

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN PUTRI MALU (*Mimosa pudica L.*) TERHADAP EKSPRESI INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE (iNOS) DAN GAMBARAN INFILTRASI SEL INFLAMATORI PADA BRONKIOLUS TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL ASMA

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :

NISA MUFIDAH

105130101111062

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN

PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2014

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN PUTRI MALU (*Mimosa pudica L.*) TERHADAP EKSPRESI INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE (iNOS) DAN GAMBARAN INFILTRASI SEL INFLAMATORI PADA BRONKIOLUS TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL ASMA

Oleh:

NISA MUFIDAH

105130101111062

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji

Pada tanggal 10 November 2014

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

Dyah Kinasih Wuragil, S.Si, MP., M.Sc
NIP. 19820914 200912 2 004

Mengetahui,
Ketua Program Studi Kedokteran Hewan
Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya

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

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : NisaMufidah
NIM : 105130101111062
Program Studi : PendidikanDokterHewan

Penulis Skripsi berjudul :

Pengaruh Pemberian Daun Putri Malu (*Mimosa pudica L.*) terhadap Ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) dan Gambaran Infiltrasi Sel Inflamatori pada Bronkiolus Tikus (*Rattusnorvegicus*) Model Asma

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 di isi 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, 9 Januari 2015
Yang menyatakan

(NisaMufidah)
NIM.105130101111062

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN PUTRI MALU (*Mimosa pudica L.*) TERHADAP EKSPRESI INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE (iNOS) DAN GAMBARAN INFILTRASI SEL INFLAMATORI PADA BRONKIOLUS TIKUS (*Rattusnorvegicus*) MODEL ASMA

ABSTRAK

Asma merupakan penyakit kronik saluran pernafasan yang banyak dijumpai pada hewan dan manusia. Gejala asma yang mucul dapat diperparah oleh infeksi rongga mulut akibat paparan Lipopolisakarida (LPS) dari bakteri Gram negatif. Penelitian ini menggunakan ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica*) untuk terapi pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) model asma. Kandungan flavonoid pada putri malu berperan sebagai antioksidan alami yang dapat menghambat radikal bebas. Tujuan penelitian ini mengetahui ekspresi iNOS dan mengetahui gambaran infiltrasi sel inflamatori pada jaringan bronkiolus pada hewan tikus model asma setelah diberi terapi ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica L.*). Penelitian ini menggunakan empat kelompok tikus, yaitu kelompok kontrol(A), kelompok asma (B), kelompok asma yang mendapat terapi daun putri malu dosis 500 mg/KgBB (C) dan dosis 1000 mg/KgBB (D). Tikus model asma disiapkan dengan cara pemberian sensitasi alergi dengan Ovalbumin (OVA) dengan dosis 10 µg/ml/ekor secara intraperitoneal dan inhalasi serta pemberian LPS dari *Phorphyromonas gingivalis* dengan dosis 1 µg/ml/ekor secara intrasulkuler. Ekspresi iNOS dengan immunohistokimia dan infiltrasi sel inflamatori bronkiolus dengan pewarnaan HE diamati secara mikroskopis. Hasil penelitian menunjukkan pemberian terapi daun putri malu dengan dosis 500 mg/Kg BB dan 1000 mg/Kg BB mampu menurunkan ekspresi iNOS dan infiltrasi sel inflamatori bronkiolus pada tikus model asma secara signifikan ($p<0,05$). Ekstrak daun putri malu dosis 1000 mg/kg BB memberikan hasil terbaik terhadap penurunan ekspresi iNOS sebesar 73,63% dan penurunan infiltrasi sel inflamatori sebesar 79,53%. Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak daun Putri malu dapat digunakan sebagai terapi herbal pada tikus model asma.

Kata Kunci: Putri malu, Asma, iNOS dan Infiltrasi sel inflamatori



**THE EXPRESSION OF INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE (iNOS)
AND BRONCHIOLES INFILTRATION INFLAMMATORY CELLS
HISTOPATHOLOGY ON ASTHMA RATS (*Rattus norvegicus*)
AFTER THERAPY USING *Mimosa pudica* LEAF EXTRACT**

ABSTRACT

Asthma is a chronic respiratory disease that often found in animals and humans. Asthma symptoms become more severe by oral infections due to exposure of Gram-negative bacterial lipopolysaccharide (LPS). The *Mimosa pudica* leaf extract were used as therapy agent on animal model of asthma rats (*Rattus norvegicus*). Flavonoid substance in *Mimosa pudica* leaf extract play a role to be nature antioxidant which has an activity to block ROS (*Reactive Oxygen Species*). The purpose of this research was to study the potency of *Mimosa pudica* leaf extract toward the expression of iNOS and bronchioles infiltration inflammatory cells on asthma rats. Four groups of rats (*Rattus norvegicus*) were used in this research control group, asthma group, and two groups with therapy of *Mimosa pudica* extract dose of 500 mg/Kg BW and 1000 mg/Kg BW. Asthma rats were prepared by sensitization of allergen conducted by intraperitoneal injected and nebulized of 10 μ g/ml Ovalbumin (Ova) also intrasulcular injection of 1 μ g/ml Lipopolysaccharide from *Phorphyromonas gingivalis*. The expression of iNOS and bronchioles infiltration inflammatory cells histopathology were observed microscopically. The result showed that *Mimosa pudica* leaf extract therapy with both dose of 500 mg/Kg BW and 1000 mg/Kg BW decreasing iNOS expression and bronchioles infiltration inflammatory cells histopathology significantly ($P<0.05$). The use of 1000 mg/kg BW dose *Mimosa pudica* leaf extract were the best therapy to decrease expression of iNOS to be 73.63% and bronchioles infiltration inflammatory cells histopathology to be 79.53%. It can be concluded that *Mimosa pudica* leaf extract have possibility as herbal therapy on asthma rats models.

Key Word: *Mimosa pudica*, Asthma, iNOS and bronchioles infiltration inflammatory



KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT Yang mengatur segala urusan manusia dan atas segala limpahan rahmat, taufik, serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir ini yang berjudul Pengaruh Pemberian Daun Putri Malu (*Mimosa pudica L.*) terhadap Ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) dan Gambaran Infiltrasi Sel Inflamatori pada Bronkiolus Tikus (*Rattusnorvegicus*) Model Asma. Sholawat dan salam semoga tetap tercurah kepada Nabi Agung Muhammad SAW.

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

1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku pembimbing I yang telah banyak memberikan bimbingan, nasehat dan arahan kepada penulis.
2. Dyah Kinasih Wuragil S.Si, M.P., M.Sc selaku pembimbing II yang telah banyak memberikan bimbingan, nasehat dan arahan kepada penulis.
3. drh. Handayu Untari dan drh. Dahliatul Qosimah, M.Kes selaku dosen penguji atas tanggapan dan saran yang diberikan.
4. Dr. Agung Pramana Warih Marhendra, M.Si selaku Ketua Program Kedokteran Hewan yang selalu memberikan dukungan tiada henti demi kemajuan PKH UB tercinta.
5. Ayah H. Asy'ari SH, M.Si, ibu Hj. Dahlia, Suami, Adik-adik serta seluruh keluarga besar yang telah memberikan do'a, kasih saying dan dukungan yang tak terhingga kepada penulis.
6. Secara khusus penulis ingin mengucapkan terimakasih kepada sahabat penulis: Sakti Mustikawati, Vita Puspita, Munip Setyowati, Eni Wulandari, Pipit Puspita S.Pi, Maulida Ari, Ninoek, dan Nella atas motivasi, belajar bersama, dan khususnya dalam semangat berjuang bersama.



7. Sahabat dalam penelitian Haldrotus, Anita, Rizzy, Aji, Tari dan Mohan teman seperjuangan melaksanakan penelitian.
8. Seluruh staf dan asisten laboratorium Biokimia Fakultas MIPA dan Laboratorium fisiologi Hewan Universitas Brawijaya atas bantuan yang telah diberikan selama penulis melakukan penelitian.
9. Seluruh staf dan karyawan PKH, yang telah membantu proses administrasi dalam membuat tugas akhir.
10. Keluarga besar COMPAC yang telah menjadi keluarga baru selama proses pendidikan di Kedokteran Hewan dan menjadi pendorong untuk meraih kesuksesan.
11. Ucapan terimakasih penulis kepada semua sahabat angkatan 2008, 2009, 2010, 2011 dan 2012 PKH UB yang telah banyak memberikan bantuan, dorongan serta motivasi sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.

Akhirnya hanya kepada Allah SWT kita kembalikan semua urusan dan semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak, khususnya bagi penulis dan para pembaca pada umumnya, semoga Allah SWT meridhoi dan dicatat sebagai ibadah disisi-Nya, Amin.

Malang, 9 Januari 2015

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	4
1.4 Tujuan	5
1.5 Manfaat	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Patomekanisme Asma	6
2.2 iNOS	8
2.3 Hubungan Lipopolisakarida dengan Asma	9
2.4 Putri malu (<i>Mimosa pudica L.</i>)	11
2.5 Hewan Coba Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Model Asma	13
BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	15
3.1 Kerangka Konsep	15
3.2 Hipotesis Penelitian	18
BAB IV METODE PENELITIAN	19
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	19
4.2 Alat dan Bahan Penelitian	19
4.3 Tahapan Penelitian	20
4.4 Prosedur Kerja	20
4.4.1 Rancangan Penelitian dan Persiapan Hewan Percobaan	20
4.4.2 Menetukan Variabel Penelitian	22
4.4.3 Menentukan Dosis dan Pembuatan Ekstrak Puri Malu	23
4.4.4 Tatalaksana Sensitisasi Alergi	23
4.4.5 Tatalaksana Injeksi Lipopolisakarida (LPS)	24
4.4.6 Tatalaksana Terapi Daun Putri Malu	24
4.4.7 Isolasi Organ Paru	24
4.4.8 Pembuatan Preparat Histologi	25
4.4.9 Pengamatan Preparat Histologi	27
4.4.10 Pembuatan Preparat Immunohistokimia	27
4.4.11 Pengamatan Preparat Immunohistokimia	28
4.5 Analisis Data	29



BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	30
5.1 Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Putri malu (<i>Mimosa pudica</i>) terhadap Ekspresi NOS pada Bronkiolistikus	30
5.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Putri malu (<i>Mimosa pudica</i>) terhadap Gambaran Infiltrasi Sel Inflamatori	35
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN.....	42
6.1 Kesimpulan.....	42
6.2 Saran.....	42
DAFTAR PUSTAKA	43
LAMPIRAN	48



Daftar Tabel

DAFTAR TABEL

Daftar Tabel	Halaman
4.1 Rancangan Penelitian	21
5.1 Jumlah ekspresi NOS	32
5.2 Rata-rata persentase area infiltrasi sel mononuklear	38



DAFTAR GAMBAR

Gambar

Halaman

InflamasiSaluranNafas.....	7
Perbandingan Organ Paru Normal danAsma.....	8
Bakteri <i>Porphyromonas gingivalis</i>	10
Putri malu (<i>Mimosa pudica</i>).....	11
KerangkaKonsep.....	15
EkspresiiNOS	30
Mekanisme Flavonoid.....	34
Infiltrasiselmononuklearpadaparu.....	36



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran

Halaman

1. Sertifikat Laik Etik	48
2. Keterangan Identifikasi Taksonomi Tanaman	49
3. Hasil Uji LCMS	50
4. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian	51
5 Komposisi Larutan	54
6. Perhitungan Dosis	55
7. Teknik Immunohistokimia	58
8. HasildanAnalisaEkspresiiNOS	59
9. PembuatanHistologiMenggunakanParafin.....	63
10.Pewarnaan Hematoxylin Eosin	64
11.HasildanAnalisaInfiltrasiSelInflamatoriBronkiolus.....	65

DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

Simbol/Singkatan	Keterangan
AlOH ₃	AlumuniumHidroksida
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
BAL	<i>bronchoalveolar lavage</i>
BB	BeratBadan
ECF	<i>Eosinophil Chemotactic Factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-Monocytecolony Stimulating Hydrogen Perokksida</i>
H ₂ O ₂	<i>Hematoksilin-Eosin</i>
HE	<i>Inducible Nitric Oxide</i>
iNOS	Kilogram
Kg	<i>Lipopopolisakarida</i>
LPS	<i>Major basicprotein</i>
MBP	Ovalbumin
OVA	<i>Phosphat Buffer Saline</i>
PBS	Rancangan Acak Lengkap
RAL	<i>Reactive Oxygen Species</i>
ROS	T helper-2
Th-2	<i>Tumor Necrosis Factor-</i>
TNF-	<i>Toll-Like Receptor-4</i>
TLR-4	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>
VCAM-1	



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Paru-Paru adalah organ vital yang memiliki fungsi penting di dalam kehidupan mamalia. Fungsi paru-paru adalah sebagai organ respirasi. Respirasi adalah peristiwa inspirasi dari luar yang mengandung oksigen ke dalam tubuh serta melakukan ekspirasi yang banyak mengandung karbon dioksida sebagai sisa dari oksidasi keluar tubuh (Syaifuddin, 1995). Paru-paru merupakan jalur masuk terpenting dari bahan-bahan berbahaya lewat udara pada paparan kerja (WHO, 1995). Asma adalah penyakit inflamasi kronik saluran napas yang melibatkan berbagai sel imun terutama sel mast, eosinofil, limfosit T, makrofag, neutrofil dan sel epitel, serta meningkatnya respon saluran napas (hipereaktivitas bronkus) terhadap berbagai stimulan. Inflamasi kronik ini akan menyebabkan penyempitan (obstruksi) saluran napas yang *reversible*, membaik secara spontan dengan atau tanpa pengobatan (Venkatasamy and Spina, 2007).

Asma beresiko tidak hanya kepada manusia, namun juga bisa terjadi pada hewan. Contohnya kucing dapat menderita penyakit asma yang disebut sebagai *Allergic Feline Asthma*. Selama Januari 2012, tercatat peningkatan jumlah kasus *Allergic Feline Asthma* sebanyak 1004 kasus. Pada bulan Februari meningkat sebanyak 1353 kasus pada salah satu klinik kucing di Amerika yang dilakukan oleh Elaine Wexler-Mitchell, DVM. Kejadian asma di Australia pernah dilaporkan menyerang anjing pada tahun 1995 sampai tahun 2000. Kejadian asma

pada hewan didasarkan pada diagnosa klinis dan patologi klinis. Hewan yang mengalami asma memiliki gejala klinis batuk dan sesak nafas(Fosteret al., 2004).

Faktor penyebab asma dapat dibedakan menjadi dua, yakni faktor genetik dan faktor lingkungan. Lingkungan adalah faktor terbesar penyebab asma, diantaranya akibat udara yang tercemar zat kimia dari asap kendaraan dan limbah industri. Pada penelitian terbaru membuktikan bahwa salah satu faktor yang menyebabkan keparahan asma meningkat adalah lipopolisakarida (LPS) dari bakteri gram negatif yang mampu menginduksi inflamasi pada saluran pernapasan (Warouw, 2008). Senyawa mediator inflamasi yang dilepaskan setelah masuknya faktor pemicu asma diantaranya eosinofil, makrofag, monosit dan sitokin proinflamatori seperti IL-1 β , IL-1 α , TNF- dan prostaglandin (Caramori & Papi, 2012). Sitokin proinflamatori akan merangsang produksi *nitric oxide* (NO) yang dikatalis oleh salah satu enzim *nitric oxide synthase* (NOS) yaitu *inducible nitric oxide synthase* (iNOS). Peningkatan ekspresi iNOS dapat digunakan sebagai salah satu parameter yang menunjukkan adanya proses peradangan pada suatu jaringan (Gunawijaya, 2000).

