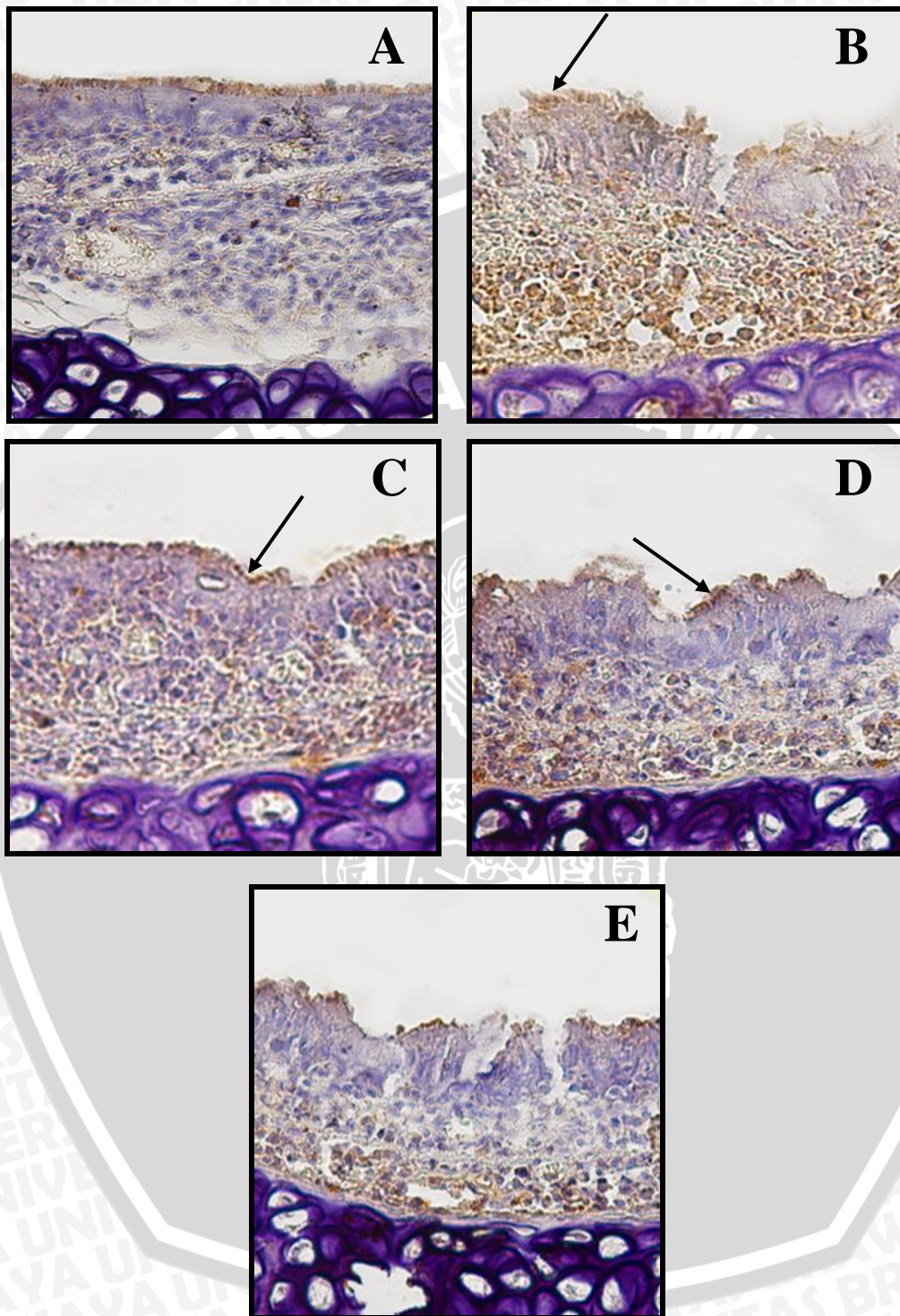


BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Ekspresi Interleukin-1 (IL-1) pada Bronkus Tikus Model Asma

Hasil ekspresi Interleukin-1 (IL-1) pada bronkus tikus model asma yang dipapar lipopolisakarida dan diterapi omega-3 ditunjukkan oleh area jaringan berwarna kecoklatan. Warna coklat disebabkan oleh ikatan antigen IL-1 pada jaringan dengan antibodi primer *Mouse Monoclonal Anti IL-1*. Ikatan tersebut diperkuat dengan penambahan antibodi sekunder *Rabbit Anti Mouse IgG* dan ditambahkan enzim *Polymere Anti-Rabbit*. Ikatan yang terbentuk kemudian dimunculkan dengan pewarna *Diamino Benzidine* (DAB) sehingga menghasilkan produk berwarna coklat. Ekspresi IL-1 pada setiap perlakuan dapat dilihat dengan munculnya warna coklat pada sitoplasma sel epitel bronkus (**Gambar 5.1**).

