Rattus norvegicus*) model asma dengan terapi ekstrak air daun putri malu (*Mimosa pudica* Linn.) (400x) (tanda panah merah)

Keterangan: A = kelompok negatif; B = kelompok asma; C = terapi dosis 500 mg/kg BB; D = terapi dosis 1000 mg/kg BB; panah merah menunjuk pada ekspresi TNF- α

Hasil uji statistik *One-Way* ANOVA dengan uji lanjutan Benar Nyata Jujur (BNJ) menunjukkan bahwa tiap perlakuan percobaan terhadap peningkatan dan penurunan ekspresi *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α) pada tikus model asma dengan terapi ekstrak air daun putri malu berbeda nyata ($p < 0,05$). Kelompok kontrol positif menunjukkan perbedaan ekspresi TNF- α yang signifikan ($p < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif dan kelompok terapi 500 mg/kg BB serta 1000 mg/kg BB. Namun ekspresi TNF- α dosis 1000 mg/kg BB tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) dengan

kelompok kontrol negatif. Hasil penelitian ini menyatakan bahwa secara statistik dosis 1000 mg/kg BB adalah dosis efektif (Tabel 5.1).

Kelompok negatif (Gambar 5.1 A) menunjukkan jaringan organ paru-paru tikus model asma sedikit mengekspresikan *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α) ($0,458 \pm 0,088$), terutama pada bagian sel otot polos bronkiolus. Ekspresi TNF- α pada saluran pernafasan kelompok negatif sedikit terlihat karena tikus pada kelompok ini belum diinduksi dengan ovalbumin (OVA) dan lipopolisakarida (LPS). Hal ini juga dikarenakan TNF- α secara normal berfungsi untuk mendukung pertumbuhan neutrofil sebagai perlindungan dari benda asing yang masuk ketika proses bernafas. Selain itu, pada fisiologi normal TNF- α bekerja untuk membantu mekanisme proliferasi sel dan apoptosis (Thomas & Heywood, 2002; Irawati, 2014).

Kelompok asma (Gambar 5.1 B) mengalami peningkatan ekspresi *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α) sebesar 521,8% ($2,848 \pm 0,413$). Ekspresi TNF- α pada kelompok asma terlihat lebih banyak pada bagian sel otot polos dan epitel bronkiolus. Ekspresi TNF- α pada kelompok asma ini meningkat karena tikus pada kelompok ini telah diinduksi dengan paparan alergen ovalbumin (OVA) dan lipopolisakarida (LPS).

Paparan alergen ovalbumin (OVA) dan lipopolisakarida (LPS) bakteri *Porphyromonas gingivalis* yang masuk ke dalam saluran pernafasan akan ditangkap oleh sel dendritik dan makrofag alveolar sebagai *Antigen Presenting Cell* (APC). Alergen yang telah ditangkap oleh *Antigen Presenting Cell* (APC) tersebut lalu dipresentasikan untuk mengaktivasi sel Th2 (*T-helper 2*) yang akan memproduksi sitokin proinflamasi *Tumor*

Necrosis Factor-Alpha (TNF- α), IL-4, IL-5, IL-9, IL-13. Sitokin proinflamasi TNF- α ini akan mengoptimalkan kerja makrofag untuk memfagositosis alergen yang masuk sehingga oksigen (O₂) yang dikonsumsi dalam proses fagositosis mengalami peningkatan. Oksigen merupakan molekul penting dalam metabolisme aerobik, namun oksigen yang berlebihan dalam tubuh dapat menginduksi kerusakan dan toksisitas sel dalam jaringan paru-paru. Peningkatan konsumsi oksigen pada proses fagositosis alergen ini akan membantu pembentukan radikal bebas yang disebut *Reactive Oxygen Species* (ROS).

Pada kelompok asma terjadi inflamasi pada jaringan paru yang ditunjukkan oleh rusaknya sel epitel bronkiolus (Gambar 5.1 B). Proses respon inflamasi pada jaringan paru-paru ini akan mengaktifasi makrofag dan sel limfosit Th2 untuk mensekresikan *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α) dan interleukin-4 (IL-4) (Mukhopadhyay, *et al.*, 2006). *Tumor Necrosis Factor-Alpha* dan interleukin-4 (IL-4) merupakan sitokin proinflamasi utama yang terlibat langsung dalam patogenesis penyakit asma kronis sehingga dapat digunakan untuk mengukur tingkat inflamasi yang terjadi pada penyakit asma. Peningkatan produksi TNF- α dan IL-4 ini akan mengaktifasi sel B untuk mensekresi imunoglobulin-E (IgE). Imunoglobulin-E (IgE) akan memicu proses degranulasi sel mast. Hasil dari proses degranulasi sel mast adalah protease dan histamin. Aktivitas proteolitik yang dimiliki oleh protease dapat menyebabkan kerusakan sel epitel bronkiolus dan hipersekresi mukus pada penyakit asma (Russo & Polosa, 2005).