Seiring dengan kemajuan dunia kesehatan dan teknologi, cara pengobatan penyakit asma banyak memberikan alternatif, yaitu obat-obatan (obat sintesis maupun obat tradisional). Dengan adanya berbagai obat sintesis membuat obat tradisional menjadi ketinggalan zaman, namun kenyataan membuktikan bahwa obat tradisional mempunyai banyak sekali keunggulan selain murah dan mudah didapat, yang lebih penting adalah tidak memiliki efek samping yang nyata, seperti yang ditimbulkan oleh obat-obatan sintetis (Zhang et al., 2011).



Tanaman obat telah digunakan selama berabad-abad sebagai obat untuk mengobati penyakit pada manusia karena mengandung komponen yang memiliki nilai terapeutik. Penelitian-penelitian mengindikasikan bahwa sejumlah tanaman obat dapat dikembangkan terutama untuk mengatasi masalah kesehatan seperti diabetes, kanker dan penyakit infeksi. Organisasi kesehatan dunia (WHO) mengestimasi sekitar 80% populasi di dunia menggunakan tanaman alami sebagai bahan dasar pembuatan obat (Bulan, 2012).

Daun putri malu memiliki total flavonoid dan phenolik yang tinggi dibandingkan dengan tanaman lain sehingga putri malu berpotensi menjadi antioksidan yang alami (Zhang *et al.*, 2011). Antioksidan memiliki peran penting untuk menghambat dan *scavenger* radikal bebas. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui bahwa ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica L.*) dapat digunakan sebagai kandidat terapi asma melalui ekspresi iNOSbronkiolus dan gambaran infiltrasi sel inflamatori pada tikus model asma (*Rattus norvegicus*).

1.2 Rumusan Masalah

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

- 1) Apakah terapi ekstrak putri malu (*Mimosa pudica L.*) dapat menurunkan ekspresi iNOS padabronkiolus (*Rattus norvegicus*) model asma?
- 2) Apakah terapi ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica L.*) dapat menekan sel inflamatori searahistopatologi bronkiolistikus (*Rattus norvegicus*) model asma?

1.3 Batasan Masalah

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

- 1) Hewan model yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) betina strain Wistar yang diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) UGM Yogyakarta dengan umur 8-12 minggu dan berat badan 150-250 gram. Penggunaan hewan model dalam penelitian sudah mendapat sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya No. 208-KEP-UB (lampiran 1).
- 2) Pembuatan keadaan asma pada hewan model tikus dilakukan dengan cara injeksi intraperitoneal ovalbumin (OVA) dengan dosis $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ditambah adjuvan Alumunium Hidroksida (Al(OH)_3) dalam PBS dan inhalasi OVA menggunakan nebulizer dengan dosis $1 \text{ mg}/\text{ml}$ selama 20 menit. Kemudian dilakukan injeksi intramuscular dengan dosis $1\mu\text{g}/\text{ml}$. Lipopolisakarida (LPS) yang digunakan adalah LPS yang didapatkan dari bakteri *Porphyromonas gingivalis* (Pusparini, 2012).
- 3) Tanaman putri malu didapatkan dari lapangan FISIP UB yang sudah diidentifikasi di Laboratorium Taksonomi MIPA UB Malang. Pemberian terapi dilakukan selama 2 minggu setelah dilakukan induksi asma (Jenova, 2009).
- 4) Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah ekspresi iNOS dengan immunohistokimia jaringan bronkiolus dan gambaran infiltrasi sel inflamatori dengan pewarnaan HE.



1.4 Tujuan

- 1) Untuk mengetahui penurunan ekspresi iNOS dengan gambaran immunohistokimia pada hewan tikus (*Rattus norvegicus*) model asma setelah diberikan terapi ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica L.*).
- 2) Mengetahui gambaran infiltrasi sel inflamatori pada histopatologi bronkiolistikus (*Rattus norvegicus*) model asma setelah diberikan terapi ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica L.*).

1.5 Manfaat

Penelitian ini bermanfaat untuk membuktikan pengaruh pemberian ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica L.*) terhadap kadar iNOS dan gambaran infiltrasi sel inflamatori bronkiolus pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) asma yang terpapar LPS dan membuktikan bahwa ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica L.*) dapat digunakan sebagai antioksidan dan antiinflamasi alami.



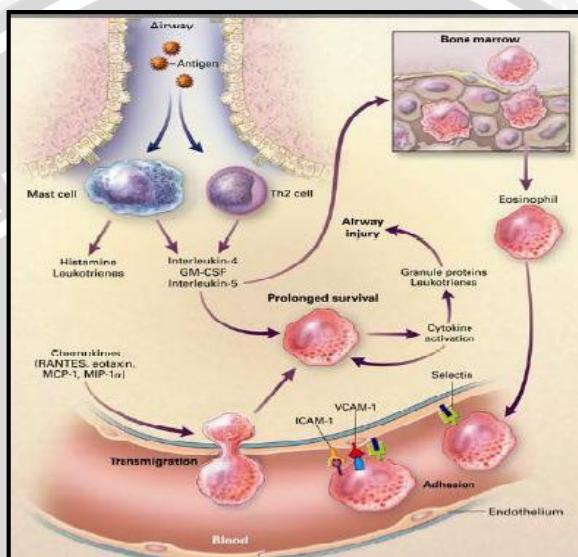
BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Patomekanisme Asma

Menurut Nelson (2007), asma merupakan penyakit inflamasi kronis pada saluran pernapasan yang menyebabkan penyempitan saluran nafas. Inflamasi didefinisikan sebagai reaksi lokal jaringan terhadap infeksi atau cidera dan melibatkan lebih banyak mediator dibanding respon imun yang didapat (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010).

Gambaran khas inflamasi seperti yang terlihat pada Gambar 2.1. Proses inflamasi paru dan hiperresponsif jalan napas dimulai dari masuknya alergen ke dalam jalan napas. Sebagian besar antigen akan dibersihkan oleh pergerakan mukosiliar. Alergen yang dapat melalui mekanisme pertahanan tersebut akan menembus lapisan epitel dasar dan akan ditangkap oleh *antigen presenting cell* (APC) terutama sel dendritik dan makrofag alveolar. Alergen tersebut akan dibawa ke kelenjar limfe dan dipresentasikan ke sel T dan B. Sel Th yang teraktivasi akan menghasilkan berbagai sitokin seperti interleukin (IL)-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18, interferon (IFN)- γ , *tumor necrosis factor* (TNF)- α , TNF- β dan *granulocytemacrophage colony stimulating factor* (GMCSF). Beberapa sel struktural juga diketahui sebagai sumber mediator dalam asma. Sel epitel saluran pernafasan, sel otot polos, sel endotelium, dan fibroblas adalah beberapa jenis sel struktural yang mampu mensintesis dan melepaskan mediator inflamasi. Beberapa jenis mediator dalam asma adalah kelompok mediator amina (histamin, serotonin, dan adenosin), lipida (prostanoid, leukotrin, dan *platelet-activating factor*), dan peptida (bradikinin, takikinin, dan endothelin)

(Sundaru, 2002; Busse & Lemanske, 2001). Sel-sel dan mediator inflamatori yang teraktivasi dapat menginfiltrasi dan menyumbat saluran pernafasan sehingga mengakibatkan kerusakan pada epitel dan deskuamasi pada lumen saluran pernafasan.

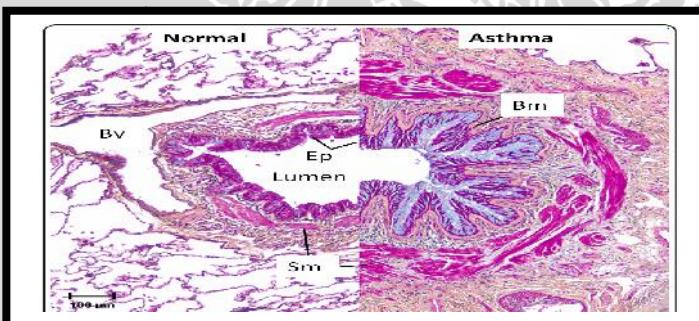


Gambar 2.1 Inflamasi saluran pernapasan. Aktivasi IL-4 akan menangsang *vascular cell adhesion molecule* (VCAM-1) pada endotel vaskuler sehingga menyebabkan migrasi linfosit T, monosit, basofil dan eosinofil ke daerah inflamasi (Busse & Lemanske, 2001).

Inflamasi yang terjadi menyebabkan saluran pernafasan menjadi hiperresponsif yaitu cenderung untuk berkonstriksi apabila terpapar oleh alergen. Hiperresponsivitas saluran napas akan merangsang terjadinya bronkokonstriksi. Lapisan otot polos pada saluran pernafasan akan mengalami peningkatan jumlah sel otot polos (hiperplasia) dan peningkatan ukurannya (hipertrofi) sehingga lapisan tersebut akan menebal. Pada penderita asma biasanya dapat melakukan inspirasi dengan baik dan adekuat, tetapi sekali-kali melakukan ekspirasi. Hal ini menyebabkan dispnea. Kapasitas residu fungsional dan volume residu paru

menjadi sangat meningkat selama serangan asma akibat kesukaran mengeluarkan udara ekspirasi dari paru. (Montefort, 2010).

Perbedaan bronkiolus normal dan bronkiolus yang terinfeksi asma yaitu pada histopatologi bronkiolus normal tidak terjadi adanya inflamasi, sedangkan pada bronkiolus yang terkena asma banyak terdapat sel inflamatori terutama eosinofil yang terdapat di sekitar bronkiolus paru. Hal tersebut dikarenakan peningkatan infiltrasi eosinofil pada area peribronkial dapat mengindikasikan terjadi keparahan asma yang diakibatkan oleh paparan LPS. Kenaikan jumlah limfosit, sel mast, dan eosinofil serta aktivasi makrofag dapat ditemukan pada cairan *bronchoalveolar lavage* (BAL) penderita asma (Filipovi & Ceki ,2001).



Gambar 2.2 Perbandingan bronkiolus normal dan asma (Wadsworth *et al.*, 2012)

2.2 iNOS(*Inducible Nitric Oxide Synthase*)

Menurut Ohuchi (1998), lipopolisakarida (LPS) akan menyebabkan hiperresponsititas saluran pernapasan, dimana *Toll-Like Receptor* berperan dalam respon LPS. Radikal bebas yang dihasilkan akibat induksi LPS dapat menyebabkan sistem imun menurun dan terjadi kerusakan sel. Sebagai senyawa sitotoksik, LPS memiliki potensi sebagai stimulator produksi radikal nitric oxide (NO) (Utomo, 2006). NO adalah radikal bebas endogen yang diproduksi saluran

pernapasan dengan katalis enzim nitric oxide synthase (NOS) dan dikenal untuk mengatur keparahan asma, termasuk modulasi saluran pernapasan. Penderita asma menunjukkan adanya peningkatan ekspresi inducible nitric oxide synthase (iNOS) di saluran napas (Batra et al., 2007). Hal ini sejalan dengan pendapat Wang (2007) bahwa sitokin akan merangsang sel pada saluran pernapasan untuk menghasilkan NO dan prostaglandin, yang akan meningkatkan reaksi infamasi dan destruksi jaringan.

Secara biologis NO bertindak sebagai mediator inflamasi untuk mempertahankan fungsi homeostasis tubuh. Pada kondisi inflamasi, NO dihasilkan sebagai regulator dan efektor. Salah satu fungsi efektor NO adalah toksitasnya terhadap tumor, antigen dan sel tubuh yang tampak pada patogenesis kerusakan jaringan. Banyak tipe sel yang merespon penyebab inflamasi dengan mengekspresikan iNOS. Inflamasi pada penyakit asma memacu pelepasan sejumlah mediator inflamasi dan makrofag pada fagositosis seperti NO. iNOS menujukkan produksi NO dalam jumlah besar untuk pertahanan imun. NO dari iNOS tidak hanya suatu mediator pertahanan imun, tetapi juga berperan dalam produksi sel lain dalam sistem regulator, memodulasi transkripsi gen, translasi dan fungsi protein (Ariesta, 2011).

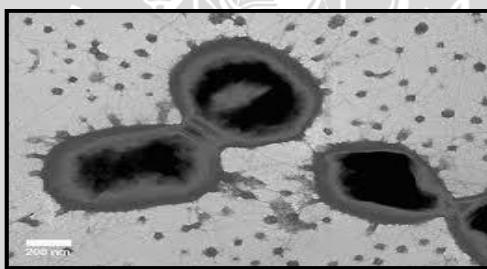
2.3 Hubungan Lipopolisakarida dengan Asma

Lipopolisakarida merupakan salah satu lapisan dinding sel bakteri Gram negatif. Struktur LPS seperti yang terlihat pada Gambar 2.3 tersusun atas lipid bilayer, polisakarida, dan protein (Madigan et al., 2003). Polisakarida dalam LPS tersusun atas tiga bagian, yaitu lipid A, polisakarida inti dan Polisakarida O. Lipid



A adalah komponen hidrofobik yang terletak bagian luar *outer membrane protein* (OMP) dan berperan dalam toksitas bakteri (Wang and Quinn, 2010).

Porphyromonas gingivalis merupakan bakteri kedua pathogen periodontal. Setelah diisolasi diketahui bahwa bakteri ini merupakan bakteri gram negative, anaerob, non motil, asaccharolytic yang biasanya terlihat berbentuk kokus dengan morfologi yang pendek. *Porphyromonas gingivalis* adalah anggota Bacteroides pigmen hitam. Organism dari kelompok ini bervariasi warnanya dari coklat hingga hitam, dikembangkan dalam blood agar dan awalnya dikelompokkan dalam spesies tunggal.



Gambar 2.3 Bakteri *Porphyromonas gingivalis* (Friskawati, 2001)

Infeksi pada rongga mulut mampu mengakibatkan gejala sistemik melalui berbagai mekanisme. Infeksi rongga mulut adalah salah satu sumber endotoksin lipopolisakarida (LPS) bakteri. Endotoksin dari bakteri utuh atau bakteri terfragmentasi dapat direspon oleh sel-sel inflamator, misalnya makrofag, neutrofil, fibroblas, dan *mast cell*, yang selanjutnya melepaskan beberapa senyawa sitokin, yaitu *tumor necrosis factor* (TNF- α), interleukin-1 (IL-1), IL-5, IL-8, alfa-interferon dan prostaglandin (Utomo, 2006). Inhalasi LPS dapat menimbulkan hiperresponsifitas saluran pernafasan pada penderita asma yang secara eksperimen lebih sensitive terhadap penyempitan saluran pernafasan. *Toll-Like Receptor-4*

(TLR-4) berperan dalam respon terhadap LPS. Hal ini ditunjukkan dengan mutasi pada gen TLR-4 menunjukkan adanya penurunan hiperresponsifitas saluran pernafasan (Schwartz, 2002).

2.4 Putri Malu (*Mimosa pudica L.*)

Putri malu dalam bahasa latin yaitu *Mimosa pudica L.* yaitu tumbuhan dengan cirri khas daun yang dapat menutup dengan sendirinya saat disentuh dan membuka kembali setelah beberapa waktu. Tanaman ini termasuk dalam *angiospermae* atau biji tertutup dan termasuk dalam kelompok dikotil.

Sistematika taksonomi tanaman putri malu ini dapat dijelaskan sebagai berikut :

Kingdom : Plantae

Subkingdom : Tracheobionta

Superdivisio : Spermatophyta

Kelas : Magnoliopsida

Ordo : Fabales

Family : Fabaceae

Genus : *Mimosa*

Spesies : *Mimosa pudica L.*



Gambar 2.4 *Mimosa pudica L.* (Nazeema, 2008)

Putri malu merupakan tanaman yang kaya akan manfaat. Tanaman ini digunakan sebagai sumber obat pada sistem pengobatan *ayurvedic* di India. Sistem Pengobatan *ayurvedic* adalah sistem pengobatan tradisional orang India, yang merupakan sistem pengobatan holistic tertua di dunia (Santosa, 2007). Putri malu tersebar luasdidaerah tropis dan subtropis India, biasanya terdapat di tempat

terbuang dimana iklimnya lembab dan hangat. Bagian dari tanaman putri malu yang berguna adalah akar, daun, dan kepala bunga. Keseluruhan tanaman putri malu digunakan sebagai obat dalam pengobatan ayurvedik. Banyak penelitian menunjukkan mimosin merupakan agen poten melawan jamur dan sejumlah bakteri.

