

**TERAPI AIR MINUM DALAM KEMASAN YANG MENGANDUNG  
OKSIGEN PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL ASMA YANG  
DIINDUKSI LPS DAN OVALBUMIN TERHADAP  
HISTOPATOLOGI TRAKEA DAN  
EKSPRESI TNF- $\alpha$**

**SKRIPSI**

**Oleh:**

**YOHANA LEURICHA**

**125130101111071**



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2016**

**TERAPI AIR MINUM DALAM KEMASAN YANG MENGANDUNG OKSIGEN  
PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL ASMA YANG DIINDUKSI  
LPS DAN OVALBUMIN TERHADAP HISTOPATOLOGI  
TRAKEA DAN EKSPRESI TNF- $\alpha$**

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

**Oleh:**

**YOHANA LEURICHA**

**125130101111071**



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2016**

## LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

### TERAPI AIR MINUM DALAM KEMASAN YANG MENGANDUNG OKSIGEN PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL ASMA YANG DIINDUKSI LPS DAN OVALBUMIN TERHADAP HISTOPATOLOGI TRAKEA DAN EKSPRESI TNF- $\alpha$

Oleh:

**YOHANA LEURICHA**  
NIM. 125130101111071

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
pada tanggal 8 September 2016  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Dosen Pembimbing I

Dosen Pembimbing II

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

**Wibi Riawan, S.Si., M.Sc**  
NIP 197701312 00501 1 001

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya

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

## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Yohana Leuricha

NIM : 125130101111071

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

Terapi Air Minum dalam Kemasan yang Mengandung Oksigen pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Asma yang Diinduksi LPS Dan Ovalbumin terhadap Histopatologi Trakea dan Ekspresi TNF- $\alpha$

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub diisi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 15 September 2016

Yang menyatakan

**Yohana Leuricha**

NIM. 125130101111071

## TERAPI AIR MINUM DALAM KEMASAN YANG MENGANDUNG OKSIGEN PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL ASMA YANG DIINDUKSI LPS DAN OVALBUMIN TERHADAP HISTOPATOLOGI TRAKEA DAN EKSPRESI TNF- $\alpha$

### ABSTRAK

Asma merupakan suatu penyakit inflamasi bersifat kronik yang dapat menyebabkan penyempitan pada saluran pernapasan bagian atas maupun bawah. Keparahan asma dapat meningkat karena adanya endotoksin lipopolisakarida (LPS) dari bakteri gram negatif. Penelitian ini menggunakan air dalam kemasan yang mengandung oksigen untuk terapi pada hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) model asma. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui gambaran histopatologi organ trakea dan ekspresi TNF- $\alpha$  pada hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) model asma setelah diberi terapi air minum dalam kemasan yang mengandung oksigen. Penelitian ini menggunakan empat kelompok perlakuan diantaranya kelompok A (kontrol negatif), kelompok B (kontrol positif), kelompok C (volume terapi 1mL/ekor/hari) dan kelompok D (volume terapi 2 mL/ekor/hari). Tikus model asma disiapkan dengan cara pemberian sensitasi alergi dengan ovalbumin (OVA) dengan konsentrasi 10  $\mu\text{g/mL}$  yang diemulsi dengan  $\text{AlOH}_3$  1,5 mg dan dilarutkan dalam PBS secara intraperitoneal serta pemberian Ovalbumin secara inhalasi dengan konsentrasi 1 mg/ mL yang dilarutkan dengan NaCl fisiologis. Reaksi asma diperparah dengan pemberian Lipopolisakarida (LPS) dari *Phorphyromonas gingivalis* dengan konsentrasi 1  $\mu\text{g/mL}$  yang dilarutkan dengan PBS dan diberikan secara intrasulkular. Gambaran histopatologi trakea dianalisa dengan metode pewarnaan HE yang diamati struktur sel epitelnya menggunakan mikroskop dan ekspresi TNF- $\alpha$  dengan metode imunohistokimia. Ekspresi TNF- $\alpha$  dianalisa menggunakan uji One Way ANOVA dan dilanjutkan dengan uji Tuckey ( $P < 0,05$ ). Hasil penelitian menunjukkan bahwa terapi air minum dalam kemasan yang mengandung oksigen dengan volume 2mL/ekor/hari secara tidak signifikan ( $P > 0,05$ ) mempengaruhi perubahan struktur sel epitel pada gambaran histopatologi trakea dan kenaikan ekspresi TNF- $\alpha$ . Kesimpulan dari penelitian ini yaitu terapi air minum dalam kemasan yang mengandung oksigen dengan volume 2 mL/ekor/hari dapat memperbaiki struktur sel epitel dan menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  pada organ trakea.

**Kata kunci:** Asma, air minum dalam kemasan yang mengandung oksigen, histopatologi trakea dan ekspresi TNF- $\alpha$

repository.ub.ac.id

## PACKAGED OXYGENATED WATER TREATMENT IN RAT ASTHMA MODELS WHICH INDUCED BY LPS AND OVALBUMIN ON TRACHEA HISTOPATHOLOGY AND TNF- $\alpha$ EXPRESSION

### ABSTRACT

Asthma is an chronic inflammatory disease which can cause the narrowing of the upper and lower respiratory tract. Asthma severity can be increased by lipopolysaccharide (LPS) endotoxin of gram-negative bacteria. This research is using bottled water that contains oxygen for therapy in rats (*Rattus norvegicus*) asthma model. The purpose of this study is to describe the histopathology of trachea and the expression of TNF- $\alpha$  in rats (*Rattus norvegicus*) model of asthma after the therapy were given. This study used four treatment groups including group A (negative control), group B (positive control), group C (therapy volume 1mL / head / day) and group D (therapy volume of 2 mL / head / day). Rat models of asthma were prepared by allergic sensitization to ovalbumin (OVA) with a concentration of 10 ug / mL which is emulsified with AIOH3 1.5 mg and dissolved in PBS intraperitoneally as well as the administration of inhaled Ovalbumin concentration of 1 mg / mL which is dissolved with NaCl. Asthma reaction were exacerbated by the administration of lipopolysaccharide (LPS) of *Phorphyromonas gingivalis* at a concentration of 1 mg / mL which is diluted in PBS and administered intrasulcularly. Histopathologic features of the trachea which is analyzed by HE staining was the epithelial cell structure by using a microscope. TNF- $\alpha$  expression was viewed by immunohistochemical methods . The expression of TNF -  $\alpha$  then analyzed using One Way ANOVA which is followed by Tuckey test (P < 0.05). The results showed that the therapeutic mineral water containing oxygen by volume of 2 mL / head / day is not significant (P >0.05) in affecting the change in the structure of the epithelial cells in the trachea and increasing the expression of TNF -  $\alpha$  . The conclusion of this analysis is therapeutic mineral water containing oxygen by volume of 2 mL / head / day can improve the structure of epithelial cells and decreased the expression of TNF -  $\alpha$  in tracheal organ.

**Key word :** Asthma , Packaged oxygenated water, trachea histopathology and the expression of TNF -  $\alpha$

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan YME yang telah memberikan segala urusan manusia dan atas segala rahmat dan kasihNya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul Terapi Air Minum dalam Kemasan yang Mengandung Oksigen pada Tikus (*Rattus novergicus*) Model Asma yang diinduksi LPS dan Ovalbumin terhadap Histopatologi Trakea dan Ekspresi TNF- $\alpha$ .

Selama penelitian dan penyusunan skripsi ini, halangan dan rintangan terus menerus terjadi pada diri penulis, sehingga dalam penulisannya penulis melibatkan banyak pihak. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan terimakasih dan apresiasi setinggi-tingginya kepada:

1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku pembimbing I dan Bapak Wibi Irawan, S.Si., M.Sc selaku pembimbing II yang telah banyak memberikan bimbingan, nasihat dan arahan kepada penulis.
2. Drh. Ajeng Aeka, M.Sc selaku penguji I dan Ibu Dhita Evi Aryani, S.Farm, Apt selaku penguji II yang sudah memberikan saran, bimbingan dan kesabaran.
3. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan yang selalu memberikan dukungan dan motivasi yang tiada henti.
4. Ayahanda Bapak Boaz Wahono, Ibunda tercinta Ibu Yohana Fater Fiani, serta adik-adikku Kelent Daviane Wahono dan Martha Leona Elizabeth yang telah memberikan doa, kasih sayang dan dukungan yang tak terhingga kepada penulis.
5. Esalis Yhuszia Rinta, Wulandari, Lucky Retno Putri, Endang Rosidayanti, Nanda Ayu, Sarlita Nesti, Arsvinda, Violita dan Reza Albert Patria atas motivasi dan dukungan yang diberikan.
6. Kelompok praktikum yang selalu memberi dukungan dan semangat yaitu Heni Tri Rahmawati, Sely Fajar, Nadia Elfiana dan Abdul Mufid.
7. Teman-teman DBD 2012 yang telah bersama-sama berjuang dalam menggapai mimpi sebagai calon dokter hewan yang nantinya dapat menjadi berkat bagi masyarakat.
8. Keluarga besar PMK Veteriner yang selalu mendoakan dan memberi dukungan tiada henti, semoga mereka juga dapat lulus sebagai dokter hewan yang siap untuk melayani masyarakat.

9. Seluruh staf dan karyawan FKH, yang telah membantu proses administrasi dalam pembuatan tugas akhir penulis
10. Seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu oleh penulis baik motivasi, dukungan dan doa yang diberikan kepada penulis.

Akhirnya hanya kepada Tuhan YME kita kembalikan semua urusan dan semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak, khususnya bagi penulis dan para pembaca .

Malang, 15 September 2016

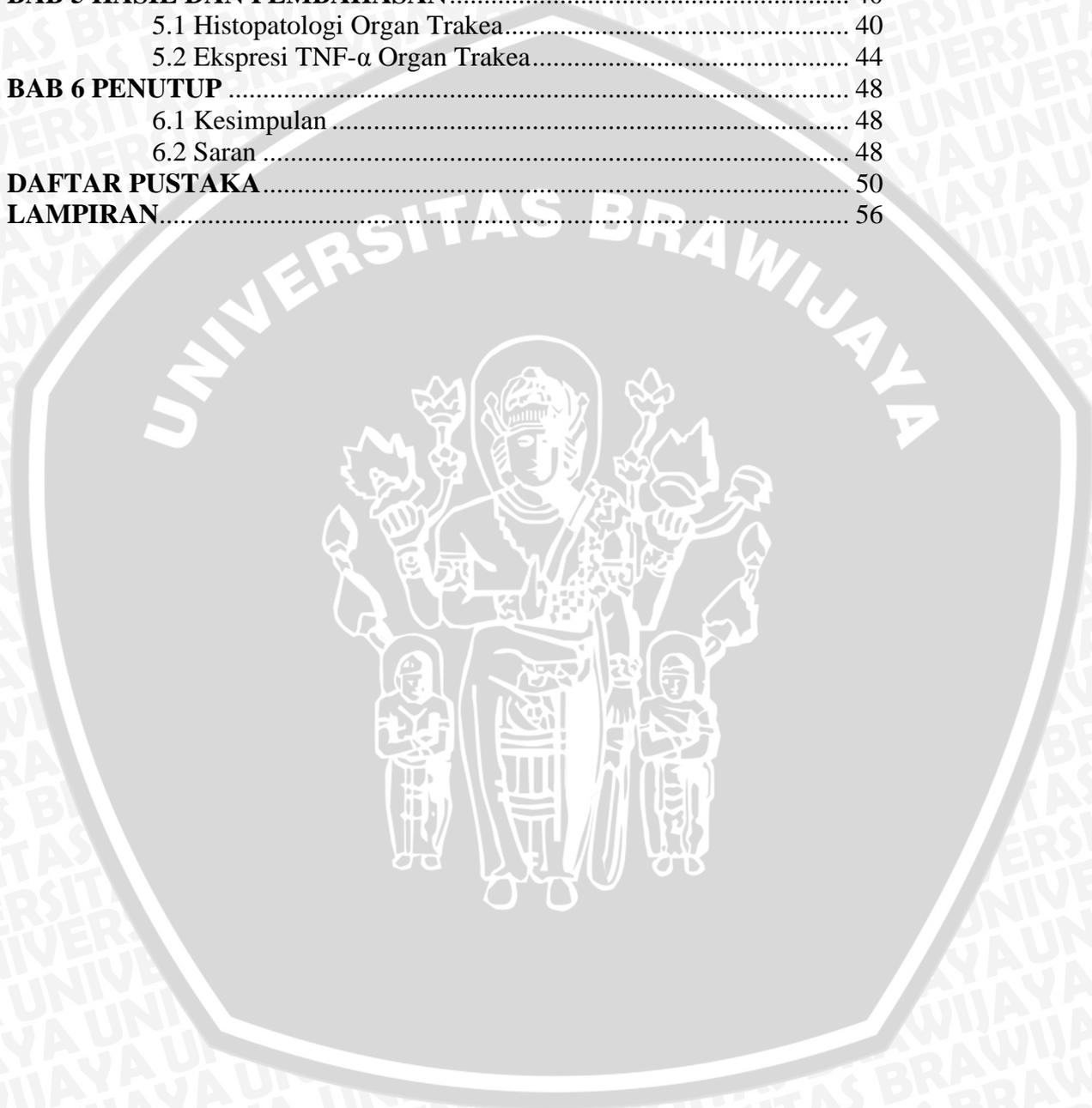
Penulis



## DAFTAR ISI

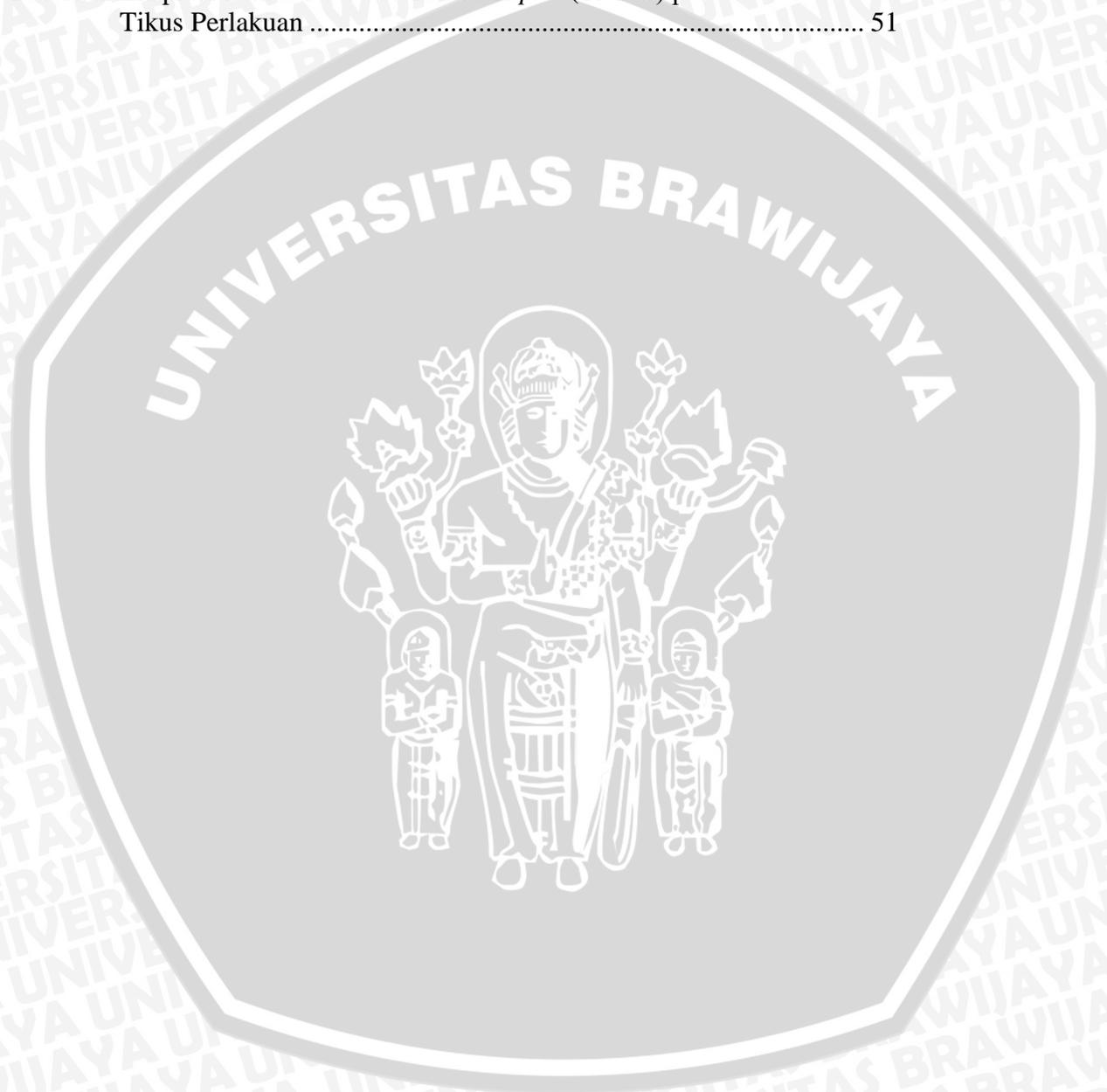
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	ii
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	iii
<b>ABSTRAK</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	vi
<b>DAFTAR ISI</b> .....	viii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	x
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xi
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xii
<b>DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG</b> .....	xiii
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
1.3 Batasan Masalah .....	4
1.4 Tujuan .....	5
1.5 Manfaat .....	6
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	7
2.1 Hewan Coba Tikus Model Asma .....	7
2.2 Patomekanisme Asma .....	8
2.3 Ovalbumin .....	12
2.4 Lipopolisakarida (LPS) .....	13
2.5 Air Minum dalam Kemasan yang Mengandung Oksigen 100 PPM .....	15
2.6 TNF- $\alpha$ .....	18
2.7 Gambaran Histopatologi Trakea .....	20
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN</b> .....	21
3.1 Kerangka Konsep .....	22
3.2 Hipotesis penelitian .....	28
<b>BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN</b> .....	30
4.1 Tempat dan waktu penelitian .....	30
4.2 Alat dan Bahan Penelitian .....	30
4.3 Sampel Penelitian .....	31
4.4 Rancangan Penelitian .....	31
4.5 Variabel Penelitian .....	32
4.6 Tahapan Penelitian .....	33
4.6.1 Persiapan Hewan Coba .....	33
4.6.2 Tatalaksana Sensitasi Alergi dengan Ovalbumin .....	33
4.6.3 Tatalaksana Injeksi Lipopolisakarida (LPS) .....	34
4.6.4 Tatalaksana Terapi Air Minum dalam Kemasan yang Mengandung Oksigen 100 PPM .....	34
4.6.5 Isolasi Organ Trakea .....	35
4.6.6 Pembuatan Preparat Histopatologi .....	35
4.6.7 Pembuatan Preparat Imunohistokimia .....	37

4.6.8 Cara Perhitungan Hasil Imunohistokimia TNF- $\alpha$ .....	38
4.6.9 Pengamatan Preparat Histopatologi dan Imunohistokima.....	38
4.7 Analisis Data.....	39
<b>BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	40
5.1 Histopatologi Organ Trakea.....	40
5.2 Ekspresi TNF- $\alpha$ Organ Trakea.....	44
<b>BAB 6 PENUTUP</b> .....	48
6.1 Kesimpulan .....	48
6.2 Saran .....	48
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	50
<b>LAMPIRAN</b> .....	56