Pada kelompok terapi ekstrak air daun putri malu (*Mimosa pudica* Linn.) dosis 500 mg/kg BB dan 1000 mg/kg BB terjadi penurunan ekspresi *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α) sebesar 47,1% ($1,509 \pm 0,329$) dan 72,1% ($0,795 \pm 0,580$). Penurunan ekspresi TNF- α pada kedua kelompok terapi ini terlihat pada bagian sel otot polos dan epitel bronkiolus (Gambar 5.1 C & D). Ekstrak air daun putri malu memiliki kandungan senyawa bioaktif, yaitu flavonoid. Flavonoid adalah salah satu kelompok senyawa fenolik yang banyak terdapat pada jaringan tanaman. Flavonoid dalam ekstrak air daun putri malu ini dikenal sebagai antioksidan yang dapat menangkal dan menyeimbangkan molekul radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh. Hasil uji *Liquid Chromatography Mass Spectrometry* (LCMS) (Lampiran 10) pada ekstrak air daun Putri Malu menunjukkan terdapat beberapa turunan senyawa flavonoid, yaitu *isoorientin*, *isovitexin*, *orientin*, *vitexin*, *isoquercetin*, *quercetin*, dan *kamempferol*.

Flavonoid sebagai antioksidan akan menetralkan radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh sehingga dapat menekan kondisi stres oksidatif pada saat inflamasi. Radikal bebas harus dinetralkan karena elektron molekulnya berjumlah satu atau lebih yang tidak berpasangan sehingga bersifat tidak stabil dan mengikat molekul sel disekitarnya. Reaktivitas radikal bebas akan menimbulkan kerusakan pada penyusun sel atau jaringan, seperti karbohidrat, protein, lipid, dan asam nukleat (Suryohusodo, 2007). Flavonoid dalam terapi hewan model asma ini bekerja sebagai antioksidan eksogen yang berasal dari luar tubuh. Keadaan patologi asma dapat mengakibatkan jumlah radikal bebas di dalam jaringan paru-paru berlebihan dan merusak jaringan. Tubuh secara

normal pada dasarnya memiliki enzim-enzim yang berfungsi sebagai antioksidan endogen untuk menetralisasi radikal bebas, seperti *Superoxide Dismutase* (SOD). Antioksidan eksogen, seperti flavonoid akan membantu mengoptimalkan kerja antioksidan endogen untuk menstabilkan radikal bebas (Redha, 2010).

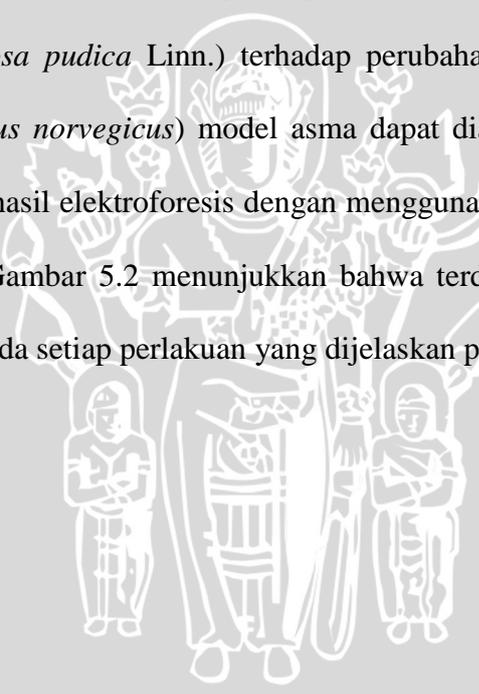
Flavonoid mempunyai kemampuan sebagai antioksidan dan mencegah terjadinya kerusakan akibat radikal bebas, salah satunya dengan mendonorkan ion hidrogen. Flavonoid dalam terapi ini bertindak secara efektif untuk menangkal radikal hidroksil (OH^*) dan radikal peroksil (ROO^*). Flavonoid ekstrak air daun putri malu (flavonoid-OH) akan berikatan dan mendonorkan ion hidrogen (H) dengan radikal peroksil (ROO^*) sehingga menjadi radikal fenoksil-flavonoid (ROOH). Selain itu, flavonoid ekstrak air daun putri malu (flavonoid-OH) juga berikatan dan mendonorkan ion hidrogen (H) dengan radikal hidroksil (OH^*) menjadi air (H_2O) dan flavonoid (flavonoid-O) (Astuti, 2008).

