

**PENGARUH TERAPI OMEGA 3 TERHADAP KADAR
MALONDIALDEHIDA (MDA) DAN EKSPRESI
TUMOR NEKROSIS FAKTOR ALFA (TNF α)
PADA BRONKUS TIKUS (*Rattus norvegicus*)
MODEL ASMA YANG DIPAPAR
LIPOPOLISAKARIDA**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

SEPTIAN VIDYA PANGASTUTI

115130101111041



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**



LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI
PENGARUH TERAPI OMEGA 3 TERHADAP KADAR
MALONDIALDEHIDA (MDA) DAN EKSPRESI
TUMOR NEKROSIS FAKTOR ALFA (TNF α)
PADA BRONKUS TIKUS (*Rattus norvegicus*)
MODEL ASMA YANG DIPAPAR
LIPOPOLISAKARIDA

Oleh :

SEPTIAN VIDYA PANGASTUTI

115130101111041

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 6 Agustus 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

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,

Dekan Fakultas 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 : Septian Vidya Pangastuti
NIM : 115130101111041
Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan
Penulis Skripsi berjudul :

Pengaruh Terapi Omega 3 Terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) Dan Ekspresi Tumor Nekrosis Faktor Alfa (TNF α) Pada Bronkus Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Asma Yang Dipapar Lipopolisakarida

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, 6 Agustus 2018

Yang menyatakan



(Septian Vidya Pangastuti)

NIM.115130101111041



PENGARUH TERAPI OMEGA 3 TERHADAP KADAR MALONDIALDEHIDA (MDA) DAN EKSPRESI TUMOR NEKROSIS FAKTOR ALFA (TNF α) PADA BRONKUS TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL ASMA YANG DIPAPAR LIPOPOLISAKARIDA

ABSTRAK

Asma adalah gangguan sistem respirasi yang disebabkan oleh perubahan kepekaan sistem imun saluran respirasi yang disebabkan oleh alergen. Asma mengakibatkan perubahan struktur dan kimia pada percabangan tracheobronkial. Asma dapat diperparah oleh infeksi rongga mulut akibat paparan Lipopolisakarida (LPS) dari bakteri Gram negatif. Omega-3 memiliki aktivitas antiinflamasi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh omega-3 pada tikus asma ditinjau dari kadar MDA dan ekspresi TNF α bronkus tikus asma. Tikus model asma disiapkan dengan sensitasi alergi menggunakan Ovalbumin secara intraperitoneal dan inhalasi serta pemberian LPS *Phorphyromonas gingivalis* secara intrasulkuler. Penelitian ini menggunakan lima kelompok tikus, yaitu kelompok kontrol negatif, kontrol positif (asma), serta terapi omega-3 dosis 30 mg/ekor/hari, 50 mg/ekor/hari, dan 70 mg/ekor/hari. Kadar MDA diukur dengan metode *Thiobarbaturic Acid* (TBA) sedangkan ekspresi TNF α diamati menggunakan metode Immunohistokimia. Data dari hasil perlakuan dianalisa menggunakan Microsoft Office Exel dan SPSS untuk Windows menggunakan analisis ragam ANOVA dan uji lanjutan Beda Nyata Jujur (BNJ) $\alpha = 5\%$. Hasil penelitian menunjukkan pemberian terapi omega-3 secara signifikan ($p < 0,05$) mampu menurunkan kadar MDA dengan penurunan tertinggi sebesar 68,39% dan menurunkan ekspresi TNF α bronkus tikus model asma dengan penurunan tertinggi sebesar 56,4% pada dosis terapi 70 mg/ekor/hari. Kesimpulan dari penelitian ini adalah omega-3 berpotensi sebagai bahan terapi asma.

Kata kunci : Tikus Asma, Omega-3, Bronkus, MDA, dan TNF α

repository.ub.ac.id

**THE EFFECT OF OMEGA 3 ON MALONDIALDEHYDE (MDA) LEVEL
AND TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA (TNF α) EXPRESSION
ON BRONCHIAL ASTHMA RATS (*Rattus norvegicus*) EXPOSED
BY LIPOPOLYSACCHARIDE (LPS)**

ABSTRACT

Asthma is a respiratory disorder caused by altered immunosensitivity of the respiratory tract due to inhaled allergens. This hyperresponsiveness causes structural and chemical changes of tracheobronchial. The symptoms of asthma become more severe by oral infections of lipopolysaccharide (LPS) of Gram-negative bacteria. Omega-3 has anti-inflammatory activity. The purpose of this study was to determine the therapeutic effect of omega-3 as anti-inflammatory on asthma rats based on the Malondialdehyde (MDA) level and Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF α) expression on bronchial asthma rats. Asthma rats were prepared by allergent sensitization of ovalbumin administered by intraperitoneal injection and inhalation, also intrasulcular injection of LPS from *Phorphyromonas gingivalis*. Five groups of rats (*Rattus norvegicus*) were used in this study: control group, asthma group, and three groups of omega-3 therapy dose of 30; 50; and 70 mg rat/day. Malondialdehyde levels were determined using Thiobarbaturic Acid (TBA) assay and expression of TNF α were observed using immunohistochemistry. The data was analyzed with Microsoft Office Exel and SPSS for Windows with ANOVA and continued with Tukey test. The result showed that omega-3 therapy decreased MDA level of bronchial's asthma rats significantly ($P < 0.05$) with the best derivation of 68.39%, and also decreased TNF α expression with the best result of 65.4%. The conclusion of the research was omega 3 had potentially to be used as therapy for astma.

Keywords : Asthma Rat, Omega-3, Bronchial, MDA and TNF α

KATA PENGANTAR

Puji syukur atas kehadiran Allah SWT atas segala limpahan rahmat, karunia dan pertolongan-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan proposal skripsi yang berjudul **“Pengaruh Terapi Omega 3 Terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) Dan Ekspresi Tumor Nekrosis Faktor Alfa (TNF α) Pada Bronkus Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Asma Yang Dipapar Lipopolisakarida”**.

Penulis menyadari skripsi ini tidak mungkin dapat diselesaikan tanpa adanya bantuan dari pihak lain. Dengan penuh rasa hormat dan ketulusan hati, penulis mengucapkan terimakasih kepada segenap pihak secara langsung maupun tidak langsung yang telah membantu dalam penyusunan skripsi ini. Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih terutama kepada :

1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Pembimbing I dan Dekan Fakultas Kedokteran Hewan atas segala bimbingan, nasihat, pengarahan dan waktu disela-sela kesibukan yang diberikan kepada penulis.
2. Dyah Kinasih Wuragil, S.Si., MP., M.Sc sebagai Pembimbing II atas segala bimbingan, arahan serta semangat yang telah diberikan kepada penulis.
3. drh.Analis Wisnu W., M.Biomed dan drh. Dodik Prasetyo, M.Vet selaku dosen penguji yang telah meluangkan waktu serta memberikan masukan dan saran yang membangun demi menyempurnakan skripsi ini.
4. Keluarga tercinta Drs. Suliono, M.Pd, Lily Poerwati, S.Pd, Sumiati, BA (Alm), drh. Mia Ika Dewisavitry, M.Kes, Rizky Aprilia Puspasari, S.Psi, Arlina Yunantiningtyas, Hendri Dwi Yulianto dan Kharis Nafian atas segala dukungan semangat, finansial serta kepercayaan yang telah diberikan. Terimakasih atas rasa bangga luar biasa karena telah menjadi bagian dari keluarga yang luar biasa.
5. Seluruh staf serta asisten Laboratorium Biokimia dan Biologi Seluler Fakultas MIPA Universitas Brawijaya yan telah membantu selama proses penelitian.
6. Tim Penelitian Hammam, Rini, Dimas dan Ricko atas kerja keras, semangat, kerja sama, serta tawa canda baik selama masa perkuliahan maupun masa penelitian berlangsung.

7. Seluruh keluarga besar BEBELUCK 2011 B untuk kebersamaan yang telah dilalui, Kolega PKH UB atas segala bantuan dalam proses penyusunan skripsi.
8. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan serta ketulusan yang telah diberikan. Semoga skripsi ini dapat menjadi sumbangan bagi kemajuan ilmu pengetahuan khususnya dalam dunia Medik Veteriner.

Malang, 6 Agustus 2018

Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
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 ISTILAH DAN LAMBANG	xiii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Batasan Masalah	4
1.4 Tujuan Penelitian	5
1.5 Manfaat Penelitian	6
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Hewan Coba Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>).....	7
2.2 Patomekanisme Asma	8
2.3 Alergen	10
2.4 Lipopolisakarida (LPS)	10
2.5 Melanoldialdehida (MDA).....	12
2.6 Tumor Nekrosis Faktor (TNF α)	13
2.7 Omega 3	14
BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	16
3.1 Kerangka Konsep Penelitian	16
3.2 Hipotesis Penelitian	18
BAB 4. METODE PENELITIAN	19
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	19
4.2 Sampel Penelitian.....	19
4.3 Rancangan Penelitian	20
4.4 Variabel Penelitian	21
4.5 Materi Penelitian	21
4.6 Tahapan Penelitian	22
4.6.1 Persiapan Hewan Coba	22
4.6.2 Prosedur Sensitasi Alergi dengan Ovalbumin	22
4.6.3 Tatalaksana Injeksi Lipopolisakarida	23
4.6.4 Dosis Omega-3	23
4.6.5 Terapi Menggunakan Omega-3	23
4.6.6 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum dan Pembuatan Kurva Baku Malondialdehida (MDA)	24



4.6.7	Persiapan Sampel dan Pengukuran Kadar Malondehida	24
4.6.8	Pembuatan Preparat IHK	25
4.7	Analisa Data	27
BAB 5.	HASIL DAN PEMBAHASAN	28
5.1	Pengaruh Pemberian Omega 3 Terhadap Kadar Malondialdehida Pada Bronkus Tikus	28
5.2	Pengaruh Pemberian Omega 3 Terhadap Ekspresi Tumor Nekrosis Faktor Alfa (TNF α) Pada Bronkus Tikus.....	33
BAB 6.	KESIMPULAN DAN SARAN	38
6.1	Kesimpulan.....	38
6.2	Saran.....	38
	DAFTAR PUSTAKA	39
	LAMPIRAN	43