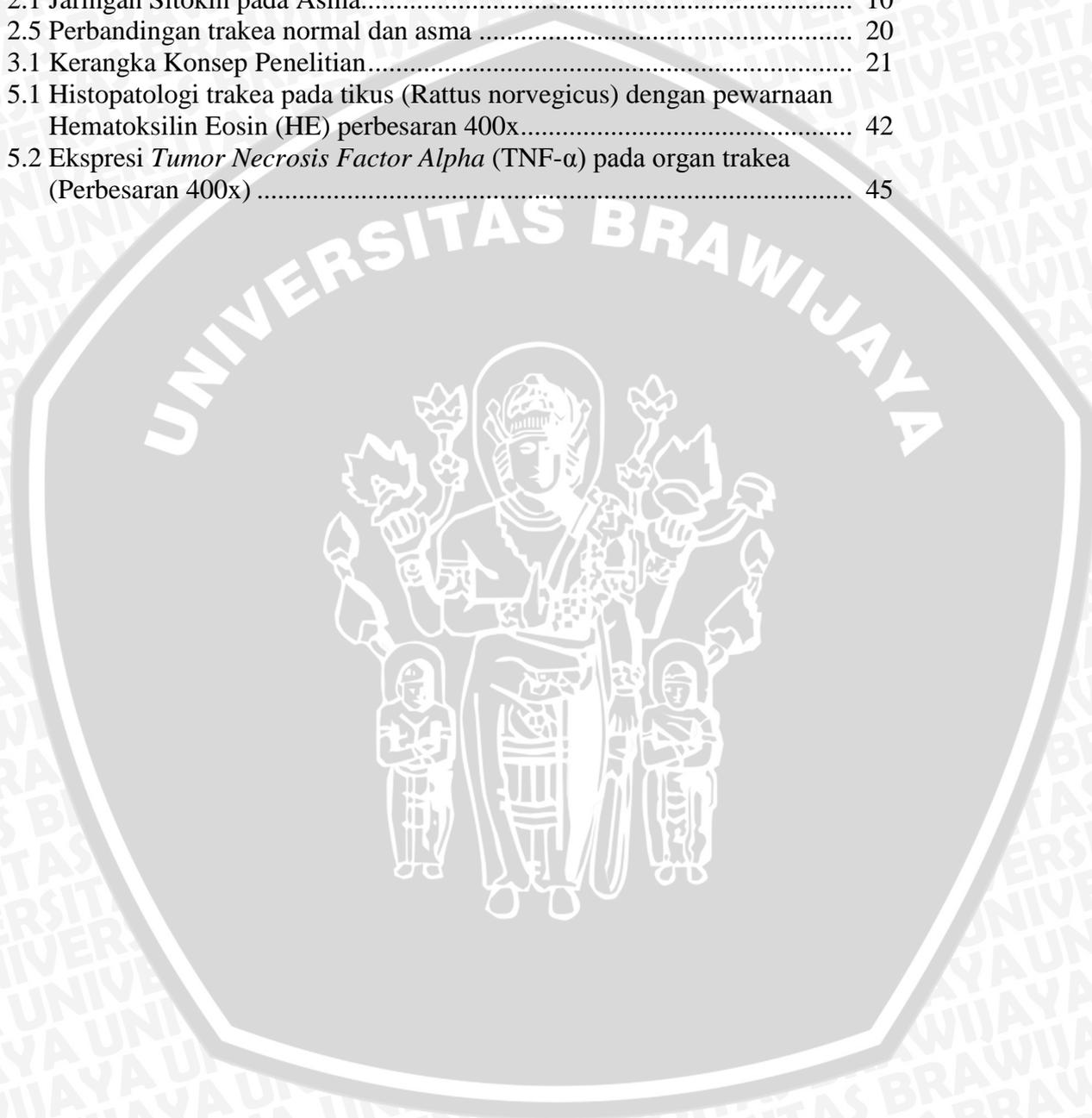
## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
Tabel 4.1 Rancangan penelitian.....	30
Tabel 5.2 Ekspresi <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i> (TNF- $\alpha$ ) pada Tikus Perlakuan .....	51



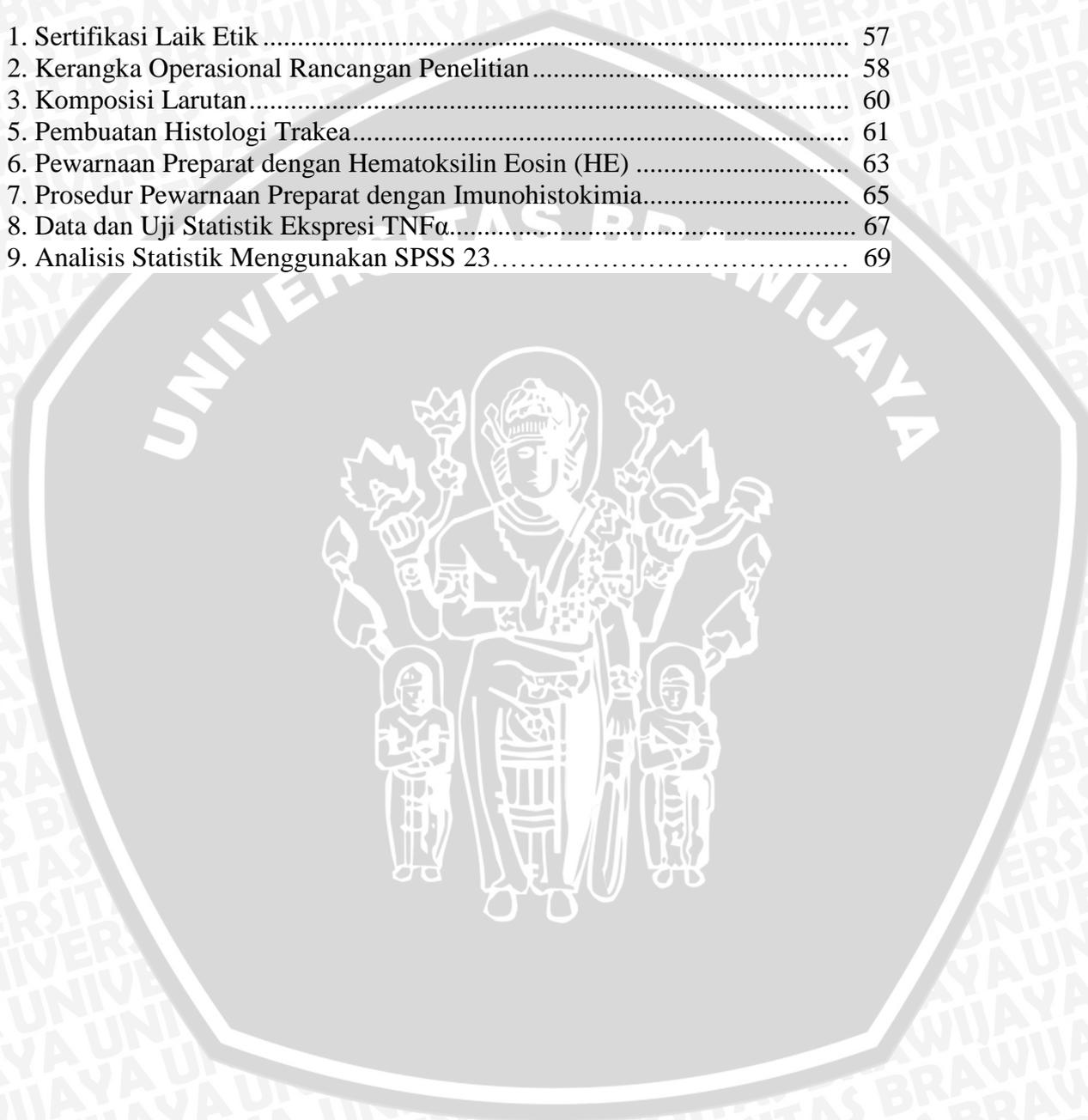
## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar</b>	<b>Halaman</b>
2.1 Jaringan Sitokin pada Asma.....	10
2.5 Perbandingan trakea normal dan asma .....	20
3.1 Kerangka Konsep Penelitian.....	21
5.1 Histopatologi trakea pada tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) dengan pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE) perbesaran 400x.....	42
5.2 Ekspresi <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i> (TNF- $\alpha$ ) pada organ trakea (Perbesaran 400x) .....	45



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Sertifikasi Laik Etik .....	57
2. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian .....	58
3. Komposisi Larutan .....	60
5. Pembuatan Histologi Trakea.....	61
6. Pewarnaan Preparat dengan Hematoksin Eosin (HE) .....	63
7. Prosedur Pewarnaan Preparat dengan Imunohistokimia.....	65
8. Data dan Uji Statistik Ekspresi TNF $\alpha$ .....	67
9. Analisis Statistik Menggunakan SPSS 23.....	69



## DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

### Simbol/Singkatan

### Keterangan

AMDK	Air Minum dalam Kemasan
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
APC	<i>Antigen Presenting Cells</i>
AP-1	<i>Activator Protein 1</i>
BB	Berat Badan
BNJ	Beda Nyata Jujur
CD14	<i>Cluster Of Differentiation</i>
CGRP	<i>Calcitonin Gene Related Peptide</i>
CSF	<i>Colony Stimulating Factor</i>
DAB	<i>Diamano Bezidine</i>
HE	Hematoksin-Eosin
IHK	Imunohistokimia
KDO	3-Deoxy-D-Mano-2-Octulosonate
LBP	<i>Lipopolysaccharide Binding Protein</i>
LPS	Lipopolisakarida
LT	Leukotrien
NF-kB	<i>Nuclear Factor-kB</i>
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrit
OVA	Ovalbumin
O <sub>2</sub>	Oksigen
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anion superoksida
ONOO <sup>-</sup>	Oksidan peroksinitrit
PAF	<i>Platelet Activating Factor</i>
PBS	Phosphat Buffer Saline
PET	<i>Polyethylene Terephthalate</i>
PFA	<i>Paraformaldehyde Acid</i>
PG	Prostaglandin
ppm	<i>Part Per Million</i>
RAL	Rancangan Acak Lengkap
RO	<i>Reverse Osmosis</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SA-HRP	<i>Strep Avidin Horse Radish Peroxidase</i>
Th	T Helper
TLR4	<i>Toll Like Receptor 4</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor- α</i>
TX	<i>Tromboxin</i>
UFO	Ultraviolet Filterisasi Ozonisasi
UPHP	Unit Pengembangan Hewan Percobaan

## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Asma merupakan suatu penyakit inflamasi bersifat kronik yang dapat menyebabkan penyempitan pada saluran pernapasan bagian atas maupun bawah. Organisasi kesehatan dunia (WHO) memperkirakan pada tahun 2011 terdapat 300 juta penduduk dunia menderita asma dan jumlahnya diperkirakan akan terus bertambah hingga mencapai 400 juta pasien penderita asma pada tahun 2025. Di Indonesia prevalensi penyakit asma diperkirakan mencapai 2-5% penduduk Indonesia. Hasil penelitian *International Study on Asthma and Allergies in Childhood* menunjukkan bahwa di Indonesia prevalensi penyakit asma meningkat dari 5,4% pada tahun 2003 menjadi sebesar 7,5% pada tahun 2013 (Oemiati, 2010).

Seperti halnya pada manusia, asma juga bisa terjadi pada hewan terutama anjing dan kucing di semua usia (Foster, *et al.*, 2004). Namun, ternyata kucing merupakan hewan yang paling banyak menderita asma atau dikenal sebagai *Allergic Feline Asthma* (Miklosi, 2007). Pada bulan Januari 2012, tercatat adanya peningkatan jumlah kasus *Allergic Feline Asthma* sebanyak 1004 kasus dan pada bulan Februari 2012 tercatat ada 1353 kasus pada salah satu klinik kucing di Amerika yang ditangani oleh Wexler – Mitchell, DVM. Gejala klinis yang umum dialami hewan antara lain batuk dan sesak napas ( Foster, *et al.*, 2004).

Faktor penyebab asma dapat dibedakan menjadi menjadi dua, yaitu faktor genetik dan faktor lingkungan. Penyakit asma berasal dari genetik

sebesar 30% dan 70% disebabkan oleh berbagai faktor lainnya seperti lingkungan (Oemiati, 2010). Lingkungan adalah faktor terbesar penyebab asma, diantaranya akibat udara yang tercemar seperti polusi udara dapat menyebabkan gangguan pernapasan pada kucing, dan adanya infeksi pada rongga mulut yang dapat meningkatkan keparahan asma (Warouw, 2008). Keparahan asma dapat meningkat karena adanya lipopolisakarida (LPS) yang berasal dari bakteri gram negatif yaitu *Phorphyromonas gingivalis* (68%) yang banyak dijumpai pada plak gigi kucing dan anjing (Utomo, 2012). Bakteri gram negatif mampu menginduksi inflamasi pada saluran pernapasan sehingga menyebabkan gangguan yang serius (Warouw, 2008). Senyawa mediator pada inflamasi yang dapat dilepaskan setelah masuknya faktor pemicu asma antara lain eosinofil, makrofag, monosit dan sitokin proinflamatori seperti IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  dan prostaglandin (Caramori dan Papi, 2012).

Bukti menunjukkan bahwa TNF-  $\alpha$  merupakan elemen penting dalam menentukan derajat keparahan asma. Pengaruh TNF-  $\alpha$  diantaranya rekrutmen leukosit melalui pengaturan molekul adhesi pada sel endotel vaskuler dan merangsang sintesis sitokin dan kemokin. Sitokin TNF-  $\alpha$  juga bisa merangsang sel mesenkim seperti fibroblas atau sel otot polos. Otot polos merupakan penyusun trakea dimana otot polos berfungsi untuk mengontrol kontraksi dan relaksasi trakea (Priyantoro, dkk, 2004). Kerusakan yang terjadi pada otot polos trakea tikus putih (*Rattus norvegicus*) akibat paparan

ovalbumin dan lipopolisakarida (LPS) dapat diketahui melalui pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE).

Pengetahuan mengenai patogenesis asma sudah sangat maju serta obat-obatan anti asma juga telah tersedia, namun beberapa negara maju masih melaporkan prevalensi, morbiditas dan mortalitas penderita asma yang masih tinggi. Pada dasarnya pengobatan asma terdiri dari dua kategori yaitu: obat-obat yang bekerja sebagai penghambat kontraksi otot polos saluran nafas (bronkodilator) dan obat-obat yang mencegah dan mengurangi inflamasi. Obat-obatan bronkodilator contohnya *adrenergic* agonis, derivat xantin dan antikolinergik, sedangkan obat-obatan yang mencegah dan mengurangi inflamasi contohnya glukokortikoid, penghambat leukotrin serta *mast cell-stabilizing agent*. Namun, seringkali obat-obatan kimia tersebut memiliki efek yang nyata yang dapat membahayakan tubuh (Priyantoro, dkk, 2004).

Minuman beroksigen adalah minuman yang mengandung oksigen 7-10 kali lebih banyak dari air biasa. Air beroksigen ini mampu berdifusi ke dalam darah melalui absorpsi di saluran respirasi dan mukosa lainnya setelah dikonsumsi. Sehingga diharapkan air tersebut dapat memberikan tambahan oksigen yang dapat meningkatkan frekuensi napas, dan fungsi paru tidak menurun. Pemberian minuman beroksigen dapat mengurangi hipoksia termasuk asma, mencegah hipoventilasi karena penurunan fungsi saluran napas dan lain-lain (Matondang, 2008).

## 1.2 Rumusan Masalah

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

- 1). Apakah terapi air minum dalam kemasan yang mengandung oksigen 100 ppm dapat menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  di jaringan trakea pada tikus (*Rattus norvegicus*) model asma yang terpapar LPS dan ovalbumin ?
- 2). Apakah terapi air minum dalam kemasan yang mengandung oksigen 100 ppm dapat menurunkan kerusakan stuktur sel epitel trakea pada gambaran histopatologi pada tikus (*Rattus norvegicus*) model asma yang terpapar LPS dan ovalbumin ?

## 1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka penelitian ini dibatasi pada:

- 1). Hewan model yang digunakan ialah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar yang diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) D'Wistar Bandung dengan umur 8-12 minggu dengan berat badan 150-250 gram.
- 2). Pembuatan keadaan asma pada hewan model tikus dilakukan dengan cara injeksi secara intraperitoneal dan inhalasi ovalbumin (OVA) serta diperparah dengan Lipopolisakarida (LPS) bakteri *Porphyromonas gingivalis* diberikan dengan cara injeksi intrasulkular dengan dosis 1 $\mu$ g/mL (Utomo, 2012).

- 3). Air minum dalam kemasan yang mengandung oksigen 100 ppm didapatkan dari salah satu produsen air mineral di Pasuruan, Jawa timur.
- 4). Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah ekspresi TNF- $\alpha$  dengan teknik imunohistokimia dan gambaran histopatologi trakea dengan menggunakan teknik pewarnaan HE.

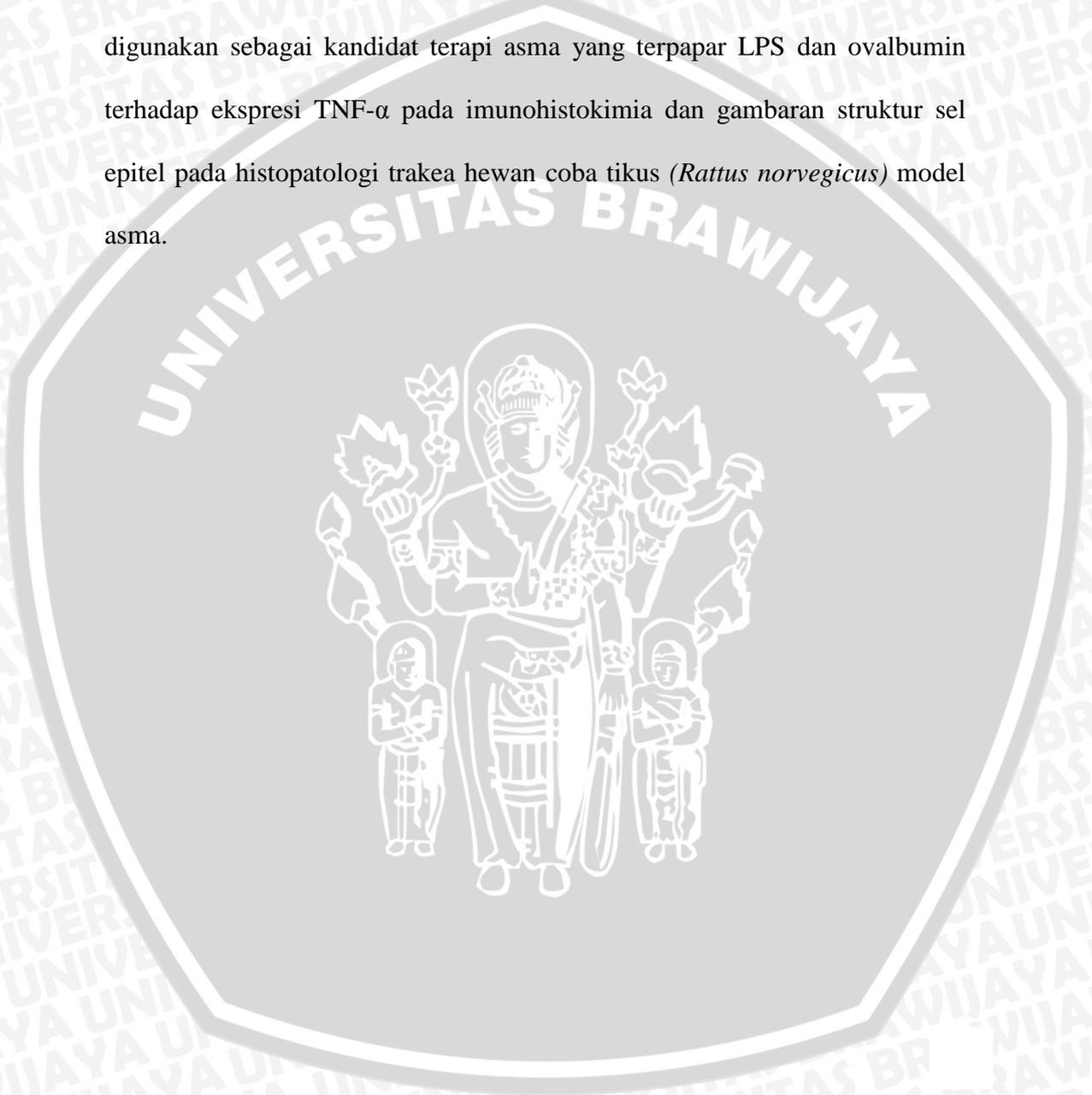
#### 1.4 Tujuan

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

- 1). Mengetahui pengaruh pemberian air minum dalam kemasan yang mengandung oksigen 100 ppm terhadap ekspresi TNF-  $\alpha$  dengan gambaran imunohistokimia pada hewan tikus (*Rattus norvegicus*) model asma yang diinduksi LPS dan ovalbumin.
- 2). Mengetahui pengaruh pemberian air minum dalam kemasan yang mengandung oksigen 100 ppm terhadap gambaran struktur sel epitel pada histopatologi trakea hewan tikus (*Rattus norvegicus*) model asma yang diinduksi LPS dan ovalbumin.

### 1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk membuktikan pengaruh pemberian air minum dalam kemasan yang mengandung oksigen 100 ppm dapat digunakan sebagai kandidat terapi asma yang terpapar LPS dan ovalbumin terhadap ekspresi TNF- $\alpha$  pada imunohistokimia dan gambaran struktur sel epitel pada histopatologi trakea hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) model asma.



## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Hewan Coba Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Asma

Peran hewan coba sebagai hewan model dalam penelitian-penelitian ilmiah telah menjadi sejarah panjang dalam upaya para peneliti menyelamatkan manusia dan lingkungannya. Salah satu hewan coba yang banyak digunakan dalam penelitian adalah tikus (*Rattus norvegicus*) (Lickteig, *et al.*, 2007). Pengembangan hewan model untuk penyakit alergi seperti rinitis, asma dan berbagai alergi yang diakibatkan oleh makanan telah banyak dilakukan pada tikus (Nials dan Uddin, 2008). Penggunaan hewan coba tikus sebagai model asma dikarenakan tikus memiliki keunggulan dalam produksi IgE yang merupakan antibodi anafilaksis terbesar dan memiliki kemampuan untuk mengalami *airway* hipereaktivitas yang lebih lama (Zosky, *et al.*, 2007). Penelitian yang dilakukan oleh Liu *et al.*, (2005) mengatakan bahwa untuk menimbulkan asma pada hewan tikus (*Rattus norvegicus*) dapat diberikan paparan OVA secara intraperitoneal dan inhalasi.

Tikus (*Rattus norvegicus*) digunakan sebagai hewan coba pada penelitian dikarenakan hewan tersebut memiliki kemiripan fungsi dan bentuk organ yang sama dengan manusia. Selain itu, tikus (*Rattus norvegicus*) memiliki kebutuhan asam amino esensial, proses biokimia dan biofisik yang sama dengan manusia (Hendrik, 2006). Tikus (*Rattus norvegicus*) galur wistar dapat mencapai panjang sekitar 40 cm yang diukur dari hidung sampai ujung ekor dan berat badan mencapai 140-500 gram. Tikus betina biasanya

memiliki ukuran lebih kecil dari tikus jantan dan memiliki kematangan seksual pada umur 4 bulan dan dapat hidup selama 4 tahun (Kusumawati, 2004). Pada percobaan digunakan tikus jantan sebagai hewan coba karena tikus jantan dapat memberikan hasil penelitian yang lebih stabil karena tidak dipengaruhi oleh adanya siklus menstruasi dan kebuntingan seperti pada tikus betina. Tikus jantan juga mempunyai kecepatan metabolisme obat yang lebih cepat dan kondisi biologis tubuh yang lebih stabil dibanding tikus betina (Sugiyanto, 1995).

Menurut Myers dan Armitage (2004), sistem klasifikasi tikus (*Rattus norvegicus*) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Subordo	: Myomorpha
Famili	: Muridae
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>
Galur	: Wistar

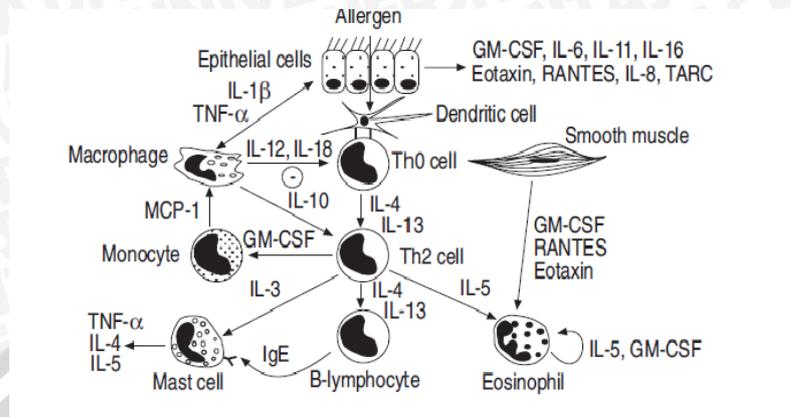
## 2.2 Patomekanisme Asma

Asma adalah suatu penyakit jalan nafas obstruktif intermiten, reversibel, dimana trakea dan bronkus berespon secara hiperaktif terhadap

stimuli tertentu. Asma dimanifestasikan dengan penyempitan jalan nafas yang mengakibatkan dispnea, batuk dan mengi (Smeltzer dan Bare, 2002). Asma dapat bersifat akut atau kronis sesuai dengan rangsangannya. Keterbatasan aliran udara yang bersifat akut dapat terjadi oleh karena saluran pernapasan pada pasien asma yang sangat hiperesponsif terhadap bermacam-macam jenis rangsangan. Pada kasus asma akut, mekanisme menyebabkan bronkokonstriksi yang terdiri dari kombinasi antara pelepasan mediator sel inflamasi dan rangsangan yang bersifat lokal atau refleks saraf pusat. Akibatnya keterbatasan aliran udara timbul oleh karena adanya pembengkakan dinding saluran napas dengan atau tanpa kontraksi otot polos. Sedangkan pada asma yang bersifat kronis saluran napas ditandai dengan mengi episodik, batuk, dan sesak di dada akibat penyumbatan saluran napas (Rengganis dan Indri, 2008).

Awal terjadinya reaksi asma tersebut sebenarnya dimulai dengan respon pengenalan oleh sel makrofag dan atau sel dendritik. Sel-sel penyaji antigen APC (*Antigen Presenting Cells*) seperti sel dendrit, makrofag dan limfosit B yang berada di epitel saluran nafas berperan sebagai sel penyaji alergen yang menempel ke mukosa hidung. Makrofag diaktivasi oleh LPS yang ditangkap oleh *lipopolysaccharide binding protein* (LBP) lewat reseptor permukaan *cluster of differentiation 14* (CD14). LPS mampu mengaktivasi sistem imun bawaan dengan menstimulasi *toll like receptor 4* (TLR4) yang merupakan protein pada permukaan sel yang dapat mengenali produk bakteri (Bascones dan Figuero, 2005).

Asma dapat terjadi melalui dua jalur, yaitu jalur imunologis dan saraf otonom. Pada jalur yang didominasi oleh IgE, masuknya alergen ke dalam tubuh akan diolah oleh APC (*Antigen Presenting Cells*), kemudian hasil olahan alergen akan dikomunikasikan kepada sel Th terutama Th2. Sel Th inilah yang akan memberikan instruksi melalui interleukin atau sitokin seperti interleukin IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, dan TNF- $\alpha$  (Sundaru, 2002; Busse dan Lemanske, 2001). Sel-sel plasma membentuk IgE, sel-sel radang lain seperti mastosit, makrofag, sel epitel, eosinofil, neutrofil, trombosit serta limfosit untuk mengeluarkan mediator inflamasi seperti histamin, prostaglandin (PG), leukotrien (LT), *platelet activating factor* (PAF), bradikinin, tromboksin (TX) dan lain-lain (Gambar 2.1). Sel-sel ini bekerja dengan mempengaruhi organ sasaran yang dapat menginduksi kontraksi otot polos saluran pernapasan sehingga menyebabkan peningkatan permeabilitas dinding vaskular, edema saluran napas, infiltrasi sel-sel radang, hipersekresi mukus, keluarnya plasma protein melalui mikrovaskuler bronkus dan fibrosis sub epitel sehingga menimbulkan hipereaktivitas saluran napas .



**Gambar 2.1** Jaringan sitokin pada asma. Banyak sitokin inflamasi dilepaskan dari inflamasi dan sel struktural dalam jalan napas dan mengatur dan mengabadikan respon inflamasi. TNF: tumor necrosis factor; IL: interleukin; GM-CSF: granulosit-makrofag colony-stimulating factor; RANTES: diatur pada -sel T aktivasi diungkapkan dan disekresikan; MCP: monosit protein chemotactic; TARC: timus dan aktivasi diatur kemokin; PDGF: faktor pertumbuhan platelet diturunkan; EGF: faktor pertumbuhan endotel; FGF: fibroblast faktor pertumbuhan; IGF: faktor pertumbuhan insulin-seperti; Th: T-helper (Kelly, *et al.*, 2000).

Pada jalur saraf otonom, inhalasi alergen akan mengaktifkan sel mast intralumen, makrofag alveolar, nervus vagus dan mungkin juga epitel saluran napas. Peregangan vagal menyebabkan refleks bronkus, sedangkan mediator inflamasi yang dilepaskan oleh sel mast dan makrofag akan membuat epitel jalan napas lebih permeabel dan memudahkan alergen masuk ke dalam submukosa sehingga meningkatkan reaksi yang terjadi. Kerusakan epitel bronkus oleh mediator yang dilepaskan pada beberapa keadaan reaksi asma dapat terjadi tanpa melibatkan sel mast misalnya pada hiperventilasi, inhalasi udara dingin, asap dan kabut. Pada keadaan tersebut reaksi asma terjadi melalui refleks saraf. Ujung saraf eferen vagal mukosa yang terangsang menyebabkan pelepasan neuropeptid sensorik senyawa P, neurokinin A dan calcitonin gene related peptide (CGRP). Neuropeptida itulah yang

menyebabkan terjadinya bronkokonstriksi, edema bronkus, eksudasi plasma, hipersekresi lendir dan aktivasi sel-sel inflamasi (Rengganis dan Indri, 2008). Sistem saraf otonom mempersarafi paru, tonus otot bronkial diatur oleh impuls saraf vagal melalui sistem parasimpatis. Pada asma idiopatik, ketika ujung saraf pada jalan napas dirangsang oleh faktor pencetus maka akan meningkatkan pelepasan jumlah asetilkolin. Hal ini menyebabkan bronkokonstriksi juga merangsang pembentukan mediator kimiawi (Smeltzer dan Bare, 2002).

### 2.3 Ovalbumin

Ovalbumin sebagai bahan yang dapat merangsang pembentukan respon imun ke arah  $Th_2$  dominan, merupakan protein utama yang berasal dari putih telur ayam berupa glikoprotein dengan berat molekul 45.000 dalton (Ngestiningsih, dkk., 2003). Melalui berbagai penelitian dengan hewan coba, OVA telah terbukti dapat digunakan sebagai alergen untuk menimbulkan reaksi hipersensitivitas tipe I (misalnya asma). Pemberian OVA pertama kalinya merangsang sel B untuk menghasilkan IgE dengan bantuan sel T helper (Th). Immunoglobulin ini selanjutnya akan menempel pada permukaan sel mast. Pemberian OVA yang kedua akan menyebabkan terjadinya ikatan antara OVA (sebagai antigen) dengan IgE (sebagai antibodi) yang ada di permukaan sel mast. Hal ini dapat memacu terjadinya degranulasi sel mast sehingga terlepaslah mediator-mediator yang terkandung dalam sel mast seperti: histamin, prostaglandin, leukotrien, *Eosinophile chemotactic factor-*

A/ECF-A dan beberapa macam sitokin misalnya TNF $\alpha$ , IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 (Muthmainah, 2011).

Ovalbumin merupakan alergen yang bertanggungjawab terhadap terjadinya reaksi alergi tipe 1. Ovalbumin sebagai bahan yang sering dipakai pada banyak penelitian untuk mengarahkan respon imun seluler ke arah Th<sub>2</sub> dominan dapat diberikan secara inhalasi, oral maupun intraperitoneal. Sensitisasi dengan ovalbumin baik secara inhalasi, oral maupun intraperitoneal terbukti dapat merubah kecenderungan respon imun menciit ke arah Th<sub>2</sub> (Ngestiningsih, dkk., 2003). Alergen yang banyak digunakan untuk asma ialah ovalbumin (OVA) dengan alumunium hidroksida AlOH<sub>3</sub> sebagai adjuvant (Nials dan Uddin, 2008).

#### 2.4 Lipopolisakarida (LPS)

Lipopolisakarida (LPS) merupakan komponen utama membran luar bakteri gram negatif (Erbs dan Newman, 2003). LPS berfungsi sebagai pengatur permeabilitas membran, pelindung dan penghalang impermeabel bagi masuknya komponen berbahaya kedalam sel bakteri serta terlibat dalam mekanisme pertahanan bakteri dari lingkungan (Dow, *et al.*, 2000; Newman, *et al.*, 2001).

Struktur LPS terdiri dari tiga bagian utama yaitu lipid A, inti oligosakarida dan rantai polisakarida dengan unit berulang yang disebut rantai-O spesifik (O-antigen) (Erbs dan Newman, 2003; Agrios, 2005). Lipid A merupakan bagian terdalam dari struktur LPS yang melekatkan LPS pada

membran. Bagian lipid A tersusun atas fosfolipid dengan rantai panjang *hydroxyfatty acids*. Lipid A terhubung dengan bagian inti oligosakarida, yang dihubungkan oleh gula *3-deoxy-D-manno-2-octulosonate* (KDO). Bagian inti oligosakarida terdiri dari rangkaian gula yang pendek dan diakhiri oleh bagian O-antigen. O-antigen merupakan bagian terluar LPS. O-antigen merupakan komponen immunodominan (komponen antigenik) pada permukaan sel bakteri (Sigeo, 1993; Dow, *et al.*, 2000; Newman, *et al.*, 2001; Erbs dan Newman, 2003).

Lipopolisakarida (LPS) adalah dinding sel bakteri gram negatif yang mampu memperparah asma. Lipopolisakarida dapat digunakan untuk memperparah kejadian asma yang berasal dari LPS bakteri *Phorpyromonas gingivalis*. Menurut Utomo (2006), bahwa 80% bakteri *Phorpyromonas gingivalis* biasanya terdapat di rongga mulut. Lipopolisakarida pada infeksi rongga mulut yang berperan sebagai alergen dapat memodulasi terjadinya inflamasi pada saluran pernafasan dan peningkatan jumlah LPS pada lingkungan memiliki korelasi positif dengan peningkatan kejadian asma (Strohmeier, *et al.*, 2001). Selain itu, LPS mampu mengaktivasi sistem imun bawaan dengan menstimulasi toll like receptor 4 (TLR4) yang merupakan protein pada permukaan sel yang dapat mengenali produk bakteri (Bascones dan Figuero, 2005).

## 2.5 Air Minum dalam Kemasan yang Mengandung Oksigen 100 ppm

Air minum yang mengandung oksigen adalah air yang dengan sengaja dilakukan penambahan oksigen terlarut sehingga mengandung jumlah oksigen yang lebih banyak dibandingkan dengan air minum biasa. Air minum tersebut dapat mengurangi hipoksia termasuk asma akibat defisiensi oksigen didalam jaringan. Jumlah oksigen terlarut yang dikandung oleh air minum biasa umumnya adalah sebesar 7-12 ppm. Oleh karena itu, konsentrasi minimum oksigen terlarut di dalam produk air minum penambah oksigen telah ditetapkan paling sedikit sebesar 80 ppm (Matondang, 2008),

Prinsip proses produksi air minum penambah oksigen serupa dengan proses pembuatan air minum dalam kemasan (AMDK) secara umum, namun ada perbedaan mendasar, yaitu adanya penambahan oksigen terlarut yang diinjeksi ke dalam botol air minum tersebut. Pada tahap awal pembuatan dilakukan proses pemurnian air terlebih dahulu. Proses ini menggunakan sistem UFO (Ultraviolet, Filterisasi dan Ozonisasi) yang dikombinasikan dengan sistem RO (*Reverse Osmosis*) atau lebih sering disebut sebagai system UFO-RO.

Tahap pemurnian air diawali dengan cara mengalirkan air dari sumber mata air pegunungan ke tempat penampungan air berbentuk seperti kolam. Di tempat ini dilakukan proses pra-filterisasi dengan menggunakan silika. Tahap pra-filterisasi tidak dapat mereduksi logam berat, senyawa nitrit, bakteri, klorin, maupun endapan, tetapi hanya dapat menghilangkan pasir. Setelah itu ditambahkan karbon aktif ke dalam kolam penampungan untuk

menghilangkan bau, rasa dan senyawa kimia lain yang berbahaya. Air dilewatkan ke dalam filter mangan (*manganese filter*) untuk menghilangkan senyawa organik. Selanjutnya dilakukan proses filterisasi I dengan menggunakan penyaring (*filter*) yang diameter pori-porinya berukuran 5  $\mu\text{m}$ . Filterisasi I dilakukan untuk memisahkan molekul-molekul berukuran besar sehingga tidak dapat melewati filter tersebut.

Proses pemurnian berlanjut dengan tahap *reverse osmosis* yang lebih dikenal ultrafiltrasi (filtrasi tingkat tinggi) merupakan jenis proses filtrasi yang paling baik. Pada proses ini dilakukan penghilangan partikel-partikel kecil seperti bakteri, garam mineral, lemak, laktosa dan protein. *Reverse osmosis* menggunakan membran *semipermeable* dengan diameter pori-pori berukuran 0.001-0.0001 mikron ditambah dengan penggunaan tekanan tinggi 30-60 bar sehingga dapat melewati pelarut dengan konsentrasi tinggi ke konsentrasi yang lebih rendah (Purnama, 2004).

Prinsip kerja *reverse osmosis* adalah memisahkan zat-zat terlarut yang memiliki berat molekul rendah, seperti garam mineral dari larutan dengan menggunakan tekanan tinggi untuk mengatasi tekanan osmotik larutan. Tahap lanjutan dilakukan dengan menampung air di dalam tangki untuk menyeimbangkan tingkat keasaman atau pH menjadi 7.2-7.5. Air mengalami proses filtrasi II untuk mencegah cemaran yang timbul akibat proses penyeimbangan pH yang dilakukan sebelumnya. Kemudian dilakukan tahap *reverse osmosis* lanjutan dengan melewati air pada membran filter

menggunakan tekanan tinggi sehingga tercapai efisiensi pemisahan maksimum air dari zat-zat organik lainnya sebesar 100%. Setelah itu air dimasukkan kembali ke dalam tangki penampungan untuk diproses ozonisasi menggunakan sinar ultraviolet yang bertujuan untuk membunuh mikroorganisme yang masih lolos setelah proses *reverse osmosis*.

Setelah melalui tahap pemurnian maka air siap untuk diisi dengan oksigen. Air kemudian dimasukkan ke dalam kemasan khusus yang kedap, seperti botol PET (*Polyethylene Terephthalate*) yang tebal dengan penutup berlapis ganda pada bagian dalam. Sebelum diisi air, botol telah terlebih dahulu disterilisasi menggunakan sinar UV. Kemudian diinjeksikan oksigen sebanyak 80 mg/l bahkan lebih menggunakan tekanan tinggi lebih dari 1 bar (760 mmHg) pada suhu rendah. Proses injeksi dilakukan pada kondisi kedap udara, suhu rendah dan menggunakan tekanan tinggi. Botol air minum penambah oksigen langsung di-*sealing* di dalam kondisi kedap udara untuk mencegah terlepasnya molekul oksigen ke udara bebas (Zakaria, 2005).

Kadar oksigen terlarut air minum penambah oksigen dapat mencapai 80 ppm karena menggunakan teknologi pengemasan penjaga oksigen (*oxygen keeper technology*) yang memaksa oksigen untuk tetap larut sehingga menjamin pengikatan oksigen oleh molekul air secara sempurna (Ramadhani, 2009).

Hasil penelitian sebelumnya diketahui bahwa pada objek penelitian kelinci, air minum dengan kandungan oksigen 80 ppm dapat meningkatkan

tekanan  $O_2$  pada pembuluh vena porta hepatica sebesar 10 mmHg, yaitu dari 58 mmHg menjadi 68 mmHg (Forth dan Adam, 2001).

Setelah melewati pembuluh kapiler dan pembuluh vena usus, oksigen akan diteruskan menuju vena porta hepatica menuju organ hati. Selain vena porta hepatica yang menjadi pembuluh utama gabungan dari berbagai pembuluh vena saluran pencernaan, terdapat pembuluh arteri hepatica menuju jantung yang juga didominasi oleh gas oksigen yang berasal dari bilik kiri jantung.

Air minum dengan kandungan oksigen 80 ppm merupakan konsentrasi minimum yang ditetapkan. Oleh karena itu air oksigen 100 ppm diharapkan dapat bekerja lebih optimal dalam mengurangi hipoksia pada asma, relaksasi saluran pernapasan dan lain-lain. Hipoksia merupakan keadaan dimana terjadi defisiensi oksigen, yang dapat mengakibatkan kerusakan sel akibat penurunan respirasi oksidatif sel (Putri, 2009).

## 2.6 TNF- $\alpha$

TNF atau *tumor necrosis factor* merupakan sitokin utama pada respon inflamasi akut terhadap bakteri gram negatif dan mikroba lainnya. Infeksi yang berat dapat memicu produksi TNF dalam jumlah besar yang menimbulkan reaksi sistemik. TNF disebut TNF- $\alpha$  atas dasar historis dan untuk membedakannya dari TNF- $\beta$  atau limfotoksin. Sumber utama TNF adalah fagosit mononuklear dan sel T yang diaktifkan antigen, sel NK dan sel mast. LPS merupakan rangsangan poten terhadap makrofag untuk mensekresi

TNF. Pada kadar rendah, TNF bekerja terhadap leukosit dan endotel, menginduksi inflamasi akut. Pada kadar sedang, TNF berperan dalam inflamasi sistemik. Pada kadar tinggi, TNF menimbulkan kelainan patologi syok septik (Rengganis, 2014).