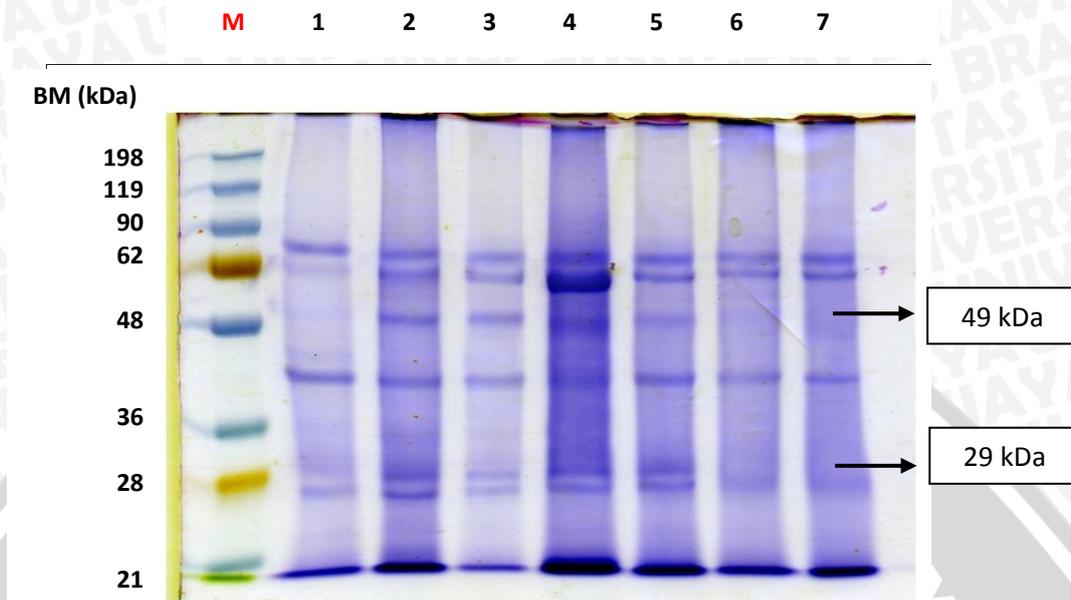
Reaksi pengikatan radikal peroksil dan radikal hidroksil oleh flavonoid ekstrak air daun putri malu menyebabkan radikal bebas di dalam paru-paru lebih bersifat stabil dan mengurangi keadaan stres oksidatif. Penurunan stres oksidatif memicu penurunan proses oksidasi dan kerusakan jaringan paru-paru penyakit asma akibat inflamasi. Flavonoid juga dapat menghambat sel makrofag dan limfosit Th2 mensekresikan $\text{TNF-}\alpha$ dan IL-4 (Mukhopadhyay, *et al.*, 2006). Hal ini sesuai dengan ekspresi *Tumor Necrosis Factor-Alpha* ($\text{TNF-}\alpha$) pada kelompok terapi 500 mg/kg BB dan 1000 mg/kg BB yang lebih rendah dibandingkan dengan ekspresi $\text{TNF-}\alpha$ kelompok asma yang

ditunjukkan oleh Tabel 5.1. Dari pemaparan di atas, dosis terapi ekstrak air daun putri malu dosis 1000 mg/kg BB bekerja efektif menurunkan ekspresi TNF- α dan hasil terapinya tidak berbeda nyata dengan kelompok negatif.

5.2 Gambaran Profil Pita Protein Serum Hewan Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Asma dengan Terapi Ekstrak Air Daun Putri Malu (*Mimosa pudica* Linn.)

