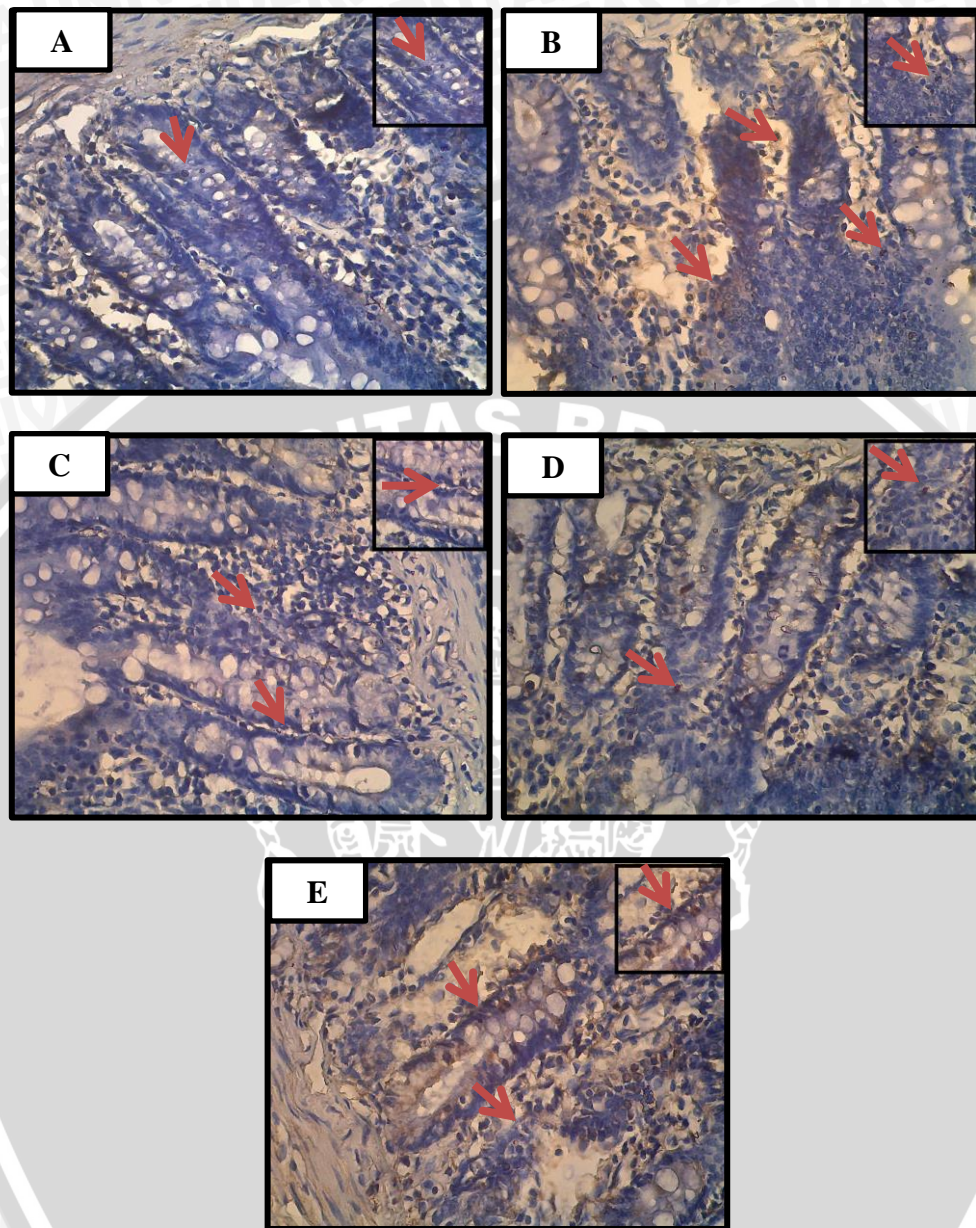


## BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Pengaruh *Virgin Coconut Oil* Fermentasi *Lactobacillus casei* Terhadap Ekspresi *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* (TNF- $\alpha$ ) Jejunum Tikus (*Rattus norvegicus*)