Tanaman putri malu dipercaya memiliki efek terapi terhadap asma karena diduga memiliki kandungan-kandungan flavonoid di dalamnya seperti isoquercetin, quercetin, vitexin, isovitexin. Flavonoid merupakan anti oksidan dan anti alergi. Untuk itu diharapkan uji klinis efek flavonoid dapat memperbaiki gejala yang terkait dengan asma (Vaidyaratnam, 2001).

Dari hasil ekstraksi simplisia putri malu (*Mimosa pudica L.*), dibuktikan bahwa putri malu mengandung beberapa senyawa metabolit sekunder yang sangat tinggi terutama antioksidan jenis Flavonoid dan phenol yang banyak terdapat pada daunnya (Zhang *et.al.*, 2011). Selain itu seluruh bagian tanaman putri malu dari daun sampai akarnya juga dapat ditemukan tanin, monotrepoid, seskuiternoid, steroid, saponin, etanol dan kuinon. Dari penelitian yang dilakukan oleh Zhang *et.al.*, 2011 menunjukkan bahwa total flavonoid dan total phenolik banyak terdapat pada daunnya dibandingkan dengan bagian yang lain dari tanaman ini. Daun dan batang putri malu (*Mimosa pudica L.*) dilaporkan memiliki kandungan alkaloid mimosine dan akarnya banyak mengandung tanin (Ghani, 2003). Kandungan flavonoid dari putri malu dapat digunakan sebagai hepatoprotektif penangkal radikal bebas (Bulan dan pramono, 2012).



2.5 Hewan Coba Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Asma

Cara membuat reaksi asma secara *artificial*(buatan) pada hewan model asma *Rattus norvegicus* secara konvensional sudah banyak dilakukan. Seperti yang telah dilakukan oleh Kumar *et al.*,(2008) yang penelitiannya menggunakan tikus dengan induksi ovalbumin (OVA) yang diperoleh dari telur ayam atau juga kombinasi OVA dan HDM. Sensitasi alergi akut dapat menggunakan allergen disertai dengan adjuvant seperti alumunium hydroxide $Al(OH)_3$ yang dapat diketahui dapat membantu fenotip *T helper 2* (Th2) oleh sistem imun ketika terpapar antigen. Setelah periode sensitiasi alergen (14-21 hari), hewan coba dipapar dengan alergen melalui inhalasi menggunakan *nebulizer*, intratrakeal, atau intranasal. Pemberian alergen selama lebih dari 12 minggu akan menyebabkan keadaan inflamasi kronik. Keadaan tersebut digunakan untuk mengetahui gejala asma lanjut seperti *remodeling* saluran pernapasan dan hiperresponsivitas asma yang persisten, serta untuk menemukan model terapi baru atau mengevaluasi efek obat terhadap inflamasi paru (Nials & Uddin, 2008).

Rattus novergicus digunakan sebagai hewan coba dikarenakan hewan tersebut mempunyai kemiripan fungsi dan bentuk organ yang sama dengan manusia. Selain itu *Rattus novergicus* memiliki kebutuhan asam amino esensial dan proses biokimia serta biofisik yang sama dengan manusia. Sehingga pengaplikasian terapi dapat dilakukan juga pada manusia (Hedrich, 2006).*Rattus norvegicus* memiliki beberapa keunggulan, antara lain: kemampuan reproduksi yang tinggi karena tidak memiliki musim kawin, masa kebuntingan singkat, sehat, bersih, dan cocok untuk berbagai macam penelitian, selain itu hewan ini tenang

dan mudah ditangani di laboratorium, serta tidak bisamuntah karena struktur anatomi yang tidak lazim di tempat esophagus bermuara ke dalam lambung dan tidak memiliki kantung empedu.

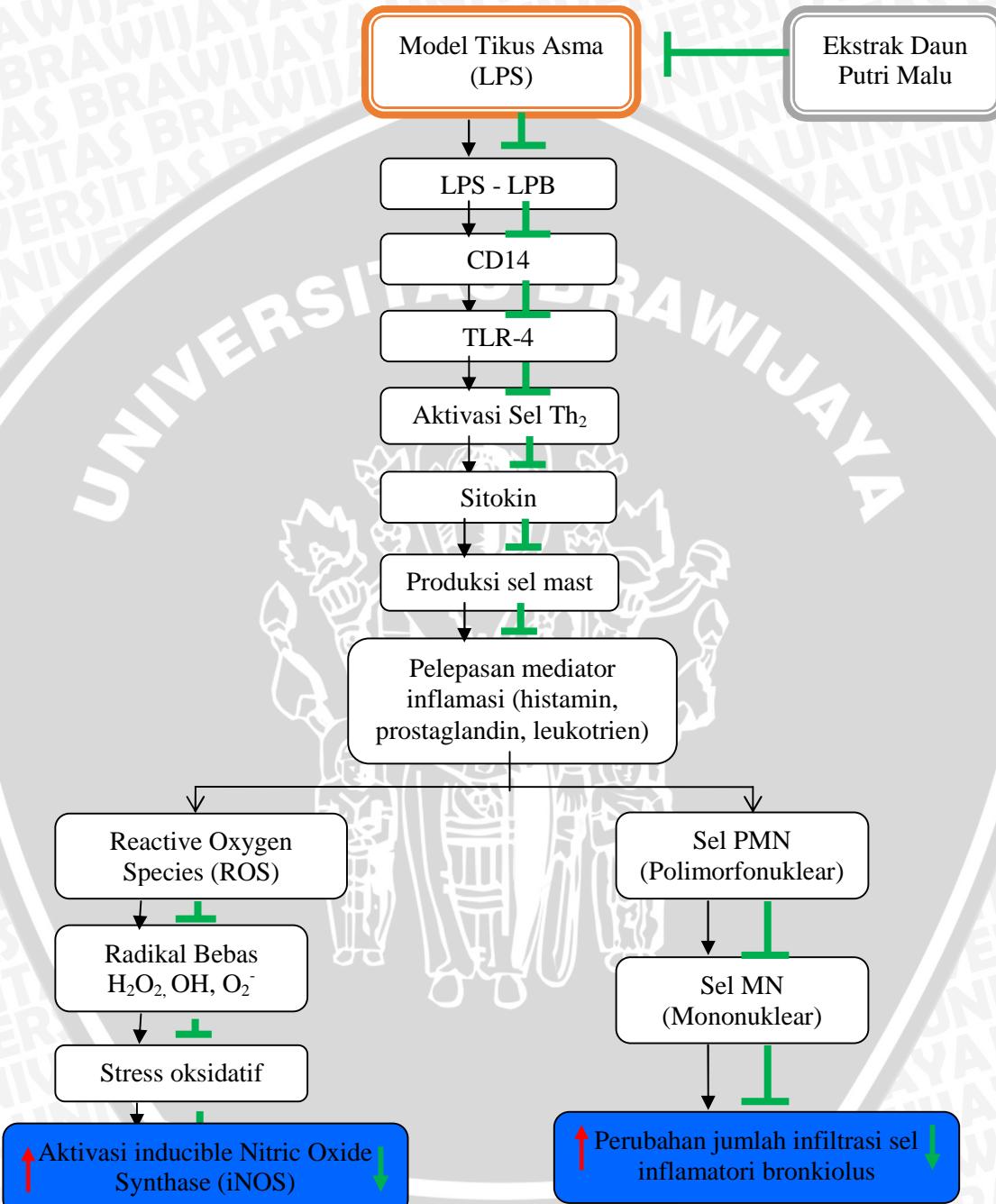
Rattus norvegicus memiliki rambut tubuh berwarna putih dan mata yang merah, panjang tubuh total 440 mm, panjang ekor 205 mm (Myers & Armitage, 2004), bobot jantan dewasa berkisar 450-520 gram dan betina 250-300 gram. Sistem klasifikasi tikus *Rattus norvegicus* menurut Myers dan Armitage (2004) adalah 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



BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1. Kerangka Konseptual Penelitian

Keterangan Gambar:

Keterangan Gambar:  : variabel terikat  : variabel bebas  : Menghambat

→ : menstimulasi

: akibat induksi asma

: efek pemberian terapi ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica L.*)

Asma adalah gangguan inflamasi yang bersifat kronik pada saluran napas yang dapat mengaktifasi berbagai macam sel inflamatori. Seperti yang ditunjukkan pada Gambar 3.1 bahwa pemberian LPS dan ovalbumin yang digunakan untuk menginduksi asma akan ditangkap oleh *Lipopolysacharide Binding Protein* (LBP). Ikatan LPS-LBP akan ditransfer oleh CD14 dan dikenali oleh *toll like receptor-4* (TLR-4) sehingga mengaktifasi sel Th₂. Sel Th₂ dapat menginduksi sitokin IL-4, IL-5 dan IL-13. Sitokin dari sel Th₂ dapat menginduksi sel B berdeferensiasi menjadi sel plasma yang kemudian akan memproduksi IgE. Stimulasi dari IgE dapat menyebabkan degranulasi sel mast. Sel mast akan melepas mediator inflamasi berupa histamin, prostaglandin dan leukotrin (Suliarni, 2003). Sel mast yang mampu melepaskan mediator inflamasi akan meningkatkan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) atau biasa disebut radikal bebas. Radikal bebas adalah salah satu komponen yang mampu menstimulasi produksi NO akibat aktivasi *inducible Nitric Oxyde Synthase* (iNOS).

Secara umum sel mast dan mediator-mediator yang dilepaskannya akan menginduksi terjadinya konstriksi jalan napas, meningkatnya permeabilitas vaskular, hiperresponsif jalan napas, sekresi mukus dan meningkatkan infiltrasi sel-sel inflamasi ke dalam jalan napas. Pada fase akut sejumlah sel polimorfonuklear (PMN) menngivasi area radang. Setelah hari ketujuh terjadi perubahan dari fase akut menjadi fase kronis. Gambaran mikroskopis radang kronis antara lain terdapat infiltrasi sel mononuklear (MN) yaitu limfosit dan monosit (Rahayu, 2012).

Pemberian ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica L.*) akan meningkatkan jumlah antioksidan dan antiinflamasi di dalam tubuh. Antioksidan yang paling banyak ditemukan pada daun putri malu adalah flavonoid. Mekanisme flavonoid dalam menghambat terjadinya radang melalui dua cara, yang pertama dengan menghambat pelepasan asam arakidonat dan sekresi enzim lisosom dari sel neutrofil, dan yang kedua menghambat fase poliferasi sel radang. Terhambatnya pelepasan asam arakidonat dari sel radang akan menyebabkan kurang tersedianya substrat arakidonat bagi jalur siklooksigenase dan jalur lipooksigenase, yang pada akhirnya akan menekan jumlah prostaglandin dan leukotrin(Rahayu, 2012). Mediator inflamasi yang dihambat oleh flavonoid akan menyebabkan menurunnya kadar iNOS dan jumlah infiltrasi sel inflamatori pada bronkiolus tikus model asma.

3.2 Hipotesa Penelitian

Hipotesis yang diajukan adalah sebagai berikut : mampu memutus jalur reaksi inflamasi sehingga memberikan efek terapi pada asma terhadap penurunan ekspresi iNOS dan mengurangi infiltrasi sel inflamatori pada gambaran histopatologi bronkiolus pada tikus (*Rattus norvegicus*) model asma.



BAB IV METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Agustus -Juni 2013 di Laboratorium Biokimia dan Laboratorium Fisiologi Hewan, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

Pada penelitian ini, peralatan yang digunakan antara lain spuit insulin, kandang tikus, *scalpel*, gunting, objek glass, cover glass, beaker glass, timbangan, sarung tangan, water bath 100⁰C, vortex, *micro pipet*, *yellow tip*, *blue tip*, *valcon*, *hitter*, *Omron CompAir Compressor Nebulizer* dan mikroskop Olympus BX51.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*), aquades, ovalbumin (Sigma-Aldrich, Nomer Katalog: A5503), ALOH3, *Phosphat Buffer Saline* (PBS) pH 7,4, PBS azida, NaCl fisiologis 0,9%, LPS1435/1449 dari bakteri Gram negatif *Porphyromonas gingivalis* (Astarte Biologics, Nomer Katalog: 7010), antibodi primer, SA-HRP, DAB, entelan, *formaldehyde*, alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 90%, alkohol 95%, alkohol 100%, H₂O₂, BSA, xylol, parafin, aquades, dan pewarna histologi hematoksilin eosin.

4.3 Tahapan Penelitian

1. Rancangan Penelitian dan Persiapan Hewan Coba
2. Variabel Penelitian

3. Penentuan Dosis dan Pembuatan Ekstrak Daun Putri malu (*Mimosa pudica*)
4. Sensitisasi Alergi
5. Injeksi Lipoposakarida (LPS)
6. Pemberian Ekstrak Daun Putri Malu (terapi)
7. Isolasi Organ Bronkiolus
8. Pembuatan Preparat Histologi dan Immunokimia
9. Pengamatan Preparat Histologi Sel Radang
10. Pengamatan Preparat Immunokimia Ekspresi iNOS
11. Analisis Data

4.4 Prosedur Kerja

4.4.1 Rancangan Penelitian dan Persiapan Hewan Percobaan

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorik dan rancangan penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan coba dibagi menjadi empat kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol, sakit (asma), terapi dosis 500 mg/kg BB, dan terapi dosis 1000 mg/kg BB dilihat pada **Tabel 4.1**

Tabel 4.1. Rancangan penelitian

Variabel yang Diamati	Ulangan				
	1	2	3	4	5
Ekspresi iNOS dan Gambaran Infiltrasi Sel Inflamatori Bronkiolus					
Kelompok A (kontrol)					
Kelompok B (asma)					
Kelompok C (terapi dosis 500 mg/kg BB)					
Kelompok D (terapi dosis 1000 mg/kg BB)					

Sampel penelitian menggunakan tikus sebagai hewan percobaan.

Tikus yang digunakan dalam penelitian ini adalah spesies *Rattus norvegicus* betina strain Wistar berumur 10-12 minggu. Berat badan tikus sekitar 200gram. *Rattus norvegicus* dipakai karena tergolong omnivora dan kebutuhan asam amino esensialnya seperti halnya hewan mamalia lainnya. Hewan coba diaklimatisasi selama tujuh hari untuk menyesuaikan kondisi di laboratorium. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Montgomery and Kowalsky, 2011):

$$P(n-1) = 15$$

$$4(n-1) = 15$$

$$4n-4 = 15$$

$$4n = 15$$

$$n = 4.75$$

$$n = 5$$

Keterangan

P = jumlah kelompok (terdiri dari empat macam perlakuan)

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk hewan menjadi 4 kelompok diperlukan jumlah ulangan paling sedikit 5 kali dalam setiap kelompok sehingga dibutuhkan 20 ekor hewan coba. Preparasi *Rattus norvegicus* sebelum diberi perlakuan perlu dilakukan adaptasi di dalam



laboratorium selama tujuh hari dengan pemberian pakan dan minum secara *ad libitum*. Selanjutnya, tikus dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan yang masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor. Tikus dikandangkan dalam kandang berukuran 17,5 x 23,75 x 17,5 cm. Kandang terbuat dari bak plastik yang dilengkapi penutup kawat, berlokasi pada tempat yang bebas dari suara ribut dan terjaga dari asap industri serta polutan lainnya. Lantai kandang mudah dibersihkan dan disanitasi.