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Rancangan kelompok penelitian	20
5.1 Kadar Malondialdehida pada Bronkus Tikus.....	29
5.2 Ekspresi TNF α pada Bronkus Tikus	35



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.4 Struktur asam lemak omega-3.....	14
2.5 Mekanisme EPA sebagai antiinflamasi	15
3.1 Kerangka konsep penelitian	16
5.1 Mekanisme Pembentukan MDA.....	31
5.2 Ekspresi Tumor Nekrosis Faktor Alfa (TNF- α) pada Bronkus Tikus	34



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Sertifikat Laik Etik.....	44
2 a. Rancangan Perlakuan	45
b. Kerangka Operasional.....	46
3. Perhitungan Dosis	47
4. Prosedur Pengukuran Kadar MDA	49
5. Imunohistokimia	51
6. Panjang Gelombang Maksimum, Kurva Baku MDA , Nilai Absorbansi dan Perhitungan Kadar MDA.....	52
7. Uji Statistik MDA	55
8. Immunoratio TNF α Bronkus.....	57
9. Uji Statistik Ekspresi TNF α	59



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

<u>Simbol/Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
BB	Berat Badan
g	Gram
H ₂ O ₂	<i>Hydrogen Peroksida</i>
IgE	<i>Imunoglobulin E</i>
IL	<i>Interleukin</i>
Kg	Kilogram
LPS	<i>Lipopopolisakarida</i>
MDA	Malondialdehida
OVA	Ovalbumin
PBS	<i>Phosphat Buffer Saline</i>
PUFA	<i>Polyunsaturated Fatty Acid</i>
RAL	Rancangan Acak Lengkap
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
rpm	Rotasi per menit
TBA	<i>Thiobarbituric Acid</i>
TCA	<i>Tricarboxylic Acid</i>
TH ₁	T Helper 1
TH ₂	T Helper 2
TNF α	Tumor Nekrosis Faktor Alfa



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Asma adalah gangguan inflamasi kronik saluran nafas yang melibatkan banyak sel dan elemen. Asma didefinisikan sebagai sebuah gangguan *obstructive reversible disease* yang menyerang saluran respirasi bagian bawah. Diperkirakan angka penderita asma di seluruh dunia sebesar 334.000.000 jiwa. Angka tersebut didapat berdasarkan analisa komprehensif yang dilakukan oleh *Global Burden of Disease Study* (GBD) pada tahun 2008-2010. Sementara *Global Asthma Report* tahun 2011 melaporkan jumlah kasus asma di seluruh dunia sebanyak 235.000.000 (Global Asthma Network, 2014). Selain kejadian pada manusia, asma merupakan salah satu gangguan paru-paru yang sering terjadi pada hewan kesayangan seperti kucing yang dapat menyebabkan morbiditas bahkan mortalitas (Pernas, 2010). Diperkirakan 1% dari populasi kucing seluruh dunia menderita asma (Tasi, 2010).

Kondisi asma terjadi karena perubahan kepekaan sistem imun (*immunosensitivity*) saluran respirasi yang disebabkan oleh alergen. Hiperresponsif yang terjadi menyebabkan berbagai macam perubahan struktur dan kimia pada percabangan tracheobronkial termasuk ketidakseimbangan adrenergik-kolinergik dan abnormalitas produksi mukus. Semua abnormalitas yang terjadi dapat bermaifestasi menjadi berbagai gejala klinis yang sering dikenali antara lain batuk, bersin, dan *expiratory dyspnea* (Bayers dan Nishi, 2005).

Sebagian besar penyebab kejadian asma pada hewan tidak diketahui, tetapi beberapa kondisi dapat menjadi sebuah “*trigger event*” antara lain, kontaminasi asap rokok, debu, infeksi saluran pernafasan dan lain-lain. Penelitian Utomo (2012) menunjukkan bahwa paparan lipopolisakrida (LPS) dari bakteri Gram negatif *Phorphyromonas gingivalis* mampu meningkatkan tingkat keparahan asma. Bakteri ini banyak dijumpai pada plak gigi kucing dan anjing.

Asma merupakan inflamasi kronis saluran pernafasan. Terjadinya inflamasi sering dihubungkan dengan peningkatan *reactive oxygen species* (ROS). Peroksidasi lipid merupakan mekanisme utama dari kerusakan seluler pada sistem biologi. Saat lipid rantai panjang tak jenuh (*Polyunsaturated fatty acids* atau PUFA) dioksidasi akan membentuk radikal spesies (ROS) yang merupakan produk toksik dan memiliki efek negatif pada sistem biologi. Peningkatan kadar ROS akan menyebabkan stress oksidatif, karena kadar radikal bebas menjadi lebih tinggi daripada kadar antioksidan dalam tubuh, hal tersebut menyebabkan peningkatan kadar malondialdehid (MDA) sebagai produk samping dari peroksidasi lipid, sehingga malondialdehid (MDA) sering digunakan sebagai marker dari peroksidasi lipid (Al-Aly, 2012).

Terjadinya inflamasi termasuk pada kasus asma didahului dengan pelepasan sitokin proinflamasi. Salah satu sitokin proinflamasi utama adalah tumor nekrosis faktor (TNF α). Kontribusi TNF α terhadap kejadian asma terlihat pada peningkatan kadar TNF α di saluran pernafasan pada pasien penderita asma. TNF α memiliki sejumlah fungsi yang berkaitan dengan asma antara lain sebagai *chemoattractant* untuk neutrofil dan eosinofil, meningkatkan efek sitotoksik

eosinofil pada sel endotel serta memicu aktivasi dan pelepasan sitokin oleh sel T (Berry *et al.*, 2006).

Selama ini pengobatan asma pada hewan seperti kucing dilakukan dengan administrasi *bronchodilator* seperti terbutaline (Pernas, 2010) . Tetapi beberapa *bronchodilator* memiliki efek samping seperti hipertensi dan osteoporosis dini. Oleh karena itu, masih dibutuhkan alternatif pengobatan asma dengan efektifitas, efisiensi dan keamanan yang lebih baik dari pengobatan konvensional yang telah dilakukan.

Minyak ikan merupakan sumber omega 3 sebagai salah satu suplemen sumber nutrisi yang diketahui memiliki manfaat bagi kesehatan antara lain memperbaiki kondisi kesehatan kardiovaskular, fungsi otak, dan menjaga kesehatan selama kehamilan. Selain itu omega 3 diketahui dapat mencegah inflamasi, penuaan, arthritis, resistensi insulin, serta menekan dan memperlambat perkembangan sel kanker (Siriwardhana *et al.*, 2012). Dari berbagai manfaat omega 3 yang telah disebutkan salah satunya adalah perannya sebagai antiinflamasi.

Proses penting yang terjadi saat asma antara lain adalah terjadinya alergi dan inflamasi yang mengakibatkan dilepaskannya mediator yang berperan dalam patomekanisme asma. Omega 3 sebagai agen antiinflamasi diharapkan dapat mencegah pelepasan mediator sehingga menurunkan derajat keparahan inflamasi dalam proses penyakit asma. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh terapi omega 3 terhadap kadar malondialdehida (MDA) dan ekspresi tumor nekrosis faktor alfa (TNF α) organ bronkus tikus (*Rattus norvegicus*) model asma yang dipapar lipopolisakarida (LPS).

1.2 Rumusan Masalah

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

1. Apakah pemberian omega 3 dapat menurunkan kadar malondialdehida (MDA) organ bronkus pada tikus (*Rattus norvegicus*) model asma yang terpapar LPS?
2. Apakah terjadi penurunan ekspresi TNF α pada organ bronkus tikus (*Rattus norvegicus*) model asma yang terpapar LPS setelah diterapi dengan omega 3?

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 150-200 gram. Penggunaan hewan coba telah mendapatkan sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya
2. Pembuatan keadaan asma pada hewan model tikus dilakukan dengan cara injeksi ovalbumin (OVA) secara intraperitoneal dan inhalasi, yang kemudian diperparah dengan paparan lipopolisakarida (LPS)

Porphyromonas gingivalis melalui injeksi intrasulkular dengan dosis 1 μ g/ekor (Utomo, 2012).

3. Omega 3 yang digunakan merupakan jenis produk komersial yang terdaftar dalam Badan POM SI 114 603 071 (*Baby's DHA-Nordic Natural. Inc*).
4. Dosis terapi Omega-3 dibedakan menjadi 3 kelompok yaitu sebesar 30mg/individu/hari, 50mg/individu/hari serta 70mg/individu/hari sesuai dengan Mickleorough *et al*, (2004) yang telah dikonversikan dari dosis omega-3 untuk manusia menjadi dosis yang sesuai dengan bobot pada hewan model tikus.
5. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah kadar malondialdehida (MDA) organ bronkus yang diukur dengan menggunakan uji TBA yang kemudian dianalisa secara kuantitatif dan ekspresi TNF α organ bronkus yang dianalisa menggunakan mikroskop.

1.4 Tujuan Penelitian

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

1. Mengetahui bahwa omega 3 dapat menurunkan kadar malondialdehida (MDA) pada organ bronkus hewan tikus (*Rattus norvegicus*) model asma.
2. Mengetahui bahwa omega 3 dapat menurunkan ekspresi TNF α pada organ bronkus tikus (*Rattus norvegicus*) model asma.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk membuktikan pengaruh terapi omega 3 terhadap penurunan kadar malondialdehida (MDA) dan ekspresi TNF α organ bronkus pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) asma yang terpapar LPS dan menguji kemampuan omega 3 sebagai agen antiinflamasi sebagai kandidat alternatif terapi asma paparan LPS.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

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

Pemilihan tikus putih untuk percobaan disebabkan oleh beberapa hal, antara lain : ekonomis, mudah berkembangbiak, mudah disimpan karena ukuran tubuh yang kecil, memiliki perilaku (biologis) tubuh menyerupai manusia, dan mudah beradaptasi dengan lingkungan (Kiara, 2013).