Metode imunohistokimia (IHK) merupakan suatu proses identifikasi protein spesifik pada jaringan atau sel menggunakan antibodi (Sukmadadari, 2012). Ekspresi TNF- $\alpha$  ditandai dengan munculnya warna coklat pada bagian sitoplasma. Hasil ekspresi TNF- $\alpha$  (**Gambar 5.1**) menunjukkan adanya warna coklat pada seluruh jaringan jejunum tikus (*Rattus norvegicus*) Salmonellosis. Konsep dasar dari IHK adalah menunjukkan adanya antigen di dalam jaringan oleh antibodi yang spesifik. Ketika ikatan antigen dan antibodi terjadi, ikatan ini akan diperlihatkan dengan sebuah reaksi warna histokimia (Ramos-Vara 2005). Metode imunohistokimia yang dilakukan adalah *indirect* menggunakan antibodi primer yang tidak ada labelnya, digunakan juga antibodi sekunder yang sudah memiliki label dan akan bereaksi dengan IgG dari antibodi primer. Pada metode uji yang dilakukan, digunakan chromogen Diaminobenzidine (DAB) dan enzim SA-HR untuk menunjukkan adanya ikatan tersebut, terlihat warna coklat spesifik pada sitokin (TNF-  $\alpha$ ) yang dapat dilihat dengan mikroskop. Analisis kuantitatif ekspresi TNF- $\alpha$  dilakukan menggunakan *immunoratio* dengan menghitung persen area ekspresi TNF- $\alpha$  pada lima lapang pandang kemudian dilakukan analisis statistika (*One Way ANOVA*) menggunakan program SPSS ( $p < 0,05$ ) dilanjutkan dengan uji Tukey untuk menentukan perbedaan antara perlakuan (**Lampiran 13**).



**Gambar 5.1** Ekspresi *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) pada jejunum tikus (*Rattus norvegicus*) perbesaran 400x.

Keterangan : A) Kelompok tikus kontrol negatif, B) Kelompok tikus kontrol positif, C) Kelompok tikus yang diberi perlakuan VCO fermentasi *Lactobacillus casei* dosis 3,4 ml/kgBB, D) Kelompok tikus yang diberi perlakuan VCO fermentasi *Lactobacillus casei* dosis 6,7 ml/kgBB, E) Kelompok tikus yang diberi perlakuan VCO fermentasi *Lactobacillus casei* dosis 10 ml/kgBB, Tanda panah merah (→) menunjukkan ekspresi TNF- $\alpha$ .

Hasil pewarnaan imunohistokimia pada tikus kontrol negatif menunjukkan ekspresi TNF- $\alpha$  (**Gambar 5.1A**). Adanya ekspresi TNF- $\alpha$  pada jaringan jejunum adalah normal karena sitokin TNF- $\alpha$  secara alami terdapat di dalam tubuh dalam jumlah relatif sedikit sebagai komponen imunitas. TNF- $\alpha$  merupakan suatu sitokin yang dihasilkan oleh leukosit yang berfungsi untuk merangsang dan mengaktifkan sistem imun terhadap respon inflamasi, dimana dalam keadaan normal, antigen yang masuk memicu reaktivitas imun pada imunitas nonspesifik maupun spesifik (Baratawidjaja, 2004).