4.4.2 Menentukan Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah:

Variabel bebas : Dosis ekstrak air daun putri malu (*Mimosa pudica L.*)

Variabel terikat : Ekspresi INOS dan Gambaran Infiltrasi Sel Inflamatori Bronkiolus

Variabel kontrol : Jenis kelamin, umur, berat badan, *Rattus norvegicus* strain wistar.

4.4.3 Menentukan Dosis dan Pembuatan Ekstrak Putri Malu (*Mimosa pudica L.*)

Penentuan dosis ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica L.*) didasarkan pada penelitian Jenova (2009), yaitu: dosis sebanyak 500 mg/kg BB dan dosis sebanyak 1000 mg/kg BB merupakan dosis efektif dan tidak toksik. Metode pembuatan ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica L.*) berdasarkan Khakim (2000), yang diterapkan pada penelitian Ramadani (2013), daun sampel yang sudah kering ditimbang sebanyak 500 mg dan 1000 mg, kemudian dimasukkan kedalam labu ukur dan ditambahkan 100 ml



akuades pada kelompok C dan kelompok D. Kemudian pada kelompok terapi C dan D tersebut direbus di atas *hotplate* pada temperatur 70°C dengan dilakukan pengadukan hingga air rebusan menjadi 10 mL. Setelah itu, disaring menggunakan kertas saring sehingga diperoleh ekstrak daun putri malu. Sediaan ekstrak air daun putri malu untuk kelompok C (terapi dosis 500 mg/kg BB) dan D (terapi dosis 1000 mg/kg BB) dipersiapkan setiap hari.

4.4.4 Tatalaksana Sensitisasi Alergi

Sensitisasi alergi pada tikus dilakukan pada hari ke-1 dan ke-15 berdasarkan protokol yang dilakukan oleh Conrad *et al.*, (2009), yaitu dengan cara injeksi ovalbumin (Sigma-Aldrich) 10 µg/ml secara intraperitoneal yang diemulsi 1,5 mg AlOH₃ dalam 200µL PBS (*phosphate buffer saline*). Sensitisasi OVA juga dilakukan secara inhalasi pada hari ke-21 dengan dosis 1mg/ml dalam NaCl steril selama 20 menit. Tikus dimasukkan dalam tabung transparan yang dihubungkan dengan *Omron CompAir Compressor Nebulizer*.

4.4.5 Tatalaksana Injeksi Lipopolisakarida (LPS)

Induksi lipopolisakarida (LPS) dilakukan menurut Utomo (2012) yaitu melalui injeksi intrasulkuler dilakukan dengan dosis 1 µg/ml pada sulkus gingiva molar rahang atas kiri tikus. LPS yang digunakan adalah LPS1435/1449 yang berasal dari bakteri *Porphyromonas gingivalis* (*Astarte Biologics*) yang berfungsi sebagai agen infeksi rongga mulut dan memodulasi respon imun. Injeksi LPS intrasulkuler gusi kiri bawah dilakukan selama dua hari berturut-turut sebelum injeksi OVA II.



4.4.6 Tatalaksana Terapi Daun Putri Malu (*Mimosa pudica L.*)

Metode pemberian volume terapi per oral tiap ekor tikus berdasarkan penelitian Ramdani (2013) dan Jenova (2009) sebanyak 2 mL pada kelompok tikus (C) terapi ekstrak air daun putri malu (*Mimosa pudica L.*) dengan dosis 500 mg/kg BB dan (D) ekstrak air ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica L.*) dosis 1000 mg/kg BB diterapi pada hari ke-15 dengan ekstrak air daun putri malu (*Mimosa pudica L.*), selama 2 minggu berturut-turut.

4.4.7 Isolasi Organ Bronkiolus

Tikus dimatikan pada hari ke-21, yaitu 30 menit setelah pemberian OVA secara inhalasi dengan cara dislokasi leher. Kemudian diambil organ parunya. Organ paru lalu dicuci dengan NaCl fisiologis dan direndam dengan larutan *Paraformaldehyde Acid* (PFA) 10% disimpan dalam suhu ruang (Amin *et al.*, 2009).

4.4.8 Pembuatan Preparat Histopatologi

Langkah-langkah dalam proses pembuatan preparat histopatologi meliputi *fiksasi, dehidrasi, clearing, infiltrasi parafin, embedding, sectioning, pewarnaan HE* dan pengamatan preparat histopatologi. Fiksasi dilakukan untuk mengawetkan dan mengeraskan jaringan. Tahapan fiksasi yaitu dengan memasukkan jaringan kedalam larutan PFA 10%. Proses selanjutnya adalah dehidrasi yang diawali dengan merendam jaringan dalam larutan etanol 70% selama 24 jam, kemudian didalam etanol 80% selama 2 jam, dilanjutkan etanol 90% selama 20 menit. Setelah dehidrasi dilakukan tahapan *clearing*, jaringan dipindahkan dari alcohol absolute III kedalam larutan penjernihan

yaitu xylol 1 (1 jam), xylol II (1 jam), xylol III (30 menit pada suhu kamar dan 30 menit pada suhu inkubator). Kemudian dilanjutkan dengan proses infiltrasi dilakukan dalam parafin cair I, parafin cair II, dan parafin cair III masing-masing selama 1 jam di dalam oven.

Proses *embedding* dilakukan dengan mencelupkan jaringan dalam parafin cair yang telah dituang ke dalam cetakan. Setelah beberapa saat parafin akan memadat. Pembuatan preparat bronkiolus dengan memasukkan hasil blok parafin pada penjepit (*block holder*). *Sectioning* diawali dengan mengatur ketebalan iris dengan ukuran $\pm 4 \text{ } \mu\text{m}$. Hasil irisan dipindahkan dengan kuas ke dalam air hangat $38-40^{\circ}\text{C}$ untuk membuka lipatan dan meluruskan kerutan halus yang ada. Irisan yang terentang sempurna diambil dengan gelas objek. Potongan terpilih dikeringkan dan diletakkan di atas *hot plate* $38-40^{\circ}\text{C}$ sampai kering. Selanjutnya preparat disimpan dalam inkubator pada suhu $38-40^{\circ}\text{C}$ lalu siap diwarnai dengan pewarnaan HE. Pewarnaan HE ini terdiri dari zat warna yaitu hematoklin dan eosin. Diawali proses deparafinasi yaitu preparat dimasukkan dalam xilol 1 dan 2 selama 5 menit. Selanjutnya proses rehidrasi preparat, dimasukkan dalam etanol bertingkat yang dimulai dari etanol absolut, 95 %, 90 %, 80 %, dan 70 % selama 5 menit. Kemudian direndam dalam aquades selama 5 menit. Tahapan selanjutnya proses pewarnaan, preparat diwarnai dengan pewarna hematoksilin selama 10 menit kemudian dicuci dengan air mengalir selama 30 menit dan dibilas aquades selama 5 menit sebelum diwarnai eosin. Setelah itu, preparat diwarnai dengan pewarna eosin selama 5 menit dan dicuci



kembali dengan air mengalir selama 10 menit dan dibilas aquades selama 5 menit. Setelah preparat diwarnai, dilakukan dehidrasi dengan memasukkan preparat pada alkohol dari 80 %, 90 %, dan 95 % hingga alkohol absolut. Selanjutnya dilakukan *clearing* dengan memasukkan xilol 1-3 selama 3 menit dan dikering anginkan. Terakhir, dilakukan *mounting* (perekatan) menggunakan entellan serta ditutup menggunakan *coverglass*.

4.4.9 Pengamatan Preparat Histopatologi

Hasil pembuatan preparat histologi bronkiolus diamati secara visual menggunakan mikroskop *Olympus BX51* perbesaran kuat (1000x) sebanyak 5 lapang pandang untuk melihat adanya infiltrasi sel inflamatori.

4.4.10 Pembuatan Preparat Immunohistokimia

Preparat jaringan paru sebelum diwarnai harus melalui proses deparafinasi dan rehidrasi. Proses deparafinasi dengan menggunakan *xylol* selama 5 menit. Proses rehidrasi dilakukan menggunakan alcohol absolute selama 3 menit, alcohol 100%, 90%, 80% dan 70% secara berurutan masing-masing selama 3 menit. Jaringan kemudian dicuci dengan akuades dan PBS pH 7,4 sebanyak 3x5 menit. Jaringan selanjutnya direndam dengan H_2O_2 selama 45 menit. Jaringan lalu dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Langkah selanjutnya jaringan *diblocking* dengan menggunakan BSA 1% selama 45 menit pada suhu ruang. Jaringan kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Prosedur selanjutnya, yaitu jaringan ditetesi antibodi primer *mouse anti-iNOS* dan diinkubasi selama semalam pada suhu 4°C. Jaringan yang telah diinkubasi dengan antibodi primer kemudian dicuci



dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Jaringan kemudian ditetesi antibodi sekunder *rabbit anti-mouse IgG* berlabel biotin dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang. Jaringan selanjutnya dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Jaringan kemudian ditetesi *strep-avidin conjugated horseradish peroxidase* (SAHRP) selama 45 menit pada suhu ruang. Jaringan lalu dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Jaringan setelah itu ditetesi *cromagen diaminobenzidine* (DAB) selama 7 menit pada suhu ruang. Preparat kemudian dicuci dengan akuades selama 3x5 menit. Preparat kemudian dicountertaining dengan *Mayer's Hematoxylin* selama 5 menit. Preparat kemudian dikeringangkan dilanjutkan dengan *mounting* menggunakan *entellan* kemudian ditutup dengan *cover glass* (Ramos-Vara, 2005).

4.4.11 Pengamatan Preparat Immunohistokimia

Preparat histopatologi bronkiolus hasil pewarnaan immunohistokimia diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya *Olympus BX51* dengan perbesaran (400x) sebanyak 5 lapang pandang untuk melihat ekspresi iNOS . Perhitungan presentasi area ekspresi iNOS menggunakan gambaran histopatologi organ bronkiolus perbesaran 400x kemudian dianalisa menggunakan *software Axio Vision*. Perhitungan ekspresi iNOS terhadap kontrol dikonversikan dalam persentase menggunakan rumus rata-rata persentase area kelompok perlakuan dikurangi dengan rata-rata persentase area kelompok kontrol dibagi dengan rata-rata kontrol dikalikan dengan 100% (Mandella, 2013).

4.5 Analisis Data

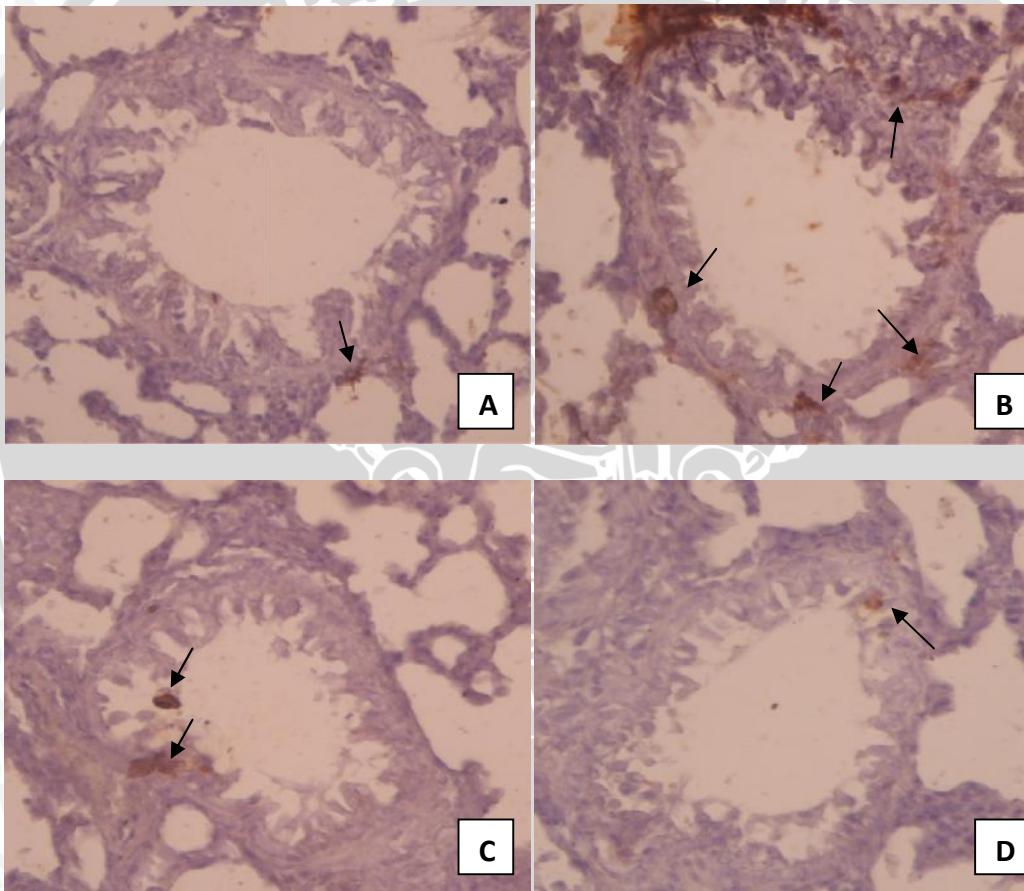
Variabel yang dipelajari dalam penelitian ini adalah ekspresi iNOS dan histopatologi bronkiolus berupa infiltrasi sel inflamatori secara kuantitatif. Data kuantitatif yang diperoleh dari hasil perlakuan ditabulasi dengan menggunakan *Microsoft Office Excel* dan dianalisis menggunakan *SPSS 21,0 for Windows* dengan analisis ragam ANOVA. Apabila terdapat perbedaan nyata dilanjutkan dengan uji pembandingan berganda dengan *Tukey* atau Beda Nyata Jujur (BNJ) = 0,05.



BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Putri Malu (*Mimosa pudica L.*) Terhadap Ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) Pada Bronkiolus Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Asma

Pengaruh pemberian ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica L.*) terhadap ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) pada bronkiolus tikus (*Rattus norvegicus*) model asma ditunjukkan pada **Gambar 5.1**.



Gambar 5.1 Ekspresi *Inducible Nitric Oxide* (iNOS) pada bronkiolus tikus (400x)

Keterangan: A = tikus kontrol; B = tikus asma; C = tikus asma dengan terapi dosis 500 mg/kg BB; D = tikus asma dengan terapi 1000 mg/kg BB

Pada kondisi normal jaringan bronkiolus tikus terdapat sedikit ekspresi iNOS ($0,318\pm0,102$). Ekspresi iNOS pada kelompok kontrol yang terlihat terlihat di daerah otot polos bronkiolus. Sedangkan pada kondisi asma terjadi peningkatan ekspresi iNOS ($2,228\pm0,325$) dibandingkan perlakuan tikus normal, yang terdapat pada daerah epitel dan otot polos bronkiolus. Ekspresi iNOS menurun dengan pemberian terapi daun putri malu dengan dosis 500 mg/kg BB ($1,226\pm0,204$) dan terapi 1000 mg/kg BB ($0,587\pm0,124$). Dosis pemberian ekstrak daun putri malu mempengaruhi banyaknya ekspresi iNOS. Semakin besar dosis terapi ekstrak daun putri malu yang diberikan akan semakin rendah ekspresi iNOS di dalam jaringan bronkiolus.

Ekspresi iNOS ditunjukkan oleh area yang berwarna kecoklatan. Timbulnya warna coklat yang terbentuk proses pewarnaan Imunohistokimia (IHK) adalah antigen dalam bronkiolus berikatan dengan antibodi primer (*Rat Anti iNOS*) selanjutnya dilabeli oleh antibodi sekunder (*Goat Anti Rat biotin labeled*) yang telah dilabel biotin. Biotin merupakan label yang akan bereaksi dengan penambahan enzim SAHRP (*Strep Avidin-horse radish peroxidase*) dan menjadi penanda terjadinya reaksi antigen dan antibodi di dalam bronkiolus. Reaksi antara antigen dan antibodi yang terbentuk akan semakin diperjelas dengan penambahan substrat enzym DAB (*Diamano Benzidine*) yang berfungsi sebagai kromogen (Ramos and Vara, 2005).