Hasil uji analisis statistika (*One-Way ANOVA*) menggunakan SPSS 16 menunjukkan bahwa pemberian Omega-3 secara signifikan ($P < 0,05$) menurunkan ekspresi IL-1. Hasil uji lanjutan menggunakan Uji Tukey menunjukkan ekspresi IL-1 berbeda signifikan ($P < 0,05$) antar perlakuan. Dosis 70 mg/ekor/hari adalah dosis terbaik dalam menurunkan ekspresi IL-1 dengan penurunan persentase ekspresi IL-1 tertinggi yaitu 47% (**Lampiran 7–8**). Sumber utama IL-1 ialah fagosit mononuklear yang diaktifkan. Efek biologis IL-1 tergantung dari jumlah yang diproduksi seperti merangsang makrofag mensekresi kemokin dan menginduksi kemotaksis dan pengerahan leukosit, menginduksi apoptosis sel inflamasi, sebagai pirogen endogen, serta gangguan metabolik yang dirangsang LPS (Bratawidjaja dan Rengganis, 2010.)



Gambar 5.1 Ekspresi Interleukin-1 (IL-1) pada jaringan jaringan tikus model asma yang dipapar LPS dengan metode immunohistokimia (Perbesaran 400x).

Keterangan : A : Negatif, B : Positif, C : Terapi (30 mg/ekor), D: Terapi (50 mg/ekor) dan E : Terapi (70 mg/ekor). —————> : Ekspresi Interleukin-1 (IL-1)

Hasil penelitian pengaruh omega-3 terhadap ekspresi Interleukin-1 (IL-1) bronkus tikus (**Tabel 5.1**)

Tabel 5.1 Ekspresi interleukin-1 (IL-1) pada bronkus tikus

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Ekspresi IL-1	Ekspresi IL-1 (%)	
		Peningkatan	Penurunan
Kelompok A (kontrol negatif)	0,085 ±0,043 ^a	-	-
Kelompok B (kontrol positif)	0,362±0,078 ^e	326	-
Kelompok C (30 mg/ekor)	0,286±0,034 ^d	-	21
Kelompok D (50mg/ekor)	0,227±0,094 ^c	-	37
Kelompok E (70mg/ekor)	0,193±0,042 ^b	-	47

Keterangan : Angka dengan *superscript* (notasi) berbeda menunjukkan perbedaan $p < 0,05$.

Rata-rata ekspresi IL-1 pada bronkus tikus kelompok A (kontrol negatif) adalah $0,085 \pm 0,043$ sedangkan pada kelompok kontrol positif menunjukkan rata-rata ekspresi IL-1 bronkus sebesar $0,362 \pm 0,078$, berdasarkan hasil tersebut, kelompok kontrol positif menunjukkan pengaruh yang berbeda nyata ($P < 0,05$) terhadap tikus kontrol negatif. Ekspresi IL-1 yang muncul pada kelompok kontrol negatif merupakan kondisi normal dalam sistem respirasi yang berperan dalam perbaikan saat terjadi kerusakan pada sistem respirasi, pada kondisi normal, IL-1 diproduksi oleh monosit dan makrofag. Dalam keadaan normal, IL-1 diproduksi dalam jumlah sedikit sebagai mediator inflamasi, akan tetapi jumlah yang cukup kecil tersebut tidak mampu menginduksi makrofag mensekresi kemokin dan menginduksi kemotaksis dan pergerakan leukosit, menginduksi apoptosis sel inflamasi, sebagai pirogen endogen (Batarawidjaya dan Rengganis, 2010).

Bakteri seperti LPS dan ovalbumin yang diberikan pada kelompok kontrol positif, kelompok C, D dan E mampu mengaktifkan makrofag dan sel lain untuk memproduksi dan melepas berbagai sitokin seperti IL-1 yang merupakan pirogen endogen, TNF- α dan IL-6 (Bratawidjaja dan Rengganis, 2010).