Ekspresi TNF- $\alpha$  pada hasil pewarnaan imunohistokimia jaringan jejunum kontrol positif menunjukkan ekspresi TNF- $\alpha$  yang lebih banyak dibandingkan tikus kontrol negatif (**Gambar 5.1B**). Meningkatnya ekspresi TNF- $\alpha$  mengindikasikan terjadinya inflamasi pada jejunum tikus. Makrofag yang teraktivasi akibat infeksi bakteri patogen pada mukosa jejunum menginduksi sekresi protein yang dikenal dengan nama kemokin. Kemokin mempunyai kemampuan merekrut sel-sel lain yang memiliki reseptor kemokin, seperti neutrofil dan monosit dari sirkulasi darah menuju ke jaringan. Sitokin (TNF- $\alpha$ ) dan kemokin yang dihasilkan makrofag sebagai respon terhadap bakteri akan mengawali proses inflamasi. Terjadinya inflamasi akan direspon oleh tubuh melalui sekresi sel-sel radang seperti neutrofil, basofil, eosinofil dan limfosit. Sel radang yang lebih dahulu muncul ketika terjadi inflamasi adalah neutrofil yang berfungsi untuk memfagosit sel, namun apabila infiltrasi neutrofil terlalu banyak pada jaringan justru dapat

menyebabkan kerusakan karena neutrofil mampu memproduksi enzim protease (Butterfield *et al.*, 2006).

**Tabel 5.1** Ekspresi TNF- $\alpha$  jejunum tikus perlakuan

Kelompok	Rata-Rata Ekspresi TNF- $\alpha$	Ekspresi TNF- $\alpha$ (%)	
		Peningkatan Terhadap Kontrol Negatif	Penurunan Terhadap Kontrol Positif
Kelompok A (Kontrol Negatif)	29,795 $\pm$ 0,7835 <sup>a</sup>	-	-
Kelompok B (Kontrol Positif)	49,595 $\pm$ 0,4265 <sup>e</sup>	66,45	-
Kelompok C (Perlakuan 1)	44,600 $\pm$ 0,2514 <sup>d</sup>	-	10,07
Kelompok D (Perlakuan 2)	38,095 $\pm$ 0,4054 <sup>b</sup>	-	23,07
Kelompok E (Perlakuan 3)	42,650 $\pm$ 0,3775 <sup>c</sup>	-	14

Keterangan: Notasi a,b,c,d dan e menunjukkan perbedaan nyata antar perlakuan (P<0,05).

Analisis uji *one way* ANOVA menunjukkan bahwa pemberian VCO (*Virgin Coconut Oil*) Fermentasi *L. casei* dapat menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  secara signifikan (p<0,05), hal ini ditunjukkan dengan notasi yang berbeda antar perlakuan dengan uji lanjutan *Tukey* (**Tabel 5.1**). Pada kelompok kontrol positif berbeda signifikan (p<0,05) dengan kelompok kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa infeksi *Salmonella enteritidis* mampu meningkatkan ekspresi TNF- $\alpha$  sebagai salah satu sitokin proinflamasi yang mampu menyebabkan inflamasi jaringan. Kelompok kontrol positif

mengalami peningkatan ekspresi TNF- $\alpha$  sebesar 66,45% karena adanya infeksi *Salmonella enteritidis*. Infeksi *Salmonella enteritidis* mempunyai faktor virulensi utama berupa lipopolisakarida (LPS). Lipopolisakarida yang merupakan komponen utama dinding sel bakteri gram negatif yang dapat memicu beberapa jenis reaksi peradangan atau inflamasi pada sel makrofag dan sel lainnya yang memiliki reseptor CD4. LPS dinding bakteri pada sel dendritik dapat menstimulasi sel monosit dan makrofag untuk mensekresi nitrit oksida (NO) dan sitokin *proinflammatory* seperti TNF- $\alpha$ . Pelepasan jumlah produksi TNF- $\alpha$  pada saluran cerna akan meningkat dan dapat menimbulkan gejala berupa diare dan demam (Baratawidjaja dan Rengganis, 2013).