Penghitungan ekspresi iNOS dihitung berdasarkan warna coklat yang terbentuk per satuan lapangan pandang. Hasil analisis pengukuran kadar iNOS pada tikus model asma dengan terapi daun putri malu menggunakan uji statistik



ANOVA dan dilanjutkan dengan uji Lanjutan Beda Nyata Jujur (BNJ) menunjukkan hasil tertera pada **Tabel 5.1**.

Tabel 5.1 Jumlah ekspresi *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) bronkiolus tikus

Kelompok Perlakuan	Ekspresi iNOS (%)	Peningkatan Ekspresi iNOSterhadap Kontrol (%)	Penurunan Ekspresi iNOS terhadap Asma (%)
Kontrol	$0,318 \pm 0,102^a$	-	-
Asma	$2,228 \pm 0,325^c$	600,57	-
Asma dengan Terapi 500 mg/kg BB	$1,266 \pm 0,204^b$	-	43,14
Asma dengan Terapi 1000 mg/kg BB	$0,587 \pm 0,124^a$	-	73,63

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

Berdasarkan **Tabel 5.1** menunjukkan bahwa terapi daun putri malu menunjukkan pengaruh yang signifikan ($p<0,05$) terhadap penurunan kadar iNOS pada bronkiolus tikus yang ditunjukkan dengan notasi yang berbeda. Pada kelompok asma terjadi peningkatan sebesar 600,57%, kelompok terapi putri malu 500 mg/kg BB secara statistik berbeda nyata dengan kelompok asma. Terapi dosis 1000 mg/kg BB adalah dosis efektif menurunkan ekspresi iNOS karena secara statistic tidak berbeda dengan kontrol negatif yang ditunjukkan dengan notasi a.

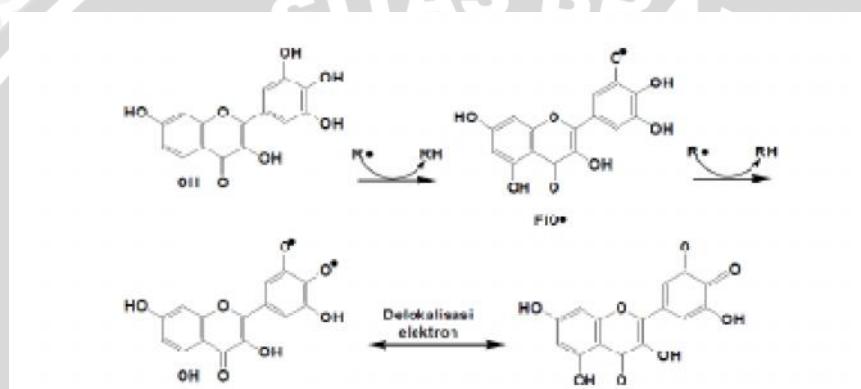
Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LCMS) (Lampiran 3) pada ekstrak daun putri malu terdapat kandungan flavonoid. Beberapa turunan flavonoid yang teridentifikasi adalah isoorientin, isovitexin dan orientin. Maka diyakini beberapa turunan flavonoid ini yang dapat menurunkan ekspresi iNOS.



Peningkatan ekspresi iNOS pada kelompok asma dikarenakan pemberian ovalbumin pada tikus model asma sebagai induksi alergen terhadap asma diperparah oleh induksi lipopolisakarida *Porphyromonas gingivalis* yang memicu reaksi fagositosis oleh makrofag dan neutrofil. Mekanisme fagositosis membutuhkan enzim oksidase *inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS). Proses fagositosis ini nantinya akan menghasilkan radikal bebas *Reactive Oxygen Species* (ROS). Produk dari ROS dapat berupa *superoxide anion* (O_2^-), *hydroxyl radicals* (OH^-), *hydrogen peroxide* (H_2O_2), dan *nitrit oxide* (NO) (Nakai, et al., 2005). Radikal bebas memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan sehingga dapat mengikat molekul yang stabil lainnya dan bersifat reaktif di dalam tubuh.

Penurunan ekspresi iNOS pada kelompok asma terapi 1000 mg/kg BB tidak berbeda nyata dengan kelompok kontrol, hal ini menunjukkan bahwa ekstrak air daun putri malu (*Mimosa pudica L.*) mengandung antioksidan yang berfungsi untuk menangkal radikal bebas. Dosis terapi pemberian ekstrak air daun putri malu berpengaruh dalam menurunkan ekspresi iNOS dalam jaringan bronkiolus. Hal tersebut didukung penelitian Jenova (2009), tentang antioksidan dalam ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica L.*). Penurunan ekspresi iNOS disebabkan karena adanya kandungan senyawa bioaktif yaitu flavonoid dari ekstrak air daun putri malu (*Mimosa pudica L.*) yang berfungsi sebagai antioksidan enzimatis (Jenova, 2009). Kandungan flavonoid pada daun putri malu ini sudah diuji menggunakan uji *Liquid Chromatography Mass Spectrometry* (LCMS) (Lampiran 3). Hasil LCMS menunjukkan dalam ekstraksi daun putri malu terdapat flavonoid. Menurut Rahmah (2012), flavonoid mampu memberikan

atom hidrogen dari gugus hidroksil (OH) kepada radikal bebas (R[•]) sehingga flavonoid berubah menjadi radikal fenoksil flavonoid (FIO[•]) pada **Gambar 5.2**. Sedangkan radikal fenoksil memiliki ikatan rangkap terkonjugasi sehingga tidak menimbulkan radikal bebas dan lebih stabil. Flavonoid juga efektif sebagai *scavenger* radikal peroksil (ROO[•]), dan radikal hidroksil (OH[•]) akan diregenerasi menjadi H₂O. Hasil dari regenerasi tersebut bersifat lebih stabil (Astuti, 2008).



Gambar 5.2 Mekanisme flavonoid sebagai antioksidan (Rahmah., 2012)

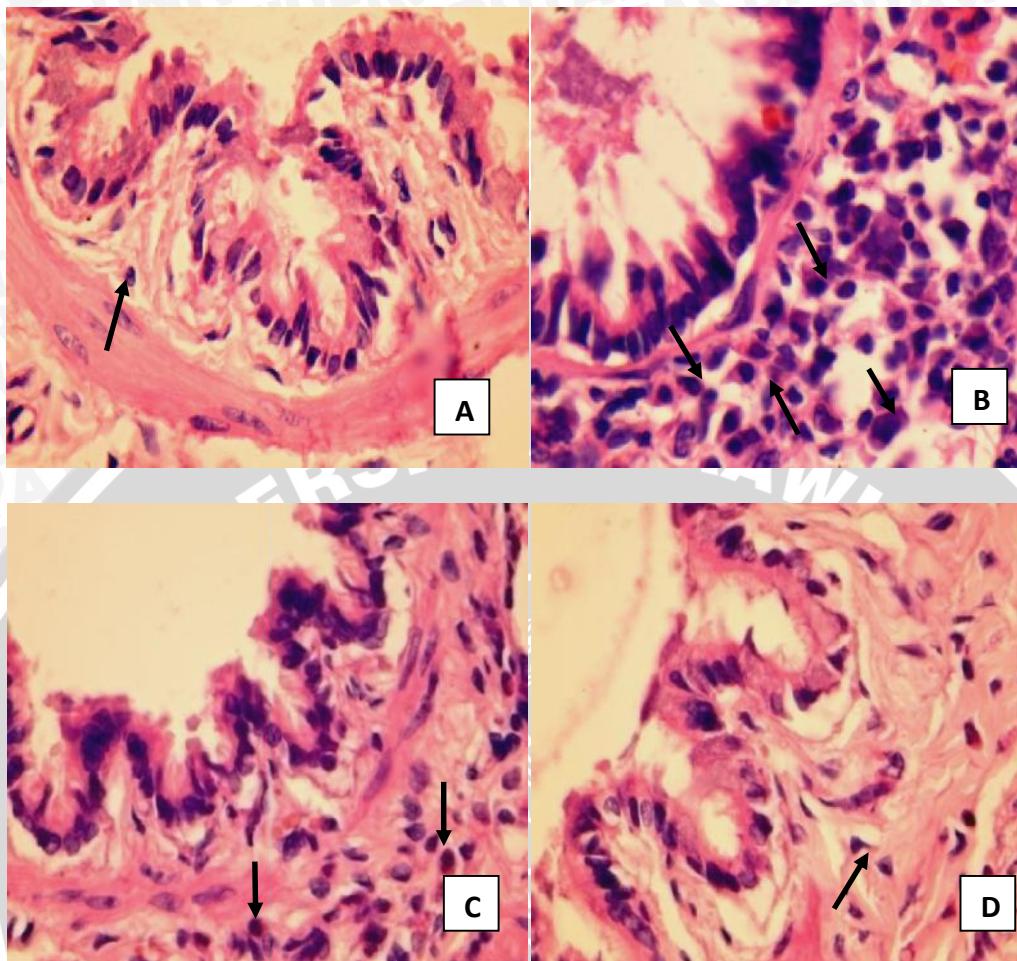
Pengikatan radikal bebas oleh flavonoid akan mencegah reaksi radikal berantai yang merusak struktur jaringan normal. Menurut penelitian Zafar *et al.* (2011) menyatakan bahwa *Mimosa pudica L.* memberikan hasil aktivitas antioksidan yang cukup tinggi sebesar 54,39 µg/mL.

Oleh karena itu, senyawa bioaktif flavonoid dapat berperan sebagai antioksidan yang dapat mencegah dan mengobati surplus radikal bebas yang diakibatkan oleh paparan lipopolisakarida dan sensitiasi alergi. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian terapi ekstrak putri malu dosis 1000 mg/kg BB pada tikus asma menunjukkan perubahan yang optimal mendekati ekspresi iNOS pada tikus kontrol.

5.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Putri Malu (*Mimosa pudica L.*) Terhadap Gambaran Infiltrasi Sel Inflamatori Pada Bronkiolus Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Asma

Pada gambaran histopatologi jaringan bronkiolus tampak adanya infiltrasi sel inflamatori. Sel inflamatori yang terlihat dalam jaringan yaitu sel-sel mononuklear (Gambar 5.3). Infiltrasi tersebut dapat dilihat melalui preparat histopatologi bronkiolus yang diwarnai dengan pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE). Pengamatan preparat bronkiolus hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) pada penelitian ini dilakukan menggunakan mikroskop Olympus BX51 dengan menggunakan perbesaran kuat (1000x). Hasil pengamatan jaringan bronkiolus tikus dapat dilihat pada **Gambar 5.3**. Pada jaringan bronkiolus kontrol terlihat adanya sel epitel *ciliated pseudostratified columnar* dan otot polos yang ditunjang dengan jaringan ikat fibrosa dengan adanya adanya sedikit infiltrasi sel inflamatori pada daerah lamina propria. Bronkiolus normal terdiri dariberbagai sel penyusun, antara lain epitel *ciliated pseudostratified columnardanotot polos* yang ditunjang dengan jaringan ikat fibrosa (Junqueira, 2007). Sedangkan kondisi jaringan pada tikus asma lapisan epitel bronkiolus semakin merapat dan tidak beraturan. Serta otot polos pada bronkiolus asma mengalami penipisan. Selain itu terdapat infiltrasi sel mononuklear yang sangat banyak dan terinfiltasi pada sel epitel dan otot polosbronkiolus. Perbedaan jaringan bronkiolus kontrol dan jaringan asma terlihat signifikan dari sel epitel, otot polos dan jumlah infiltrasi sel inflamatori.





Gambar 5.3 Infiltrasi sel mononuklear pada jaringan bronkiolus (pewarnaan HE)

Keterangan: A = tikus kontrol; B = tikus asma; C = tikus asma dengan terapi dosis 500 mg/kg BB; D = tikus asma dengan terapi 1000 mg/kg BB. Panah = sel mononuklear. Perbesaran 1000x.

Sel mononuklear tersebut terlihat memiliki satu buah inti berbentuk bulat dengan sitolasma lebih besar daripada inti seperti pada Junqueira (2007) bahwa sel mononuklear berbentuk bulat dengan satu inti berada di tengah. Gambaran histologi jaringan bronkiolistikus normal tanpa perlakuan terdapat sejumlah kecil sel-sel mononuklear (**Gambar 5.3. A**), adanya sedikit sel-sel mononuklear menunjukkan keadaan yang normal karena sel-sel mononuklear berfungsi untuk mengapoptosis sel-sel yang mati.

Sel-sel mononuklear terinfiltasi paling banyak pada jaringan bronkiolus ticus asma (**Gambar 5.3 B**). Sel-sel mononuklear pada jaringan bronkiolustikus perlakuan asma terlihat jelas bentuknya dan mampu dibedakan dengan sel-sel histologi bronkiolus, misalnya sel epitel dan otot polos. Distribusi sel mononuklear pada bronkiolus terlihat menumpuk sehingga menekan sel-sel otot polos dan sel epitel.

Tabel 5.2 Rata-rata Persentase Area Infiltrasi Sel Mononuklear

Kelompok Perlakuan	Infiltrasi Sel Mononuklear (%)	Peningkatan Infiltrasi Sel Inflamatori terhadap Kontrol (%)	Penurunan Infiltrasi Sel Inflamatoriterhadap Asma (%)
Kontrol	$0,578 \pm 0,513^a$	-	-
Aisma	$13,996 \pm 2,685^c$	2320,62	-
Aisma dengan Terapi 500 mg/kg BB	$7,700 \pm 0,548^b$	-	44,99
Aisma dengan Terapi 1000 mg/kg BB	$2,864 \pm 0,497^a$	-	79,53

Keterangan : Perbedaan notasi (a,b,c) menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar perlakuan terhadap Infiltrasi Sel Mononuklear($p<0,05$)

Berdasarkan **Tabel 5.2** menunjukkan bahwa adanya perbedaan yang signifikan ($p<0,05$) antar perlakuan. Hal ini ditunjukkan dengan adanya perbedaan notasi antar perlakuan a, b dan c untuk kelompok kontrol negatif, asma, terapi dosis 500 mg/kg BB, dan 1000 mg/kg BB. Nilai infiltrasi sel inflamatori kelompok asma dan kelompok terapi daun putri malu 500 mg/kg BB menunjukkan perbedaan nyata pada kelompok kontrol, akan tetapi tidak berbeda

nyata dengan kelompok terapi 1000 mg/kg BB. Hal ini ditunjukkan dengan peningkatan infiltrasi sel inflamatori kelompok asma sebesar 2320,62%. Kelompok terapi 500 mg/kg BB secara signifikan menurunkan infiltrasi sel inflamatori sebesar 44,99%, namun belum bisa mendekati jumlah infiltrasi sel inflamatori kelompok kontrol. Nilai persentase kelompok terapi daun putri malu dosis 1000 mg/kg BB menunjukkan tidak berbeda nyata pada kelompok kontrol, hal ini ditunjukkan dengan penurunan jumlah infiltrasi sel inflamatori pada bronkiolus sebesar 79,53%. Data ini menunjukkan bahwa terapi daun putri malu dengan dosis 1000 mg/kg BB adalah dosis efektif untuk terapi asma.