Penggunaan tikus sebagai hewan model asma dikarenakan tikus memiliki beberapa keunggulan yaitu produksi IgE yang merupakan antibodi anafilaksis (hipersensitivitas terhadap antigen) terbesar. Selain itu tikus memiliki kemampuan untuk mengalami *airway hipereaktivitas* yang lebih lama (Zosky *et al.*, 2007). Penelitian Kumar *et al.*, (2008) telah menggunakan Ovalbumin (OVA) dan *Aluminium Hydroxide* ($AlOH_3$) pada hewan coba sebagai sensitisasi alergi akut penginduksi asma, yang diketahui dapat membantu pembentukan T *helper* 2 (TH₂) oleh sistem imun ketika terpapar antigen.

Klasifikasi tikus putih menurut Sirois (2005), yaitu ;

Kingdom : Animalia

Filum : Chordata

Kelas : Mamalia

Ordo : Rodentia

Famili : Muridae

Genus : *Rattus*

Spesies : *Rattus norvegicus*

2.2 Patomekanisme Asma

Sedikitnya ada tiga peristiwa yang berasosiasi dengan asma yaitu perubahan respon imun, ketidakseimbangan sistem adrenergik-kolinergik, dan peningkatan produksi mukus (Pernas, 2010)

2.2.1 Perubahan Respon Imun

Seperti halnya asma pada manusia, asma pada hewan misalnya pada hewan kesayangan seperti kucing termasuk kedalam reaksi hipersensitivitas tipe I. Pada hewan dengan asma, paparan alergen melalui aerosol akan menstimulasi produksi dari antibodi IgE dari alergen spesifik. Reaksi dimulai ketika sel dendritik pada traktus respiratorius pasien asma membawa partikel antigenic dan bermigrasi ke nodus limpatikus untuk dipresentasikan pada limfosit T₁ (sel TH₁). Interaksi antara TH₁ dan limfosit T₂ (sel TH₂) menginduksi perubahan seluler dari limfosit B untuk memproduksi IgE spesifik untuk melawan antigen. IgE yang diproduksi bersama dengan sel mast dan basophil pada lapisan mukosa respirasi akan membuat saluran respirasi menjadi lebih sensitif terhadap paparan selanjutnya dari antigen yang sama (Bay *et al.*, 2004; Byers, 2005; Padrid, 2010)

Ketika terjadi paparan kedua dari antigen yang sama, IgE di permukaan sel mast yang telah sensitif berikatan dengan alergen, hal ini menyebabkan pelepasan mediator yang sebagian besar berupa histamin dan serotonin. Histamin merupakan protein vasoaktif yang apabila bergabung dengan mediator lain akan menyebabkan sekresi mukus, peningkatan permeabilitas kapiler dan kenaikan kemotaksis granulosit. Pelepasan serotonin saat kejadian

asma akut pada kucing dari sel mast menyebabkan kontraksi secara tiba-tiba pada otot polos bronkus (Bay *et al.*, 2004; Padrid, 2010)

Aktivasi sel mast juga menyebabkan tubuh melepaskan mediator lain yaitu *eosinophilic chemotactic factors*, interleukin 1, 2, 3, 4, dan 5, *granulocyte* dan *macrophage stimulating factor*, interferon γ , *tumor necrosis factor* α (TNF α), prostaglandin, tromboksan A_2 , dan leukotrin (Byers, 2005; Cohn, 2007; Padrid, 2010)

2.2.2 Ketidakseimbangan Sistem Adregenik-Kolinergik

Kontraksi yang tidak tepat dari otot polos bronkus secara langsung dihubungkan dengan keadaan inflamasi, perubahan keseimbangan simpatis-parasimpatis dari cabang bronkus. Sistem adregenik berperan pada pernafasan melalui reseptor adregenik β_2 yang menstimulasi peningkatan produksi cAMP penyebab bronkodilatasi dan reduksi produksi mukus. Stimulasi kolinergik berlawanan dengan aktivitas adregenik β_2 dengan membangkitkan cAMP yang menyebabkan kontraksi otot polos (bronkokonstriksi), peningkatan produksi mukus dan vasodilatasi. Aktivitas TH_2 dan eosinofil berkontribusi pada ketidakseimbangan sistem adregenik-kolinergik sistem respirasi (Byers, 2005)

2.2.3. Peningkatan Produksi Mukus

Peningkatan produksi mukus adalah faktor kunci perkembangan asma yang berkontribusi pada morbiditas dan mortalitas penyakit. Sel goblet dan sel glandula submukosa berperan dalam produksi mucin pada saluran pernafasan. Mucin adalah glucoprotein yang merupakan kandungan paling

banyak dari mukus pada saluran pernafasan dan merupakan agen penting untuk viscoelastis serta sebagai fungsi adesif. Beberapa sumber mendokumentasikan terjadinya hiperplasia dan atau hipertropi dari sel yang menseskresikan mukus pada kasus asma, hal ini mengindikasikan terjadinya *airway remodeling*. Keadaan ini menyebabkan peningkatan akumulasi mucin dan sekresi mucin pada sputum. Akibat yang muncul adalah peningkatan produksi mukus dan penyempitan saluran nafas yang berkontribusi pada keparahan asma. Sitokin TH₂ (khususnya interleukin-13) berperan dalam peningkatan produksi mukus dengan menstimulasi terjadinya hiperplasia sel goblet pada kasus asma (Byers, 2005; Padrid, 2010).

2.3 Alergen

Ovalbumin merupakan protein utama dari putih telur yang menempati 54% total protein putih telur. Protein ovalbumin ayam terdiri dari 385 asamamino. Ovalbumin telah terbukti dapat digunakan sebagai alergen untuk menimbulkan reaksi hipersensitivitas tipe I (Heriprasetya, 2007). Pemberian ovalbumin memberikan gambaran peningkatan IgE dan inflamasi yang ditandai dengan infiltrasi sel radang dan eosinofil pada histopatologi jaringan paru. Sensitisasi menggunakan ovalbumin secara inhalasi pada hewan coba menunjukkan *airway remodelling* seperti gambaran asma pada manusia (Tang *et al.*, 2006).

2.4 Lipopolisakarida (LPS) *Porphyromonas gingivalis*

P.gingivalis merupakan bakteri obligat anaerob gram negatif berpigmen hitam yang tidak berspora dan non-motile yang menginfeksi jaringan periapikal.

Bakteri ini berukuran kecil, antara 0,5 - 2 μm dan berbentuk *coccobacilli* (Yoshino, 2007). Berdasarkan taksonominya, *P.gingivalis* diklasifikasikan sebagai berikut (Kusumawardani dkk., 2010)

- Kingdom : Eubacteria
- Filum : Bacteroidates
- Klas : Bacteroides
- Ordo : Bacteroidales
- Famili : Porphyromonadaceae
- Genus : *Porphyromonas*
- Spesies : *Porphyromonas gingivalis*

P.gingivalis merupakan spesies yang paling sering ditemukan dalam genusnya dan mungkin merupakan bakteri patogen yang paling penting dalam genusnya. Hal ini disebabkan karena *P.gingivalis* merupakan bakteri yang paling proteolitik dan paling patogen diantara bakteri anaerob gram negatif berpigmen hitam sehingga patogenitas bakteri ini banyak diteliti secara luas (Zhang dkk., 2010) . *P.gingivalis* diketahui memiliki berbagai faktor virulensi patogenik yang berperan dalam menyebabkan penyakit. Faktor virulensi tersebut antara lain seperti *fimbriae*, *capsule*, *extracellular vesicles*, *hemagglutinin*, *gingipain*, *hydrolytic enzyme*, *collagenase* dan *lipopolysaccharide (LPS)* (Ferraz dkk., 2011).

Patogenitas yang utama dari bakteri gram negatif disebabkan oleh adanya *lipopolysaccharide (LPS)* pada dinding selnya. *LPS* adalah komponen permukaan mayor dari bakteri gram negatif yang tersusun dari *polysaccharide*, *core*

polysaccharide dan *Lipid A* (Yoshino, 2007). *LPS* memiliki potensi yang kuat sebagai stimulator inflamasi karena *LPS* mampu menembus ke dalam jaringan periradikuler dan bertindak sebagai endotoksin dalam organisme inangnya sehingga menyebabkan peradangan dan berlanjut dengan terjadinya kerusakan tulang. Penelitian menunjukkan bahwa respon radang dimulai saat *LPS P.gingivalis* berikatan dengan *lipopolisakarida binding protein (LBP)* membentuk kompleks molekul CD14. Komplek molekul ini akan dikenali oleh makrofag melalui reseptor TLR4 sehingga menstimulasi terbentuknya IL-1, IL-6 dan TNF- α , yaitu sitokin yang berperan dalam proses terjadinya resorpsi tulang (Yustina dkk., 2012).

2.5 Malondialdehida (MDA)

Stres oksidatif terjadi apabila jumlah radikal yang ada dalam tubuh lebih tinggi dibandingkan dengan jumlah antioksidan tubuh. Radikal bebas dalam tubuh akan paling mudah menyerang komponen makro seperti protein, lemak, dan unsur DNA termasuk karbohidrat (Winarsi 2007). Pengukuran radikal bebas dalam tubuh yang paling umum adalah mengukur kerusakan jaringan lipid dengan mengukur senyawa malondialdehida (MDA) yang merupakan produk peroksidasi lipid (Arkhaesi, 2008)

MDA merupakan produk oksidasi asam lemak tidak jenuh oleh radikal bebas. Di samping itu, MDA juga merupakan metabolit komponen sel yang dihasilkan oleh radikal bebas. Konsentrasi MDA yang tinggi menunjukkan adanya proses oksidasi dalam membran sel. Status antioksidan yang tinggi biasanya