LPS pada *Salmonella enteritidis* menyebabkan produksi sitokin *proinflamasi* seperti TNF dan IL-1. Produksi TNF  $\alpha$  dan IL-1 yang berlebih dapat menyebabkan terjadinya inflamasi pada jejunum. Infeksi *Salmonella enteritidis* juga mengakibatkan kontraksi usus yang berlebih sehingga menuntut adanya penambahan energi yang berasal dari pemecahan glukosa. Hiperperistaltik yang terjadi pada usus dapat mengakibatkan diare karena berkurangnya kesempatan usus untuk dapat menyerap makanan, sehingga pelintasan *chymus* (makanan yang belum dicerna dengan sempurna) dipercepat dan masih banyak mengandung air pada saat meninggalkan tubuh sebagai feses (De Carvalho, *et al.*, 2008). Selain itu, diare akibat Salmonellosis juga disebabkan karena bertumpuknya cairan di usus akibat terganggunya keseimbangan absorpsi dan sekresi. Hal ini menyebabkan

peningkatan aktivitas terjadi karena bertambahnya energi kinetik yang diakibatkan adanya inflamasi mempercepat gerak rotasi enzim dengan substrat sehingga meningkatkan kecepatan reaksi enzim (Nofiana, 2002).

Hasil analisa secara statistika menggunakan *One-Way ANOVA* menunjukkan bahwa VCO fermentasi *L. casei* ( $p < 0,05$ ) memberi pengaruh yang berbeda nyata antar perlakuan sebagaimana ditunjukkan pada Tabel 5.1, perhitungan statistika secara lengkap dapat dilihat pada **Lampiran 13**. Perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ) untuk kelompok perlakuan 1, 2, dan 3 dengan kelompok kontrol positif menunjukkan bahwa terapi tersebut mampu menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$ . Penurunan ekspresi TNF- $\alpha$  pada kelompok C sebesar 10,07%, penurunan ekspresi TNF- $\alpha$  pada kelompok E sebesar 14%, sedangkan pada kelompok D menunjukkan penurunan yang lebih tinggi yaitu sebesar 23,07% (**Tabel 5.1**).

Penurunan ekspresi TNF- $\alpha$  menunjukkan adanya pencegahan inflamasi pasca pemberian VCO fermentasi *L. casei* yang mengandung dan asam laurat sebagai antibakteri dan vitamin E yang berfungsi sebagai antioksidan. Antioksidan merupakan senyawa aktif yang berperan untuk menghambat reaksi oksidasi dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif sehingga kerusakan sel dapat dihambat (Andayani *et al.*, 2008). Tubuh secara alami memiliki sistem antioksidan untuk menangkal reaktivitas radikal bebas secara berkelanjutan, namun jika jumlah radikal bebas dalam tubuh berlebih maka dibutuhkan antioksidan tambahan yang dapat diperoleh dari vitamin C, vitamin E, flavonoid, dan karotin (Erguder *et*

al.,2007). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Prapun (2016), VCO yang dibuat dengan cara fermentasi memiliki kandungan  $\alpha$ -tokoferol atau vitamin E yang lebih tinggi dibandingkan dengan metode pemanasan dan metode menggunakan enzim.

Vitamin E sangat penting untuk metabolisme dan merupakan senyawa yang larut dalam lemak dengan sifat antioksidan, yang bertindak sebagai *inactivator* radikal bebas. Vitamin E juga memiliki sifat anti-inflamasi. Terbukti bahwa vitamin E atau  $\alpha$ -tokoferol menurunkan pelepasan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan menurunkan pelepasan sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  dari monosit. Vitamin E telah berhasil mengurangi pelepasan TNF- $\alpha$  pada sistem yang terdapat Peripheral Blood Mononuclear cells (PBMNCs) distimulasi dengan LPS ( Bladen et al, 2013).

Penurunan ekspresi TNF- $\alpha$  pada kelompok E lebih rendah dari kelompok D, hal ini kemungkinan disebabkan karena vitamin E atau  $\alpha$ -tokoferol sebagai antioksidan berubah menjadi prooksidan. Pada konsentrasi tinggi, aktivitas antioksidan senyawa fenolik berupa tokoferol dapat lenyap, bahkan antioksidan tersebut menjadi prooksidan . Vitamin E bertindak sebagai prooksidan dalam keadaan tertentu tergantung dari dosis. Prooksidan dimediasi oleh aktivitas *dose-dependent* vitamin E (Hajiani et al, 2008).