Peningkatan infiltrasi sel inflamatori pada kelompok asma dikarenakan oleh paparan LPS dan ovalbumin. Hasil tersebut didukung oleh data penelitian Yoon *et al.* (2007) yang menunjukkan adanya keparahan inflamasi eosinofilik pada mencit asma yang dipapar oleh 0,1 µg LPS. Infiltrasi sel mononuklear pada saluran pernapasan terjadi karena adanya migrasi yang dinisiasi oleh faktor kemoatraktan serta melalui mekanisme seluler yang spesifik dan terkoordinasi disetiap tahapan ekstravasasi termasuk adesi, kemotaksis, dan aktivasi. Kinnula & Crapo (2003) menyebutkan dalam penelitiannya bahwa sitokin IL-5 yang teraktivasi karena adanya paparan alergen merupakan faktor utama pada proliferasi dan diferensiasi sel inflamatori eosinofil di sum sum tulang. Eosinofil dibantu dengan IL-3 dan IL-4 kemudian akan merangsang produksi *Vascular Cell Adhesion Molecule-1* (VCAM-1) pada endotel vaskuler yang menyebabkan migrasi limfosit T, monosit, basofil, dan eosinofil ke daerah inflamasi. Adanya

peningkatan infiltrasi sel inflamatori tersebut menyebabkan produksi radikal bebas semakin banyak.

Penurunan infiltrasi sel inflamatori pada kelompok asma terapi 1000 mg/kg BB yang tidak berbeda nyata dengan kelompok kontrol, hal ini menunjukkan bahwa di dalam ekstrak air daun putri malu terdapat senyawa flavonoid yang berpotensi sebagai antioksidan. Flavonoid berfungsi mengurangi dampak negatif radikal bebas yang berlebihan dengan cara mencegah terjadinya reaksi berantai pembentukan radikal bebas, mengikat ion logam (*chelating*) dan memblokade jalur poliol serta menghambat peroksidasi lipid (Djamali, 2007).

Flavonoid mempunyai sifat antiinflamasi. Mekanisme flavonoid dalam menghambat terjadinya radang melalui dua cara, yang pertama menghambat pelepasan asam arakidonat dan sekresi enzim lisosom dari sel neutrofil dan sel endotel, dan yang kedua menghambat fase poliferasi dan fase eksudasi dari proses radang. Terhambatnya pelepasan arakidonat dari sel radang akan menyebabkan kurang tersedianya substrat arakidonat dan bagi jalur siklooksigenase dan lipooksigenase, yang pada akhirnya akan menekan jumlah prostaglandin dan leukotrin (Rahma, 2012).

Flavonoid berperan juga dalam proses pemulihan jaringan. Jaringan yang mengalami inflamasi akan membentuk jaringan granulasi. Secara histologis jaringan granulasi ditandai dengan proliferasi pembuluh darah baru (*neovaskularisasi*) dan fibroblas. Rekrutmen dan stimulasi fibroblas dikendalikan oleh banyak faktor pertumbuhan, meliputi *platelet-derived growth factor* (PDGF), *basic fibroblast growth factor* (bFGF), dan *transforming growth factor-beta*



(TGF-), sitokin (interleukin 1) dan *tumor necrosis factor* (TNF) yang disekresikan oleh leukosit dan fibroblast (Yamashita & Nakayama, 2008). Secara khusus makrofag merupakan unsur sel yang penting pada pembentukan jaringan granulasi. Selain membersihkan debris ekstraseluler dan fibrin pada tempat jejas, makrofag juga mengelaborasi suatu penjamu mediator yang menginduksi proliferasi fibroblas dan produksi matriks ekstraseluler (ECM). Sintesis kolagen oleh fibroblas dimulai sejak awal proses penyembuhan (hari ke-3 hingga ke-5) dan berlanjut selama beberapa minggu tergantung pada luas penyembuhan.



BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

1. Pemberian terapi ekstrak daun putri malu menurunkan ekspresi iNOS pada bronkiolus. Terapi ekstrak daun putri malu 1000 mg/kg BB adalah dosis efektif yang mampu menurunkan ekspresi iNOS sebesar 73,63%.
2. Penurunan infiltrasi sel inflamatori terjadi pada kelompok tikus dosis terapi ekstrak daun putri malu 1000 mg/kg BB dibandingkan kelompok tikus dosis terapi ekstrak daun putri malu 500 mg/kg BB.

6.2 Saran

Diperlukan penelitian lanjutan mengenai organ-organ lain yang dapat terkena dampak asma dengan pemberian dosis terapi putri malu (*Mimosa pudica L.*).

DAFTAR PUSTAKA

- Ariesta, R.L. 2011. Aktivitas Superoksida Dismutase (SOD), Kadar Malondialdehid (MDA), Ekspresi INOS dan Gambaran Histologis Jaringan Pankreas Tikus Diabetes Melitus tipe I yang Mendapat Terapi Ekstrak Temu Giring [M.Sc. Thesis]. *Jurnal Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya, Malang*.
- Armitage, D. 2004. *Rattus norvegicus*. Animal Diversity Web Online. [at://animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/Rattus_norvegicus/](http://animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/Rattus_norvegicus/). Diakses tanggal 05 September 2013.
- Astuti, S. 2008. Isoflavon Kedelai dan Potensinya sebagai Penangkap Radikal Bebas. *Jurnal Teknologi Hasil Pertanian Universitas Lampung, Lampung*. Volume 13, No. 2.
- Azmi, L., M.K. Singh and A.K Akhtar. 2011. International Journal of Pharmacy & Life Science : Pharmakological and biological overview on Mimosa pudica Linn (2)11. *Journal Faculty of Pharmacy Integral University, Lucknow (UP). India*.
- Barnes, P.J., Djukanovic, and S.T. Holgate. 2003. *Pathogenesis of asthma*. In: Gibson, G.J., D.M. Geddes., U. Costabel., P. Sterk., B. Corrin (eds.)
- Baratawidjaja, K.G. dan Rengganis, I. 2010. *Imunologi Dasar*. Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Batra, J., Chatterjee R., and B. Ghosh. 2007. Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS): Role in Asthma Pathogenesis. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*. Vol. 44 pp 303-309
- Bulan, M. S dan P. Adi. 2012. The level of SGOT and SGPT after Consuming *Mimosa pudica* Leave Boiled on Carbon Tetra Chloride Induced in Wistar Strain. PSPD, (Abstr):1
- Busse, W.W. and R.F. Lemanske, Jr. 2001. Asthma. *The New England Journal of Medicine* 344(5) : 350-362.
- Caramori, G. and A. Papi. 2004. *Oxidants and Asthma*. Thorax 59 (2): 170-173.
- Conrad, M.L., A.Ö. Yildirim, S.S. Sonar, A. Kilic, S. Sudowe, M. Lunow, R. Teich, H. Renz, & H. Garn. 2009. Comparison of Adjuvant and Adjuvant-Free Murine Experimental Asthma Models. Clinical & Experimental Allergy. *Journal Clinical & Experimental Allergy*. Volume 39, Issue 8, pages 1246–1254.



- Cunningham, G. 2003. *Williams Obstetrics 21 Edition*. McGraw-Hill Companies : USA.
- Djamali, A. 2007. Oxidative stress as a common pathway to chronic tubulointerstitial injury in kidney allograft. *J Physiol Renal* 293: F445.
- Foster, S.F., G.S. Allan, P. Martin and I.D. Robertson. 2004. Twenty five asthma syndrom (1995-2000). *Journal of feline medical and surgery*. 6(3):181-188
- Friskawati, I. 2001. *Daya Kerja Anti Bakterial Lipopolisaarida (LPS) Asal Bakteri Vibrio harvey Terhadap Bakteri Lingkungan*. Fakultas Kedokteran Hewan IPB. Indonesia
- Ghani, A. 2003. *Medicinal plants of Bangladesh, 2nd Ed*; The Asiatic Society of Bngladesh, Dhaka. Pp-302303.
- GINA (Global Initiative For Asthma). 2006. *Global Strategy For Asthma Management And Prevention*. MCR VISION, Inc.
- Gunawijaya, Eka. 2000. Peran Nitrogen Oksida pada Infeksi. *Jurnal Sari Pediatri*. Vol. 2, No. 2 : 113-119.
- Junqueir, L. C. and J. Carneiro. 2007. *Histologi Dasar: Teks dan Atlas Edisi 10*. Jakarta : EGC.
- Karras, E., H. Yang, P. Lymberi and P. Christadoss. 2005. Human Thyroglobulin Peptide p23340 Induces Autoimmune Thyroiditis in HLA-DR3 Transgenic Mice. *Journal of Autoimmunity*. 24:2005, pp. 291-296.
- Kinnula, V.L. & J.D. Crapo. 2003. Superoxide Dismutases in the Lung and Human. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*. Vol. 19 no. 3 301-304.
- Kumar, R.K., C. Harbet, and P.S. Foster. 2008. The “classical” ovalbumin challenge model of asthma in mice. *Journal Drug Targets*. 9:485-94.
- Montefort, S., D.B. Corry and C.G. Irvin. 2010. The Site of Disruption of the Bronchial Epithelium in Asthmatic and Nonasthmatic Subjects. *Journal of Thorax*. Volume 47(7) p. 499-503.
- Myers, P. and D. Armitage. 2004. *Rattus norvegicus*. http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Rattus_norvegicus.html. [10 Maret 2012]

- Nakai, K., M.B, Kadiiska., J, Jiang, K, Stadler., and R.P, Manson. 2005. Free Radical Production Both Inducible Nitric Oxide Synthase And Xanthine Oxidase in LPS-Treared skin. Laboratory of pharmacology and Chemistry, National Institute of Environmental Health Sciences, National Institute of Health. Research Triangle Park, NC. *PNAS Journal*, 103(12) : 4616-4621
- Nambu, A., J. Christie, and F. Ramsdell. 2010. *IL-1 and Allergy*. Allergology International Vol 59, No2, 2010 www.jsaweb.jp.
- Nials, A.T. and S. Udin. 2008. *Tikus model asma alergi: akut dan kronis tantangan alergen*. Dis Model Mech. 1:213-20.
- Nelson, D.L. and M.M. Cox. 2008. *Lehninger Principles of Biochemistry* (4th ed.). Worth Publisher. New York.
- Purnomo. 2008. *Faktor-faktor risiko yang berpengaruh terhadap kejadian asma bronkial pada anak*. Tesis. Program pasca sarjana univ. Diponegoro: Semarang.
- Rahayu, Y.C. 2012. Respon Antiinflamasi Serbuk Biji Alpukat (*Persea Americana mill*) terhadap jumlah PMN Neutrofil Mencit yang Diinduksi Bakteri *E.Coli*. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Rahmah, N. L. 2012. The Potency of *Sargassum duplicatum* Bory Extract on Inflammatory Bowl Disease Therapy in *Rattus norvegicus*, *Journal of Life Sciences* 6, pp. 144-154.
- Ramos and Vara, J. A., 2005. Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Vet Pathol* 42 (4): 405-426. Doi:10.1354/vp.42-4-405. PMID 16006601.
- Santosa, I. 2007. *Sejarah Pengobatan Ayurveda*. Online. (http://www.indospiritual.com/artikel_sejarah-pengobatan-ayurveda.html, diakses tanggal 23 Mei 2013)
- Schwartz, D. A. 2002. The Genetics of Innate Immunity. *Chest Journal* 121 : 62S–68S.
- Shearer, P. 2010. *Canine and feline geriatric health*. Banfield applied research.
- Suliani. 2003. Aktivitas Faktor VII Pada Sepsis Bagian Patologi Klinik. Fakultas Kedokteran Universitas Sumatra Utara. USU digital library.
- Sundaru, H. 2002. *Respons imun pada asma bronkial*. Dalam: *Naskah lengkap PIT IPD*. Alwi F, Setiati S, Kasjmri YI, Bawazier LA, Syam AF, Mansjoer A, Suprahoita, eds. Jakarta: Pusat Informasi dan Penerbitan Bagian IPD FKUI: 1-6.

- Utomo, H. 2006. Management of Oral Focal Infection in Patients with Asthmatic Symptoms. *Dent. J.* 39(3): 120–125.
- Vaidyaratnam, P.S. 2001. *Indian Medical Plants database 1st ed*, vol. II, Orient Logman, Arya Vidyashala Kottakkal, pp 36-37.
- Venkatasamy, R., and D, Spina. 2007. Protease Inhibitors In Respiratory Disease: Focus On Asthma And Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Expert Ref Clin Immunol.* (3):365-81. Doi:10.1586/1744666X.3.3.365.
- Samuel J. W., S. J. Yang and R. Delbert. 2012. IL-13, Asthma and Glycosylation in Airway Epithelial Repair. *Studies on Glycobiology and Glycotechnology*. 19 : 188-215
- Wang, X. and P.J. Quinn. 2010. *Lipopolysaccharide: Biosynthetic Pathway and Structure Modification*. *Journal in Lipid Research*. 49: 97–107.
- Warouw, Najoan Nan. 2008. *Penyakit Saluran Pernapasan*. (810 -813). Abdul Bari Syaifuddun (Eds.). Ilmu Kebidanan Sarwono Prawirohardjo. Ed. 4 Cet. 1. Jakarta : PT Bina Husada Sarwono Prawirohardjo.
- Wheelan, R., J. Sigal and J. Stanley. 2004. Role and regulation of interleukin-1 molecules in pro-asthmatic sensitised airway smooth muscle. *Eur Respir J* 2004. 24: 559–567.
- WHO (World Health organization). 1995. Bronchioalveolar carcinoma and lung and lung adenocarcinoma.
- Yamasitha, M., and T. Nakayama. 2008. Progress in Allergy Signal Research on Mast Cells: Regulation of Allergic Airway Inflammation Through Toll-Like Receptor 4-Mediated Modification of Mast Cell Function. *J. Pharmacol. Sci.* 106: 332 – 335.
- Yoon, K.K., Y.O. Sun, G.J. Seong, W.P. Heung, Y.L. Soo, Y.C. Eun, B. Boram, S.L. Hyun, H.O. Min, S.K. You, H.K. Jong, S.G. Yong, H.C. Sang, U.M. Kyung, Y.K. You, and Z. Zhu. 2007. Airway Exposure Levels of Lipopolysaccharide Determine Type 1 versus Type 2 Experimental Asthma. *The Journal of Immunology*. 178: 5375-5382.
- Zang, J., Keyuan, W.L. Zhou., J. Zhou. and Ping-Yang. 2011. Studies on the active components and antioxidant active of the extract *Mimosa pudica*. Shouthern China. Vol Jan-Mar; 7(25):35-39.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Sertifikat Laik Etik

 <p style="text-align: center;">KOMISI ETIK PENELITIAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA</p> <p style="text-align: center;">KETERANGAN KELAIKAN ETIK “ETHICAL CLEARENCE”</p> <p style="text-align: center;">No: 208-KEP-UB</p> <p style="text-align: center;"> KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE) UNIVERSITAS BRAWIJAYA TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:</p>	
PENELITIAN BERJUDUL	: PENGARUH TERAPI EKSTRAK DAUN PUTRI MALU (<i>Mimosa pudica</i>) BERDASARKAN PADA PENGUKURAN KADAR MALONDIALDEHIDA (MDA) SERTA GAMBARAN HISTOPATOLOGI EPITEL BRONKIOLUS TIKUS (<i>Rattus norvegicus</i>) MODEL ASMA
PENELITI	: RIZY AHMADA
UNIT/LEMBAGA/TEMPAT	: UNIVERSITAS BRAWIJAYA
DINYATAKAN	: LAIK ETIK
Malang, 3 Maret 2014 Ketua Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya	
 Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES. NIP. 19600903 198802 2 001	



Lampiran 2. Taksonomi Putri Malu



LABORATORIUM TAKSONOMI, STRUKTUR DAN
PERKEMBANGAN TUMBUHAN
JURUSAN BIOLOGI, FAKULTAS MIPA
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
JALAN VETERAN, MALANG 65145
Telepon/faks: 0341-575841

KETERANGAN IDENTIFIKASI

No. 0102/Takso.Identifikasi/03/2013

Kepala Laboratorium Taksonomi, Struktur dan Perkembangan Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, menerangkan bahwa spesimen yang dibawa oleh:

Nama : Rizy Ahmada (NIM. 105130101111075)
Anita Wanda S (NIM. 105130101111063)
Nisa Mufidah (NIM. 105130101111062)
Adekhantari Y (NIM. 105130101111064)
Yehuda Laksana A (NIM. 105130101111101)
Hadlrotus Okvianty M P (NIM. 105130107111013)

Instansi : Program Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya

Berdasarkan deskripsi karakter dan kunci identifikasi pada Flora of Java (Backer dan Van den Brink, 1968), volume I, halaman 561, diidentifikasi sebagai:

Familia : Fabaceae
Genus : *Mimosa*
Species : *Mimosa pudica* L.