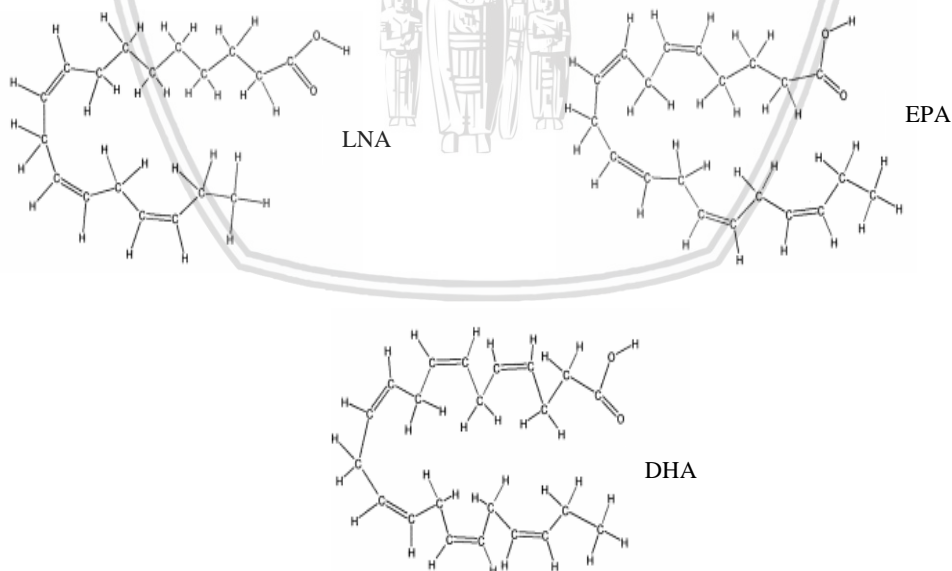
diikuti oleh penurunan kadar MDA (Helliwell dan Gutteridge, 2006). Keadaan stress oksidatif biasanya terjadi bila jumlah radikal bebas lebih tinggi dibandingkan jumlah antioksidan dalam tubuh. Stress oksidatif tubuh dapat ditentukan dengan mengukur salah satu parameternya, yaitu kadar malondialdehida (MDA) dalam plasma. Semakin tinggi kadar MDA plasma maka semakin tinggi stress oksidatif yang terjadi dalam sel-sel tubuh (Valko *et al.*, 2006).

2.6 Tumor Necrosis Factor (TNF α)

Tumor Nekrosis Faktor Alfa (TNF- α) merupakan sitokin utama pada respon inflamasi akut terhadap bakteri gram negatif, mikroba dan infeksi lainnya. Infeksi yang berat akan memicu produksi TNF- α dan akan menimbulkan reaksi sistemik. Sumber utama TNF- α adalah fagosit mononuklear dan sel T yang diaktifkan antigen, sel *Natural Killer* (NK) dan sel mast. TNF- α berfungsi membuat permukaan sel endotel menjadi adhesif melalui ekspresi reseptor permukaan baru (molekul adhesif) pada konsentrasi yang rendah. Selain itu, TNF- α juga menyebabkan peningkatan kemampuan adhesif netrofil terhadap endotel. Pada kadar rendah, TNF- α bekerja terhadap leukosit dan endotel, menginduksi inflamasi akut. Pada kadar sedang, TNF- α berperan dalam inflamasi sistemik, dan saat tinggi menimbulkan patologi syok septik (Bratawijaya dan Iris, 2010).

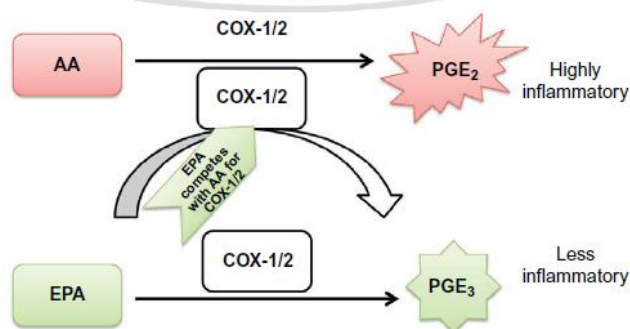
2.7 Omega 3

Ada dua famili utama dari *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) yaitu n-6 (omega-6) dan n-3 (omega-3) (Calder, 2003). Asam lemak omega-3 adalah rantai panjang PUFA yang umumnya memiliki 18, 20, atau 22 atom karbon, dengan panjang rantai pertama 3-6 ikatan ganda berdekatan dengan atom karbon ketiga ketika dihitung dari ujung metil karbon dari molekul asam lemak. Omega-3 asal ikan terdiri dari EPA (20 atom karbon, 5 ikatan ganda - 20: 5n-3) dan DHA (22 atom karbon, 6 ikatan rangkap - 22: 6n-3). Jumlah kecil dari *docosapentaenoic acid* (DPA, 22: 5n-3) ditemukan dalam minyak ikan dan ikan. . Minyak nabati tidak mengandung EPA dan DHA, sejumlah jenis tertentu mengandung asam lemak omega-3 dikenal sebagai asam alpha-linolenic (LNA, 18: 3n-3) yang memiliki 18 atom karbon dan 3 ikatan rangkap (Holub. D.J, and Holub. B. J., 2004).



Gambar 2.4. Struktur asam lemak omega-3 (Holub. D.J, and Holub. B. J., 2004).

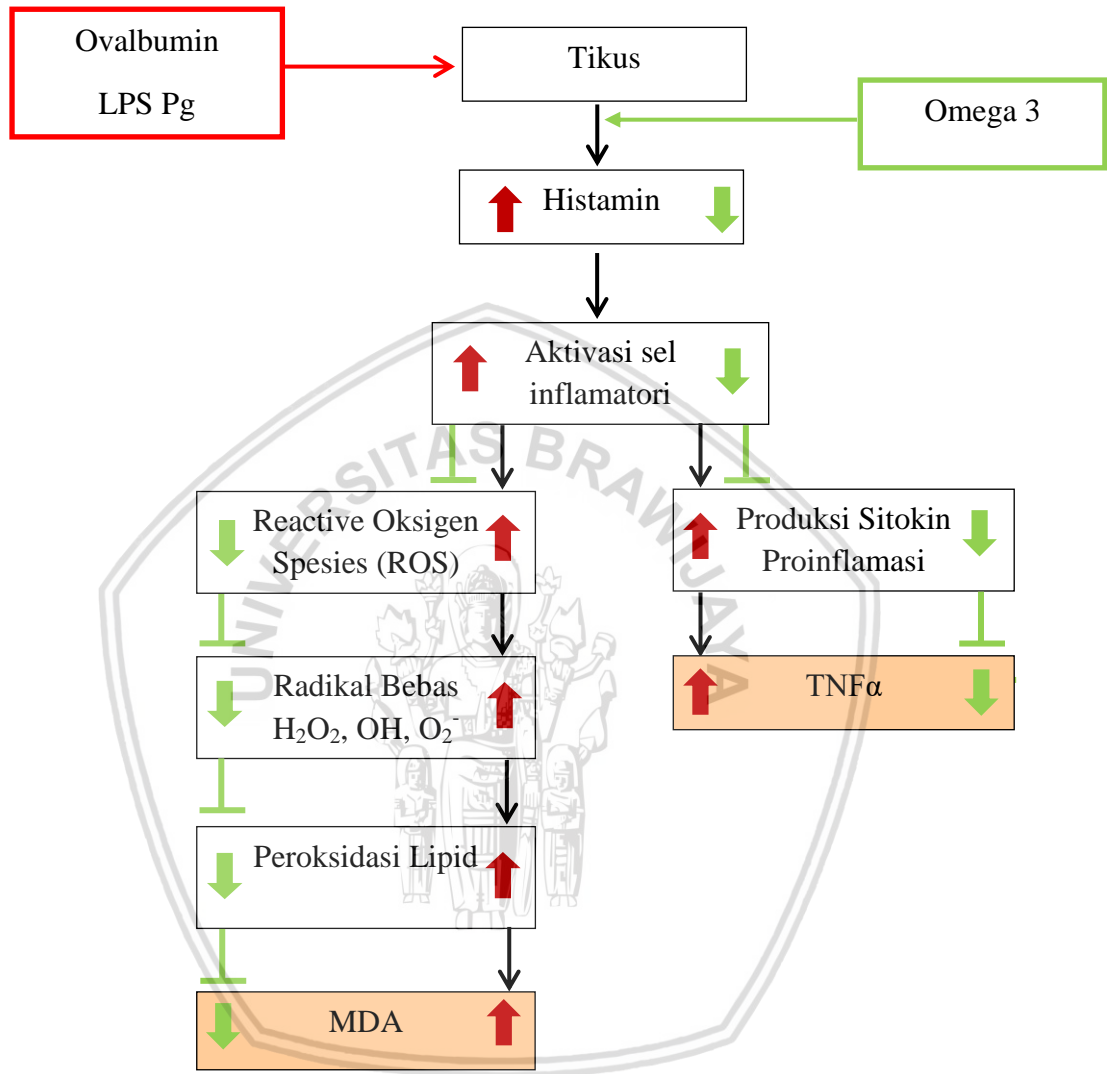
Cyclooxygenase (COX) merupakan enzim pada jalur biosintetik dari prostaglandin (PG), tromboksan dan prostasiklin dari asam arakhidonat (AA). COX-1 berfungsi sebagai *housekeeping* gen pada hampir semua jaringan normal. COX-2 bertanggung jawab terhadap proses inflamasi dan rasa nyeri. COX-2 membentuk PGE₂ dan PGI₂ yang menyebabkan beberapa proses biologis seperti peningkatan permeabilitas kapiler, agen piretik dan hiperalgesia. Salah satu mekanisme utama EPA sebagai anti-inflamasi adalah perannya sebagai inhibitor untuk *proinflammatory arachidonic acid* (AA) pada *cyclooxygenase* (COX), yang menghasilkan *proinflammatory eicosanoids*. Ketika EPA menjadi subjek oksigenasi oleh COX, akan dihasilkan *less inflammatory prostaglandin* E₃ (PGE₃). Sementara AA akan menghasilkan *highly proinflammatory prostaglandin* E₂ (PGE₂). EPA memiliki struktur mirip AA sehingga EPA dapat berkompetisi dengan AA masuk ke dalam membran fosfolipid sel dan menjadi substrat untuk COX (Calder, 2009). Selain itu DHA dengan dosis yang sesuai menghambat anti-CD40 / IL-4 mendorong diferensiasi IgE (Koch, 2009)



Gambar 2.5. Mekanisme EPA sebagai antiinflamasi (Calder, 2009)

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan:

- ↓ : Patomekanisme
- (orange) : Induksi asma
- (green) : Terapi
- ↑ (red) : Peningkatan aktivitas
- ↓ (green) : Penurunan aktivitas
- ⊥ (green) : Menghambat
- (orange) : Variabel yang diamati

Ovalbumin sebagai alergen akan menyebabkan respon sel yang mengakibatkan sel menjadi hiperesponsif. Lipopolisakarida dari *Porphyromonas gingivalis* akan mengaktifasi sel-sel inflamasi seperti sel mast, neutrofil, dan makrofag (Wang and Ohura, 2002). Inflamasi kronik pada hewan model asma ditambah dengan paparan LPS menyebabkan aktivasi sel-sel inflamatori seperti eosinofil, makrofag dan sel mast yang mampu melepaskan mediator inflamasi seperti histamin, leukotrien dan sitokin serta menghasilkan oksigen reaktif (ROS) (Busse and Lemnaske, 2001). Oksigen reaktif yang terlepas menyebabkan ketidakseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan sehingga menimbulkan stres oksidatif. Radikal bebas akan bereaksi dengan asam lemak tidak jenuh (PUFA) penyusun membran sel atau disebut sebagai proses peroksidasi lipid yang menghasilkan MDA. Pada kondisi inflamasi, makrofag akan melepaskan TNF α sebagai salah satu mediator proinflamasi. TNF α akan menyebabkan pengerahan sel seperti neutrophil dan monosit ke lokasi inflamasi.