Kandungan asam laurat dari VCO fermentasi *L.casei* akan bertindak sebagai anti bakteri bakterisidal. Asam laurat memiliki dua mekanisme antibakteri yaitu secara langsung merusak membran sel dan secara tidak langsung berinteraksi dengan membran melalui peningkatan permeabilitas,

kedua mekanisme tersebut akhirnya sama-sama menyebabkan sel pecah. Pada mekanisme yang pertama asam laurat yang merupakan asam lemak rantai sedang (*Medium Chain Fatty Acid*, MCFA) pada VCO didalam tubuh akan berubah menjadi monolaurin. *S. enteritidis* yang merupakan bakteri gram negatif memiliki lapisan membran berupa lipid bilayer. Monolaurin kemudian akan berpenetrasi dengan mudah melalui membran lipid dari bakteri *S. enteritidis* tersebut. Selanjutnya monolaurin akan melarutkan membran lipid tersebut sehingga bakteri menjadi lisis atau hancur. Pada mekanisme kedua, interaksi terjadi lebih spesifik pada lipid bilayer membran dan membentuk lubang atau sumur. Lubang atau sumur yang terbentuk akan menyebabkan berbagai macam bahan masuk ke dalam sel, sehingga sel membengkak dan pecah. Asam laurat memiliki kemampuan antibakteri dengan cara membunuh bakteri patogen tersebut namun tanpa merusak sel normal tubuh atau pun menghambat pertumbuhan bakteri normal tubuh (Noriko, 2014).

Pemberian VCO fermentasi *L. casei* dengan dosis pemberian 3,4 ml/kg (Kelompok C), 6,7 ml/kg BB (Kelompok D), dan 10 ml/kg BB (Kelompok E) berbeda signifikan ( $p < 0,05$ ) dengan kelompok kontrol negatif. Kelompok D dengan dosis pemberian 6,7 ml/kg BB secara statistika berbeda signifikan ( $p < 0,05$ ) dibandingkan kelompok kontrol positif dan juga yang paling mendekati dengan kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa kelompok D memberikan pengaruh terbaik terhadap penurunan ekspresi TNF- $\alpha$ .