Pengaruh TNF- $\alpha$  diantaranya rekrutmen leukosit melalui pengaturan molekul adhesi pada sel endotel vaskuler dan merangsang sintesis sitokin dan kemokin. Sitokin TNF- $\alpha$  juga bisa merangsang sel mesenkim seperti fibroblas atau sel otot polos. Hal ini akan menyebabkan *airway remodelling*. Inhalasi TNF- $\alpha$  menyebabkan peningkatan hiperresponsivitas saluran napas dan jumlah neutrofil sputum (Amrani, *et al.*, 1996).

Bukti menunjukkan bahwa TNF- $\alpha$  merupakan elemen penting dalam menentukan derajat keparahan asma. Sampel sputum dan biopsi dari pasien asma berat menunjukkan peningkatan jumlah neutrofil. Salah satu perangsang utama dalam rekrutmen neutrofil adalah pajanan endotoksin. Keparahan gejala asma berhubungan dengan endotoksin alergen. Penelitian pada hewan menunjukkan efek yang dimediasi endotoksin terjadi karena terlepasnya TNF- $\alpha$  endogen (Amrani, *et al.*, 1996). Serangan asma akut juga dipengaruhi oleh jumlah TNF- $\alpha$ . Pasien asma terpasang ventilator karena asma berat terdapat peningkatan kadar neutrofil dan sitokin pro-inflamasi seperti TNF- $\alpha$  (Tillie, *et al.*, 1999).

Sitokin GM-CSF merupakan salah satu *colony stimulating factor* (CSF) yang bekerja dalam mengatur pertumbuhan, diferensiasi dan aktivasi sel hematopoetik termasuk sel inflamasi seperti eosinofil dan neutrofil.

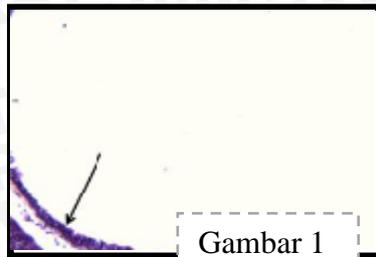
Sitokin GM-CSF dihasilkan oleh beberapa sel saluran napas yaitu makrofag, eosinofil, sel T, fibroblas, sel epitel, sel endotel dan sel otot polos saluran napas. Sitokin tersebut juga bisa memperlama daya tahan hidup sel eosinofil. Sitokin GM-CSF dapat merangsang pelepasan anion superoksida dan cys-LTs dari eosinofil. Sitokin GM-CSF dapat merangsang sintesis dan pelepasan beberapa sitokin lain termasuk IL-1 dan TNF- $\alpha$  dari monosit. Hal ini menunjukkan bahwa GM-CSF mengakibatkan eosinofilia kronis dan *airway remodeling* pada asma (Peter, *et al.*, 1999).

### 1.7 Gambaran Histopatologi Trakea

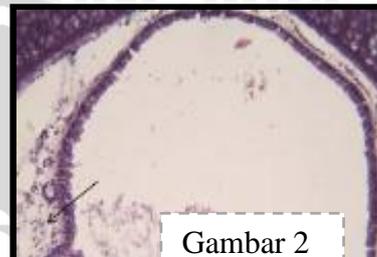
Histopatologi asma mempunyai beberapa gambaran kunci, yaitu peningkatan sel-sel eosinofil, limfosit, dan sel mast, edema mukosa, meningkatnya jumlah sel goblet dan mukus yang diproduksi, deskuamasi epitel, hiperplasia otot polos dan konstiksi. Gambaran ini juga terdapat pada rinitis alergi dan sinusitis kronik, kecuali perubahan otot polos dan deskuamasi epitel. Trakea dilapisi oleh sel epitel bersilia. Pada tingkat jaringan tampak kerusakan sel epitel akan terjadi inflamasi sampai submukosa, dan mungkin terjadi rekonstruksi mukosa oleh jaringan ikat serta hipertropi otot polos (Irsa, 2005).

Asma juga menunjukkan peningkatan masuknya neutrofil, eosinofil, sel mast dan TNF- $\alpha$ . Sel-sel inflamasi dan pro-inflamasi mediator seperti TNF- $\alpha$  inilah yang mengakibatkan kerusakan epitel pada trakea

(Gambar 2.5) dan peningkatan permeabilitas endotel, dengan edema jalan nafas yang dihasilkan (Chaudhari, *et al.*, 2011).



Gambar 1



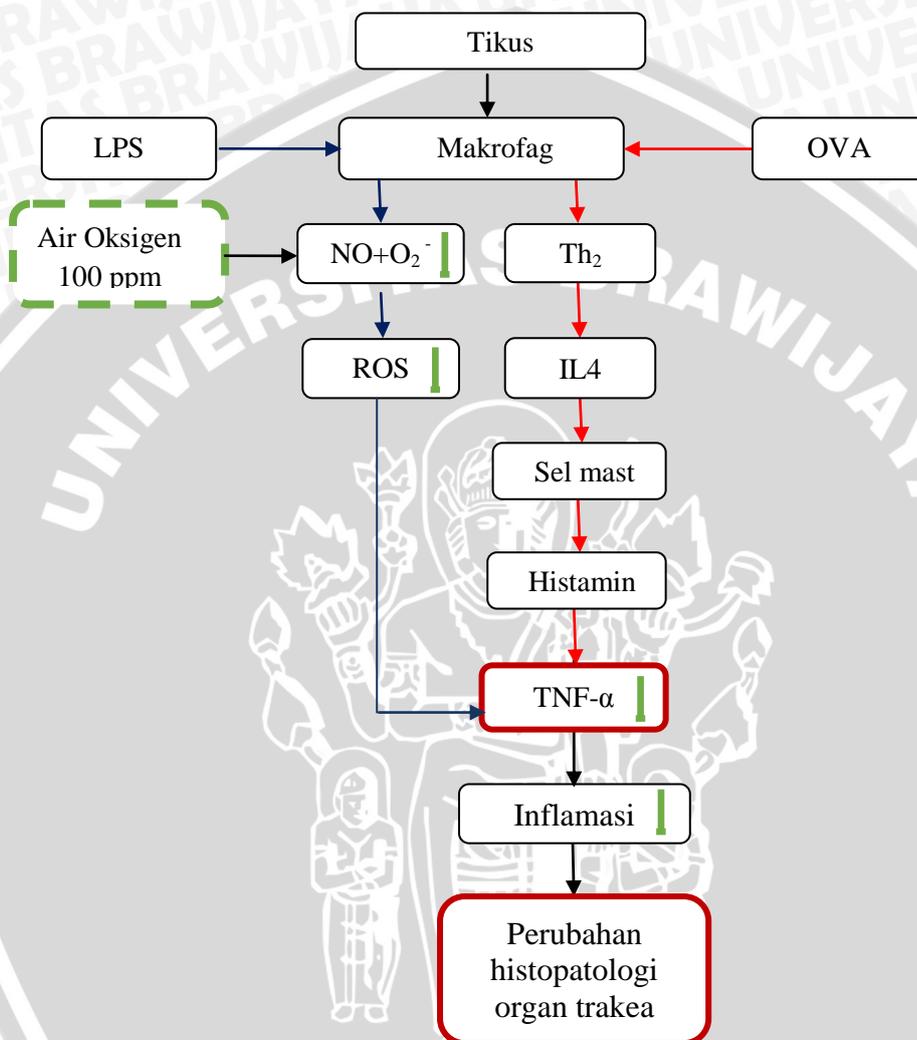
Gambar 2

**Gambar 2.5** Perbandingan trakea normal dan asma / gambar 1.trakea menggambarkan histologi normal, gambar 2. Trakea dari tikus asma menunjukkan submukosa sel-sel inflamasi, H & E (Chaudhari, *et al.*, 2011).

Sel struktural pada saluran napas meliputi sel epitel, fibroblas dan sel otot polos yang merupakan sumber penting mediator inflamasi (sitokin dan mediator lipid). Oleh karena jumlahnya yang lebih banyak dari sel inflamatori, mereka turut berperan dalam inflamasi asma kronis. Sel epitel mentranslasikan sinyal lingkungan menjadi respon inflamasi (Barnes, 2012). Selain itu, sel goblet yang tinggi serta pembesaran kelenjar submukosa berhubungan dengan hipersekresi mukus, yang bisa menyebabkan penyempitan lumen saluran napas, sehingga memperberat obstruksi. Sel otot polos memproduksi mediator pro inflamasi. Akibat dari inflamasi dan produksi faktor pertumbuhan, sel otot polos berproliferasi dan menjadi hipertropi. Otot polos sendiri cenderung mengalami hipertropi dan hiperplasia. Kondisi tersebut disebabkan oleh faktor pertumbuhan seperti *endothelin-1* dan *platelet derived growth factor*, sehingga hal ini akan menyebabkan disfungsi jalan napas pada asma (NHLBI, 2007).

## BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN

### 3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

**Keterangan Gambar:**

- : Variabel bebas
- : Variabel terikat
- | : Menghambat
- | : Terapi
- : Menstimulasi

Asma adalah penyakit inflamasi kronis saluran pernafasan. Paparan asma dapat timbul pada hewan tikus (*Rattus norvegicus*) karena pemberian OVA secara intraperitoneal dan inhalasi (Liu, *et al*, 2005). Pemberian OVA pada tikus percobaan pertama kalinya merangsang sel B untuk menghasilkan IgE dengan bantuan sel T helper (Th). Imunoglobulin ini selanjutnya akan menempel pada permukaan sel mast. Pemberian OVA dapat memacu terjadinya degranulasi sel mast sehingga terlepaslah mediator-mediator yang terkandung dalam sel mast seperti: histamin, prostaglandin, *leukotriene* dan beberapa macam sitokin misalnya TNF $\alpha$ , IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 (Muthmainah, 2011). Lipopolisakarida dari *Porphyromonas gingivalis* akan mengaktifasi sel-sel inflamasi seperti sel mast, neutrofil, dan makrofag (Wang dan Ohura, 2002). Sel mast, makrofag, dan neutrofil merupakan sel inflamasi yang dapat melepaskan enzim proteolitik yaitu protease. Menurut Reed dan Kita (2004), pada kondisi asma, protease akan meningkat pada saluran pernapasan. Aktivitas protease yang meningkat dapat merusak dan mengganggu fungsi saluran pernapasan melalui degradasi makromolekul, matriks ekstraseluler, dan kerusakan epitel. Kerusakan sel epitel pada saluran pernapasan dapat menjadi indikasi tingkat keparahan asma (Wasworth, *et al.*, 2012). Pada tikus paparan terhadap LPS lebih dari 6 hari setelah ovalbumin (OVA) akan menyebabkan neutrofilia saluran pernafasan dan peningkatan permeabilitas vaskuler (Tulic, 2000).

Awal terjadinya reaksi asma tersebut sebenarnya dimulai dengan respon pengenalan oleh sel makrofag dan atau sel dendritik. Sel-sel penyaji

antigen APC (*Antigen Presenting Cells*) seperti sel dendrit, makrofag dan limfosit B yang berada di epitel saluran nafas berperan sebagai sel penyaji alergen yang menempel ke mukosa hidung. Makrofag akan menghasilkan *Nitric oxide* akibat aktivasi berbagai sitokin dan endotoksin yaitu LPS.

LPS yang terikat dengan reseptor LPS di membran sel akan mengaktivasi monosit, makrofag, neurofil dan sel endotel yang selanjutnya akan menghasilkan NO dalam jumlah besar melalui iNOS. Peningkatan produksi NO melalui iNOS berkontribusi terhadap respon imun. Makrofag yang teraktivasi LPS merupakan sumber iNOS yang menghasilkan NO (*Nitric oxide*) (Rubbo, *et al.*, 2000). NO akan bereaksi dengan anion superoksida ( $O_2^-$ ) untuk menghasilkan oksidan peroksinitrit ( $ONOO^-$ ). Peroksinitrit terlibat dalam pembentukan hidroksiradikal yang mengakibatkan induksi *stress nitrosative*, antara lain destruksi protein dan enzim pada membran sel. Produksi yang berlebihan akan mengakibatkan efek *reactive oxygen species* (ROS) (Fardian, dkk., 2015). Apabila radikal bebas tersebut mengalami peningkatan sehingga mempengaruhi peningkatan produksi TNF- $\alpha$  pula, sehingga proses inflamasi akan terjadi dan mengakibatkan kerusakan jaringan.

Makrofag selain menghasilkan *nitric oxide* juga diaktivasi oleh LPS yang ditangkap oleh *lipopolysaccharide binding protein* (LBP) lewat reseptor permukaan *cluster of differentiation 14* (CD14). LPS mampu mengaktivasi sistem imun bawaan dengan menstimulasi *toll like receptor 4*

(TLR4) yang merupakan protein pada permukaan sel yang dapat mengenali produk bakteri (Bascones dan Figuero, 2005).

Aktivasi jalur sinyal TLR menunjukkan berbagai efek, memacu ekspresi gen yang berperan dalam inflamasi, induksi perubahan dalam APC yang membuatnya lebih efisien dalam presentasi antigen, dan menimbulkan sintesis dan ekspor sinyal molekul interseluler yang mempengaruhi perilaku leukosit dan sel lain (Rengganis, 2014). Dalam sel APC tersebut, ikatan antara MHC kelas II di permukaan APC dengan reseptor di permukaan sel T akan mengaktivasi sel T sehingga mengeluarkan IL-4 yang akan mempengaruhi sel Th berdiferensiasi menjadi sel Th<sub>2</sub>. Sel Th<sub>2</sub> inilah yang akan memberikan intruksi melalui interleukin atau sitokin seperti interleukin IL-3, IL-4, IL-5, IL-10 dan IL-13 (Sundaru, 2002; Busse dan Lemanske, 2001).

Sitokin sel Th<sub>2</sub> terutama IL-4 memiliki efek langsung terhadap sel B untuk memproduksi IgE. Paparan alergen dosis rendah yang terus-menerus dan presentasi alergen oleh sel-sel penyaji antigen (APC) kepada sel B disertai adanya pengaruh sitokin IL-4 membuat sel B akan memproduksi IgE yang terus bertambah yang akan berada bebas dalam sirkulasi, berikatan dengan reseptornya di sel basofil yang kemudian keluar dari sirkulasi yang berada dalam jaringan. Produksi IL-4 cepat dan bersifat transien, dapat dideteksi dalam 1-5 jam dan ekspresinya hilang setelah 24-48 jam. Efek IL-4 yang paling penting adalah perkembangan sel Th<sub>2</sub> dan memerintahkan sel B untuk memproduksi IgE.

IgE diproduksi oleh sel plasma yang terletak pada limfonodul dan daerah yang mengalami reaksi alergi, yaitu pada germinal pusat pada jaringan yang mengalami inflamasi. IgE berbeda dengan antibodi yang lain dalam hal lokasinya. IgE sebagian besar menempati jaringan dan berikatan dengan permukaan sel mast dengan reseptornya yang disebut FcεRI yang merupakan reseptor spesifik berafinitas tinggi (Merijanti, 1999). Ikatan antigen dari LPS dengan IgE menyebabkan terjadinya penggabungan silang antar reseptor yang berakibat tersekresinya mediator kimia dari sel mast. Mekanisme pada sel mast, beberapa menit setelah terpapar ulang alergen, sel mast akan mengalami degranulasi yaitu suatu proses pengeluaran isi granul ke lingkungan ekstrasel yang berupa histamin, prostaglandin, leukotrien serta sitokin-sitokin yang menimbulkan berbagai gejala klinis. Hal ini menyebabkan terjadinya hipersensitivitas (Rifai, 2011).

Peningkatan berbagai mediator seperti sitokin yang berasal dari struktur sel saluran napas antara lain sel otot polos, sel epitel, sel endotel dan fibroblas ditemukan pada pasien yang mengalami asma. Sel epitel diduga berperan penting karena mengalami aktivasi oleh sinyal lingkungan dan melepaskan berbagai protein inflamasi yang diatur oleh meningkatnya transkripsi gen yang dikendalikan oleh faktor transkripsi proinflamasi yaitu *nuclear factor-κB* (NF-κB) dan *activator protein-1* (AP-1) yang teraktivasi pada saluran napas pasien yang mengalami asma (Rozaliyani, dkk., 2011). NFκB merupakan kompleks protein yang mengontrol proses transkripsi DNA. Protein ini memiliki peran penting pada proses inflamasi, imunitas, proliferasi

sel, diferensiasi dan ketahanan hidup sel. Aktivasi NF- $\kappa$ B merupakan respon terhadap adanya proses inflamasi dan juga merupakan regulator penting dalam produksi prostaglandin dan proinflamasi seperti TNF- $\alpha$  (Prasetyo, dkk., 2014). Mekanisme genomik berupa inhibisi faktor transkripsi yang berperan dalam produksi mediator inflamasi, yaitu *nuclear factor- $\kappa$ B* (NF- $\kappa$ B). NF- $\kappa$ B mengatur ekspresi gen sitokin, *inflammatory enzymes*, protein dan reseptor yang berperan dalam inflamasi (IFN-g, TNF-a, dan IL-1). Penghambatan sitokin akan menurunkan produksi mediator inflamasi (Sitompul, 2011).

Inflamasi terjadi akibat adanya peningkatan radikal bebas (ROS) yang menyebabkan produksi TNF- $\alpha$  meningkat. Radikal bebas superoksida terbentuk dari hipoxantin yang merupakan hasil degradasi ATP yang terbentuk pada keadaan patologik karena energi rendah. Pada proses inflamasi diperantarai oleh sintesis prostaglandin yang dikatalisis oleh siklo-oksigenase. Produk antara sintesis ini adalah terbentuknya radikal bebas, selain itu aktifitas sel-sel fagosit sebagai mekanisme imunologik normal dapat meregulasi proses inflamasi (antara lain dengan merubah permeabilitas vaskuler dan pembentukan faktor-faktor kemotaktik). Untuk menghambat peningkatan radikal bebas yang terjadi, maka ikatan kompleks antara NO dengan oksidan seperti  $O_2^-$  dapat dihambat oleh  $O_2$  (Oksigen) sehingga produk radikal bebas tidak terproduksi melainkan berubah produk menjadi ion nitrit ( $NO_2^-$ ). Nitrit dapat mengakibatkan terjadinya pelebaran pembuluh darah (vasodilatasi), hal ini mungkin diakibatkan karena mengandung molekul seperti  $O_2$  yang berperan dalam membuat relaksasi otot-otot polos (Rubbo, *et al.*, 2000).

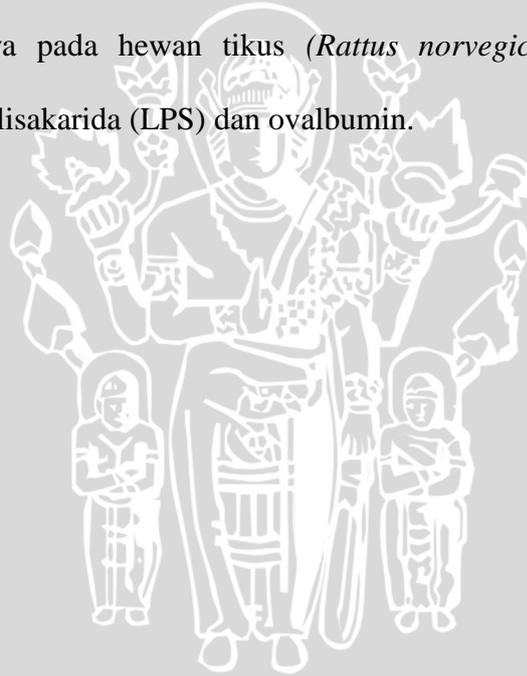
Menurut Matondang (2008), menyatakan bahwa minuman beroksigen dapat mengurangi hipoksia pada asma karena penurunan fungsi saluran napas akibat defisiensi oksigen dan dapat terjadi dilatasi pembuluh darah. Air minum dalam kemasan yang mengandung oksigen 100 ppm diharapkan dapat bekerja secara optimal mengurangi hipoksia pada asma. Hipoksia merupakan keadaan dimana terjadi penurunan pemasukan oksigen ke jaringan sampai di bawah tingkat fisiologik meskipun perfusi jaringan oleh darah memadai. Etiologi Hipoksia dapat terjadi karena defisiensi oksigen pada tingkat jaringan akibatnya sel-sel tidak cukup memperoleh oksigen sehingga metabolisme sel akan terganggu atau mengakibatkan kerusakan sel (Putri, 2009).