Demikian surat keterangan identifikasi ini dibuat untuk digunakan seperlunya.

Malang, 26 Agustus 2013

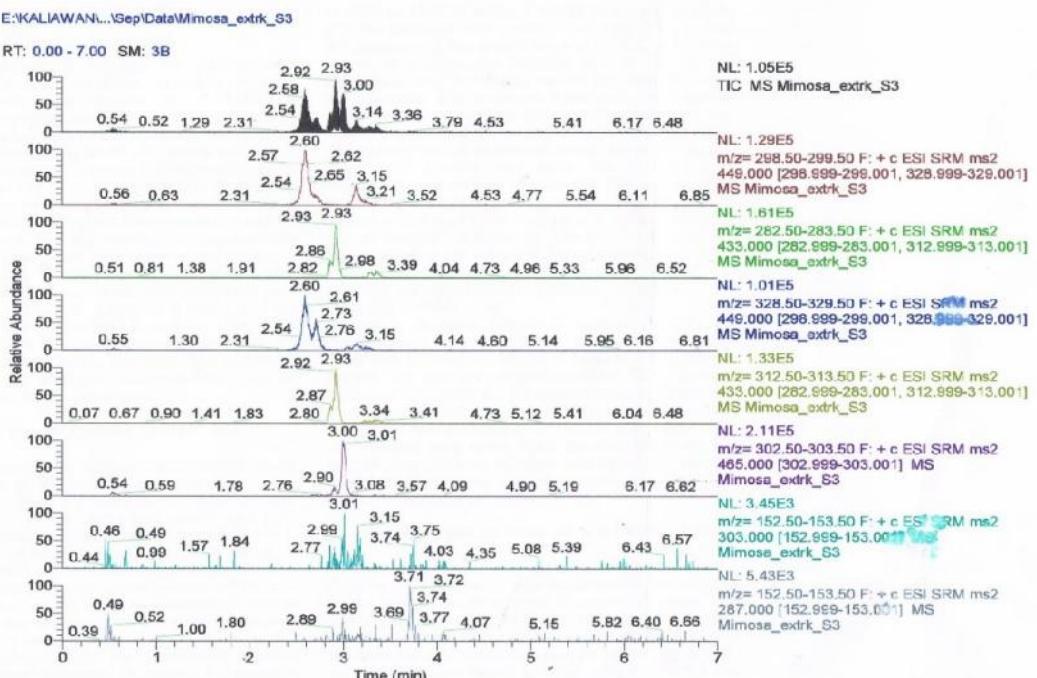
Kepala Laboratorium
Taksonomi, Struktur dan
Perkembangan Tumbuhan,

Dr. Serafinah Indriyani, M.Si.
LABORATORIUM TAKSONOMI
TU630909 198802 2 001

Lampiran 3. Hasil Uji LCMS

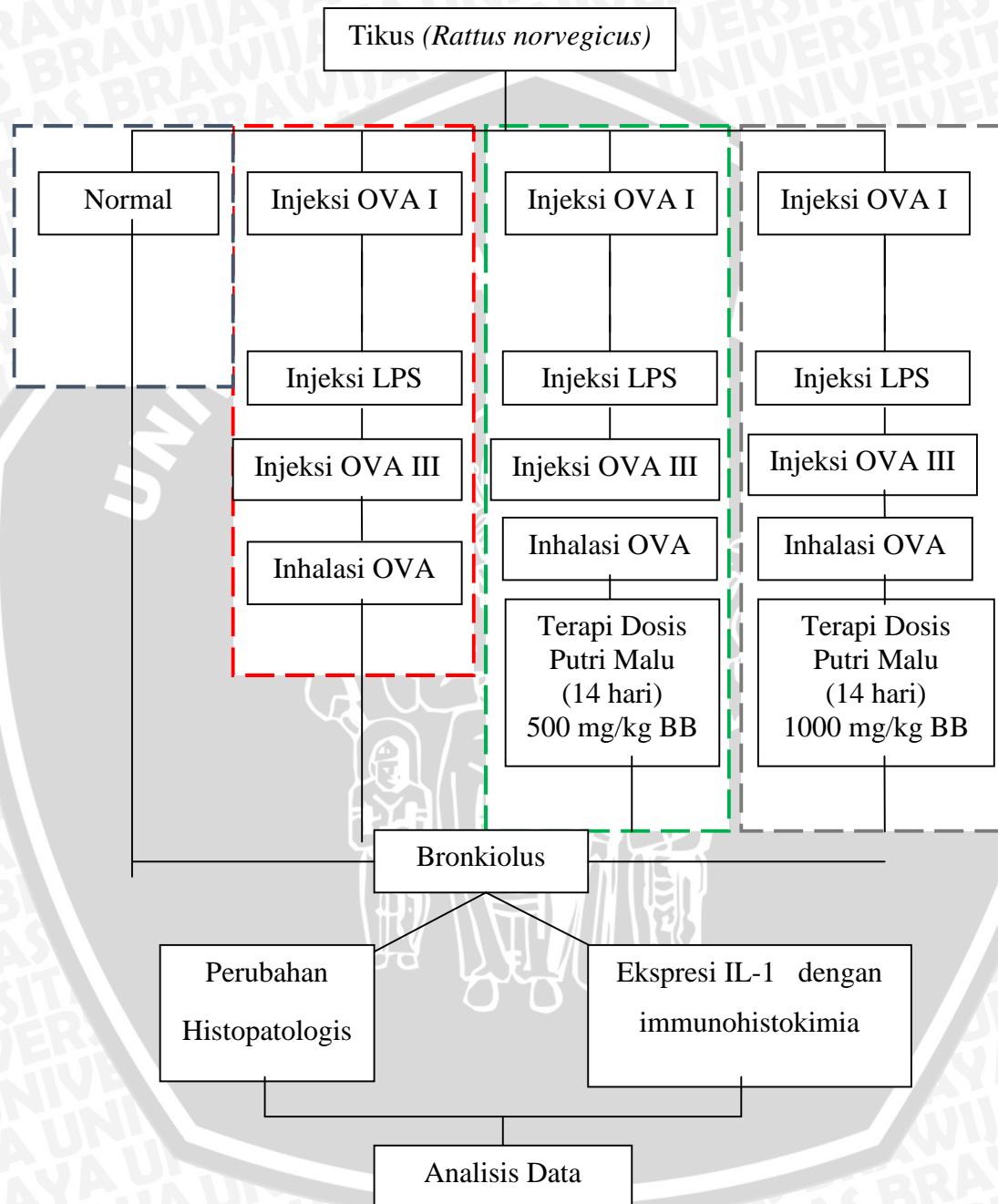
Uji ini Untuk Mengetahui Adanya Flavonoid didalam Ekstrak Air

daun Putri malu (*Mimosa pudoca*)



- 2) Isovitechin : Molar mass 283 g/mol
- 3) Orientin : Molar mass 329 g/mol
- 4) Vitexin : Molar mass 313 g/mol
- 5) Isoquercetin : Molar mass 303 g/mol
- 6) Quercetin : Molar mass 153 g/mol
- 7) Kaempferol : Molar mass 153 g/mol



Lampiran 4. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian**A. Skema Kerja Penelitian**

Keterangan :

[---] Kelompok Perlakuan 1 (Negatif)

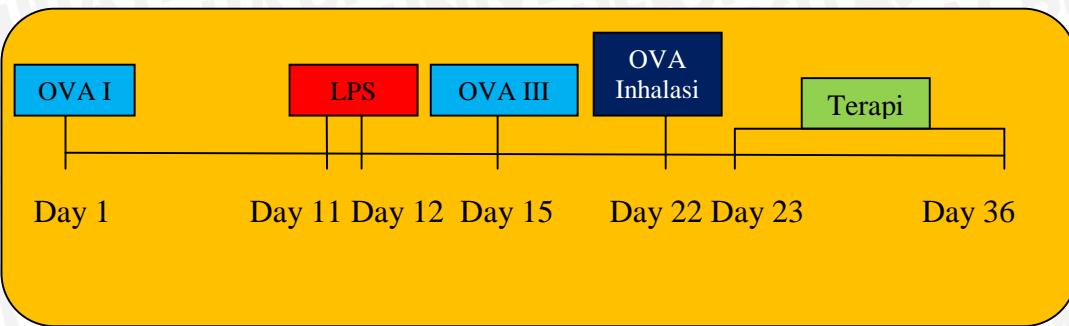
[---] Kelompok Perlakuan 2 (Positif)

[---] Kelompok Perlakuan 3 (Terapi 1)

[---] Kelompok Perlakuan 4 (Terapi 2)



B. Rancangan Perlakuan



Keterangan :

1. Injeksi OVA I, OVA II, dan OVA III dilakukan secara intraperitoneal dengan dosis $1\mu\text{g}/\text{ml}$ dengan ajuvan AlOH₃ dalam $200 \mu\text{L}$ larutan PBS.
2. Inhalasi OVA dilakukan dengan cara nebulasi OVA dalam larutan NaCl fisiologis dengan dosis $1\text{mg}/\text{ml}$ selama 20 menit.
3. Pemberian LPS dilakukan pada hari ke-11 dan ke-12 dengan dosis $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ dalam $200 \mu\text{L}$ larutan PBS pada sulkus gingiva molar rahang atas kiri tikus.
4. Pada hari ke-22, 30 menit setelah diberikan OVA secara inhalasi tikus dibunuh untuk mengetahui control positif.
5. Pada hari ke-23 dilakukan pemberian terapi ekstrak daun putri malu dengan cara sonde. Untuk terapi 1 diberikan dosis 500 mg dan untuk terapi 2 diberikan dosis 1000 mg . Terapi dilakukan sehari satu kali selama 14 hari.
6. Pada hari terakhir pemberian terapi dilakukan pembedahan untuk mengukur ekspresi iNOS dan gambaran histopatologi sel inflamatori bronkiolus.

Lampiran 5. Komposisi Larutan

No.	Larutan	Bahan - Bahan
1.	100 mL NaCl fisiologis 0,9%	4,5 gram garam NaCl Akuades
2.	PBS pH 7,4	0,2 gram KCl 0,2 gram KH ₂ PO ₄ 8 gram NaCl 2,16 gram Na ₂ HPO ₄ .H ₂ O
3.	Larutan OVA injeksi	10 µg ovalbumin 1,5 mg AlOH ₃ dilarutkan dalam 200 µl PBS
4.	Larutan LPS injeksi	LPS dosis 1 µg/ml dalam 200 µL larutan PBS
5.	Buffer Formalin 10%	100 ml formaldehida 40% 4 g NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O 6,5 g Na ₂ HPO ₄ 900 ml Akuades



Lampiran 6. Dosis Putri Malu

Dosis experimental ditentukan berdasarkan penelitian Rajendran, 2010.

Dosis yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebesar 500 mg/Kg BB dan 1000 mg/Kg BB, hal ini dikarenakan dosis yang sering dipakai dalam penelitian menggunakan ekstrak daun putri malu antara 200 mg/Kg BB sampai 2000 mg/Kg BB. Pemberian dosis lebih dari 2000 mg/Kg BB diduga merupakan dosis yang toksik.

Kelompok C (Dosis terapi = 500 mg/kg BB)

Perhitungan untuk dosis 500 mg/Kg BB

Diketahui :

- Rata-rata berat badan tikus adalah 200 g,

$$\text{Dihitung : } \frac{200}{1000} \text{ kg} \times 500 \text{ mg/kg}$$

$$= 100 \text{ mg berat kering daun putri malu/ ekor tikus}$$

Perhitungan berat kering daun putri malu untuk satu kelompok perlakuan terapi 500 mg/Kg BB

Diketahui :

- Banyaknya daun putri malu yang dibutuhkan per ekor adalah 100 mg
- Jumlah kelompok terapi 500 mg/Kg BB adalah 5 ekor

Dihitung :

$$\text{Berat kering daun putri malu} = \text{jumlah pemberian/ekor} \times \text{jumlah tikus}$$

$$= 100 \text{ mg} \times 5$$

$$= 500 \text{ mg/ 5 ekor tikus}$$

Perhitungan = 500 mg --- 100 ml → 500 mg/ 10 ml

100 mg/ 2 ml

Dosis terapi = 500 mg, untuk tikus berat 200 gr = 100 mg/ekor tikus

Volume pemberian 2 ml/ekor tikus.

Diagram :

Daun Putri malu (*Mimosa pudica*)

- Ditimbang sebanyak 0,5 gram (500 mg)
- Dimasukkan ke labu ukur
- Ditambahkan aquades hingga 100 ml
- Direbus pada temperatur 70°C
- Disisihkan air rebusan hingga 10 ml
- Disaring menggunakan kertas saring

Ekstrak Air daun Putri malu

Kelompok D (Dosis terapi = 1000 mg/kg BB)

Perhitungan untuk dosis 1000 mg/Kg BB

Diketahui :

- Rata-rata berat badan tikus adalah 200 g,

$$\text{Dihitung : } \frac{200}{1000} \text{ kg} \times 1000 \text{ mg/kg}$$

$$= 200 \text{ mg berat kering daun putri malu/ ekor tikus}$$

Perhitungan berat kering daun putri malu untuk satu kelompok perlakuan ter: 57

1000 mg/Kg BB



Diketahui :

- Banyaknya daun putri malu yang dibutuhkan per ekor adalah 200 mg
- Jumlah kelompok terapi 1000 mg/Kg BB adalah 5 ekor

Dihitung :

$$\begin{aligned}\text{Berat kering daun putri malu} &= \text{jumlah pemberian/ekor} \times \text{jumlah tikus} \\ &= 200 \text{ mg} \times 5 \\ &= 1000 \text{ mg/ 5 ekor tikus}\end{aligned}$$

Perhitungan = 1000 mg --- 100 ml \rightarrow 1000 mg/ 10 ml

200 mg/ 2 ml

Dosis terapi = 1000 mg, untuk tikus berat 200 gr = 200 mg/ekor tikus

Volume pemberian 2 ml/ ekor tikus

Diagram :

Daun Putri malu (*Mimosa pudica*) Kering

- Ditimbang sebanyak 1 gram (1000 mg)
- Dimasukkan ke labu ukur
- Ditambahkan aquades hingga 100 ml
- Direbus pada temperatur 70°C
- Disisihkan air rebusan hingga 10 ml
- Disaring menggunakan kertas saring

Ekstrak Air Daun Putri malu



Lampiran 7. Teknik Immunohistokimia**Preparat Bronkiolus**

- Direndam ke dalam Xylol I, Xylol II, Etanol bertingkat (100%, 90%, 80%, 70%), Aquades (1x5 menit)
- Dicuci PBS pH 7,4 selama 3x5 menit
- Direndam dalam 3% Hidrogen Peroksida selama 20 menit
- Dicuci PBS pH 7,4 selama 3x5 menit
- Direndam dalam PBS yang mengandung 5 % FBS
- Dicuci PBS pH 7,4 selama 3x5 menit
- Ditetesi dengan antibody primer (Anti iNOS), semalam suhu 4⁰C (diencerkan dalam 1% BSA dalam PBS)
- Dicuci PBS pH 7,4 selama 3x5 menit
- Ditetesi antibody sekunder berlabel biotin (*Anti rabbit IgG biotin labeled*), 1 jam suhu ruang
- Dicuci PBS pH 7,4 selama 3x5 menit
- Ditetesi SA-HRP, biarkan 30-60 menit dalam suhu ruang
- Dicuci PBS pH 7,4 selama 3x5 menit
- Ditetesi kromagen DAB, biarkan 10-20 menit dalam suhu ruang
- Dicuci akuades selama 3x5 menit
- Ditetesi pewarna HE, biarkan selama 5 menit dalam suhu ruang