Omega 3 memiliki efek antiinflamasi yang bekerja dengan cara berkompetisi dengan asam arakhidonat (AA) untuk berikatan dengan COX-1 dan COX-2 sehingga PGE2 sebagai faktor inflamasi tidak terbentuk. Hal ini menyebabkan penurunan aktivitas sel inflamasi seperti makrofag, sel mast, neutrofil dan lain-lain. Selain itu DHA dengan dosis yang sesuai menghambat anti-CD40 / IL-4 mendorong diferensiasi IgE (Koch, 2009) Ketika sel-sel tersebut mengalami penurunan, diharapkan terjadi penurunan ekspresi TNF α dan kadar MDA

3.2 Hipotesis

Hipotesis yang dapat diambil dari penelitian ini adalah

1. Omega 3 mampu menurunkan ekspresi TNF α pada tikus (*Rattus norvegicus*) model asma.
2. Omega 3 mampu menurunkan kadar MDA pada tikus (*Rattus norvegicus*) model asma.



BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2014 – Juli 2015. Bertempat di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

4.2 Sampel Penelitian

Hewan model menggunakan tikus (*Rattus norvegicus*) betina strain wistar berumur 8-12 minggu (Epstein, 2004). Bobot badan tikus antara 150 - 200 gram. Hewan coba diadaptasikan selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008):

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

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

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 20/5$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

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

4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan eksperimental yang digunakan adalah rancangan eksperimen sederhana dimana subyek dibagi menjadi 5 kelompok secara random. Tiap kelompok terdiri dari 4 tikus. Kelompok 1 adalah tikus kontrol negatif, kelompok 2 adalah tikus yang diinduksi OVA + LPS (kontrol positif), sedangkan kelompok 3, 4 dan 5 diberi OVA+LPS+ omega 3 dengan dosis masing-masing sebesar 30 mg/hari, 50 mg/hari dan 70 mg/hari (Lampiran 3).

Tabel 4.1 Rancangan Kelompok Penelitian

Kelompok	Variabel Yang Diamati (Kadar MDA dan Ekspresi TNF- α)			
	Ulangan			
	1	2	3	4
Kelompok A (kontrol negatif)				
Kelompok B (kontrol positif)				
Kelompok C (30mg/ekor/hari)				
Kelompok D (50mg/ekor/hari)				
Kelompok E (70mg/ekor/hari)				

4.4 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah:

Variabel bebas : Dosis omega 3, Ovalbumin, LPS

Variabel tergantung : Kadar MDA dan TNF α bronkus

Variabel kendali : Tikus, jenis kelamin, berat badan, umur

4.5 Materi Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*), Ovalbumin (Sigma-Aldrich, 950512), LPS 1435/1449 dari bakteri *Porphyromonas gingivalis* (Astarte Biologics), Omega 3 (Baby's DHA-Nordic Natural. Inc), AlOH₃, Phosphat Buffer Saline (PBS), Paraformaldehyde Acid (PFA), Aquades, standar MDA, TCA 100%, HCl, Na-Thio 1%, NaCl fisiologis 0,9%, alkohol 70%, alkohol 90%, alkohol 95%, alkohol absolut, xilol, parafin, aquades, antibodi primer (Mouse monoclonal anti TNF α), antibodi sekunder berlabel biotin (*Rabbit anti mouse IgG*) (Novolink Polymer Detection system RE7140-K), H₂O₂, Casein protein block, Polymere Anti-rabbit Poly-HRP-IgG, DAB chromogen, DAB substrate buffer, hematoxylen, etellan .

Peralatan yang dipergunakan dalam penelitian ini, antara lain spuit 1 mL, spuit 3 mL, kandang tikus, *scalpel* , gunting, pinset, gelas objek, mortar, *microtube*, vortex, water bath 100°C, *Omron CompAir Compressor Nebulizer*, spektrofotometer *Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-1601*, timbangan, tabung polipropilen, tabung ependorf (mikrotube), pipet tetes, *micropipette*, *freezer* dan mikroskop Olympus BX51.

4.6 Tahapan Penelitian

4.6.1 Persiapan Hewan Coba

Tikus yang digunakan untuk penelitian diaklimatisasi terhadap lingkungan selama tujuh hari dengan pemberian makanan berupa ransumbasal berisikan serat (5%), protein (20%), dan lemak (5-10%). Pakan tikus berbentuk pelet yang diberikan dua kali sehari secara teratur. Air minum untuk tikus berasal dari air PDAM. Tikus dikandangkan dalam kandang yang berukuran 17.5x23.75x17.5 cm, dengan jumlah empat ekor. Kandang terbuat dari plastic dan dilengkapi dengan kawat *stainless steel* pada bagian atas kandang. Kandang tikus berlokasi pada tempat yang bebas dari suara ribut dan terjaga dari asap industri serta polutan. Lantai kandang mudah dibersihkan dan disanitasi. Suhu optimum ruangan untuk tikus adalah 22-24°C dan kelembaban udara 50-60% dengan ventilasi yang cukup.

4.6.2 Prosedur Sensitasi Alergi dengan Ovalbumin

Perlakuan pertama yang dilakukan pada tikus adalah menginjeksikan ovalbumin (Sigma-Aldrich). Larutan ovalbumin (OVA) dibuat dengan cara mencampur 1,5 mg $AlOH_3$ ke dalam 200 μ L PBS (*phosphate buffer saline*) kemudian dihomogenkan, lalu ditambah 10 μ g OVA. Injeksi OVA dilaksanakan pada hari ke-1 dan 14 secara intra peritoneal dengan volume injeksi 0,2 mL/ekor (Cornad *et al.*,2009). Selanjutnya dilakukan sensitasi OVA secara inhalasi. Pemaparan OVA aerosol dilakukan dalam tabung transparan yang dihubungkan dengan *Omron CompAir Compressor Nebulizer* pada hari ke 21, dilakukan

dengan melarutkan OVA dalam NaCl steril sebanyak 1 mg/mL selama 20 menit (Lampiran 2).

4.6.3 Tatalaksana Injeksi Lipopolisakarida (LPS)

Pemaparan lipopolisakarida (LPS) dilakukan secara intrasulkuler menggunakan dosis 1 µg/ekor yang dilarutkan dalam aquades stereril sebanyak 1 mL pada sulkus gingiva molar rahang atas kiri tikus sesuai yang dilakukan oleh Stephanie *et al.*, (2002) dan Utomo (2012). LPS yang digunakan adalah LPS1435/1450 dari *Porphyromonas gingivalis* (Astarte Biologics) yang berfungsi sebagai agen infeksi rongga mulut dan memodulasi respon imun. Injeksi LPS intrasulkuler dilakukan berturut-turut pada hari ke 10 dan 11 (Sthepanie *et al*, 2002) (Lampiran 2).

4.6.4 Dosis Omega 3

Dosis terapi Omega-3 dibedakan menjadi 3 kelompok yaitu sebesar 30 mg/ekor/hari, 50 mg/ekor/hari serta 70 mg/ekor/hari sesuai dengan Mickleorough *et al*, 2004 yang telah di konversikan dari dosis omega-3 untuk manusia menjadi dosis yang sesuai dengan bobot pada hewan model tikus. Tidak terdapat penelitian mengenai letal dosis dari omega-3 (Lampiran 2).

4.6.5 Terapi Menggunakan Omega 3

Omega-3 yang digunakan merupakan jenis omega-3 yang terdaftar dalam Badan POM SI 114 603 071 dengan merek dagang Baby's DHA dan diproduksi oleh Nordic Natural. Inc dengan *expired date* 08/16. Metode pemberian omega 3

melalui terapi per oral dengan volume pemberian tiap ekor tikus sebanyak 0,2 mL/ekor/hari untuk kelompok tikus (C), 0,3 mL/ekor/hari untuk kelompok tikus (D) dan 0,4 mL/ekor/hari untuk kelompok tikus (E) selama 3 minggu berturut-turut (Mickleorough *et al*, 2004).

4.6.6 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum dan Pembuatan Kurva

Baku Malondialdehida (MDA)

Standar MDA dimasukkan ke dalam kuvet, kemudian diatur absorbansi pada panjang gelombang 500-600 nm, lalu dicari panjang gelombang dengan nilai absorbansi tertinggi.

Standar MDA dengan konsentrasi 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 dan 8 mg/mL masing-masing diambil 100 μ L, kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi yang berbeda, setelah itu ditambahkan 550 μ L aquades. Setiap tabung tersebut ditambahkan 100 μ L TCA 100%, 250 μ L HCl 1N dan 100 μ L Na-Thio 1%, dan campuran yang terbentuk dihomogenkan dengan vortex. Tabung ditutup dengan plastik dan diberi lubang. Tabung diinkubasi dalam penangas air dengan suhu 100°C selama 30 menit. Setelah itu, didinginkan pada suhu ruangan. Larutan standar kemudian dibaca pada panjang gelombang maksimum (533 nm) menggunakan spektrofotometer (*Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-1601*). Kurva standar MDA dihasilkan dari persamaan regresi antara absorbansi (y) dan konsentrasi MDA (x) (Amin, 2009).