Penelitian ini juga menggunakan parameter gambaran profil pita protein serum dengan menggunakan *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE). Pengaruh pemberian terapi ekstrak air daun Putri Malu (*Mimosa pudica* Linn.) terhadap perubahan pita protein serum hewan tikus (*Rattus norvegicus*) model asma dapat diamati dengan metode ini. Profil protein hasil elektroforesis dengan menggunakan SDS-PAGE yang ditunjukkan pada Gambar 5.2 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan berat molekul protein pada setiap perlakuan yang dijelaskan pada Tabel 5.2.





Gambar 5.2 Profil pita protein serum hewan tikus (*Rattus norvegicus*) (SDS 12%)

Keterangan : M = marker; (1) = kelompok negatif; (2-3) = kelompok asma; (4-5) = terapi dosis 500 mg/kg BB; (6-7) = terapi dosis 1000 mg/kg BB

Tabel 5.2 Berat Molekul Profil Pita Protein Serum Hewan Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Asma dengan Terapi Ekstrak Air Daun Putri Malu (*Mimosa pudica* Linn.)

Kelompok Perlakuan	Berat Molekul (BM) Pita Protein (kDa)					
	78	62	49	46	29	28
Negatif	√	√	-	√	-	√
Asma	√	√	√	√	√	√
Terapi 500 mg/kg BB	√	√	√	√	√	√
Terapi 1000 mg/kg BB	√	√	-	√	-	√

Keterangan : tanda (-) menunjukkan pita protein dengan berat molekul (BM) tersebut tidak terekspresikan

Kelompok negatif (*line* 1) dan kelompok terapi ekstrak air daun putri malu 1000 mg/kg BB (*line* 6-7) menunjukkan tidak munculnya pita protein berat molekul (BM) 49 kDa sedangkan pada kelompok asma (*line* 2-3) dan kelompok terapi 500 mg/kg BB (*line* 4-5) terdapat pita protein dengan BM 49 kDa. Kelompok negatif (*line* 1) dan kelompok terapi ekstrak air daun putri

malu dosis 1000 mg/kg BB (*line*6-7) tidak menunjukkan pita protein dengan BM 29 kDa. Sedangkan, pada kelompok asma (*line* 2-3) dan kelompok terapi ekstrak air daun putri malu dosis 500 mg/kg BB (*line* 4-5) terdapat pita protein dengan BM 29 kDa (Tabel 5.2).

Protein dengan BM 49 kDa diasumsikan sebagai *Outer Membrane Protein* (OMP) *P. gingivalis* (Mubarokah, dkk., 2009). Protein ini tidak ditemukan pada kelompok negatif dikarenakan pada kelompok tersebut belum diberi perlakuan injeksi antigen dari lipopolisakarida (LPS) *P. gingivalis*. Pada kelompok asma muncul pita protein dengan BM 49 kDa hal ini menunjukkan adanya akumulasi protein dengan BM 49 kDa yang diasumsikan sebagai OMP *P. gingivalis*. Pada kelompok terapi ekstrak air daun putri malu dosis 500 mg/kg BB masih ditemukan protein dengan BM 49 kDa (OMP *P. gingivalis*) dikarenakan LPS *P. gingivalis* masih menginfeksi jaringan paru-paru namun dalam jumlah yang telah mengalami penurunan. Namun, pada kelompok terapi ekstrak air daun putri malu dosis 1000 mg/kg BB pita protein dengan berat molekul 49 kDa tidak terekspresi. Hal ini dikarenakan, flavonoid dari ekstrak air daun putri malu dapat menekan terjadinya proses fagositosis *P. gingivalis* oleh makrofag (Gambar 5.2).

Outer Membrane Protein (OMP)*P. gingivalis* merupakan protein yang memiliki peran penting dalam tingkat virulensi proses adhesi suatu bakteri Gram-negatif dengan sel hospesnya. Pada penelitian ini bakteri Gram-negatif *P. gingivalis* digunakan sebagai agen infeksi rongga mulut dan modulator respon imun dalam penyakit asma setelah pemaparan alergen berupa ovalbumin (OVA) (Utomo, 2012). Bakteri Gram-negatif ini dapat dengan

mudah menginfeksi ke dalam paru-paru melalui sirkulasi darah, karena pada sirkulasi darah yang masuk ke dalam paru-paru banyak mengandung hemoglobin dan oksigen untuk memenuhi nutrisi bakteri *P. gingivalis* (Mubarokah, dkk., 2009).