Reaksi hipersensitivitas muncul ketika ada allergen masuk ke dalam saluran nafas akan ditangkap oleh sel dendrit yang merupakan sel pengenal antigen (*Antigen Presenting Cell/APC*). Antigen diproses dalam APC dan dipresentasikan kepada sel limfosit T dengan bantuan *Major Histocompatibility Complex* (MHC) kelas II, limfosit T akan membawa ciri antigen spesifik, teraktivasi dan berdiferensiasi ke profil Th2. Sub tipe Th2 ini merupakan sub tipe utama yang terlibat pada asma, mensekresi berbagai sitokin yang bertanggung jawab bagi berkembangnya reaksi tipe lambat atau *Cell-Mediated Hypersensitivity Reaction* (Barnes *et al.*, 2003). Sitokin dari sel Th2 dapat menginduksi diferensiasi sel B menjadi sel plasma yang kemudian akan menghasilkan Ig E dan reseptornya Fc ϵ R1. Stimulasi dari IgE dan reseptornya dapat menyebabkan ikatan silang yang memicu adanya degranulasi sel mast, ikatan asam arakidonat (AA) dengan *cyclooxygenase* (COX) (COX1 dan COX2), ikatan AA dengan *lipxygenase* (LOX), dan produksi sitokin. Salah satu sitokin yang dilepas oleh sel mast adalah sitokin IL-1 (Baratawidjaja dan Rengganis, 2013).

Kelompok terapi C (30 mg/ekor), D (50 mg/ekor) dan E (70 mg/ekor) menunjukkan penurunan ekspresi IL-1 yang berbeda nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Pada kelompok Terapi C penurunan ekspresi IL-1 dari kelompok positif sebesar 21% (dengan ekspresi rata-rata IL-1 sebesar

0,286±0,034) dibandingkan dengan kelompok kontrol positif dan berbeda secara signifikan terhadap kelompok kontrol negatif. Kelompok Terapi D menunjukkan penurunan ekspresi IL-1 dari kelompok kontrol positif sebesar 37% (dengan ekspresi rata-rata IL-1 sebesar 0,227±0,094) dibandingkan dengan kelompok kontrol positif dan berbeda signifikan terhadap kelompok kontrol negatif. Kelompok terapi E merupakan kelompok terapi dengan ekspresi rata-rata IL-1 bronkus sebesar 0,193±0,042. Penurunan ekspresi IL-1 pada kelompok E dari kelompok kontrol positif yaitu sebesar 47%, maka dosis terapi 70 mg/ekor/hari adalah dosis terbaik dalam menurunkan ekspresi IL-1.

Ekspresi IL-1 tertinggi yang ditunjukkan dengan adanya warna kecoklatan yang muncul pada jaringan bronkus (**Gambar 5.1 B**), sedangkan efek terapi menunjukkan penurunan ekspresi IL-1 pada bronkus. Ekspresi IL-1 dihasilkan akibat induksi ovalbumin dan paparan LPS yang memicu aktivasi mediator khususnya histamin sehingga terjadi inflamasi yang secara spesifik disebut sebagai kejadian asma. Perbedaan rata-rata ekspresi IL-1 pada metode imunohistokimia membuktikan terjadinya penurunan sitokin proinflamasi setelah diberikan terapi omega-3 pada hewan coba asma. Penurunan ekspresi IL-1 disebabkan oleh aktivitas DHA yang mencegah diferensiasi IgE sehingga tidak terjadi sensitasi sel mast dan selanjutnya tidak menghasilkan histamin pada bronkus. Omega-3 sebagai antiinflamasi bekerja dengan mencegah Asam Arakidonat (AA) mengikat COX-1 dan COX-2 yang menghasilkan inflamasi melalui prostaglandin E2 (PGE2). *Eicosapentaenic acid* (EPA) kompetitif yang mengikat COX-1 dan COX-2 mengurangi inflamasi dengan berkurangnya

pembentukan PGE2 pada bronkus, aktivitas EPA dan DHA ini menekan kemampuan sel inflamatori dalam menghasilkan IL-1 dan TNF- α (Siriwardhana *et al.*, 2012). Hasil penelitian ini menyatakan bahwa berdasarkan analisis statistika, kandungan DHA dan EPA dari Omega-3 mampu menurunkan ekspresi IL-1 pada tikus model asma yang terpapar LPS.