Apabila inflamasi yang diakibatkan oleh TNF- $\alpha$  terus menerus terjadi akan mengakibatkan adanya perubahan struktur pada jalan napas seperti hipertropi otot polos, pembentukan pembuluh darah baru, peningkatan sel-sel goblet epitelial, fibrosis subepitelial, penebalan membran basalis (Boushey, 2000). Kerusakan struktur epitel dan otot polos oleh mediator yang dilepaskan, dapat terlihat pada saluran napas yang mengalami asma melalui Perubahan histopatologi sel epitel dan otot polos pada organ trakea (Sundaru, 2002; Busse dan Lemanske, 2001). Sehingga kerusakan sel dapat diamati melalui gambaran histopatologi trakea pada hewan coba tikus yang mengalami asma.

### 3.2 Hipotesa Penelitian

Dari rumusan permasalahan yang telah diuraikan, maka hipotesa dari penelitian adalah sebagai berikut:

1. Terapi air minum dalam kemasan yang mengandung oksigen 100 ppm mampu menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  pada hewan tikus (*Rattus norvegicus*) yang dipapar dengan Lipopolisakarida (LPS) dan ovalbumin.
2. Terapi air minum dalam kemasan yang mengandung oksigen 100 ppm dapat mengurangi kerusakan struktur sel epitel di trakea pada gambaran histopatologinya pada hewan tikus (*Rattus norvegicus*) yang dipapar dengan Lipopolisakarida (LPS) dan ovalbumin.



## BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

### 4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari – Juni 2016 di Laboratorium Biosains, Laboratorium Biokimia dan Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Brawijaya – Malang.

### 4.2 Alat dan Bahan Penelitian

#### 4.2.1 Alat

Pada penelitian ini, alat yang digunakan antara lain spuit insulin, kandang tikus, *scalpel*, gunting, *object glass*, *cover glass*, beaker glass, timbangan, sarung tangan, *micropipet*, *yellow tip*, *blue tip*, *valcon*, *Omron Comp Air Compressor Nebulizer* dan mikroskop Olympus BX51.

#### 4.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*), aquades, ovalbumin,  $\text{AlOH}_3$ , PFA 10%, *phosphat buffer saline* (PBS), NaCl fisiologis 0,9%, LPS dari bakteri gram negatif *Porphyromonas gingivalis*, antibodi primer universal, antibodi sekunder universal berlabel biotin, SA-HRP, DAB, entelan, etanol 50%, etanol 70%, etanol 80%, etanol 90%, etanol 95%, etanol 100%,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , BSA, xylol, alkohol, parafin dan pewarna histologi hematoxilin eosin.

### 4.3 Sampel Penelitian

Hewan coba diaklimatisasi selama tujuh hari untuk menyesuaikan diri dengan kondisi di laboratorium. Estimasi jumlah sampel yang digunakan dihitung berdasarkan rumus yang digunakan oleh Montgomery dan Kowalsky, (2011) :

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

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

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 15$$

$$n \geq 4.75$$

$$n \geq 5$$

Keterangan

P = jumlah kelompok (terdiri dari empat macam perlakuan)

n = jumlah ulangan yang diperlukan

### 4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian yang bersifat eksperimental laboratorik dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan eksperimental yang digunakan adalah rancangan eksperimental sederhana dimana hewan coba dibagi menjadi empat kelompok secara acak.

Tiap kelompok terdiri dari lima tikus (*Rattus norvegicus*) dimana pada kelompok 1 merupakan tikus yang sehat tanpa perlakuan (kontrol negatif), kelompok 2 adalah tikus yang diberi OVA dan LPS (kontrol positif),

sedangkan kelompok 3 dan 4 diberi OVA, LPS, dan terapi air oksigen 100 ppm. Pada kelompok 3 volume terapinya sebesar 1 mL/ekor/hari dan kelompok 4 volume terapinya sebesar 2 mL/ekor/hari (Tabel 4.1).

**Tabel 4.1 Rancangan Penelitian**

Variabel yang diamati	Ulangan				
	1	2	3	4	5
<b>Gambaran Histopatologi Trakea dan Ekspresi TNF-<math>\alpha</math></b>					
Kelompok A (kontrol negatif)					
Kelompok B (kontrol positif)					
Kelompok C (volume terapi 1 mL/ekor/hari)					
Kelompok D (volume terapi 2 mL/ekor/hari)					

#### 4.5 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah:

Variabel bebas : volume air oksigen 100 ppm

Variabel terikat : gambaran histopatologi trakea dan Ekspresi TNF- $\alpha$

Variabel kontrol : tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar, jenis kelamin, umur, berat badan

#### 4.6 Tahapan Penelitian

##### 4.6.1 Persiapan Hewan Coba

Sampel penelitian yang digunakan ialah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan galur wistar yang dapat mencapai 40 cm diukur dari hidung sampai ujung ekor dan berat 150-200 gram. Tikus Wistar memiliki beberapa keunggulan dibanding hewan laboratorium lainnya yaitu mampu beradaptasi dengan baik dan tahan terhadap berbagai kondisi. Tikus jantan biasanya

memiliki ukuran lebih besar dari tikus betina dan memiliki kematangan seksual pada umur 4 bulan dan dapat hidup selama 4 tahun (Kusumawati, 2004). Pada percobaan digunakan tikus jantan sebagai hewan coba karena tikus putih jantan dapat memberikan hasil penelitian yang lebih stabil karena tidak dipengaruhi oleh adanya siklus menstruasi dan kehamilan seperti pada tikus putih betina. Tikus putih jantan juga mempunyai kecepatan metabolisme obat yang lebih cepat dan kondisi biologis tubuh yang lebih stabil dibanding tikus betina (Sugiyanto, 1995).

#### 4.6.2 Tatalaksana Sensitasi Alergi dengan Ovalbumin

Perlakuan pertama yang dilakukan pada tikus adalah menginjeksikan ovalbumin 10  $\mu\text{g}$  yang diemulsi 1,5 mg  $\text{Al}(\text{OH})_3$  dalam 200  $\mu\text{l}$  PBS (*phospat buffer saline*) pada hari ke-1 dan 14 secara intraperitoneal, kemudian dilakukan sensitasi OVA secara inhalasi (Ngestiningsih dkk., 2003). Pemaparan OVA aerosol dilakukan dalam tabung transparan yang dihubungkan dengan *Omron Comp Air Compressor Nebulizer* pada hari ke 21, yaitu dilakukan dengan cara melarutkan OVA dalam NaCl steril sebanyak 1 mg/mL selama 20 menit. Model asma alergi disebut akut jika pemaparan terhadap alergen dilakukan kurang dari 1 bulan.

#### 4.6.3 Tatalaksana Injeksi Lipopolisakarida (LPS)

Induksi lipopolisakarida (LPS) dapat digunakan untuk memperparah kejadian asma yang berasal dari LPS bakteri *Phorpyromonas*

*gingivalis*. Menurut Utomo (2006), bahwa 80% bakteri *Phorpyromonas gingivalis* biasanya terdapat di rongga mulut. Oleh karena itu LPS dapat diinjeksi melalui intrasulkular dengan konsentrasi 1µg/ml pada sulkus gingivalis molar rahang atas kiri tikus (*Rattus norvegicus*). Injeksi LPS intrasulkular dilakukan pada hari ke 10 dan 11. LPS yang digunakan berfungsi sebagai agen infeksi rongga mulut dan dapat memodulasi respon imun.

#### **4.6.4 Tatalaksana Terapi Air Minum dalam Kemasan yang Mengandung Oksigen 100 ppm**

Metode pemberian terapi air oksigen 100 ppm dilakukan dengan cara menyonde pada bagian lambung tikus (*Rattus norvegicus*). Pemberian terapi tersebut menggunakan volume 1 mL untuk terapi 1 dan 2 mL untuk terapi 2. Volume yang digunakan hanya 1 mL dan 2 mL dikarenakan lambung tikus (*Rattus norvegicus*) hanya dapat menampung air sebanyak 0,12-2,96 ml (Ofusori, *et al.*, 2008). Air minum dalam kemasan yang mengandung oksigen 100 ppm diberikan selama dua minggu berturut-turut dari hari ke 22 hingga hari ke 36.

#### **4.6.5 Isolasi Organ Trakea**

Sampel jaringan diambil dengan melakukan euthanasia pada hewan coba. Hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) dimatikan pada hari ke 21, yaitu 30 menit setelah pemberian OVA secara inhalasi dengan cara dislokasi leher.

Kemudian hewan coba diposisikan rebah terlentang, disayat pada bagian leher untuk dilakukan pengambilan organ trakea. Organ trakea yang telah diambil, dicuci dengan menggunakan NaCl fisiologis dan direndam dalam pot yang berisi larutan *paraformaldehyde acid* (PFA) 4% dan disimpan dalam suhu ruang (Muntiha, 2001). Pengambilan sampel jaringan digunakan untuk mengukur ekspresi TNF- $\alpha$  menggunakan metode imunohistokimia.

#### 4.6.6 Pembuatan Preparat Histopatologi

Tahap pembuatan sediaan histopatologi dilakukan sesuai metode Kiernan yang terdiri dari fiksasi, dehidrasi, penjernihan, infiltrasi paraffin, *embedding*, *sectioning*, dan penempelan (Junquiera & Carneiro, 2007). Pertama ialah tahapan fiksasi yaitu untuk mencegah rusaknya jaringan. Fiksasi dilakukan dengan cara merendam jaringan kedalam larutan PFA 10%, dan kemudian direndam kedalam etanol 70% selama 24 jam, kemudian jaringan diiris (*trimming*) agar dapat dimasukkan dalam kotak untuk diproses dalam *tissue processor*. Tahap berikutnya, jaringan tersebut dimasukkan ke dalam etanol 70% selama 24 jam, etanol 80% selama 2 jam, etanol 90% selama 2 jam, dan etanol absolut selama 20 menit. Proses ini disebut dehidrasi, yaitu keluarnya air dari jaringan.

Tahapan selanjutnya yaitu penjernihan, dengan cara jaringan dipindahkan dari etanol absolut kedalam larutan *xylol* I selama 20 menit dan *xylol* II selama 30 menit. Kemudian dilakukan proses infiltrasi, dengan cara

jaringan dimasukkan kedalam paraffin cair yang ditempatkan dalam inkubator dengan suhu 58-60°C.

Tahapan berikutnya ialah *embedding* yang dilakukan dengan cara mencelupkan jaringan kedalam paraffin cair yang telah dituang dalam cetakan dan tunggu hingga paraffin memadat. Pembuatan preparat dilakukan dengan memasukkan hasil *embedding* pada penjepit (*block holder*). Selanjutnya proses *sectioning* diawali dengan mengatur ketebalan menggunakan mikrotom dengan ketebalan 4-5 µm. Jaringan yang terpotong dipindahkan dengan kuas kedalam air hangat dengan suhu 38-40°C. Hal ini bertujuan untuk membuka lipatan dan meluruskan kerutan halus yang ada. Irisan yang telah jadi diambil dengan *object glass*. Potongan yang telah dipilih dikeringkan dan diletakkan diatas hot plate 38-40°C hingga kering. Selanjutnya preparat disimpan dalam inkubator dengan suhu 38-40°C dan preparat siap untuk dilakukan pewarnaan *hematoxylin eosin* (HE).

Tahapan pewarnaan HE menggunakan metode Harris adalah sebagai berikut, proses pewarnaan diawali dengan deparafinasi preparat di atas *object glass* yang direndam dalam *xylol* I, *xylol* II, dan *xylol* III masing-masing 5 menit. Kemudian dilakukan proses rehidrasi yaitu preparat direndam dalam alkohol bertingkat dengan konsentrasi 95%, 90%, 80%, dan 70% secara berurutan masing-masing selama tiga menit. Selanjutnya dicuci dengan air mengalir dan aquades selama 5 menit. Kemudian sediaan direndam dalam *hematoxylin* selama 1 menit, lalu dicuci dengan air mengalir selama 10 menit dan aquades selama 5 menit. Sediaan dilakukan pewarnaan

dengan menggunakan *eosin* selama 5 menit, lalu dicuci kembali dengan air mengalir selama 10 menit dan aquades selama 5 menit. Setelah sediaan diwarnai, dilakukan dehidrasi dengan alkohol 70%, 80%, 90%, dan 95% masing-masing selama beberapa detik. Lalu dilanjutkan dengan menggunakan alkohol I, II, dan III masing-masing selama 2 menit. Setelah itu, dilanjutkan dengan proses *clearing* dengan menggunakan *xylol* I, II, dan III masing-masing selama 3 menit. Terakhir, sediaan dikeringkan dan dilakukan *mounting* (perekatan) dengan menggunakan entelan serta ditutup dengan menggunakan *cover glass*. Lalu preparat diperiksa di bawah mikroskop untuk pemeriksaan terhadap perubahan histopatologi.

#### 4.6.7 Pembuatan Preparat Imunohistokimia

Uji imunohistokimia (IHK) dengan pembuatan preparat yaitu deparafinisasi, dimana slide yang ditempeli potongan jaringan biopsi dari blok paraffin dimasukkan kedalam *xylol* I dan *xylol* II masing masing selama 5 menit, kemudian kedalam alkohol dan *xylol* masing masing selama 5 menit. Lalu preparat dimasukkan kedalam etanol 100%, etanol 90%, etanol 70% dan etanol 50% masing masing selama selama 5 menit, lalu preparat dicuci dengan aquades. Kemudian dicuci dengan PBS selama 3 x 5 menit. Selanjutnya preparat ditetesi dengan hidrogen peroksida selama 20 menit. Lalu dicuci kembali dalam PBS selama 3x5 menit. Selanjutnya, tetesi preparat dengan BSA dalam PBS selama 30 menit pada suhu ruang. Kemudian ditetesi antibodi primer universal dan diinkubasi dalam suhu

dingin 4<sup>0</sup>C selama semalam. Lalu dicuci dengan PBS selama 3x5 menit. Preparat selanjutnya ditetesi dengan antibodi sekunder universal berlabel biotin selama 1 jam pada suhu ruang. Dilakukan pencucian kembali dengan PBS selama 3 x 5 menit. Berikutnya, preparat ditetesi SA-HRP (*Strep Avidin-Horseradish Peroxidase*) selama 30-60 menit pada suhu ruang. Kemudian ditetesi dengan *chromogen* DAB (*3,3-diamano bezidine tetra tetra hydrochloride*) selama 10-20 menit dengan suhu ruang. Dicuci kembali dengan aquades selama 3 x 5 menit. Selanjutnya *counterstaining* menggunakan *hematoxylen* selama 5 menit dalam suhu ruang. Dicuci kembali dengan aquades selama 3 x 5 menit. Terakhir preparat di *mounting* dengan entelan dan ditutup dengan *cover glass*. Lalu preparat dapat diamati dengan menggunakan mikroskop (Setiabudi, 2005).

#### 4.6.8 Cara Perhitungan Hasil Imunohistokimia TNF- $\alpha$

Proses perhitungan hasil imunohistokimia TNF- $\alpha$  dapat dilakukan secara otomatis yaitu menggunakan aplikasi *immunoratio*, yaitu perangkat lunak pengolahan citra yang dikembangkan dalam bahasa *Java* sehingga dapat digunakan pada semua sistem operasi komputer. Tahapan yang dilakukan ialah dengan cara mengirim gambar imunohistokimia dan diberi nama pada *file* gambar, klik *analyze* dan tunggu beberapa saat. Metode *immunoratio* tersebut menggunakan perbandingan jumlah sel pada DAB dengan hematoksilinya, sehingga menghasilkan gambar yang cocok dengan segmentasi daerahnya. Kemudian hasil gambar imunohistokimia akan keluar

beserta dengan jumlah persentasenya. Lalu hasil persentase setiap perlakuan ditabulasi di *Microsoft excel* untuk mendapatkan rata-rata dan standar deviasinya. Kemudian dilanjutkan dengan analisis statistik menggunakan SPSS (*Statistical Product and Service Solutions*).

#### 4.6.9 Pengamatan Preparat Histopatologi dan Imunohistokimia Trakea

Gambaran histopatologi trakea diamati secara kualitatif menggunakan mikroskop cahaya Olympus BX51 dengan perbesaran 40x dan 400x, sedangkan ekspresi TNF- $\alpha$  secara diamati menggunakan mikroskop cahaya Olympus BX51 dengan perbesaran 400x saja.

#### 4.7 Analisis Data

Data penelitian ini disajikan data berupa data kuantitatif dan data kualitatif. Data kuantitatif berupa ekspresi TNF- $\alpha$  dianalisis menggunakan aplikasi *immunoratio* dan ditabulasi menggunakan *Microsoft Office Excel*. Kemudian dianalisa menggunakan *analysis of variance* (ANOVA) dengan *software SPSS for Windows* dan dilanjutkan dilanjutkan uji Beda Nyata Jujur (*Tukey*) dengan  $\alpha = 5\%$ . Sedangkan data kualitatif berupa pengamatan histopatologi jaringan trakea yang dianalisis secara deskriptif.

## BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

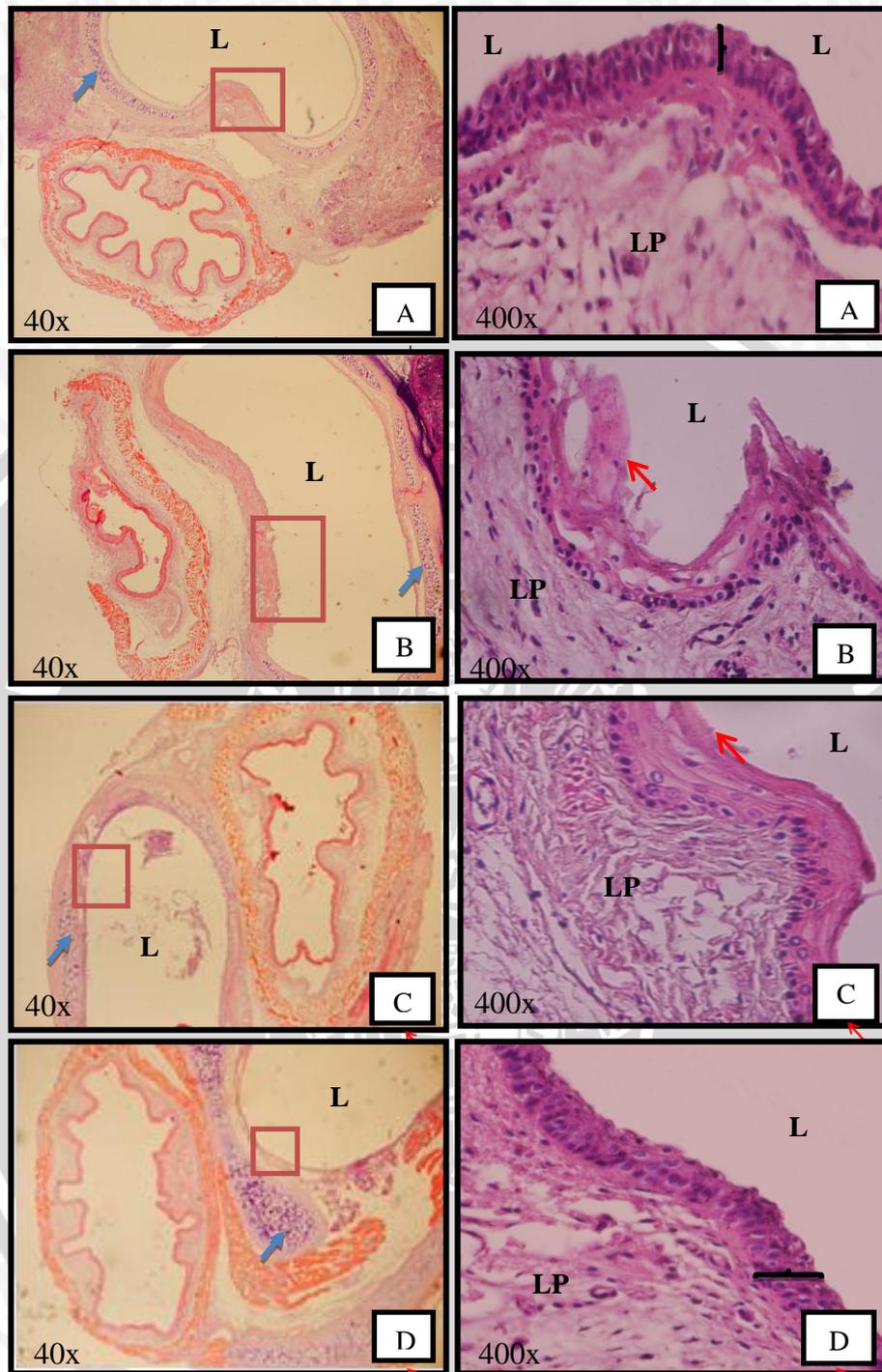
### 5.1 Terapi Air Minum dalam Kemasan yang Mengandung Oksigen pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Asma yang Diinduksi LPS dan Ovalbumin terhadap Histopatologi Trakea

Kerusakan yang terjadi pada organ trakea tikus (*Rattus norvegicus*) model asma yang diinduksi LPS dan ovalbumin secara visual dapat diketahui melalui pewarnaan HE. Metode pewarnaan ini merupakan metode rangkap yang menggunakan dua macam zat warna yaitu warna hemaktosilin dan zat warna eosin. Metode ini umumnya digunakan untuk mewarnai jaringan yang membutuhkan kontras warna antara sitoplasma dan inti.