4.6.7 Persiapan Sampel dan Pengukuran Kadar Malondialdehida

Sampel disiapkan dengan melakukan penggerusan organ bronkus sebanyak 0,225 g pada mortar dingin, kemudian ditambahkan 500 μ L NaCl

fisiologis 0,9%, selanjutnya homogenat dipindah kedalam ependorf dan disentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk diambil 100 μ L dimasukkan kedalam ependorf, ditambah 550 μ L akuades, 100 μ L TCA kemudian dihomogenkan dengan vortex, ditambahkan 250 μ L HCL lalu dihomogenkan dengan vortex. Kemudian ditambahkan dengan 100 μ L Na-Thio 1% dan dihomogenkan kembali dengan vortex. Setelah itu, mulut tabung ditutup menggunakan *plastix wrap* dan dipanaskan dalam *water bath* 100°C selama 30 menit. Setelah dipanaskan, dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk dipindah kedalam tabung reaksi baru. Sampel kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer *Shimadzu UVvisible spectrophotometer UV-1601* pada panjang gelombang maksimum (533 nm) Amin (2009) (Lampiran 3).

4.6.8 Pembuatan Preparat IHK

Pada penelitian ini tikus satu per satu didislokasi servical. Setelah tikus mati, tikus dibedah untuk diambil organ bronkus, kemudian direndam di dalam larutan PFA 10% dan disimpan di dalam suhu ruang.

Organ yang sudah difiksasi menggunakan PFA 10% kemudian didehidrasi menggunakan alkohol bertingkat dari konsentrasi 70% selama 24 jam, etanol 80% selama 2 jam, etanol 90%, 95% dan etanol absolut selama 20 menit. Kemudian dilakukan penjernihan dengan cara merendam jaringan dalam larutan xylol I selama 20 menit dan xylol II selama 30 menit. Infiltrasi dan embeeding dengan menggunakan parafin cair pada inkubator bersuhu 58 – 60°C. Lalu dilakukan trimming dengan cara cetakan dijepit dalam mikrotom dan jaringan dipotong

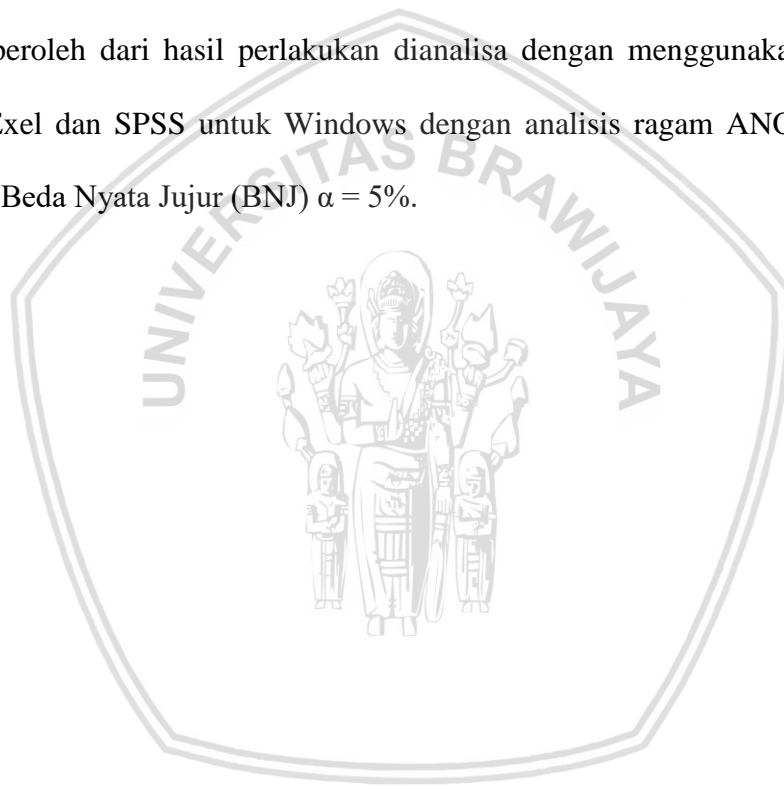
dengan ketebalan 5 μ m. Sediaan disimpan dalam inkubator suhu 38 – 40°C 24 jam (Muntiha, 2001).

Preparat bronkus direndam kedalam xylol I, xylol II, etanol bertingkat (100%, 90%, 80%, dan 70%), dan akuades secara berurutan (masing – masing 5 menit). Kemudian dicuci dengan PBS selama 3 x 5 menit. Diteteskan H₂O₂ pada preparat lalu diinkubasi selama 5 menit kemudian dicuci dengan PBS 2 x 5 menit. Preparat diinkubasi dengan caseine protein block selama 5 menit lalu dicuci dengan PBS 2 x 5 menit. Preparat kemudian ditetaskan antibodi primer (Mouse monoclonal anti TNf α) selama 1 jam pada suhu ruang. Dilakukan pencucian kembali dengan PBS 2 x 5 menit. Preparat kemudian ditetaskan antibodi sekunder (rabbit anti mouse IgG) lalu diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang, setelah itu preparat dicuci kembali dengan PBS 2 x 5 menit.

Preparat kemudian diinkubasi dengan Polymere Anti-rabbit Poly-HRP-IgG selama 30 menit, setelah itu dicuci kembali dengan PBS 2 x 5 menit. Preparat ditetesi dengan DAB chromogen selama 5 menit kemudian dicuci dengan PBS. Selanjutnya counterstaining menggunakan hematoxylen selama 5 menit. . Preparat dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Tahapan terakhir di mounting dengan etellan dan ditutup dengan cover glass. Lalu diamati menggunakan mikroskop. Perhitungan persentase area menggunakan program *immunoratio* (Lampiran 5). Dokumentasi hasil pengamatan dengan mikroskop selanjutnya diunggah dalam program *immunoratio* untuk mendapat hasil perhitungan persen area (lampiran 8).

4.7 Analisa Data

Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah perubahan kadar malondialdehida (MDA) dan ekspresi TNF α pada organ bronkus. Perubahan kadar MDA diamati secara kuantitatif menggunakan Uji TBA sedangkan dan ekspresi TNF α diamati menggunakan metode imunohistokimia yang selanjutnya dianalisa menggunakan *immunoratio* untuk mengetahui persentase area. Data yang diperoleh dari hasil perlakuan dianalisa dengan menggunakan Microsoft Office Exel dan SPSS untuk Windows dengan analisis ragam ANOVA dan uji lanjutan Beda Nyata Jujur (BNJ) $\alpha = 5\%$.



BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Terapi Omega 3 Terhadap Kadar Malondialdehida Pada Bronkus Tikus

Hewan model asma dibuat dengan memberikan alergen ovalbumin (OVA) dan diperparah dengan pemberian lipopolisakarida (LPS) yang berasal dari bakteri *Phorphyromonas gingivalis* (Utomo, 2012). Pemberian LPS *Phorphyromonas gingivalis* secara intrasulkular bertujuan untuk memperparah keadaan asma (Dong, 2009). Kondisi asma pada tikus akan menyebabkan kenaikan kadar Malondialdehida (MDA).

Malondialdehida (MDA) merupakan marker dari peroksidasi lipid yang memiliki korelasi erat dengan kejadian asma karena mengacu pada terjadinya stress oksidatif saat proses peroksidasi lipid tersebut. Stress oksidatif (*oxidative stress*) terjadi apabila tingkat oksigen reaktif intermediate (ROI) yang toksik melebihi pertahanan antioksidan endogen. Keadaan ini mengakibatkan kelebihan radikal bebas, yang akan bereaksi dengan lemak, protein, asam nukleat seluler, sehingga terjadi kerusakan lokal dan disfungsi organ tertentu. Pada keadaan normal, kadar MDA akan rendah, hal ini disebabkan karena kadar radikal bebas dalam tubuh tidak melebihi antioksidan endogen. Pengukuran kadar MDA pada bronkus tikus model asma yang telah diterapi dengan omega 3 ditampilkan pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1. Kadar Malondialdehida pada Bronkus Tikus

Kelompok Perlakuan	Rata – rata Kadar MDA ($\mu\text{g/mL}$)	Kadar MDA (%)	
		Peningkatan Terhadap Kelompok A (Kontrol Negatif)	Penurunan Terhadap Kelompok B (Kontrol Positif)
Kelompok A (kontrol negatif)	1,84 \pm 0,14 ^a	-	-
Kelompok B (kontrol positif)	8,89 \pm 0,77 ^e	383,15	-
Kelompok C (30 mg/ekor/hari)	6,93 \pm 0,18 ^d	-	21,93
Kelompok D (50mg/ekor/hari)	4,88 \pm 0,14 ^c	-	45,11
Kelompok E (70mg/ekor/hari)	2,81 \pm 0,67 ^b	-	68,39

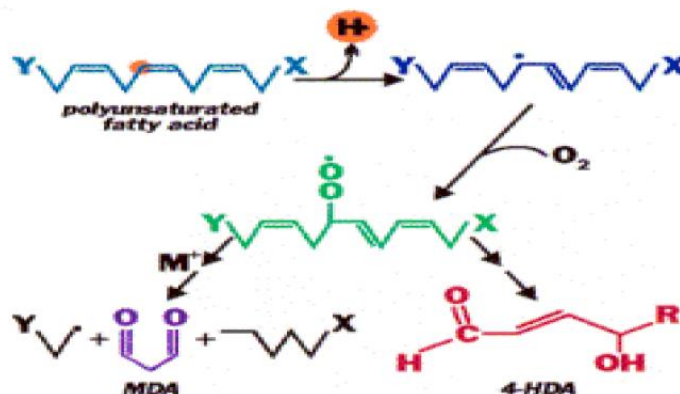
Keterangan : Angka dengan superscript (notasi) berbeda menunjukkan perbedaan $p < 0,05$. Kontrol negatif : tanpa perlakuan, kontrol positif : induksi Ovalbumine dan dipapar LPS, C : 30 mg/ekor/hari, D : 50 mg/ekor/hari dan E : 70 mg/ekor/hari.