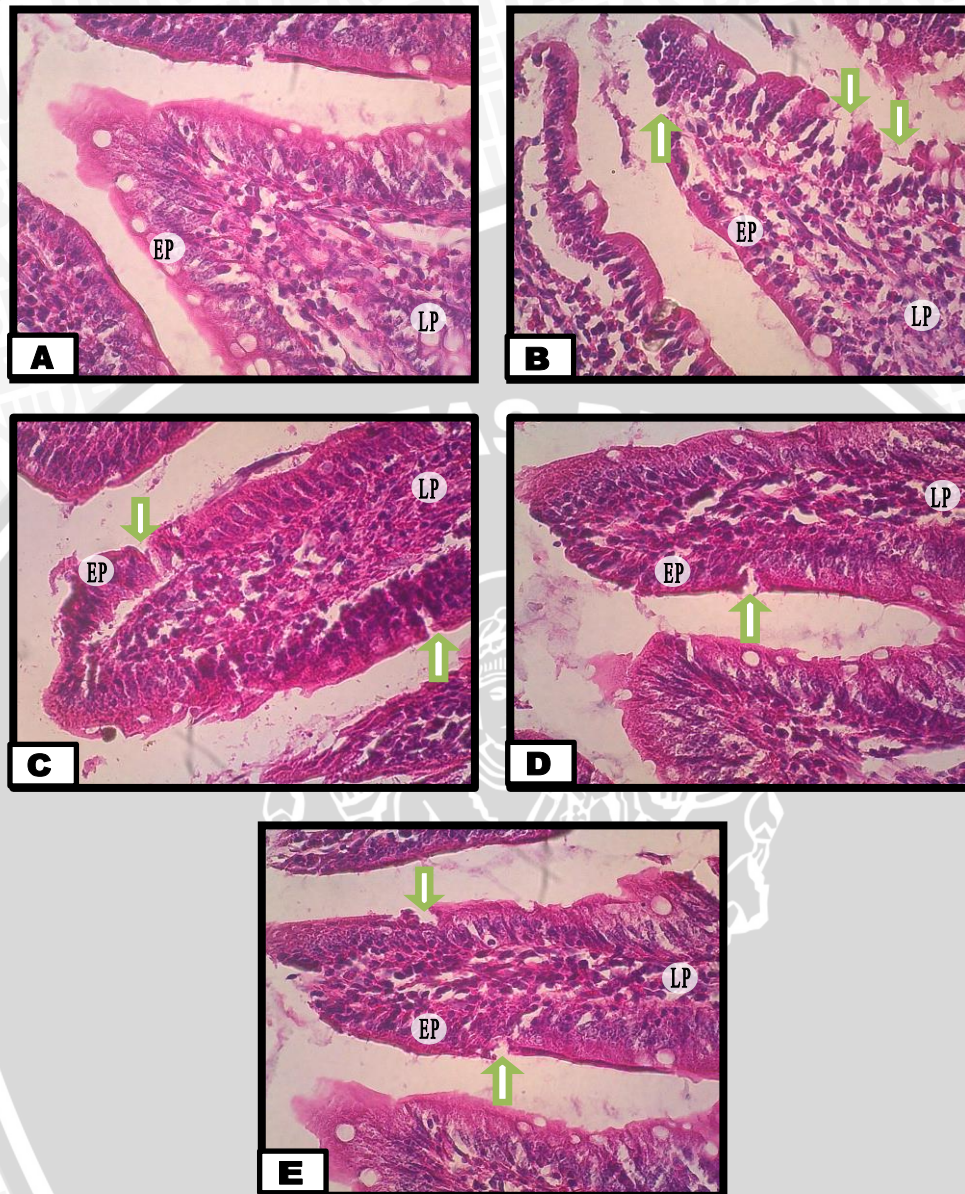
## 5.2 Gambaran Histopatologi Jejunum pada Hewan Coba Tikus (*Rattus norvegicus*) dengan Pewarnaan Hematoksilin Eosin

Pada penelitian ini, selain menggunakan menggunakan parameter ekspresi TNF- $\alpha$ , juga menggunakan parameter histopatologi organ jejunum. Pembuatan preparat histopatologi dengan menggunakan perwarnaan Hematoksilin Eosin (HE). Pengamatan preparat histopatologi dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya Olympus BX 51 melalui perbesaran 400x. Pengambilan gambar histopatologi menggunakan kamera dilakukan setelah mendapat gambar preparat yang diinginkan.

Pengamatan yang diamati meliputi perubahan vili jejunum yang berupa erosi sel-sel epitel kolumnar. Erosi pada epitel ditandai dengan terlepasnya sel epitel dari membrane basalis (Vegad, 2007). Epitel pada saluran pencernaan merupakan *barrier* pertama yang berinteraksi secara langsung terhadap antigen sehingga perubahan struktur pada epitel dapat digunakan sebagai indikasi adanya infeksi (Jawetz *et al.*, 2005)

Hasil penelitian tentang histopatologi jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinfeksi *Salmonella enteritidis* menunjukkan perubahan pada bentukan vili jejunum. Pada vili jejunum menunjukkan perubahan yaitu berupa adanya erosi pada sel-sel epitel kolumnar. Gambaran histopatologi jejunum pada masing-masing kelompok perlakuan dapat diamati pada

**Gambar 5.2.**



**Gambar 5.2** Histopatologi jaringan jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan pewarnaan Hematoksinilin Eosin perbesaran 400x.