Hematoksilin merupakan zat warna bersifat basa berupa garam dari senyawa basa pembawa warna dan radikal asam yang tidak bewarna. Selanjutnya bagian inti sel yang bersifat asam akan terwarnai ungu. Sedangkan, zat warna eosin yang bersifat asam berupa garam dari senyawa asam pembawa warna dan basa yang tidak berwarna. Sehingga sitoplasma sel yang bersifat basa terwarnai merah. Hematoksilin akan teroksidasi membentuk hematin yang mengikat ion aluminium hidrat dan membentuk kompleks mordant. Kompleks mordant sebagai kation yang akan mengikat komponen anion (gugus fosfat asam nukleat) dari jaringan khususnya inti yang membentuk warna biru keunguan. Sedangkan eosin bertindak sebagai anion yang mengikat kation (terminal N) residu asam amino dari protein pada sitoplasma membentuk warna merah.

Hasil pengamatan gambaran histopatologi trakea menunjukkan perbedaan antar perlakuan dimana kelompok A merupakan kelompok kontrol negatif (tanpa pemberian perlakuan), kelompok B merupakan kelompok kontrol positif (pemberian induksi LPS dan ovalbumin), kelompok C merupakan kelompok terapi 1 (pemberian induksi terapi dengan air minum dalam kemasan yang mengandung oksigen sebanyak 1 mL/ekor/hari) dan kelompok D merupakan kelompok terapi 2 (pemberian induksi terapi dengan air minum dalam kemasan yang mengandung oksigen sebanyak 2 mL/ekor/hari). Berdasarkan perlakuan yang telah dilakukan, didapatkan perbedaan gambaran histopatologi pada trakea. Pemberian ovalbumin dan LPS dapat menyebabkan kerusakan jaringan akibat adanya inflamasi. Salah satu jaringan yang rusak akibat adanya inflamasi ialah sel epitel organ trakea. Epitel merupakan sel pada jaringan pertama yang terpapar oleh alergen. Kerusakan sel epitel pada saluran pernapasan dapat menjadi indikasi tingkat keparahan asma (Wasworth, *et al.*, 2012).

Kerusakan yang terjadi pada trakea tikus (*Rattus norvegicus*) model asma hasil induksi LPS dan ovalbumin ditunjukkan pada gambar 5.1 B. Gambaran histologi kelompok tikus kontrol (Gambar 5.1 A) sangat berbeda dengan kelompok tikus model asma (Gambar 5.1 B). Pada kelompok tikus model asma (Gambar 5.1 B) Nampak adanya deskuamasi sel epitel pseudo kompleks kolumnar bersilia dengan ditunjukkan adanya susunan sel epitel yang tidak kompak dan tidak rapi serta terkelupas dari membran basalis.



**Gambar 5.1** Histopatologi trakea pada tikus (*Rattus norvegicus*) dengan pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE) perbesaran 40x dan 400 x.

Keterangan : (A) Tikus kontrol negatif, (B) Tikus kontrol positif, (C) Tikus terapi air minum dalam kemasan yang mengandung oksigen dengan volume 1mL/ekor/hari, (D) Tikus terapi air minum dalam kemasan yang mengandung oksigen dengan volume 2mL/ekor/hari. (↑) kartilago hialin, (↑) terkelupasnya sel epitel, (L) Lumen, (LP) Lamina Propria.

Gambar 5.1 C merupakan gambaran histopatologi tikus model asma setelah diberikan terapi air minum dalam kemasan yang mengandung oksigen 100 ppm dengan volume 1 mL/ekor/hari. Pada gambar tampak adanya perbedaan dengan Gambar 5.1 B, yaitu pada sel epitel sudah terlihat adanya perbaikan sel dengan ditunjukkan dengan adanya susunan sel epitel yang mulai kompak dan rapi, walaupun masih ditandai dengan terkelupasnya sel epitel (↑). Gambar 5.1 D merupakan gambaran histopatologi tikus model asma setelah diberikan terapi air minum dalam kemasan yang mengandung oksigen 100 ppm dengan volume 2 mL/ekor/hari. Pada gambar tampak adanya perbedaan dengan Gambar 5.1 B dimana sel epitel mulai berjajar dengan rapi dan terjadi perbaikan sel epitel pseudo kompleks kolumnar bersilia dengan sudah tidak terkelupasnya sel epitel dari membran basalisnya yang merupakan tempat menempelnya sel epitel.

Inflamasi terjadi akibat adanya peningkatan radikal bebas (ROS) didalam tubuh. Untuk menghambat peningkatan radikal bebas yang terjadi, maka ikatan kompleks antara NO dengan oksidan seperti  $O_2^-$  dapat dihambat oleh  $O_2$  (Oksigen) sehingga produk radikal bebas tidak terproduksi melainkan berubah produk menjadi ion nitrit ( $NO_2^-$ ). Nitrit dapat mengakibatkan terjadinya pelebaran pembuluh darah (vasodilatasi), hal ini mungkin diakibatkan karena mengandung molekul seperti  $O_2$  yang berperan dalam membuat relaksasi otot-otot polos (Rubbo, *et al.*, 2000). Oksigen dapat diperoleh melalui konsumsi terapi air minum dalam kemasan yang mengandung oksigen 100 ppm.

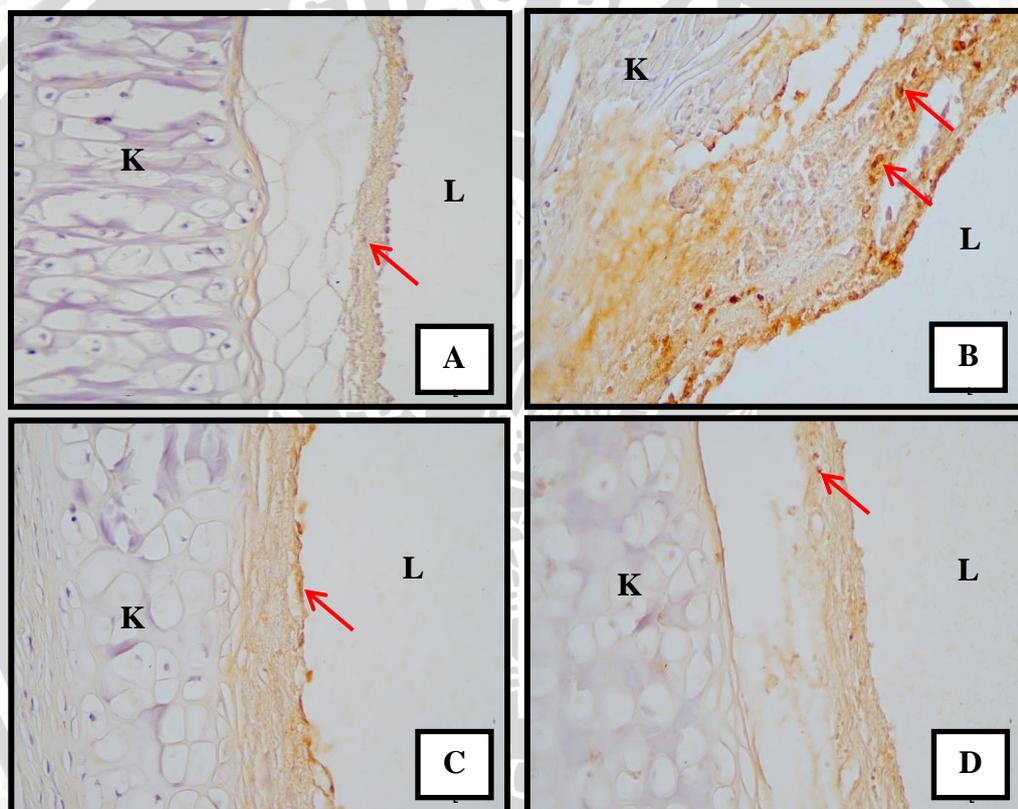
Hasil terbaik ditunjukkan oleh Gambar 5.1 D yaitu dengan pemberian air minum dalam kemasan yang mengandung oksigen 100 ppm dengan volume 2 mL/ekor /hari yang ternyata mampu memperbaiki kerusakan sel epitel pada organ trakea. Pemberian terapi air minum dalam kemasan yang mengandung oksigen 100 ppm dengan volume 2 mL/ekor /hari yang tampak pada Gambar 5.1 D mampu memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan pada Gambar 5.1 C.

### **5.1 Terapi Air Minum dalam Kemasan yang Mengandung Oksigen pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Asma yang Diinduksi LPS dan Ovalbumin terhadap Ekspresi TNF- $\alpha$ Trakea**

Keberadaan ekspresi TNF- $\alpha$  dalam suatu jaringan dapat digambarkan melalui metode IHK (imunohistokimia). IHK merupakan metode pewarnaan substansi yang melibatkan gabungan metode imunologi dan histologi. Metode pewarnaan substansi atau bahan aktif didalam jaringan pada IHK menggunakan prinsip-prinsip dasar imunologi yaitu pengikatan bahan aktif (antigen) pada sisi aktif yang spesifik oleh suatu anti bahan aktif yang disebut antibodi (pengikatan antigen dan antibodi). Hasil reaksi antigen dan antibodi ini dapat diidentifikasi pada spesimen karena antibodi diikat oleh suatu penanda yang dapat divisualisasikan. Sehingga dapat menandai keberadaan bahan aktif (antigen) tersebut didalam jaringan.

Imunohistokimia yang melibatkan metode imunologi menggunakan kespesifikan ikatan antara antigen dan antibodi. Pada awalnya antigen berikatan dengan antibodi primer, kemudian diikuti dengan

pengikatan antibodi sekunder berlabel biotin. Antibodi sekunder langsung berikatan dengan avidin pada *streptavidin horseradish peroxidase* (SA-HRP) untuk membentuk kompleks avidin biotin HRP. Selanjutnya kromogen yang digunakan adalah *3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride* (DAB). Kompleks yang terbentuk dari kromogen DAB akan menghasilkan warna coklat.



**Gambar 5.2** Ekspresi *Tumor Necrosis Factor* (TNF- $\alpha$ ) pada organ trakea (Perbesaran 400x).

Keterangan: (A) Tikus kontrol negatif, (B) Tikus kontrol positif, (C) Tikus terapi air minum dalam kemasan yang mengandung oksigen 1mL/ekor/hari, (D) Tikus terapi air minum dalam kemasan yang mengandung oksigen 2mL/ekor/hari. (↑) Ekspresi TNF- $\alpha$ , (K) Kartilago hialin, (L) Lumen.

Ekspresi TNF- $\alpha$  pada organ trakea ditunjukkan dengan warna coklat pada sitoplasma sel epitel dan ekstraseluler matriks (Gambar 5.2).

Hasil ekspresi TNF- $\alpha$  dapat dilihat pada Tabel 5.1. Antibodi primer yang

digunakan akan berikatan dengan TNF- $\alpha$  didalam 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. Daerah total yang terekspresi akan dihitung sesuai dengan luas bidang pandang menggunakan aplikasi *immunoratio*.

**Tabel 5.1** Ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- $\alpha$ ) pada Tikus Perlakuan

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Ekspresi TNF- $\alpha$	Ekspresi TNF- $\alpha$ terhadap kontrol (%)	
		Peningkatan	Penurunan
<b>A (Kontrol negatif)</b>	19,58 $\pm$ 2,95 <sup>a</sup>	-	-
<b>B (Kontrol positif)</b>	64,66 $\pm$ 5,23 <sup>c</sup>	230,23	-
<b>C (Terapi 1ml/ekor/hari)</b>	33,53 $\pm$ 3,28 <sup>b</sup>	-	48,15
<b>D (Terapi 2ml/ekor/hari)</b>	22,58 $\pm$ 0,77 <sup>a</sup>	-	65,07

Keterangan: Angka dengan *superscript* (notasi) menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar perlakuan dengan uji BNJ 5%.

Kelompok kontrol negatif (Gambar 5.1 A) menunjukkan pada jaringan organ trakea tikus model asma sedikit mengekspresikan TNF- $\alpha$  (19,58 $\pm$ 2,95<sup>a</sup>), terutama pada bagian sel epitel. Ekspresi dari TNF- $\alpha$  pada saluran pernapasan kelompok kontrol negatif sedikit terlihat adanya ekspresi TNF- $\alpha$  tersebut dikarenakan belum diinduksinya LPS dan ovalbumin (OVA). Hal ini juga dikarenakan TNF- $\alpha$  berfungsi sebagai pelindung tubuh dari antigen yang masuk. Selain itu, secara fisiologis TNF- $\alpha$  bekerja untuk membantu dalam mekanisme proliferasi sel.

Kelompok kontrol positif (Gambar 5.1 B) menunjukkan adanya peningkatan ekspresi TNF- $\alpha$  sebesar 230,23% (64,66 $\pm$ 5,23<sup>c</sup>). Ekspresi TNF-

$\alpha$  pada kontrol positif terlihat lebih banyak pada bagian sel epitel dan ekstraseluler matriksnya. Ekspresi TNF- $\alpha$  kelompok tersebut meningkat dikarenakan adanya paparan alergen (OVA) dan LPS.

Kelompok terapi air minum dalam kemasan yang mengandung oksigen 100 ppm. Pemberian terapi dengan volume 1 mL/ekor/hari dan 2 mL/ekor/hari menunjukkan adanya penurunan ekspresi TNF- $\alpha$  sebesar 48,15% ( $33,53 \pm 3,28^b$ ) dan 65,07% ( $22,58 \pm 0,77^a$ ) terhadap kontrol positif. Penurunan ekspresi TNF- $\alpha$  pada kedua kelompok tersebut terlihat pada bagian sel epitel organ trakea (Gambar 5.1 C dan Gambar 5.1 D). Namun pada terapi dengan volume 2 mL/ekor/hari menunjukkan ekspresi TNF- $\alpha$  dengan penurunan yang lebih tinggi dibandingkan dengan pemberian terapi dengan volume 1 mL/ekor/hari terhadap kontrol positif.

Air minum dalam kemasan yang mengandung oksigen 100 ppm berfungsi dalam menghambat peningkatan radikal bebas yang terjadi, sehingga ikatan kompleks antara NO dengan oksidan seperti  $O_2^-$ . Adanya kadar oksigen yang tinggi didalam tubuh menyebabkan produk radikal bebas tidak terproduksi dan ekspresi TNF- $\alpha$  dapat mengalami penurunan serta kerusakan jaringan dapat diperbaiki.

Hasil uji statistik *One-Way* ANOVA menunjukkan adanya perbedaan antar perlakuan, kemudian dilanjutkan dengan uji BNJ yang menunjukkan hasil berbeda nyata antar perlakuan secara signifikan. Pada tiap perlakuan percobaan terjadi peningkatan dan penurunan *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- $\alpha$ ) pada tikus model asma dengan terapi air minum

dalam kemasan yang mengandung oksigen 100 ppm. Kelompok kontrol positif menunjukkan perbedaan ekspresi TNF- $\alpha$  yang signifikan ( $p < 0,05$ ) dibandingkan kelompok kontrol negatif, kelompok terapi 1 dengan volume 1 ml/ekor/hari dan kelompok terapi 2 dengan volume 2 mL/ekor/hari. Namun ekspresi TNF- $\alpha$  dengan pemberian terapi dengan volume 2 mL/ekor/hari tidak berbeda nyata ( $p > 0,05$ ) dengan kontrol negatif. Sehingga hasil penelitian ini menyatakan bahwa secara statistik terapi dengan volume 2 mL/ekor/hari merupakan volume terbaik.



## BAB 6 PENUTUP

### 6.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat ditarik kesimpulan bahwa:

1. Terapi air minum dalam kemasan yang mengandung oksigen 100 ppm dengan volume 2 mL/ekor/hari merupakan volume terbaik dalam memperbaiki kerusakan sel epitel pada organ trakea pada tikus (*Rattus norvegicus*) model asma yang diinduksi LPS dan Ovalbumin.
2. Terapi air minum dalam kemasan yang mengandung oksigen 100 ppm dengan volume 2 mL/ekor/hari merupakan volume terbaik dalam menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor Alpha*) pada tikus (*Rattus norvegicus*) model asma yang diinduksi LPS dan Ovalbumin.

### 6.2 Saran

Air minum dalam kemasan yang mengandung oksigen 100 ppm ternyata mampu dijadikan sebagai salah satu alternatif terapi untuk penyakit asma. Namun, diharapkan adanya kajian lebih lanjut mengenai penelitian tersebut.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ardinata, D. 2008. *Eosinofil dan Patogenesis Asma*. Majalah Kedokteran Nusantara 41(4).
- Agrios, G.N. 2005. *Plant Pathology*. 5th Edition. Elsevier Academic Press. California. 205-922.
- Amrani, Y, Panettieri R.A Jr, Frossard N, Bronner C. 1996. *Activation of The TNF Alpha-P55 Receptor Induces Myocyte Proliferation and Modulates Agonist-Evoked Calcium Transients in Cultured Human Tracheal Smoothmuscle Cells*. Am J Respir Cell Mol Biol 15: 55-63.
- Bascones, M.A and Figuro, R. 2005. Periodontal Diseases as Bacterial Infection. *Av Periodon Implantol* 17(3):111-8.
- Barnes, A. S. 2012. *Obesity and Sedentary Lifestyles Risk for Cardiovascular Disease in Women*. Houston: Texas Heart Institute
- Busse, W.W. and R.F. Lemanske, Jr. 2001. *Asthma*. The New England Journal of Medicine 344(5): 350-362.
- Dow, M., M. A. Newman & E.V.Roepenack. 2000. *The Induction and Modulation of Plant Defense Responses by Bacterial Lipopolysaccharides*. Annual Review Phytopathology 38: 241-261.
- Caramori, G. And A, Papi. 2004. *Oxidants and Asthma*.Thorax 59 (2). 170-173.
- Chaudhari, B., Jagdale, P., Raisuddin,S. 2011. *Histological Studies in Murine Model of Asthma: Effect of Stat3 siRNA*. Journal of Applied Pharmaceutical Science 1(10): 77-84.
- Erbs, G & M. A. Newman. 2003. *The Role of Lipopolysaccharides in Induction of Plant Defence Responses*. Molecular Plant Pathology 4(5): 421-425.
- Fardian, N., Johan, A., dan Kisdjamiatun, R,A. 2015. *Pengaruh Pemberian Seng terhadap Indeks Fagositosis Makrofag dan Kadar Nitric Oxide Mencit Balb/C yang Terpapar Lipopolisakarida e.Coli*. Jurnal Gizi Indonesia 3(2): 68-72.
- Forth & Adams, R.H. 2001. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics 8nd edition*. State University Press Ames. Iowa. 818-819, 868-869.
- Foster, S.F.,Allan,P., and I.D,Robertson. 2004. *Twenty Five Asthma Syndrom (1995-2000)*. Journal of Feline Medical and Surgery 6(3):181-188.

- Hendrik, H. 2006. *Problema Haid (Tinjauan Syariat Islam dan Medis)*. Tiga Serangkai. Solo.
- Irsa, L. 2005. *Penyakit Alergi Saluran Napas yang Menyertai Asma*. Sari Pediatri 7(1): 19-25.
- Jatakanon A, Uasuf C, Maziak W, Lim S, Chung K.F, Barnes P.J. 1999. *Neutrophilic Inflammation in Severe Persistent Asthma*. Am J Respir Crit Care Med. 160: 1532-9.
- Junqueira, L & Carneiro. 2007. *Persiapan Jaringan untuk Pemeriksaan Mikroskopik*. Edisi 10. EGC. Jakarta. 3-5.
- Kelly M.M, Leigh R, McKenzie R, Kamada D, Ramsdale E.H, Hargreave F.E. 2000. *Induced Sputum Examination: Diagnosis of Pulmonary Involvement in Fabry's Disease*. Thorax 55: 720-721.
- Kusumaati, D. 2004. *Bersahabat dengan Hewan Coba*. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Lickteig, A.J., Craig D. Fisher, Lisa M. Augustine, Lauren M. Aleksunes, David G., Besselsen, Angela L., Slitt, Jose E., Manautou, and Nathan J. Cherrington. 2007. *Efflux Transporter Expression and Acetaminophen Metabolite Excretion Are Altered in Rodent Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. Drugs Metabolism and Disposition J 35 (10):1970-1978.
- Liu S, K., Chihara and K, Maeyama. 2005. *The Contribution of Mast Cells to The Late-Phase of Allergic Asthma in Rats*. Inflamm Res 2005; 54:221-8.
- Mariano, F.S., Janaina., Cristiane, D., Jose F.H., Reginaldo, B.G. 2010. *The Role of Immune System in The Development of Periodontal Disease: A Brief Review*. Rev Odonto Cienc 25(3): 300-305.
- Matondang, M.A. 2008. *Pengaruh Minuman Beroksigen dibanding Minum Air Biasa terhadap Nilai FEV1, FVC, VO<sub>2</sub> MAX dan Frekuensi Napas pada Latihan Fisik*. USU.
- Merijanti, L.T. 1999. *Peran Sel Mast dalam Reaksi Hipesensitivitas Tipe-I*. J Kedokteran Trisakti 18(3):145.
- Montgomery & Kowalsky. 2011. *Applied Statistics and Probability for Engineers*. 5th Ed. John Wley. Hoboken, NJ.