Hasil analisa statistik One-Way ANOVA menggunakan SPSS. 16 menunjukkan bahwa pemberian terapi omega 3 pada tikus model asma yang diinduksi ovalbumin dan dipapar LPS, memberikan pengaruh yang beda nyata ($P < 0,05$) terhadap kadar MDA bronkus antar setiap kelompok perlakuan. Data pada Tabel 5.1 menunjukkan bahwa kadar MDA pada kelompok tikus kontrol positif lebih tinggi dan berbeda nyata dibandingkan kelompok tikus kontrol negatif. Kadar Malondialdehida pada kelompok tikus kontrol positif meningkat sebesar 383,15% terhadap kelompok tikus kontrol negatif . Kelompok tikus terapi (kelompok C, D, dan E) juga berbeda nyata terhadap tikus kontrol positif dan kontrol negatif. Hasil uji lanjutan menggunakan Uji Tukey menunjukkan kadar MDA berbeda signifikan ($P < 0,05$) antar perlakuan, dosis 70 mg/ekor adalah dosis

terbaik dalam menurunkan kadar MDA dengan presentase penurunan tertinggi sebesar 68,39%.

Tingginya kadar MDA pada kelompok kontrol positif (kelompok B) menunjukkan induksi ovalbumin yang dilanjutkan dengan paparan LPS *Phorphyromonas gingivalis* pada tikus model asma (kelompok B) mengaktifkan fungsi fagosit dalam tubuh sebagai respon adanya benda asing. Aktivitas fagositosis ini menghasilkan produk samping berupa oksigen reaktif (ROS). Selanjutnya LPS akan memicu munculnya respon inflamasi. Proses inflamasi yang terjadi juga akan berkontribusi dalam peningkatan kadar ROS dalam tubuh. Akibat yang timbul adalah tingkat radikal bebas dalam tubuh naik melebihi kadar antioksidan. Radikal bebas tersebut akan berupaya menstabilkan muatan atomnya, salah satu caranya adalah dengan berikatan dengan molekul lemak. Membran sel adalah kompartemen sel yang rentan terjadi kerusakan karena reaksi dengan bahan pengoksidasi sebab membran memiliki sejumlah besar *poly unsaturated fatty acid* (PUFA). Kerusakan membran sel oleh bahan pengoksidasi disebut dengan peroksidasi lipid. Tingginya angka kerusakan sel akibat peroksidasi lipid akan diikuti dengan tingginya kadar Malondialdehid (MDA) sebagai produk samping peroksidasi lipid (Al-Aly, 2012).

Malondialdehida terbentuk melalui proses peroksidasi lipid yang diawali dengan penghilangan atom hidrogen (H) dari molekul *poly unsaturated fatty acid* oleh gugus radikal hidroksil (.OH), hal ini menyebabkan lipid bersifat radikal. Radikal lipid ini kemudian bereaksi dengan atom oksigen (O₂) membentuk radikal peroksil (.OO), selanjutnya menghasilkan MDA (Yustika, 2013)



Gambar 5.1. Mekanisme Pembentukan MDA (Yustika, 2013)

Pada kelompok terapi C, D, E yaitu kelompok terapi menggunakan bahan terapi omega 3 mampu menurunkan kadar MDA. Kelompok terapi C (30 mg/ekor), D (50 mg/ekor) dan E (70 mg/ekor) menunjukkan penurunan kadar MDA berbeda nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Pada kelompok Terapi C penurunan kadar MDA sebesar 21,93% dibandingkan dengan kelompok kontrol positif serta dinyatakan berbeda nyata dengan kelompok kontrol negatif dilanjutkan dengan kelompok Terapi D penurunan kadar MDA sebesar 45,11% dibandingkan dengan kelompok kontrol positif serta dinyatakan berbeda nyata dengan kelompok kontrol negatif. Kelompok terapi E merupakan kelompok terapi dengan penurunan kadar MDA tertinggi sebesar 68,39%, maka dosis terapi 70mg/ekor merupakan dosis terbaik dalam menurunkan kadar MDA. Dosis terbaik dengan penurunan kadar MDA tertinggi (kelompok E) masih memiliki hasil berbeda nyata dengan kelompok kontrol negatif (kelompok A) yang ditunjukkan dengan perbedaan notasi (*superscript*) pada nilai rata-rata kadar MDA (Tabel 5.1).

Aktivitas DHA dan EPA dalam Omega-3 kelompok E terlihat paling optimal dalam menurunkan kadar MDA. DHA memiliki kemampuan untuk menghambat IL-4 dan CD40, dimana IL-4 dan CD40 dibutuhkan sebagai sinyal pembentukan rantai epsilon dalam proses pembentukan IgE. Pada jalur pertama, apabila terjadi ikatan antara IL-4 dan IL-4R, maka dalam tubuh limfosit B akan terjadi sinyal hantaran melalui STAT-6 untuk mengaktivasi faktor transkripsi terhadap sintesis rantai epsilon. Jalur kedua dihasilkan melalui ligasi CD40 pada limfosit B dengan CD40L pada limfosit T yang dapat menginduksi hantaran sinyal di limfosit B, dan mengakibatkan rekombinasi DNA sehingga terjadi aktivasi faktor transkripsi pada lokus rantai epsilon sehingga dapat terjadi sintesis IgE (Sudiana, 2014). Aktivitas DHA dalam menghambat IL-4 dan CD40 menyebabkan tidak adanya sinyal untuk mengaktivasi faktor transkripsi dari rantai epsilon, sehingga tidak terjadi sintesis IgE. Ketika IgE tidak terbentuk, sel mast tidak akan bergranulasi sehingga tidak terjadi pelepasan histamin.

Penurunan kadar MDA juga didasari oleh adanya aktivitas anti inflamasi omega 3. Mekanisme utama aktivitas anti inflamasi omega 3 adalah peran EPA sebagai inhibitor kompetitif untuk *proinflammatory arachidonic acid* (AA) pada jalur *cyclooxygenase* (COX) yang memproduksi *proinflammatory eicosanoids*. Ketika EPA menjadi subjek oksigenasi pada jalur COX, *lessinflammatory prostaglandin E₃* (PGE₃) akan terbentuk, sedangkan ketika AA menjadi objek oksigenasi akan dihasilkan *proinflammatory prostaglandin E₂* (PGE₂). Oksigenasi AA pada jalur COX dapat dihambat oleh omega 3 dan PGE₃ akan dihasilkan menggantikan PGE₂. Omega 3 bertindak seperti obat anti-inflamasi nonsteroid

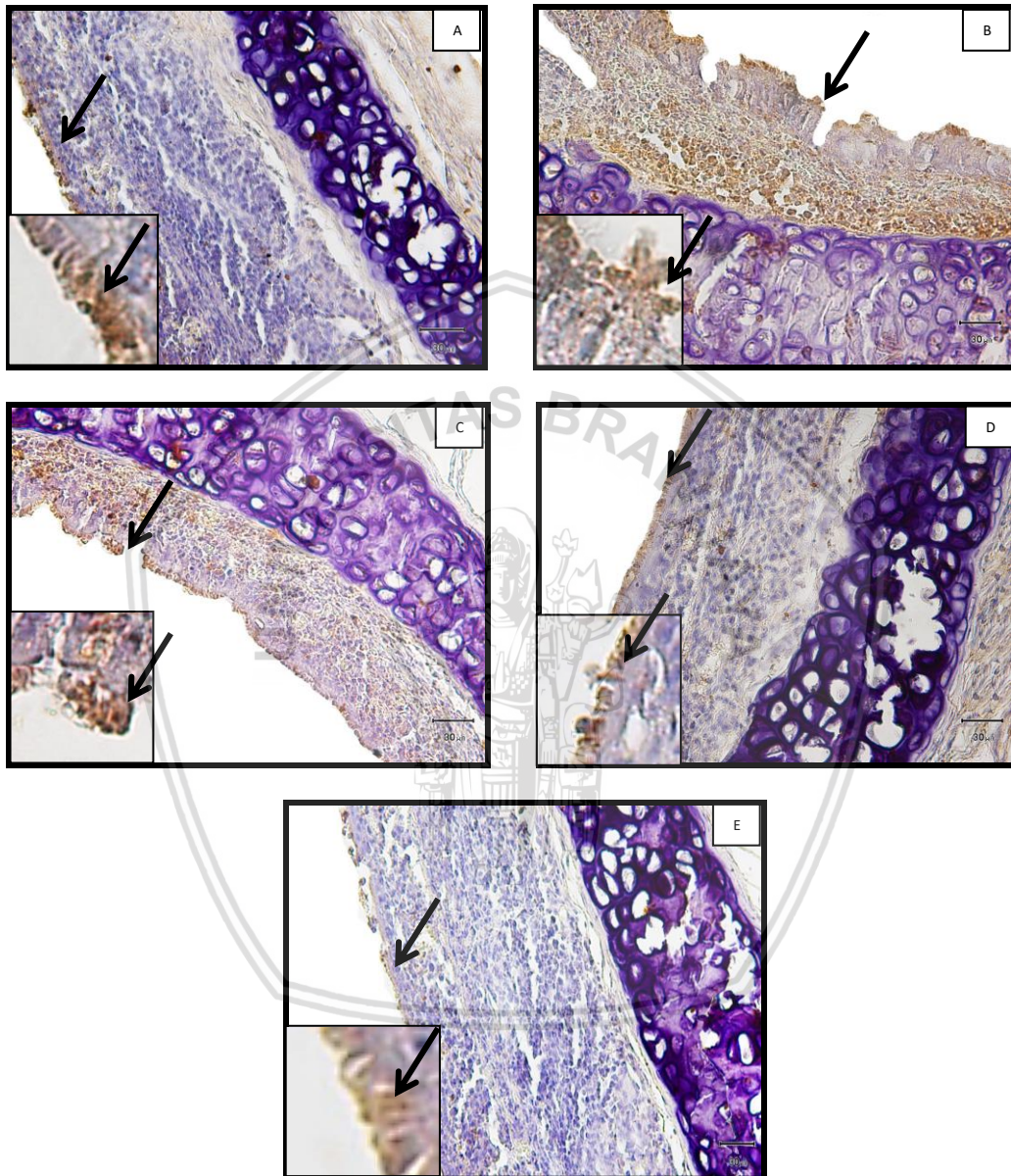
untuk mengurangi aktivitas enzim COX dan kemudian mengurangi peradangan. Penurunan faktor proinflamasi akan menyebabkan penurunan derajat keparahan inflamasi sehingga kadar radikal bebas juga akan menurun, akibatnya kadar MDA sebagai produk samping peroksidasi lipid sebagai efek tingginya radikal bebas juga akan menurun (Siriwardhana *et al.*, 2012).