Keterangan: A) Kelompok tikus kontrol negatif, B) Kelompok tikus kontrol positif, C) Kelompok tikus yang diberi perlakuan VCO fermentasi *Lactobacillus casei* dosis 3,4 ml/kgBB, D) Kelompok tikus yang diberi perlakuan VCO fermentasi *Lactobacillus casei* dosis 6,7 ml/kgBB, E) Kelompok tikus yang diberi perlakuan VCO fermentasi *Lactobacillus casei* dosis 10 ml/kgBB,  
 EP (Lapisan epithelial) : terdiri dari enterosit (sel epitel kolumner), sel goblet dan sel paneth.  
 LP (Lamina propia) : terdapat jaringan ikat, kapiler darah dan kelenjar mukosa berupa unit sekretori.  
 Panah hijau : erosi pada sel epitel

Histopatologi jejunum dalam keadaan normal (**Gambar 5.2A**) menunjukkan vili-vili usus yang tersusun rapi, rapat dan juga teratur. Didukung dari pernyataan Peckham (2014) yang menyebutkan bahwa pada jejunum normal dapat terlihat mukosa dengan vili yang berbentuk teratur, panjang dan tipis. Histologi dari kelompok A dapat dijadikan sebagai acuan adanya perubahan dan kerusakan yang terjadi pada kelompok lainnya. Saluran pencernaan secara normal terdiri dari beberapa lapisan, yakni mukosa, submukosa, dan muskularis. Hasil ini sudah sesuai dengan kondisi histologi jejunum dalam keadaan normal.

Hasil histopatologi dari kelompok B yang merupakan kontrol positif menunjukkan adanya kerusakan vili dikarenakan terjadinya inflamasi akibat penetrasi dari *Salmonella enteritidis* yang menyebabkan abnormalitas struktur vili, adanya erosi sel-sel epitel kolumnar (**Gambar 5.2B**), sesuai dengan gejala Salmonellosis pada kelompok B yaitu diare. Hal tersebut menjelaskan bahwa infeksi *Salmonella enteritidis* dengan dosis  $10^8$  cfu/ml/ekor dapat merusak jaringan jejunum, didukung juga oleh pernyataan Mitchell and Cotran (2003) bahwa inflamasi pada jejunum ditandai dengan hemoragi lamina propria serta kerusakan vili dan epitel.

Epitel pada saluran pencernaan merupakan *barrier* pertama yang berinteraksi secara langsung terhadap antigen sehingga perubahan struktur pada epitel dapat digunakan sebagai indikasi adanya infeksi (Jawetz *et al.*, 2005), dimana *Salmonella enteritidis* mempunyai 3 tahap dalam menginfeksi

usus yaitu adhesi pada permukaan epitel usus, kolonisasi, dan melakukan invasi ke dalam mukosa usus dengan menembus sel epitel.

Invasi yang dilakukan *Salmonella enteritidis* pada permukaan usus mengeluarkan endotoksin yang dapat merusak struktur jaringan jejunum. Endotoksin tersebut dapat menyebabkan kerusakan jaringan dan destruksi sel epitel usus. Penghambatan sintesis protein dalam sel epitel usus oleh endotoksin inilah yang dapat mengubah morfologi bagian mukosa usus yang meliputi vili, sel epitel dan lamina propria (Finlay *et al.*, 2003).

Pada pengamatan histopatologi jejunum yang diberi perlakuan VCO (*Virgin Coconut Oil*) fermentasi *L.casei* 3,4 ml/kg BB, 6,7 ml/kg BB dan 10 ml/kg BB menunjukkan berkurangnya terhadap epitel vili jejunum. Berdasarkan gambaran histopatologi pada semua kelompok perlakuan, tampak bahwa kelompok perlakuan 2 (**Gambar 5.2C**), menunjukkan gambaran epitel vili jejunum yang menyerupai normal (kontrol negatif) ditemukan sedikit erosi pada epitel vili bagian ujung. Pada kelompok perlakuan 1 (**Gambar 5.2D**) dan perlakuan 3 (**Gambar 5.2E**), menunjukkan gambaran histopatologi tidak jauh berbeda, sel epitel vili pada kelompok perlakuan 1 dan perlakuan 3 ditemukan sedikit erosi pada sel epitel. Hal ini mungkin disebabkan oleh peningkatan fungsi *barrier* dari usus.