- Muntiha, M. 2001. *Teknik Pembuatan Preparat Histopatologi dari Jaringan Hewan dengan Pewarnaan Hematoksin Eosin (H&E)*. Temu Teknis Fungsional Non Peneliti: Bogoe.
- Muthmainah, 2011. *Pengaruh Akupunktur terhadap Jumlah Eosinofil Bronkiolus Tikus Putih Model Asma*. Artikel Penelitian 61 (3).
- Myers, P dan Armitage, D. 2004. *Rattus norvegicus Animal Diversity*. [http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Rattus\\_norvegicus](http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Rattus_norvegicus). [31 Maret 2016].
- National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI). 2007. *Expert Panel Report 3: Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma*. U.S. Department of Health and Human Services. <http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/asthma/asthgdln.pdf>. [31 Maret 2016].
- Newman, M.A., J.M. Dow & M.J. Daniels. 2001. *Bacterial Lipopolysaccharides and Plant Pathogen Interactions*. European Journal of Plant Pathology 107: 95-102.
- Ngestiningsih, D., Diana N., Innawati, J. 2003. *Pengaruh Pemberian Epigallocatechin Gallate (EGCG) Teh Hijau terhadap Kadar Eosinofil pada Mencit yang Disentisasi dengan Ovalbumin*. Laporan Penelitian Dik Rutin. Bagian Biokimia., Semarang.
- Nials, A.T., and S, Uddin. 2008. *Mouse Models of Allergic Asthma: acute and Chronic Alergen Challenge*. Journal Dis Model Mech, 1(4-5): 213–220.
- Oemiati, R., Sihombing, M., Qomariah. 2010. *Faktor-Faktor yang Berhubungan dengan Penyakit Asma di Indonesia*. Media Litbang Kesehatan. Volume 20, No.1.
- Ofusori, D.A., Enaibe, B.U., Falana, B.A., Adeeyo, O.A., Yusuf, U.A., dan Ajayi, S.A. 2008. *A Comparative Morphometric Analysis of the Stomach in Rat Rattus norvegicus, Bat Eidolon Helvum and Pangolin Manis tricuspis*. Journal of Cell and Animal Biology 2(3): 079-083.
- Peter J.B., Fan C.K., Clive P.P. 1999. *Inflammatory mediators of asthma: An update*. The American society for pharmacology and experimental therapeutics 50: 515-96.
- Prasetyo, B., Erry, G.D., Teguh W., dan Achmad Y. 2014. *Pengaruh Ekstrak Kulit Batang Cempedak (Artocarpus chamedon) terhadap Parasitemia serta Ekspresi NFkB COX-2 Plasenta Mencit BABL/c Bunting Model yang*

*Diinfeksi Plasmodium berghei*. Majalah Obstetri & Ginekologi 22(3): 132-139.

Priyantoro, S.T.Y., Sudjari, dan Setyawati, S.D. 2004. *Efek Ekstrak Daun Ciplukan (Physalis Minima L) terhadap Relaksasi Otot Polos Terpisah Trakea Marmut (Cavia Porcellus)*. Jurnal Kedokteran Brawijaya. Volume 20, No.1.

Purnama, L. 2004. *Teknologi Produksi Air Beroksigen. Materi Presentasi dalam Diskusi Ilmiah Air Minum Penambah Oksigen*. R&K Health Living dan FATETA IPB, Bogor.

Putri, W.N. 2009. *Aktivitas Spesifik*. Badan Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. 17.

Ramadhan, F.A. 2013. *Pengaruh Waktu Kematian terhadap Kemampuan Pergerakan Silia Cavitas Nasi Hewan Coba Post Mortem yang Diperiksa pada Suhu Kamar dan Suhu Dingin [Skripsi]*. Fakultas Kedokteran. Universitas Diponegoro.

Ramadhani, I. 2009. *Efek Konsumsi Air Minum Penambahan Oksigen Terhadap Proliferasi Sel Limfosit Manisia [Skripsi]*. Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Reed, C.E., and H, Kita. 2004. *The Role Of Protease Activation Of Inflammation In Allergic Respiratory Disease*. Journal Allergy Clinical Immunology. 114(5):997- 1008.

Rengganis, dan Indri. 2008. *Diagnosis dan Tatalaksana Asma Bronkial*. Majalah Kedokteran Indonesia 58: 444-51.

Rengganis, I. 2014. *Imunologi Dasar*. Edisi ke 11. Badan Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. 226.

Rifai, M. 2011. *Alergi dan Hipersensitif [Diktat]*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya.

Rozaliyani, A., Agus, D.W.S., Boedi, S., Faisal, Y. 2011. *Mekanisme Resistens Kortikosteroid pada Asma*. J Respir Indo 31(4).

Rubbo, H., Radi, R., and Anselmi, D. 2000. *Nitric Oxide Reaction with Lipid Peroxyl Radicals Spares  $\alpha$ -Tocopherol during Lipid Peroxidation*. The Journal of Biological Chemistry vol 275 (15): 10812-10818.

- Setiabudi, A. 2005. *Perbandingan Ekspresi Sel T CD4<sup>+</sup> di Jaringan Sekitar Luka Dengan dan Tanpa Infiltrasi Levobupivakain pada Nyeri Pasca Insisi Studi Imunohistokimia pada Tikus Wistar*. [M.Si.Med.Thesis]. Universitas Diponegoro.
- Sigeo, C.C. 1993. *Bacterial Plant Pathology: Cell and Molecular Aspects*. Cambridge University Press. Cambridge. 11-325.
- Sitompul, R. 2011. *Kortikosteroid dalam Tata Laksana Uveitis: Mekanisme Kerja, Aplikasi Klinis, dan Efek Samping*. [https://www.google.co.id/?gws\\_rd=cr,ssl&ei=9MAcVGHJNDhuQTel4vYBQ#q=nfkb+pada+sel+mast.pdf](https://www.google.co.id/?gws_rd=cr,ssl&ei=9MAcVGHJNDhuQTel4vYBQ#q=nfkb+pada+sel+mast.pdf). [26 April 2016].
- Smeltzer, Suzanne C. dan Bare, Brenda G, 2002, *Buku Ajar Keperawatan Medikal Bedah Brunner dan Suddarth. Volume 8*, No.12. EGC: Jakarta.
- Strohmeier, G.R., et al. 2001. *Lipopolysaccharide Binding Protein Potentiates Airway Reactivity in a Murine Model of Allergic Asthma*. *J Immunol* 166: 2063-2070.
- Sugiyanto, 1995. *Petunjuk Praktikum Farmasi Edisi IV*. Laboratorium Farmasi dan Taksonomi UGM. Yogyakarta. 11-12.
- Sundaru, H. 2002. *Asma*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Swarayana, M.I, Sudira, I.W, Berata, I.K. 2012. *Perubahan Histopatologi Hati Mencit (Mus musculus) yang Diberikan Ekstrak Daun Ashitaba (Angelica keiskei)*. *Buletin Veteriner Udayana* 4(2): 19-125.
- Tillie, Leblond I, Pugin J, Marquette CH. 1999. *Balance Between Proinflammatory Cytokines Andtheir Inhibitors in Bronchial Lavage from Patients with Status Asthmaticus*. *Am J Respir Crit. Care Med* 159: 487-94.
- Utomo, H. 2006. *Management of Oral Focal Infection in Patients with Asthmatic Symptoms*. *Dent J* 39(3): 120-125.
- Utomo, H. 2012. *Rapid Relief Mechanism of Allergic Rhinosinosis After "Assisted Drainage" Therapy*. *Journal of Dentistry Indonesia* 19(3): 57-64.
- Warouw, NN. 2008. *Penyakit Saluran Pernapasan*. Edisi 4. PT Bina Husada Sarwono, Prawirohardjo. Jakarta.810-813.

Wang and Ohura. 2002. *Porphyromonas gingivalis* Lipopolysaccharide Signaling in Gingival Fibroblasts CD14 and Tolllike Receptor. Journal Critical Reviews in Oral Biology & Medicine. 13 : 132

Wadsworth, S.J., S. J, Yang., and D.B, Dorscheid. 2012. IL-13, *Asthma and Glycosylation in Airway Epithelial Repair*. License InTech Carbohydrates – Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology.

Zakaria, F. R. 2005. *Air Minum Beroksigen Tinggi Aman untuk Dikonsumsi*. Tulisan Ilmiah. R&K Beverages, Bogor.

Zosky, G.R., Larcombe, A.N., White, O.J. 2007. *Ovalbumin Sensitised Rat are Good Models For Airway Hiperresponsiveness Clinical and Experimental Allergy*. Journal of Immunology 179: 5748-5749.





**LAMPIRAN**



Lampiran 1. Sertifikasi Laik Etik



**KOMISI ETIK PENELITIAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
"ETHICAL CLEARANCE"**

No: 537-KEP-UB

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG  
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:**

**PENELITIAN BERJUDUL** : AKTIVITAS TERAPI AIR OKSIGEN PADA *Rattus norvegicus* MODEL ASMA YANG DIINDUKSI LPS DAN OVALBUMIN

**PENELITI** : LUCKY RETNO PUTRI

**UNIT/LEMBAGA/TEMPAT** : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

**DINYATAKAN** : LAIK ETIK

Malang, 13 April 2016

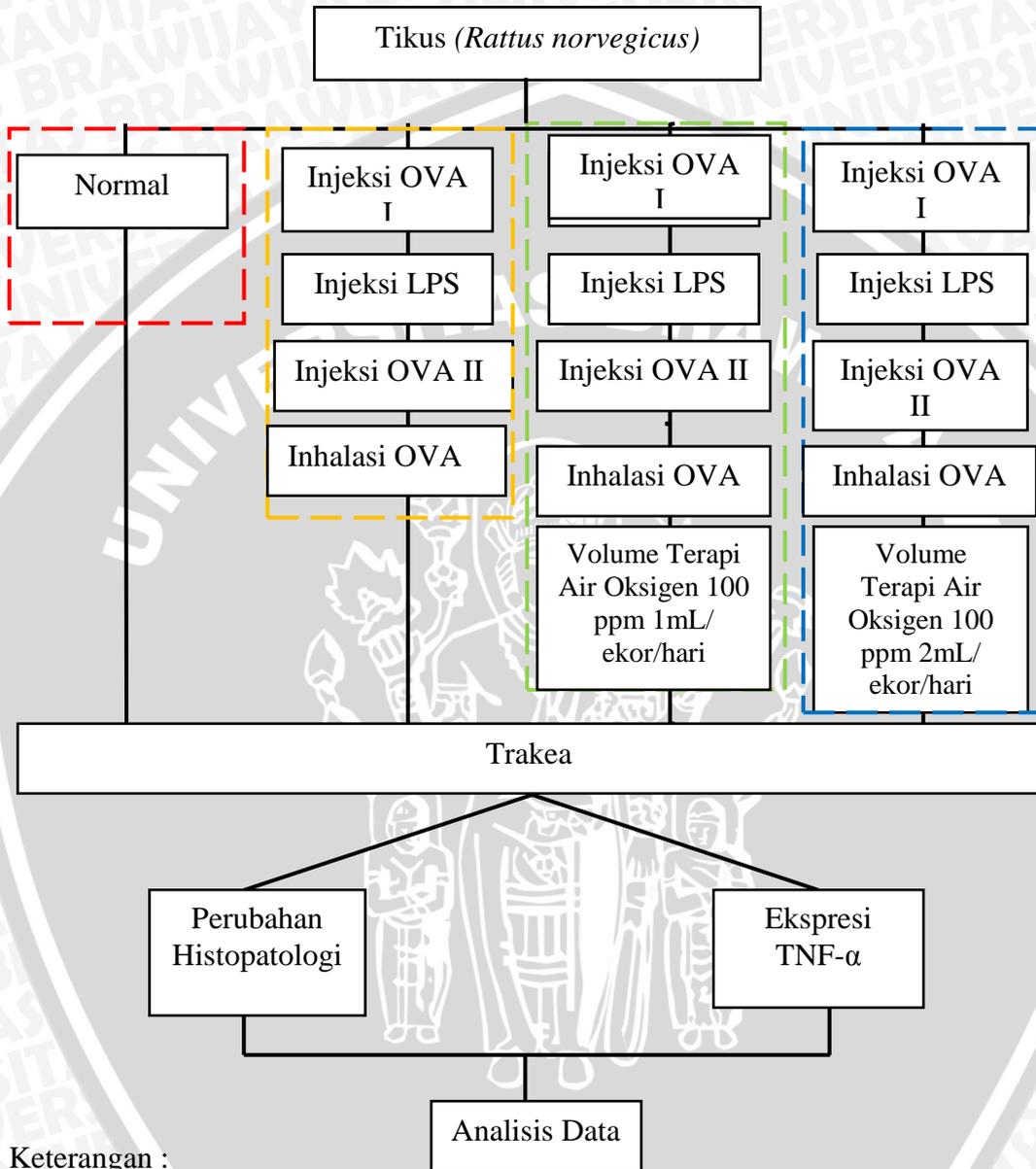
Ketua Komisi Etik Penelitian  
Universitas Brawijaya



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



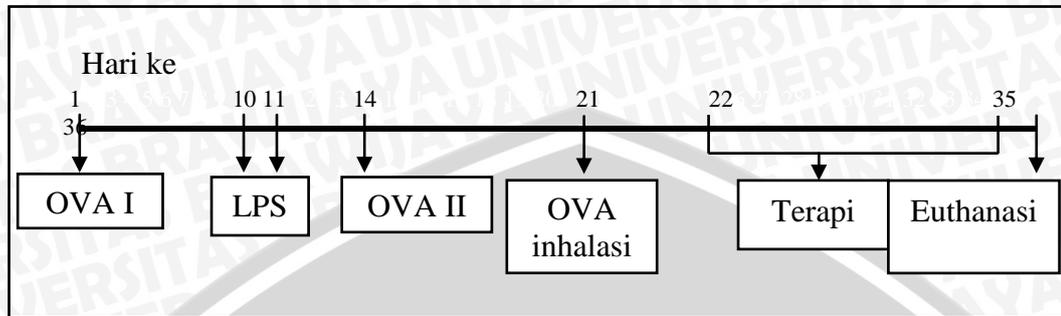
**Lampiran 2. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian**  
**A. Sistema Kerja Penelitian**



Keterangan :

- Kelompok kontrol Negatif
- Kelompok Kontrol Positif
- Kelompok Terapi 1
- Kelompok Terapi 2

## B. Rancangan Perlakuan



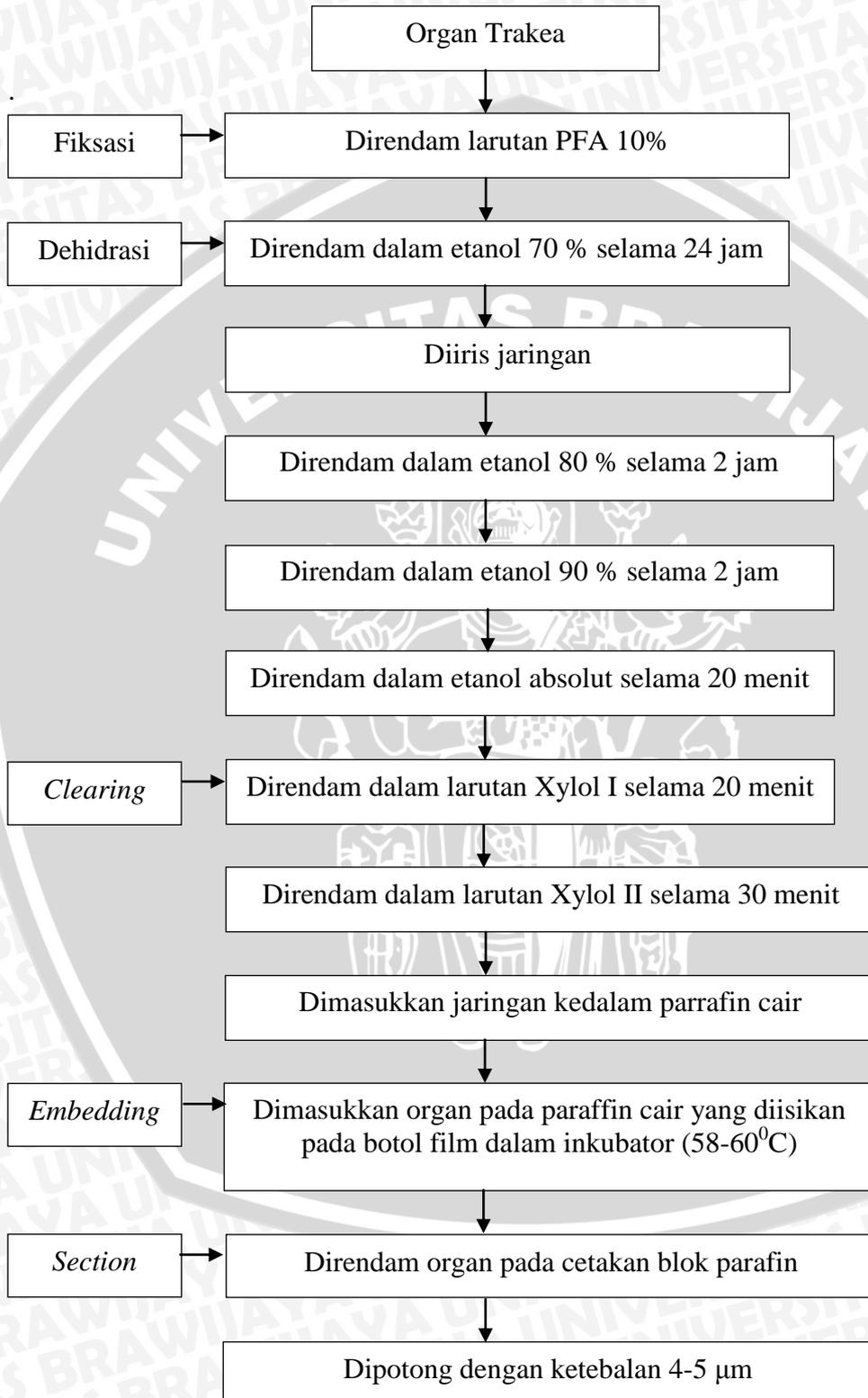
### Keterangan :