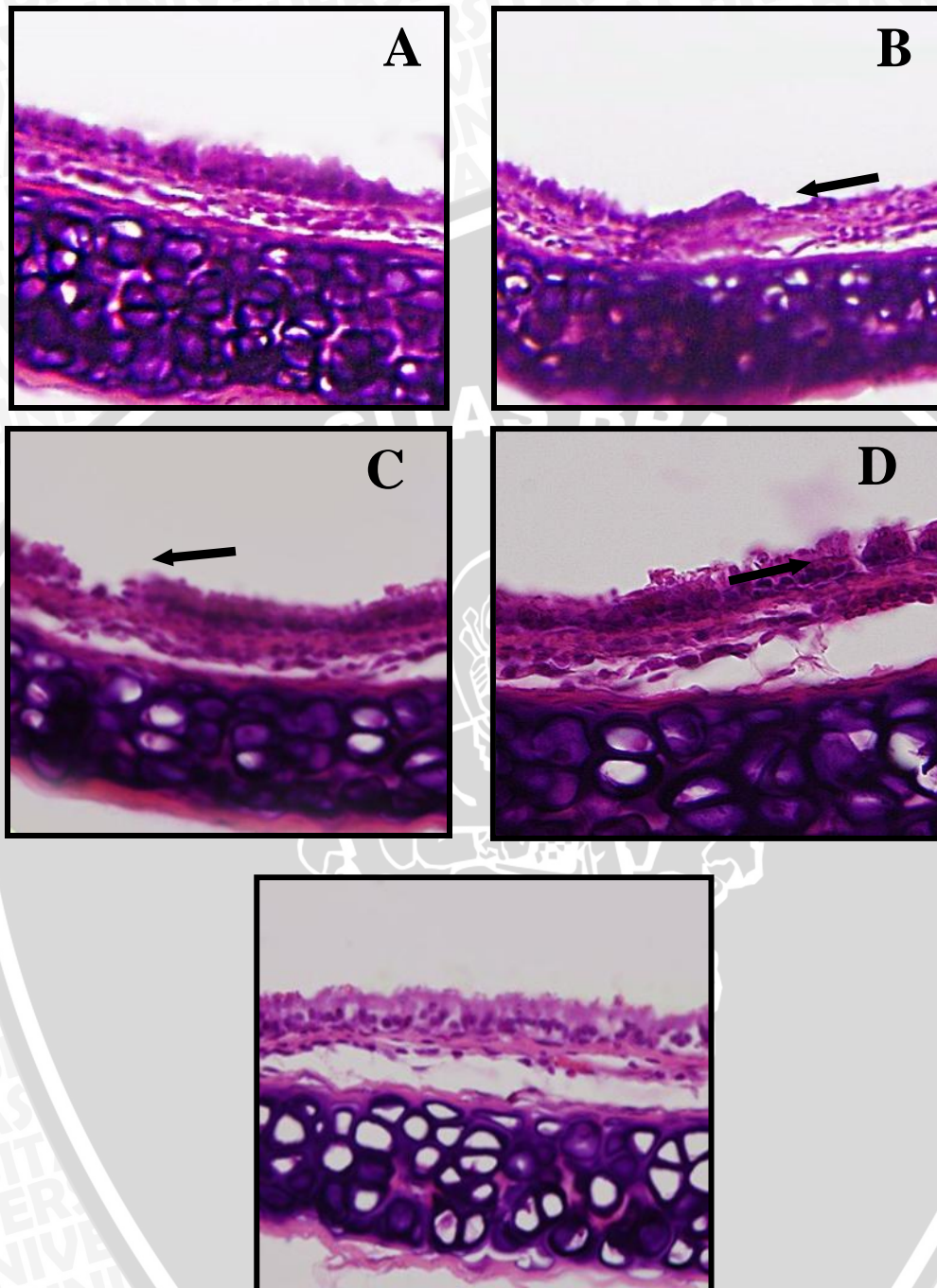
5.2 Gambaran Histopatologi Brokus pada Tikus Model Asma

Gambaran histopatologi bronkus tikus model asma yang telah diterapi dengan omega-3 dapat dilihat pada **Gambar 5.2**. Hasil pengamatan preparat bronkus pada masing-masing kelompok perlakuan dapat dilihat pada **Gambar 5.2**. Gambaran histopatologi bronkus kelompok kontrol negatif menunjukkan kondisi normal bronkus yaitu dengan struktur epitel terlihat tersusun rapi, rapat, dan kompak (**Gambar 5.2 A**). Uhlen *et al.* (2010) menyatakan bahwa secara normal epitel pada bronkus tersusun atas epitel silindris *pseudostratified* (semu bertingkat) bersilia. Gambaran histopatologi pada kelompok A dijadikan sebagai acuan adanya kerusakan maupun perbaikan yang terjadi pada kelompok perlakuan lainnya. Hasil pengamatan histopatologi dari kelompok B (kontrol positif) menunjukkan adanya kerusakkan epitel akibat paparan ovalbumin dan LPS (**Gambar 5.2 B**).