Outer Membrane Protein (OMP) *P. gingivalis* berperan sebagai molekul adhesi pada sel inflamatori, seperti makrofag, neutrofil, dan Th2. Adanya proses adhesi OMP *P. gingivalis* ini dapat meningkatkan kerja fagositosis oleh makrofag sehingga terjadi peningkatan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) di daerah jaringan paru-paru. Hasil dari proses fagositosis makrofag dan inisiasi antigen kepada sel limfosit Th2 dapat mengaktifasi munculnya *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α) dan interleukin-4 (IL-4) (Sunetha, *et al.*, 2011).

Protein dengan berat molekul (BM) 29 kDa diasumsikan sebagai protease (Wardani & Nindita, 2012). Pada kelompok negatif tidak ditemukan pita protein BM 29 kDa (protease) dikarenakan pada kelompok ini tidak diberi paparan LPS dan OVA sebagai alergen sehingga tidak memicu peningkatan stres oksidatif dan inflamasi pada jaringan paru-paru yang dapat menyebabkan peningkatan protease. Protease adalah suatu enzim yang dapat memecah protein (bersifat proteolitik) menjadi peptida atau ikatan asam amino yang lebih sederhana (Ahmad, 2007). Protease dapat diproduksi dari berbagai organisme hidup, yaitu mikroorganisme, hewan, dan tanaman. Peningkatan jumlah protease pada jaringan yang mengalami inflamasi akan mengakibatkan meningkatnya aktivitas protease, yang dapat menyebabkan kerusakan jaringan (Segal, 2005).

Protein dengan berat molekul (BM) 29 kDa (protease) ditemukan pada kelompok asma karena pada kelompok ini diberi paparan LPS dan OVA. Paparan ovalbumin (OVA) dan lipopolisakarida (LPS) *P. gingivalis* merupakan pemicu enzim protease dalam penyakit asma. Ovalbumin (OVA) dan lipopolisakarida (LPS) *P. gingivalis* yang diinduksikan ke dalam tubuh tikus hewan model asma akan ditangkap oleh *Antigen Presenting Cell* (APC), seperti sel dendritik dan makrofag. Proses penangkapan ini akan mengaktifasi sel Th2 untuk mensekresikan sitokin proinflamasi, seperti IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, dan *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α). Munculnya beberapa sitokin ini akan mempercepat proses fagositosis alergen oleh makrofag alveolar. Proses fagositosis ini akan menghasilkan peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) sehingga jaringan paru-paru mengalami keadaan stres oksidatif dan terjadi inflamasi (Padrid, 2010).

Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF- α) dan interleukin-4 (IL-4) yang disekresikan oleh makrofag dan sel Th2 akan mengaktifasi proliferasi sel B untuk memproduksi IgE. Immunoglobulin-E (IgE) akan merangsang terjadinya degranulasi sel mast. Hasil proses degranulasi sel mast adalah histamin dan protease. Protease yang memiliki sifat proteolitik akan meningkatkan aktivitas protease dan memperparah keadaan asma dengan merusak susunan protein pada jaringan paru-paru, hiperresponsivitas saluran pernafasan, hiperplasia dan hipertropi sel otot polos bronkiolus. Pecahan molekul protein akibat proses inflamasi ini akan dengan mudah masuk ke dalam pembuluh darah dan mengikuti aliran darah di sekitar jaringan paru-paru. Oleh karena itu pengamatan dengan profil pita protein dapat digunakan untuk mengetahui

kejadian inflamasi pada paru-paru tikus hewan coba asma (Sunetha, *et al.*, 2011; Mubarokah, dkk., 2009).

Pada kelompok terapi ekstrak air daun putri malu dosis 500 mg/kg BB ditemukan kemunculan pita protein BM 29 kDa (protease). Hal ini dikarenakan kerja senyawa flavonoid ekstrak air daun putri malu dosis 500 mg/kg BB sebagai antioksidan kurang dapat menstabilkan ROS yang meningkat di dalam jaringan paru-paru, sehingga proses inflamasi akibat degranulasi sel mast belum dapat merubah profil pita protein pada tikus hewan model asma. Kelompok terapi ekstrak air daun putri malu dosis 1000 mg/kg BB tidak ditemukan munculnya pita protein BM 29 kDa (protease). Kerja senyawa flavonoid pada kelompok kontrol terapi ekstrak daun putri malu dosis 1000 mg/kg BB diyakini telah dapat memperbaiki profil pita protein mendekati profil pita protein kelompok kontrol negatif asma. Hal ini dikarenakan kandungan senyawa flavonoid yang dimiliki terapi ekstrak daun putri malu dosis 1000 mg/kg BB lebih banyak dan dapat menstabilkan ROS dalam jaringan paru-paru sehingga menekan adanya stres oksidatif dan aktivitas enzim protease yang bersifat proteolitik akibat proses degranulasi sel mast pada jaringan paru-paru.

BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa:

1. Terapi ekstrak air daun putri malu (*Mimosa pudica* Linn.) menurunkan ekspresi *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α) pada asma. Dosis terapi 1000 mg/kg BB adalah dosis efektif.
2. Terapi ekstrak air daun putri malu (*Mimosa pudica* Linn.) memberikan perbedaan profil pita protein pada asma dengan tidak tersintesisnya protein 49 kDa sebagai *Outer Membrane Protein P. gingivalis* serta protein 29 kDa sebagai protease.

6.2 Saran

1. Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui efek toksik dan cara pemberian efektif dari terapi ekstrak air daun putri malu (*Mimosa pudica* Linn.) sebagai antioksidan dalam menurunkan ekspresi *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α) dan merubah profil pita protein serum.
2. Diperlukan pengujian lebih lanjut tentang karakterisasi protein BM 49 kDa dan BM 29 kDa dengan metode *imunoblotting*, salah satunya adalah metode *Western Blotting*.

DAFTAR PUSTAKA

- Adikari, NS. 2003. *Prevention of Disease though Cure*. Yojana. 36(1-3):42-44
- Ahmad, R.Z. 2007. Aktivitas Enzim Kitinase dan Protease pada Cendawan Nematofagus (*Duddingtonia flagrans* dan *Saccharomyces cerevisiae*). *Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner*. Balai Besar Penelitian Veteriner. Bogor
- Akkoc, T. 2010. Animal Models of Asthma. *Marmara Pharmaceutical Journal*. 14: 104-111
- Alleoni, A.C.C. 2006. Albumen Protein and Functional Properties of Gelation and Foaming. *Science Agriculture*. Piracicaba, Brazil. Volume 63, No. 3. 291-298
- Amanda, G. 2012. Obesitas dan Asma. *CDK*. Volume 39, No. 1
- Amin, M.H.F., A.P.W. Marhendra, & Aulanni'am. 2009. *Pengaruh Paparan Lipopolisakarida pada Rongga Mulut dan Assisted Drainage Therapy (Adt) terhadap Kadar S-Ige dan Profil Radikal Bebas Pada Tikus Asma*. Seminar Nasional Biologi XX dan Kongres PBI XIV UIN Maliki. Malang. 24-25 Juli 2009.
- Anonim. 2009. *Farmakologi dan Terapi Edisi 5*. Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Balai Penerbit FKUI. Jakarta
- AOAC (Association of Official Analytical Chemist). 2005. *Official Methods of Analysis*. Washington DC
- Astuti, S. 2008. Isoflavon Kedelai dan Potensinya sebagai Penangkap Radikal Bebas. *Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian*. Volume 13, No. 2
- Atik, N., E. Avriyanti, J. Iwan, A.R. Indrati, dan R. Gunadi. 2012. Pengaruh Lidah Buaya (*Aloe vera* L.) pada Paru-paru Tikus yang diinduksi Asap Rokok. *MKB*. 44(3):159-64
- Azmi, L. 2011. *Pharmacological and Biological Overview on Mimosa pudica* Linn. *Int. J. of Pharm. & Life Sci. (IJPLS)*. Vol. 2, Issue 11. 1226-1234
- Balcombe, J. 2006. Laboratory Environments and Rodents' Behavioural Needs: A *Review Laboratory Animals* 40. 3:127-235
- Barlianto, W., M.S.C. Kusuma, S. Karyono, dan K. Mintaroem. 2009. Pengembangan Model Mencit Alergi dengan Paparan Kronik Ovalbumin. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. Vol. XXV, No. 1