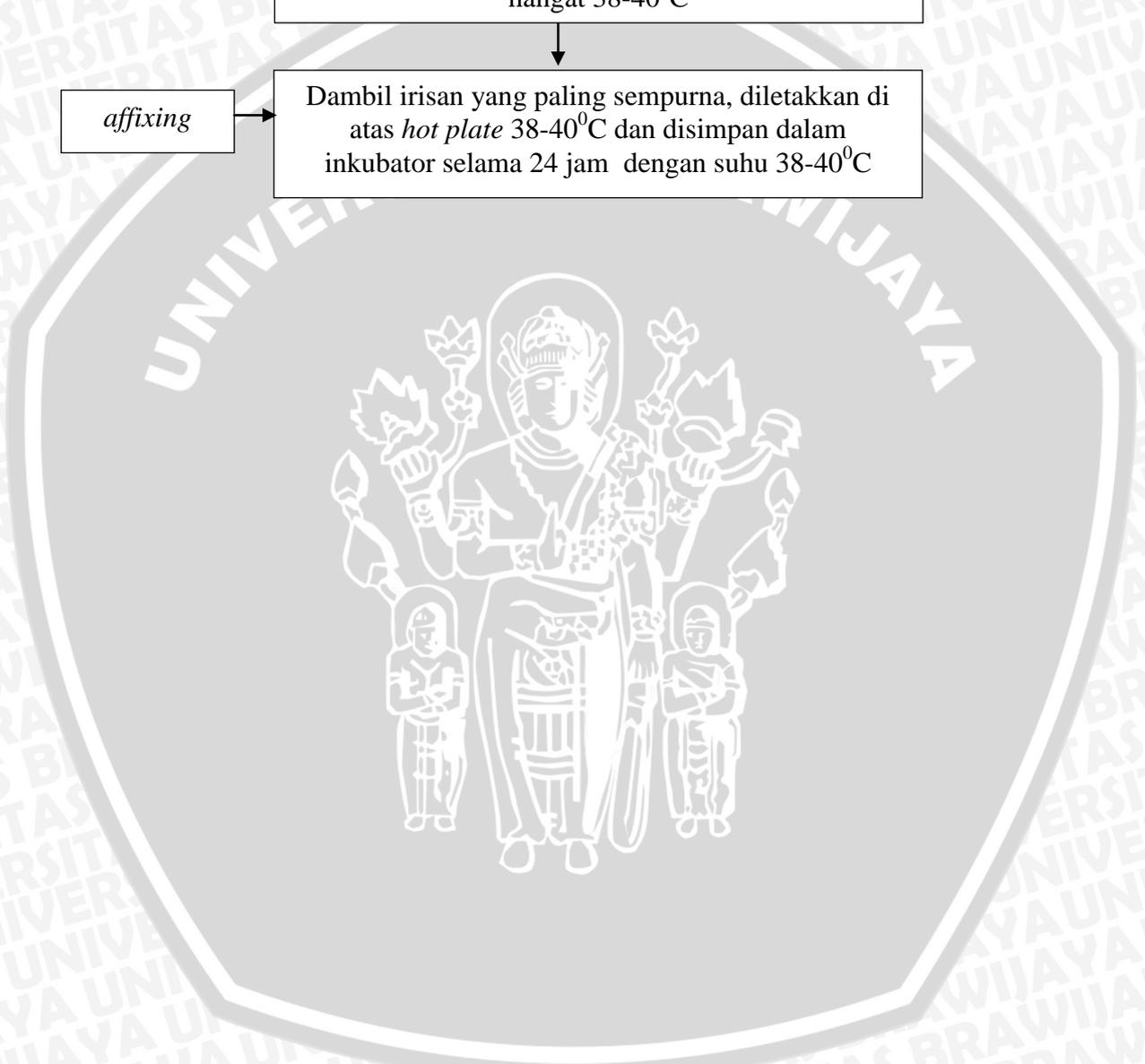
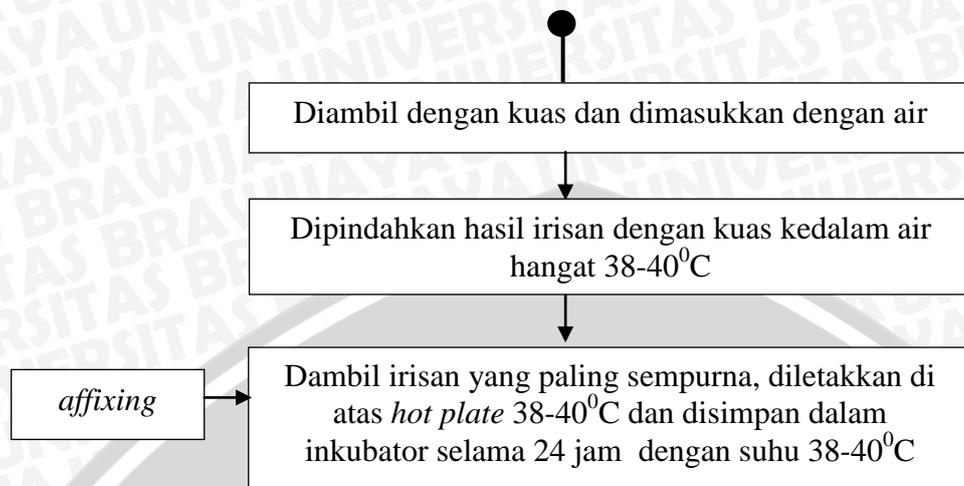
1. Injeksi OVA I dan OVA II dilakukan secara intra peritoneal dengan konsentrasi  $10 \mu\text{g/mL}$  dengan Ajuvan  $\text{AlOH}_3$  sebanyak  $1,5 \text{ mg}$  dalam  $200 \mu\text{l}$  larutan PBS.
2. Pemberian LPS dilakukan pada hari ke-11 dan ke-12 dengan konsentrasi  $1 \mu\text{g/mL}$  dalam  $200 \mu\text{l}$  larutan PBS pada sulkus gingiva molar rahang atas.
3. Inhalasi OVA dilakukan pada hari ke -21 dengan cara nebulasi OVA dalam larutan NaCl fisiologis dengan konsentrasi  $1 \text{ mg/mL}$  selama 20 menit.
4. Terapi Air Oksigen dilakukan pada hari- 21 pada kelompok terapi. Kelompok terapi 1 diberikan volume air oksigen sebanyak  $1 \text{ mL/ekor/hari}$ . Kelompok terapi 2 diberikan volume air oksigen sebanyak  $2 \text{ mL/ekor/hari}$ . Terapi dilakukan sehari satu kali selama 14 hari.
5. Pada hari ke-36 dilakukan eutanasi serta pembedahan untuk dilakukan pengambilan organ dan dilakukan uji lanjutan untuk mengetahui ekspresi  $\text{TNF-}\alpha$  dan gambaran histopatologi.

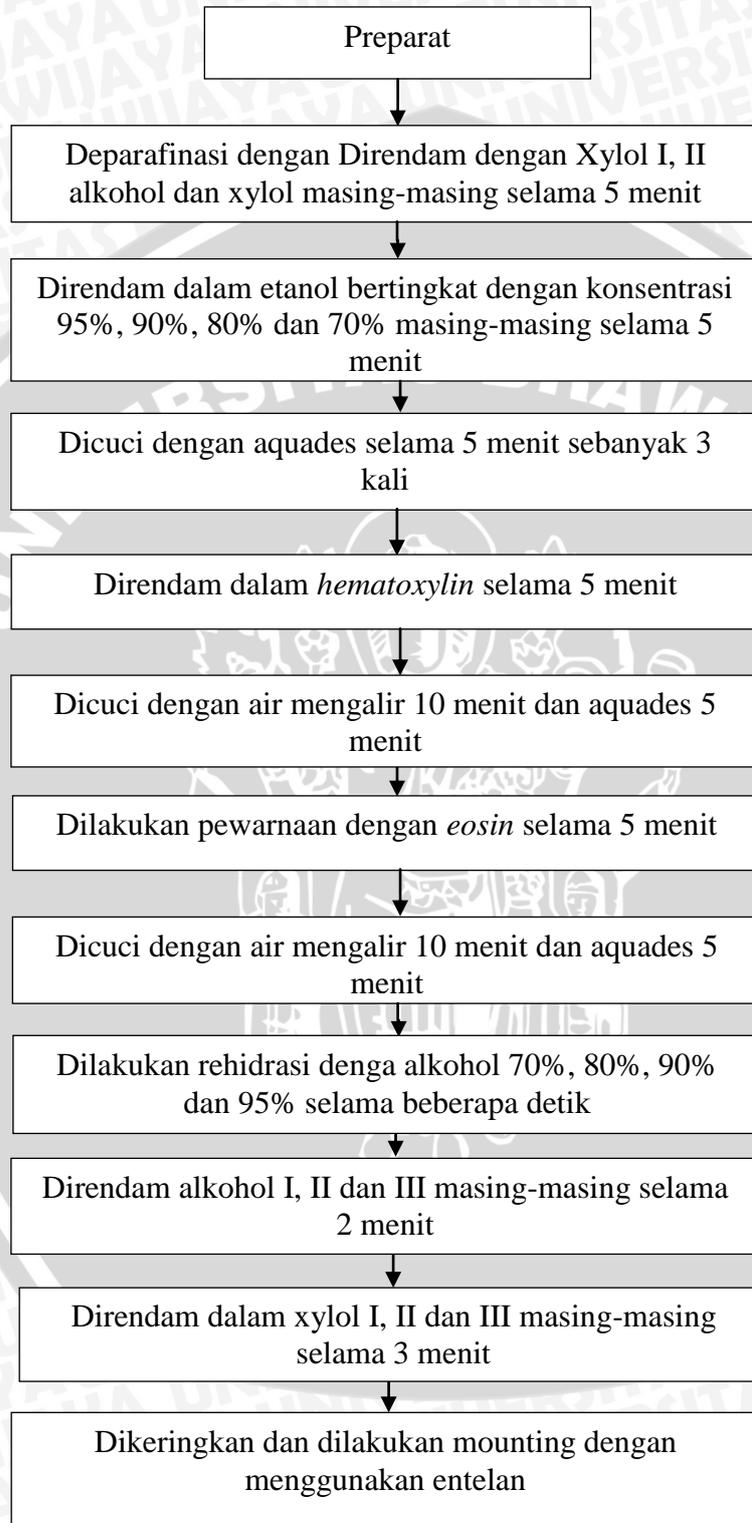
**Lampiran 3. Komposisi Larutan**

No.	Larutan	Bahan- bahan
1.	NaCl fisiologis 0,9 %	4,5 gram NaCl Akuades
2.	PBS pH 7,4	0,2 gram KCl 0,2 gram $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 8 gram NaCl 2,16 gram $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{H}_2\text{O}$
3.	Larutan OVA injeksi	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ OVA 1,5 mg $\text{AlOH}_3$ 200 $\mu\text{l}$ PBS
4.	Larutan Ova Inhalasi	1 mg/mL OVA NaCl fisiologis 0,9 %
5.	Larutan LPS Injeksi	LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 200 $\mu\text{l}$ PBS

#### Lampiran 4. Pembuatan Histologi Trakea





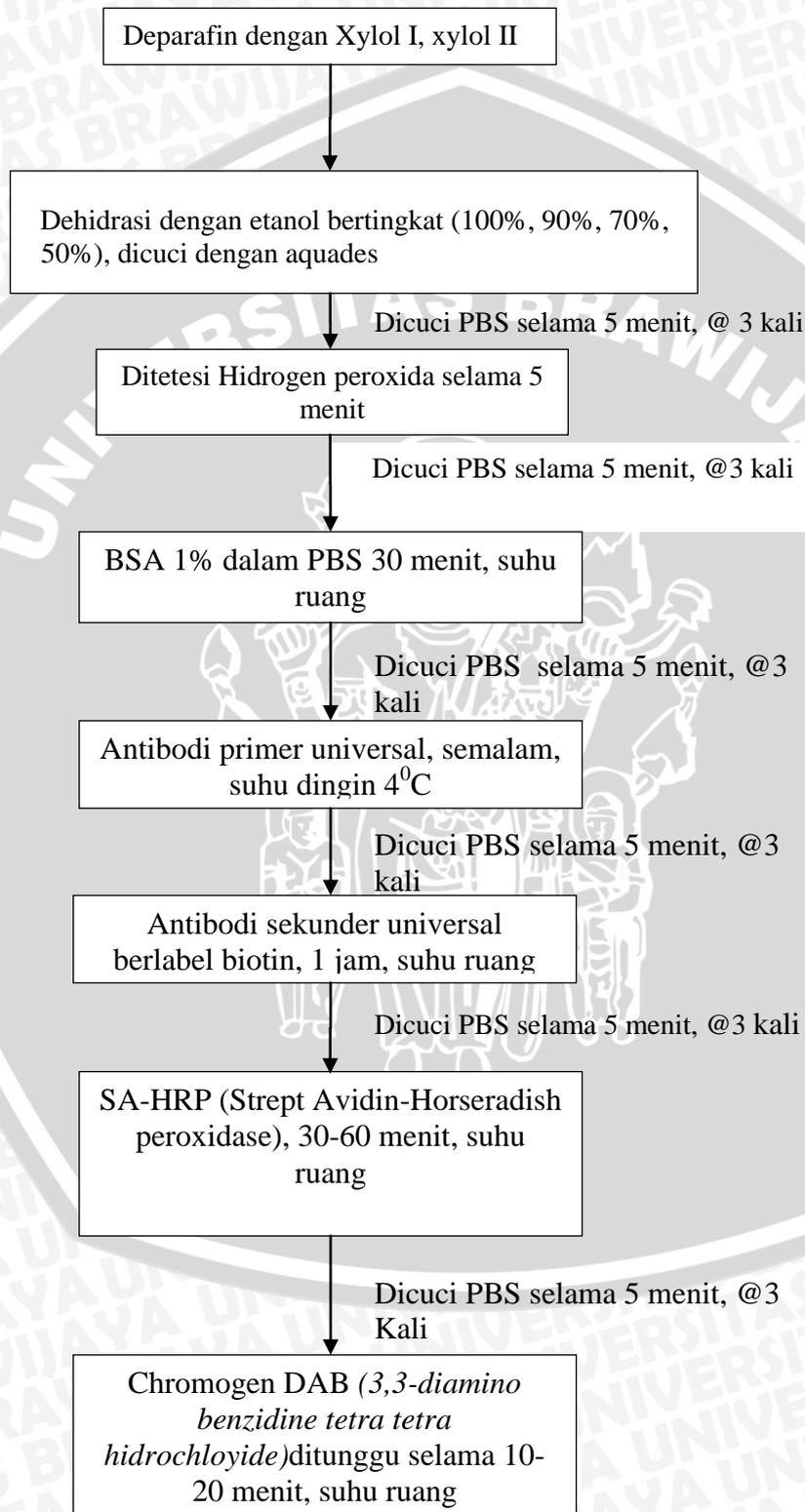
**Lampiran 5. Pewarnaan Preparat dengan Hematoksilin- Eosin (HE)**

Pelabelan

Ditutup dengan menggunakan cover glass



## Lampiran 6. Prosedur Pewarnaan Preparat dengan Metode Imunohistokimia





Dicuci aquades, 5 menit, @3 kali

Counterstaining dengan  
(*Hematoxylen*), 5 menit, suhu ruang

Dicuci dengan aquades 5 menit, @ 3 kali

Mounting dengan entelan

Pengamatan dibawah mikroskop



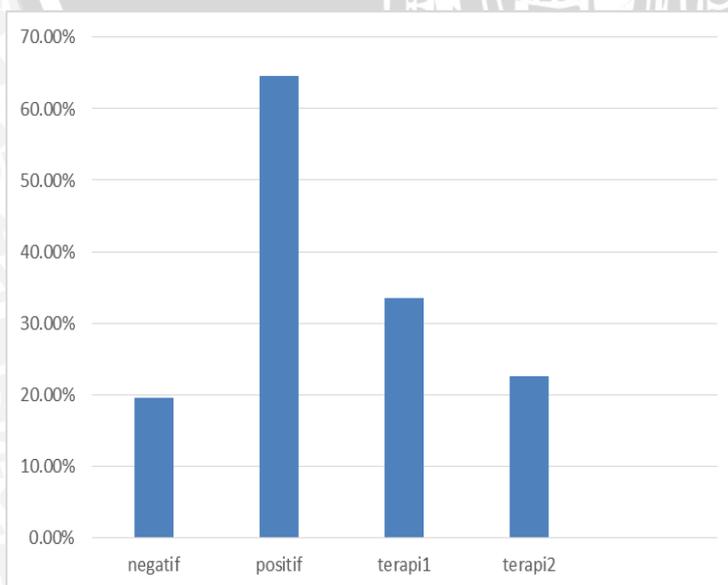
**Lampiran 7. Data dan Uji Statistik Ekspresi TNF- $\alpha$**   
**A. Tabel Data Ekspresi TNF- $\alpha$**

Perlakuan	U1	U2	U3	U4	U5	Rata-rata
<b>Kontrol Negatif</b>	15,80	18,50	18,50	23,10	22,00	19,58
<b>Kontrol Positif</b>	60,10	67,20	67,90	70,00	58,10	64,66
<b>Terapi 1 ml/ekor/hari</b>	34,30	30,50	38,70	31,00	33,10	33,52
<b>Terapi 2 ml/ekor/hari</b>	23,70	22,00	22,40	22,20	23,80	22,58

**STDEV (Standar Deviasi)**

<b>Kontrol Negatif</b>	2,95%
<b>Kontrol Positif</b>	5,23%
<b>Terapi 1 ml/ekor/hari</b>	3,28%
<b>Terapi 2 ml/ekor/hari</b>	0,77%

**B. Grafik Ekspresi TNF- $\alpha$**



### C.Persentase kenaikan dan penurunan ekspresi TNF- $\alpha$

#### Kontrol negatif

$$\text{Kenaikan Ekspresi TNF-}\alpha \text{ (\%)} = \frac{(\text{Rataan Negatif}-\text{Rataan Negatif})}{\text{Rataan Negatif}} \times 100\%$$

$$= \frac{(19,58-19,58)}{19,58} \times 100\%$$

$$= 0\%$$

#### Kontrol Positif

$$\text{Kenaikan Ekspresi TNF-}\alpha \text{ (\%)} = \frac{(\text{Rataan Positif}-\text{Rataan Negatif})}{\text{Rataan Negatif}} \times 100\%$$

$$= \frac{(64,66-19,58)}{19,58} \times 100\%$$

$$= 230,23\%$$

#### Terapi 1 ml/ekor/hari

$$\text{Penurunan Ekspresi TNF-}\alpha \text{ (\%)} = \frac{(\text{Rataan Positif}-\text{Rataan Terapi 1 ml/ekor/hari})}{\text{Rataan Positif}} \times 100\%$$

$$= \frac{(64,66-33,52)}{64,66} \times 100\%$$

$$= 48,15\%$$

#### Terapi 2 ml/ekor/hari

$$\text{Penurunan Ekspresi TNF-}\alpha \text{ (\%)} = \frac{(\text{Rataan Positif}-\text{Rataan Terapi 2 ml/ekor/hari})}{\text{Rataan Positif}} \times 100\%$$

$$= \frac{(64,66-22,58)}{64,66} \times 100\%$$

$$= 65,07\%$$

## Lampiran 8. Analisis Statistik Menggunakan SPSS 23

### A. Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol negatif	5	19.5800	2.95246	1.32038	15.9140	23.2460	15.80	23.10
Kontrol positif	5	64.6600	5.22714	2.33765	58.1696	71.1504	58.10	70.00
Terapi 1 ml/ekor/hari	5	33.5200	3.28207	1.46779	29.4448	37.5952	30.50	38.70
Terapi 2 ml/ekor/hari	5	22.8200	.86139	.38523	21.7504	23.8896	22.00	23.80
Total	20	35.1450	18.53868	4.14537	26.4686	43.8214	15.80	70.00

### B. Test of Homogeneity of Variances

IHK

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5.777	3	16	.07

### C. ANOVA

IHK

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6339.754	3	2113.251	177.756	.000
Within Groups	190.216	16	11.889		
Total	6529.970	19			

## D. Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: IHK

Tukey HSD

(I) Kelom-pok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol negatif	Kontrol positif	-45.08000 <sup>*</sup>	2.18069	.000	-51.3190	-38.8410
	Terapi 1 ml/ekor/hari	-13.94000 <sup>*</sup>	2.18069	.000	-20.1790	-7.7010
	Terapi 2 ml/ekor/hari	-3.24000	2.18069	.468	-9.4790	2.9990
Kontrol positif	Kontrol negatif	45.08000 <sup>*</sup>	2.18069	.000	38.8410	51.3190
	Terapi 1 ml/ekor/hari	31.14000 <sup>*</sup>	2.18069	.000	24.9010	37.3790
	Terapi 2 ml/ekor/hari	41.84000 <sup>*</sup>	2.18069	.000	35.6010	48.0790
Terapi 1 ml/ekor/hari	Kontrol negatif	13.94000 <sup>*</sup>	2.18069	.000	7.7010	20.1790
	Kontrol positif	-31.14000 <sup>*</sup>	2.18069	.000	-37.3790	-24.9010
	Terapi 2 ml/ekor/hari	10.70000 <sup>*</sup>	2.18069	.001	4.4610	16.9390
Terapi 2 ml/ekor/hari	Kontrol negatif	3.24000	2.18069	.468	-2.9990	9.4790
	Kontrol positif	-41.84000 <sup>*</sup>	2.18069	.000	-48.0790	-35.6010
	Terapi 1 ml/ekor/hari	-10.70000 <sup>*</sup>	2.18069	.001	-16.9390	-4.4610

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

## E. Homogenous Subsets

IHK

Tukey HSD<sup>a</sup>

Kelompok	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Kontrol negatif	5	19.5800		
Terapi 2 ml/ekor/hari	5	22.8200		
Terapi 1 ml/ekor/hari	5		33.5200	
Kontrol positif	5			64.6600
Sig.		.468	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.