Gambaran histopatologi bronkus pada kelompok A menunjukkan kondisi normal bronkus (**Gambar 5 A**). Bronkus normal memiliki beberapa lapisan antara lain lapisan mukosa yang terdiri dari sel-sel epitel bersilia *pseudo comlumnar complex* (silindris berlapis semu bersilia) dengan lamina propria tipis (dengan banyak serabut elastin). Bronkus memiliki beberapa kelompok tulang rawan hialin

yang tidak ditemukan pada bronkiolus yang berada di lapisan *fibro-cartilaginous*. Di dalam lamina propria bronkus tampak terlihat lapisan otot polos (Koptyev *et al.*, 2014). Preparat histopatologi bronkus umumnya menunjukkan mukosa bronkus menjadi berlipat-lipat karena kondisi otot yang mengalami pengerutan saat hewan mati.

Menurut Wadsworth *et al.* (2012), pada kondisi asma seluruh saluran pernafasan akan mengalami perubahan struktur termasuk pada epitel bronkus. Asma pada tikus kelompok kontrol positif, C, D dan E merupakan hasil dari paparan ovalbumin (OVA) dan LPS yang ditangkap oleh *Lipopolysaccharide Binding Protein* (LBP). Ikatan LPS-LBP dikenali oleh *toll like receptor-4* (TLR-4) sehingga meningkatkan respon fagositosis dari neutrofil dan makrofag (Suliarni, 2003). Respon imun dimulai dengan masuknya alergen ke dalam saluran nafas akan ditangkap oleh sel dendrit yang merupakan sel pengenal antigen (*Antigen Presenting Cell/APC*). Antigen diproses dalam APC dan dipresentasikan kepada sel limfosit T dengan bantuan *Major Histocompatibility Complex* (MHC) kelas II, limfosit T akan membawa ciri antigen spesifik, teraktivasi dan berdiferensiasi ke profil Th2. Sub tipe Th2 ini merupakan sub tipe utama yang terlibat pada asma, mensekresi berbagai sitokin yang bertanggung jawab bagi berkembangnya reaksi tipe lambat atau *Cell-Mediated Hypersensitivity Reaction* (Barnes *et al.*, 2003). Diferensiasi sel B menjadi sel plasma kemudian akan menghasilkan Ig E dan reseptornya Fcε R1 menyebabkan degranulasi sel mast. Sel mast akan melepaskan mediator inflamasi berupa protease sehingga menimbulkan gejala hipersensitivitas pada asma (Endaryanto dan Harsono, 2006)



Gambar 5.2 Gambaran histopatologi bronkus tikus (Perbesaran 400x).

Keterangan : A : Negatif; B : Positif; C : Terapi (30 mg/ekor); D: Terapi (50 mg/ekor) dan E : Terapi (70 mg/ekor); **→** : erosi epitel bronkus

Asma mengakibatkan kerusakan epitel yang disebabkan oleh antigen dari LPS dan ovalbumin yang menempel pada lumen sehingga memicu infiltrasi sel-sel inflamasi. Hal tersebut sesuai dengan pengamatan bronkus pada kelompok kontrol positif (**Gambar 5.2 B**), epitel bronkus mengalami kerusakan yang ditandai dengan adanya erosi sel epitel. Erosi sel epitel terjadi akibat dari sel eosinofil dan makrofag yang melepas enzim proteolitik dan ROS sehingga mampu merusak sel epitel bronkus (Bratawidjaja dan Rengganis, 2013). Inhalasi LPS yang dipaparkan mampu mengakibatkan hiperresponsivitas saluran pernapasan pada penderita asma yang secara eksperimen lebih sensitif terhadap penyempitan saluran pernapasan. *Toll-Like Receptor-4* (TLR-4) berperan dalam respon terhadap LPS. Hal ini ditunjukkan dengan mutasi pada gen TLR-4 yang menunjukkan adanya penurunan hiperresponsivitas saluran pernapasan (Schwartz, 2002).