Menurut Huang (2013), flora normal usus dapat berperan dalam mempertahankan fungsi *barrier* dengan menginduksi peningkatan proliferasi sel epitel dan meningkatkan keutuhan epitel usus, melalui translokasi protein. Flora normal pada usus juga dapat meningkatkan ketahanan hidup sel epitel

usus dengan menghambat aktivasi sel epitel *proapoptotic pathway* yang berhubungan dengan bakteri patogen. Produk fermentasi bakteri telah terbukti meningkatkan fungsi barrier usus dengan memfasilitasi perakitan tight junction melalui aktivasi AMP-activated protein kinase.

Homeostasis mukosa usus dapat dipertahankan meskipun terus menerus terserang spesies bakteri yang berbeda. Saat menghadapi ancaman seperti kontak langsung dengan bakteri berkonsentrasi besar, epitel usus berubah menjadi *barrier* atau penghalang. *Barrier* tersebut dapat merekrut sel imun dari hematopoietik kemudian akan menghasilkan mucus atau lendir dan beragam protein antimikroba yang secara langsung membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Epitel usus terdiri dari beberapa sel, enterosit merupakan jenis sel epitel yang paling banyak pada epitel usus, dan mensekresi beberapa protein antimikroba. Sel Paneth adalah sel khusus pada usus kecil yang dapat mengeluarkan banyak protein antimikroba. Pada akhirnya, sel goblet mensekresi musin glikoprotein yang berkumpul untuk membentuk lapisan lendir tebal yang menutupi epitel (Huang, 2013).

Menurut Brandtzaeg (2010), barrier mukosa juga diperkuat oleh *secretory* imunoglobulin A (sIgA) dan sIgM dihasilkan melalui translokasi eksternal dimer IgA dan pentameric IgM yang diproduksi secara lokal oleh plasma sel. Dimer IgA dan pentameric IgM mengandung polipeptida kecil yaitu rantai gabungan untuk membentuk sIgA dan sIgM yang dapat secara aktif diekspor oleh epitel *secretory*. Transportasi eksternal ini dimediasi oleh polymeric Ig reseptor (pIgR), yang dikenal juga sebagai *membrane secretory*

*component* (mSC). Pada tikus yang kekurangan *secretory* IgA dan IgM menunjukkan penurunan fungsi *barrier* epitel. Inflamasi berkelanjutan secara normal dihambat dengan menghalangi aktivitas antibodi pada lamina propria oleh serum yang diturunkan atau diproduksi IgA secara lokal. Immunoglobulin A kompleks juga dapat menghambat pelepasan mediator proinflammatory yaitu TNF $\alpha$  dari sel fagosit aktif seperti makrofag. *Secretory* immunoglobulin A dan sIgM membentuk garis pertahanan pertama terhadap patogen serta agen yang berpotensi membahayakan lainnya.

Rahmadi (2013) dalam penelitiannya menyatakan, Senyawa asam laurat pada VCO (*Virgin Coconut Oil*) fermentasi *L.casei* memiliki sifat antibakteri. Aktivitas antibakteri dari VCO fermentasi *L.casei* dapat disebabkan oleh asam lemak rantai sedang (asam laurat) dan komponen asam organik (asam laktat) dengan cara merusak dinding sel bakteri patogen dan melisiskannya, sedangkan perbaikan jaringan jejunum terjadi karena antioksidan pada VCO (*Virgin Coconut Oil*) fermentasi *L.casei* berupa vitamin E mampu menghambat lipid peroksida sehingga radikal bebas dapat ditekan kemunculannya.

Hasil terbaik perbaikan histopatologi jejunum ditunjukkan pada kelompok D yaitu dosis pemberian 6,7 ml/kg BB (**Gambar 5.2D**). Pemberian VCO (*Virgin Coconut Oil*) Fermentasi *L.casei* pada dosis 6,7 ml/kg BB dapat mencegah adanya erosi pada sel epitel vili jejunum.