- Bay, JD., and LR. Johnson. 2004. *Feline Bronchial Disease/Asthma: Textbook of Respiratory Disease in Dogs and Cats*. Philadelphia. WB Saunders. 388-396
- Busse, WW., and RF. Lemanske. 2001. Advances in Immunology. *National England Journal Medicine*. 344:350-62
- Byers, ChG., and N. Dhupa. 2005. *Feline Bronchial Asthma: Pathophysiology and Diagnosis*. Compend Contin Education Veterinary. 27:418-425
- Carol, O., and T.C. Yao. 2011. The Genetics of Asthma and Allergic Disease: A 21st Century Perspective. *Immunological Reviews*. 242:10-30
- Concannon, C.G., A.M. Gorman, and A. Samali. 2003. On the Role of Hsp 27 in Regulating Apoptosis. *Apoptosis*. Vol. 8, No. 1
- Darveau, R.P., S. Arbabi, I. Garcia, B. Bainbridge, and R.V. Maier. 2002. Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharide is Both Agonist and Antagonist for P38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activation. *Journal Infection and Immunity*. 70(1):1867
- Gandhiraja, N., S. Sriram, V. Meena, J. Kavitha Srilakshmi, C. Sasikumar, and R. Rajeswari. 2009. *Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of the Plant Extracts of Mimosa pudica L. Against Selected Microbes*. Ethnobotanical Leaflets. 13:618-24
- Hadiwidjaja, S. 2004. Pengaruh Interleukin-1 β (IL-1 β) dan Tumor Necrosis Fator-Alpha (TNF- α) terhadap Dopamin pada Cerebral Palsy. *Bioteknologi*. Volume 1(1): 25-29
- Irawati, L. 2014. Hubungan Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF- α) dengan Kadar Hemoglobin dan Parasitemia pada Infeksi Malaria falciparum. *Jurnal Kesehatan Andalas*. 3(2)
- Kim, Y.K. 2007. Airway Exposure Levels of Lipopolysaccharide Determine Type 1 versus Type 2 Experimental Asthma. *The Journal of Immunology*. 178:5375-5382
- Kumar, RK., C. Herbert, and PS. Foster. 2008. The “classical” Ovalbumin Challenge Model of Asthma in Mice. *Curr Drug Targets*. 9:485-94
- Kusriningrum. 2008. *Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya
- Lafuente, A.G., E. Guillamon, A. Villares, M.A. Rostagno, and J.A. Martinez. 2009. Flavonoids as Antiinflammatory Agents: Implications in Cancer and Cardiovascular Disease. *Inflammation Research*. Switzerland. 58:537-552

- Little, S. 2003. *Feline Asthma*. The Winn Feline Foundation. Winn. Manasquan.
- Mitchell, O., R. Ginanni, and R. Sergysels. 2010. Relation between The Bronchial Obstructive Response to Inhaled Lipopolysaccharide and Bronchial Responsiveness to Histamine. *Thorax*. 47:288-291
- Meiyanti, J., dan I. Mulia. 2000. Perkembangan Patogenesis dan Pengobatan Asma Bronkial. *Jurnal Kedokteran Trisakti*. Vol. 19, No. 3
- Montgomery, D., & S. Kowalsky. 2011. *Design and Analysis of Experiment*. John Wiley and Sains Inc. ISBN 978-0-470-16990-2
- Moorman, TR., and RL. Coffman. 2007. Th1 and Th2-cells: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. *Annu Rev Immunology*. 7:145-73
- Mubarokah, S.N., Sumarno, dan I.K.G. Muliarta. 2009. Outer Membrane Protein 49,4 kDa dari *Porphyromonas gingivalis* merupakan Protein Hemagglutinin dan Adhesin terhadap Neutrofil. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. Vol. XXV, No. 2
- Mukhopadhyay, S., J.R. Haidal, and T.K. Mukherjee. 2006. Role of TNF- α in Pulmonary Pathofisiology. *Respiratory Research*. 7:125
- Nitawati, N.P.M., D.M.C. Robin, dan M. Syafridi. 2014. Respon Limfosit T Sitotoksik pada Gingivitis setelah Pemberian Kurkumin. *Jurnal Kesehatan*. Volume 2, No. 1
- Padrid, P. 2009. *Chronic Bronchitis and Asthma in Cats*. WB Saunders. Philadelphia. 650-658
- Padrid, P. 2010. *Asthma in Cats. Consultations in Feline Internal Medicine*. Philadelphia. WB Saunders. 447-458
- Padrid, P. 2010. *Chronic Bronchitis and Asthma in Dogs and Cats*. Chicago. WB. Saunders. 459-465
- Raven, H. Peter, F. Evert Ray, Eichhorn, and E. Susan. 2005. *Section 6, Physiology of Seeds Plants: 29, Plant Nutrition and Soils Biology of Plants (7th edition)*. New York: W.H. Freeman and Company Page no. 639
- Redha, A. 2010. Flavonoid: Struktur, Sifat Antioksidan dan Peranannya dalam Sistem Biologis. *Jurnal Belian*. Vol. 9, No. 2. 196-202
- Reinero, C.R. 2011. Advances in the understanding of pathogenesis and diagnostics and therapeutics for feline allergic asthma. *Veterinarian Journal*. 190(1):28-33