Paparan kronik ovalbumin yang diberikan selanjutnya menyebabkan perubahan struktur saluran pernafasan berupa penebalan epitel, peningkatan sel goblet dan penebalan otot polos (Temelkovski *et al.*, 1998; Locke, 2007). Paparan LPS pada tikus asma akan menyebabkan kerusakan struktur epitel silindris bersilia menjadi tidak beraturan dan terjadi pelepasan epitel dari membran basalis. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Utomo (2006) bahwa LPS dari bakteri gram negatif diketahui dapat menginduksi inflamasi pada saluran pernafasan sehingga mampu memperparah kondisi asma.

Kerusakan struktur epitel dapat berupa erosi sel yang ditandai dengan adanya jejas sel karena sel tidak dapat beradaptasi dengan rangsangan yang terlalu

berat. Berdasarkan tingkat kerusakannya jejas sel dikelompokkan menjadi 2 kategori utama yaitu jejas reversibel dan jejas irreversibel. Epitel sel bronkus mengalami jejas irreversibel karena berakhir dengan nekrosis sel sehingga memicu erosi pada sel epitel. Nekrosis pada sel epitel bronkus disebabkan oleh peningkatan radikal bebas dalam tubuh yang merupakan akibat dari induksi ovalbumin dan LPS. Oksigen reaktif yang terlepas menyebabkan ketidakseimbangan antara radikal bebas dengan anti-oksidan sehingga menimbulkan stres oksidatif. Radikal bebas akan bereaksi dengan PUFA penyusun membran sel untuk mencapai keseimbangan disebut sebagai peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid akan menyebabkan kebocoran sel yang dapat mengakibatkan kerusakan sel. Akibat dari adanya erosi pada sel epitel bronkus maka akan terjadi peningkatan ketahanan saluran pernafasan yang dapat merangsang terjadinya kontraksi otot polos bronkus (Caramori *and* Papi, 2004).

Kelompok B sebagai kontrol positif menunjukkan erosi sel epitel paling parah, berbeda dengan kelompok terapi omega-3 yang terlihat mengalami perbaikan berdasarkan gambaran histopatologi bronkus (**Gambar 5.2 C**). Erosi sel epitel bronkus pada kelompok C terlihat mengalami kerusakan lebih ringan dibandingkan dengan kelompok B. Erosi sel epitel pada kelompok D (**Gambar 5.2 D**) lebih ringan dibandingkan dengan kelompok C. Kelompok E mengalami erosi sel epitel yang paling ringan dibandingkan dengan kelompok D, C, atau pun B.

Hasil dari kedua histopatologi bronkus menunjukkan bahwa kelompok E (**Gambar 5.2 E**) merupakan kelompok yang mengalami perbaikan jaringan paling

baik dibandingkan dengan kelompok C dan kelompok D dengan dosis terapi omega-3 sebesar 70mg/ekor/hari. Perbaikan gambaran histopatologi yaitu kelompok E mengalami perbaikan pada sel epitel kolumner simpleks bersilia hingga menyerupai kelompok kontrol negatif.

Hal tersebut tidak lepas dari aktivitas DHA dan EPA dalam omega-3. Berdasarkan penelitian Koch (2009) bahwa DHA dengan dosis yang sesuai mampu menghambat IL-4 mendorong diferensiasi IgE. *Immunoglobuline-E* pada bronkus yang tidak berdeferensiasi kemudian tidak berikatan dengan sel mast mengakibatkan sitokin pro-inflamasi dan histamin tidak lagi diproduksi pada bronkus sehingga akan mengurangi terjadinya inflamasi. Sementara itu, EPA memiliki peran sebagai anti-inflamasi yang bekerja dengan mengikat COX dan LOX sehingga terjadi penurunan PGE₂ dan LTB₄ pada bronkus, akibatnya mediator inflamasi tidak terbentuk sehingga kerusakan sel berkurang (Siriwardhana *et al.*, 2012). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa omega-3 mampu memperbaiki kerusakan histopatologi bronkus mendekati kelompok kontrol negatif dengan dosis terbaik yaitu dosis tertinggi omega-3 sebesar 70mg/ekor/hari (kelompok E **Gambar 5.2 E**). Omega-3 yang diberikan memiliki efek sebagai antiinflamasi yang bekerja dengan mencegah asam arakidonat (AA) mengikat COX-1 menjadi COX-2 yang dapat mengakibatkan inflamasi. Kandungan EPA yang terdapat pada omega-3 dapat mengikat COX-1 dan COX-2 untuk mengurangi inflamasi dan secara tidak langsung EPA dan DHA yang terkandung pada omega-3 dapat menekan kemampuan sel mast dalam

menghasilkan IL-1 pada jaringan sehingga dapat mempercepat adanya regenerasi pada sel epitel bronkus.