Hasil pengamatan dengan entellan



Lampiran 8. Hasil dan Analisa Ekspresi iNOS

8.1 Data Ekspresi iNOS

Kelompok Perlakuan	Presentase area					Rata-Rata
	1	2	3	4	5	
A. Kontrol	0,3498	0,4624	0,1801	0,3130	0,2845	0,31797
B. Asma	2,35	1,899	2,729	2,03	2,13	2,2276
C. Terapi 500 mg/Kg BB	1,0992	1,4995	1,3568	1,0099	1,3674	1,26658
D. Terapi 1000 mg/Kg BB	0,41753	0,5468	0,59742	0,75989	0,61491	0,58731

8.2 Perhitungan Persentase Peningkatan Ekspresi iNOS

$$\text{Persentase Peningkatan (\%)} = \frac{\text{Rataan perlakuan} - \text{Rataan kontrol}}{\text{Rataan kontrol}} \times 100\%$$

$$\text{Persentase Penurunan (\%)} = \frac{\text{Rataan asma} - \text{Rataan perlakuan}}{\text{Rataan asma}} \times 100\%$$

$$\text{A : Persentase Peningkatan (\%)} = \frac{0,318 - 0,318}{0,318} \times 100\% = 0\%$$

$$\text{B : Persentase Peningkatan (\%)} = \frac{2,228 - 0,318}{0,318} \times 100\% = 600,57\%$$

$$\text{C : Persentase Penurunan (\%)} = \frac{2,228 - 1,266}{2,228} \times 100\% = 43,1\%$$

$$\text{D : Persentase Penurunan (\%)} = \frac{2,228 - 0,587}{2,228} \times 100\% = 73,6\%$$

8.3 Analisis Data

- Uji Normalitas Data

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Perlakuan	,169	20	,139	,863	20	,009
KadarIHK	,183	20	,078	,905	20	,052

*. $P > 0,05$ data normal



- Uji Homogenesitas

Test of Homogeneity of Variances

KadarIHK

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3,127	3	16	,055

- Uji Statistik ANOVA

ANOVA

KadarIHK

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10,868	3	3,623	83,701	,000
Within Groups	,693	16	,043		
Total	11,561	19			



- Uji Lanjutan BNJ (Beda Nyata Jujur)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: KadarIHK

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	Sakit	-1,90963100*	,13157834	,000	-2,2860793	-1,5331827
	Terapi 500 mg/kg	-,94861422*	,13157834	,000	-1,3250625	-,5721660
	BB					
	Terapi 1000 mg/kg	-,26933940	,13157834	,212	-,6457877	,1071089
	BB					
	Kontrol	1,90963100*	,13157834	,000	1,5331827	2,2860793
Sakit	Terapi 500 mg/kg	,96101678*	,13157834	,000	,5845685	1,3374650
	BB					
	Terapi 1000 mg/kg	1,64029160*	,13157834	,000	1,2638433	2,0167399
	BB					
	Kontrol	,94861422*	,13157834	,000	,5721660	1,3250625
	Terapi 500 mg/kg	Sakit	-,96101678*	,13157834	,000	-1,3374650
BB	Terapi 1000 mg/kg	,67927482*	,13157834	,000	,3028266	1,0557231
	BB					
	Kontrol	,26933940	,13157834	,212	-,1071089	,6457877
	Terapi 1000 mg/kg	Sakit	-1,64029160*	,13157834	,000	-2,0167399
	BB	Terapi 500 mg/kg	-,67927482*	,13157834	,000	-1,0557231
	BB					

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



- Pemberian Notasi pada Uji BNJ

Kadar IHK

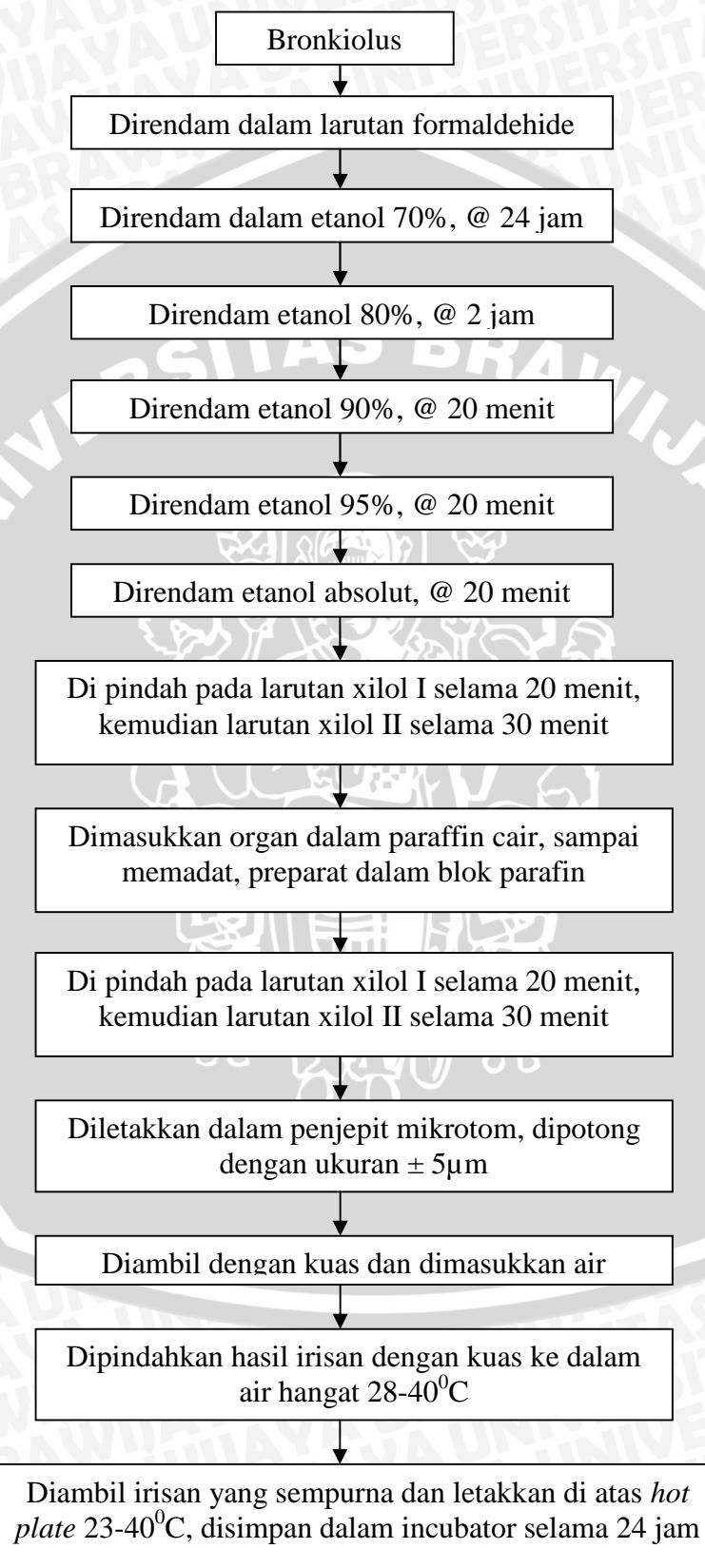
Tukey HSD^a

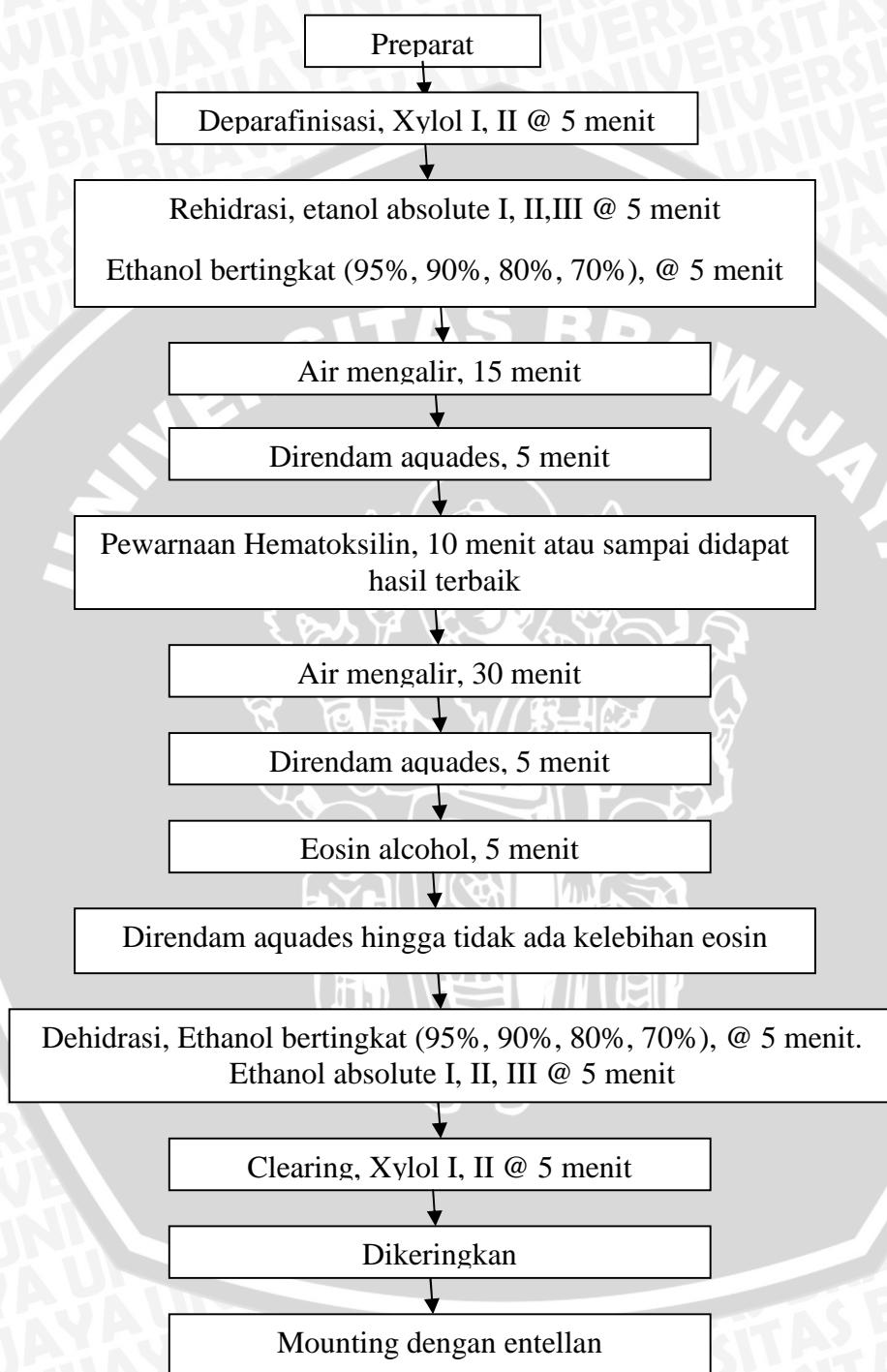
Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Kontrol	5	,3179690		
Terapi 1000 mg/kg BB	5	,5873084		
Terapi 500 mg/kg BB	5		1,2665832	
Sakit	5			2,2276000
Sig.		,212	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.



Lampiran 9. Pembuatan Histologi Bronkiolus menggunakan Metode Parafin

Lampiran 10. Pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE)

Lampiran 11. Hasil dan Analisa Infiltrasi Sel Inflamatori Bronkiolus

11.1 Data Infiltrasi Sel Inflamatori Bronkiolus

Kelompok Perlakuan	Percentase Area					Rata-Rata
	1	2	3	4	5	
A. Kontrol	1,49	0,391	0,31	0,28	0,42	0,5782
B. Asma	14,11	12,3	13,59	18,44	11,54	13,996
C. Terapi 500 mg/Kg BB	8,19	7,41	7,89	8,12	6,885	7,699
D. Terapi 1000 mg/Kg BB	2,03	2,89	3,32	2,93	3,15	2,864

11.2 Perhitungan Persentase Infiltrasi Sel Inflamatori Bronkiolus

$$\text{Persentase Peningkatan (\%)} = \frac{\text{Rataan perlakuan} - \text{Rataan kontrol}}{\text{Rataan kontrol}} \times 100\%$$

$$\text{Persentase Penurunan (\%)} = \frac{\text{Rataan asma} - \text{rataan perlakuan}}{\text{Rataan asma}} \times 100\%$$

$$\text{A : Persentase Peningkatan (\%)} = \frac{0,578 - 0,578}{0,578} \times 100\% = 0\%$$

$$\text{B : Persentase Peningkatan (\%)} = \frac{13,996 - 0,578}{0,578} \times 100\% = 2320,62\%$$

$$\text{C : Persentase Penurunan (\%)} = \frac{13,996 - 7,699}{13,996} \times 100\% = 44,99\%$$

$$\text{D : Persentase Penurunan (\%)} = \frac{13,996 - 2,864}{13,996} \times 100\% = 79,53\%$$

11.3 Analisis Data

- Uji Normalitas Data

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	
Perlakuan	,169	20	,139	,863	20	,009
InfiltrasiSelRadang	,207	20	,024	,904	20	,050

*. P>0,05 data normal

- Uji Homogenitas**Test of Homogeneity of Variances**

InfiltrasiSelRadang

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3,154	3	16	,054

- Uji Statistik ANOVA**ANOVA**

InfiltrasiSelRadang

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	528,649	3	176,216	87,891	,000
Within Groups	32,079	16	2,005		
Total	560,727	19			



- Uji Lanjutan BNJ

Multiple Comparisons

Dependent Variable: InfiltrasiSelRadang

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	Asma	-13,4178000*	,8955287	,000	-15,979925	-10,855675
	Terapi 500 mg/Kg	-7,1208000*	,8955287	,000	-9,682925	-4,558675
	BB					
	Terapi 1000 mg/Kg	-2,2858000	,8955287	,089	-4,847925	,276325
Asma	BB					
	Kontrol	13,4178000*	,8955287	,000	10,855675	15,979925
	Terapi 500 mg/Kg	6,2970000*	,8955287	,000	3,734875	8,859125
	BB					
Terapi 500 mg/Kg	Terapi 1000 mg/Kg	11,1320000*	,8955287	,000	8,569875	13,694125
	BB					
	Kontrol	7,1208000*	,8955287	,000	4,558675	9,682925
	Asma	-6,2970000*	,8955287	,000	-8,859125	-3,734875
BB	Terapi 1000 mg/Kg	4,8350000*	,8955287	,000	2,272875	7,397125
	BB					
	Kontrol	2,2858000	,8955287	,089	-,276325	4,847925
	Asma	-11,1320000*	,8955287	,000	-13,694125	-8,569875
Terapi 1000 mg/Kg	Terapi 500 mg/Kg	-4,8350000*	,8955287	,000	-7,397125	-2,272875
	BB					

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



- Uji Pemberian Notasi BNJ

InfiltrasiSelRadang

Tukey HSD^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Kontrol	5	,578200		
Terapi 1000 mg/Kg BB	5	2,864000		
Terapi 500 mg/Kg BB	5		7,699000	
Asma	5			13,996000
Sig.		,089	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