- Russo, C., and R. Polosa. 2005. TNF- α as a promising therapeutic target in chronic asthma: a lesson from rheumatoid arthritis. *Clinical Science*. 109:135-142
- Segal, A.W. 2005. How Neutrophils Kill Microbes. *Annu. Rev. Immunol.* 23: 197-223
- Sirois, M. 2005. *Laboratory Animal Medicine: Principles and Procedures*. Elsevier Mosby, USA.
- Sugito. 2008. Respon Pemberian Ekstrak N-Heksan Tanaman Jaloh pada Ayam Broiler yang diberi Cekaman Panas terhadap Ekspresi Enzim iNOS pada Jaringan Paru, Kadar Glukosa, dan Kalsium dalam Serum. *JITV*. 13(3):174-181
- Sundaru, H. 2006. *Asma Bronkial*. Departemen Ilmu Penyakit Dalam. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. Juni, Halaman 247
- Sunetha, B., P. Kumar, Prasad, Vidyadhara, and S. Rao. 2011. Hepatoprotective and Antioxidant Activities of Methanolic Extract of *Mimosa pudica* Roots against Carbon Tetrachloride Induced Hepatotoxicity in Albino Rats. *International Journal of Pharmacy*. 1(1):46-53
- Suryohusodo, P. 2007. *Kapita Selekta Ilmu Kedokteran Molekuler*. CV. Sagung Seto. Jakarta
- Tamilarasi, T., and T. Ananthi. 2012. Phytochemical Analysis and Anti Microbial Activity of *Mimosa pudica* Linn. *Research Journal of Chemical Sciences* Vol. 2(2), 72-74, Feb, ISSN 2231-606X
- Thomas, P.S., and G. Heywood. 2002. Effects of Inhaled Tumour Necrosis Factor-Alpha in Subjects with Mild Asthma. *Thorax*. 57(9): 774-8
- Touma, C., and R. Palme. 2005. Measuring Fecal Glucocorticoid Metabolites in Mamamals and Birds: The Improtance of Validation. *Annals of The New York Academy of Sciences*. June. 1046:54-74
- Utomo, H. 2012. Rapid Relief Mechanisms of Allergic Rhinosinosis after "Assisted Drainage" Therapy. *Journal of Dentistry Indonesia*. Vol. 19, No. 3, 57-64.
- Vidyasagar, A., N.A. Wilson, and A. Djamali. 2012. Heat Shock Protein 27 (HSP27): Biomarker of Disease and Therapeutic Target. *Fibrogenesis & Tissue Repair*. 5:7

Vikram, P.K., R. Malvi, and D.K. Jain. 2012. Evaluation of Analgesic and Antiinflammatory Potential of *Mimosa pudica* Linn. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*. India. Volume 4, Issue 4.

Wardani, A.K., dan L.O. Nindita. 2012. Purifikasi dan Karakterisasi Protein dari Bakteri Hasil Isolasi dari *Whey Tahu*. *Jurnal Teknologi Pertanian*. Vol. 13, No. 3. 149-156

Wu, S.M., H.Y. Wu, Y.J. Wu, L. Liu, R.P. Cai, and Y.J. Xu. 2012. Effects of Baicalin and Ligustrazine on Airway Inflammation and Remodelling and Underlying Mechanism in Asthmatic Rats. *Advances in Biosciences and Biotechnology*. 585-591

Zakaria, S., R. Kurnijasanti, dan I.S. Hamid. 2009. Profil dan Identifikasi Serum Amiloid Protein (SAP) sebagai Protein Fase Akut pada Mencit yang dipapar *Salmonella enteritidis*. *Jurnal Penelitian Med. Eksakta*. 8(1):1-7