5.2 Pengaruh Terapi Omega 3 Terhadap Ekspresi Tumor Nekrosis Faktor Alfa (TNF α) Pada Bronkus Tikus

Kejadian asma yang melibatkan terjadinya keadaan alergi dan inflamasi menyebabkan tubuh memberikan respon terhadap keadaan yang terjadi, salah satunya adalah pembentukan sitokin proinflamasi sebagai respon adanya patogen penyebab infeksi. Pembentukan sitokin proinflamasi berperan dalam menghasilkan sistem imun untuk melawan patogen penyebab infeksi. Tumor Nekrosis Faktor Alfa (TNF- α) sebagai salah satu sitokin proinflamasi berfungsi untuk merangsang makrofag mensekresi kemokin agar sel imun non spesifik (makrofag) migrasi ke dalam jaringan untuk menyingkirkan patogen. Panas yang terjadi saat inflamasi juga disebabkan oleh TNF- α karena mampu merangsang hipotalamus untuk melepaskan pirogen. Jika kerusakan sel parah, maka TNF- α menginduksi nekrosis. Nekrosis sel disebabkan radikal bebas merusak membran sel (lipid) (Baratawidjaja, 2010).

Ekspresi TNF- α sebagai salah satu sitokin proinflamasi pada organ bronkus ditunjukkan oleh gambaran jaringan dengan daerah berwarna kecoklatan pada sitoplasma sel epitel bronkus. Warna coklat yang muncul berasal dari ikatan antigen (TNF- α) dan antibodi spesifik yang kemudian diberi label *chromogen*.

Adanya ekspresi TNF- α diamati dengan teknik imunohistokimia dan dihitung menggunakan program *immunoratio* (Lampiran 8) (Gambar 5.2).



Gambar 5.2 Ekspresi Tumor Nekrosis Faktor Alfa (TNF- α) Pada Sitoplasma Epitel Bronkus Tikus (↑) yang Dipapar LPS (Perbesaran 400x).

Keterangan : (A) Kontrol Negatif, (B) Kontrol Positif, (C) Terapi 1 (30 mg/ekor/hari), (D) Terapi 2 (50 mg/ekor/hari) dan (E) Terapi 3 (70 mg/ekor/hari).

Ekspresi Tumor Nekrosis Faktor Alfa (TNF α) pada bronkus tikus model asma yang dipapar lipopoliskarida dan diterapi omega 3 ditunjukkan dalam Tabel 5.2.

Tabel 5.2 Ekspresi Tumor Nekrosis Faktor Alfa (TNF α) Pada Bronkus Tikus

Kelompok Perlakuan	Rata – rata Ekspresi TNF α	Ekspresi TNF α (%)	
		Peningkatan Terhadap Kelompok A (Kontrol Negatif)	Penurunan Terhadap Kelompok B (Kontrol Positif)
Kelompok A (kontrol negatif)	0,15 \pm 0,27 ^a	-	-
Kelompok B (kontrol positif)	0,55 \pm 0,31 ^e	267	-
Kelompok C (30 mg/ekor/hari)	0,47 \pm 0,17 ^d	-	14,55
Kelompok D (50mg/ekor/hari)	0,36 \pm 0,22 ^c	-	34,55
Kelompok E (70mg/ekor/hari)	0,24 \pm 0,24 ^b	-	56,4

Keterangan : Angka dengan superscript (notasi) berbeda menunjukkan perbedaan $p < 0,05$. Kontrol negatif : tanpa perlakuan, kontrol positif : induksi Ovalbumine dan dipapar LPS, C : 30 mg/ekor/hari, D : 50 mg/ekor/hari dan E : 70 mg/ekor/hari.

Hasil uji analisis statistika (One-Way ANOVA) menggunakan SPSS 16 menunjukkan bahwa pemberian Omega-3 secara signifikan ($P < 0,05$) menurunkan ekspresi TNF- α . Hasil uji lanjutan menggunakan Uji Tukey menunjukkan ekspresi TNF- α berbeda signifikan ($P < 0,05$) antar perlakuan. Dosis 70 mg/ekor adalah dosis terbaik dalam menurunkan ekspresi TNF- α dengan penurunan presentase ekspresi TNF- α tertinggi yaitu 56,4%.

Terjadi peningkatan ekspresi TNF α yang signifikan pada tikus kelompok kontrol positif dibandingkan tikus kelompok kontrol negatif. Tingginya ekspresi TNF α pada kelompok kontrol positif (kelompok B) menunjukkan tingginya aktivasi sel-sel proinflamasi yang berperan dalam proses inflamasi yang terjadi

sebagai respon terhadap induksi LPS bakteri Gram negatif. LPS mengikat protein spesifik dalam plasma yaitu LBP, selanjutnya kompleks LPS-LBP ini akan berikatan dengan CD14 yang merupakan reseptor di membran makrofag. CD14 akan mempresentasikan LPS kepada TLR4 yaitu reseptor untuk transduksi sinyal sehingga terjadi aktivasi makrofag. Pengenalan antigen oleh CD14 dan TLR4 di membran monosit dan makrofag akan memicu pelepasan sitokin untuk mengaktifkan system imunitas seluler. Pengaktifan ini menyebabkan sel T berdiferensiasi menjadi sel TH₁ serta TH₂. Sel TH₁ menskresikan sitokin proinflamasi seperti TNF dan IFN γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 dan IL-12 (Aalto, 2007).

Ekspresi TNF- α tertinggi ditunjukkan oleh Gambar 5.2 (B) dimana daerah kecoklatan muncul pada jaringan epitel bronkus. Ekspresi TNF α dihasilkan akibat adanya paparan LPS yang memicu terjadinya inflamasi. Kelompok terapi C (30 mg/ekor), D (50 mg/ekor) dan E (70 mg/ekor) menunjukkan penurunan ekspresi TNF- α berbeda nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Pada kelompok Terapi C penurunan ekspresi TNF- α sebesar 14,55% dibandingkan dengan kelompok kontrol positif serta dinyatakan berbeda nyata dengan kelompok kontrol negatif dilanjutkan dengan kelompok Terapi D penurunan ekspresi TNF- α sebesar 34,55% dibandingkan dengan kelompok kontrol positif serta dinyatakan berbeda nyata dengan kelompok kontrol negatif. Kelompok terapi E terlihat memiliki daerah kecoklatan yang menunjukkan ekspresi TNF α paling sedikit dibandingkan kelompok kontrol positif dan kelompok terapi C dan D. Kelompok terapi E merupakan kelompok terapi dengan penurunan ekspresi TNF-

α tertinggi sebesar 68,39%, maka dosis terapi 70mg/ekor merupakan dosis terbaik dalam menurunkan ekspresi TNF- α . Dosis terbaik dengan penurunan ekspresi TNF α tertinggi (kelompok E) masih memiliki hasil berbeda nyata dengan kelompok kontrol negatif (kelompok A) yang ditunjukkan dengan perbedaan notasi (*superscript*) pada nilai rata-rata ekspresi TNF α (Tabel 5.2).

Perbedaan rata – rata ekspresi TNF α pada metode imunohistokimia membuktikan terjadinya penurunan sitokin proinflamasi setelah diberikan omega 3. Penurunan TNF α disebabkan oleh disebabkan adanya aktivitas DHA dan EPA dalam omega 3. DHA berperan dalam proses diferensiasi IgE melalui penghambatan awal pada proses *signalling pathways* dari CD40 dan IL-4. Hal ini dapat terjadi karena sinyal CD40 dan IL-4 dibutuhkan dalam proses diferensiasi IgE. Penghambatan ini terjadi karena penurunan aktivasi STAT6 and NF κ B secara simultan (Koch, 2009), akibatnya IgE pada saluran pernafasan tidak berdeferensiasi sehingga tidak terjadi kompleks IgE-sel mast. Karena kompleks IgE-sel mast dibutuhkan untuk pelepasan mediator inflamasi seperti histamin yang memegang peranan penting dalam kejadian asma, maka dalam keadaan tersebut terjadi penurunan pelepasan mediator inflamasi karena tidak terbentuk kompleks IgE-sel mast. Hal tersebut akan mempengaruhi pelepasan mediator proinflamasi seperti TNF α (Siriwardhana *et al.*, 2012).

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Terapi omega 3 menurunkan kadar MDA bronkus yang diinduksi ovalbumin dan mendapat paparan LPS. Dosis terapi 70 mg/ekor/hari memberikan efek terapi terbaik dalam menurunkan kadar MDA bronkus.
2. Terapi omega 3 menurunkan ekspresi TNF- α pada bronkus tikus yang diinduksi ovalbumin dan mendapat paparan LPS. Dosis terapi 70 mg/ekor/hari adalah dosis terbaik dalam menurunkan ekspresi TNF- α pada bronkus tikus model asma

6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai dosis letal dan efek toksik omega 3.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Aly, R.A. 2012. Evaluated of Malondialdehyde Level and Antioxidant System in Asthma Patients. *Medical Journal of Babylon* 9:84-89
- Amin, M.H.F, A.P.W. Marhendra, dan Aulanni'am. 2009. *Pengaruh Paparan Lipopolisakarida pada Rongga Mulut dan Assisted Drainage Therapy (Adt) terhadap Kadar S-Ige dan Profil Radikal Bebas Pada Tikus Asma*. Hal : 437-443
- Arkhaesi, N. 2008. *Kadar malondialdehyde (MDA) serum sebagai indikator prognosis keluaran pada sepsis neonatorum* [tesis]. Semarang: Program Pascasarjana, Universitas Diponegoro
- Bay, J.D., and LR. Johnson. 2004. *Feline bronchial disease/asthma*. In: King LG (ed). *Textbook of respiratory disease in dogs and cats*. Philadelphia: WB Saunders; 388-396.
- Bayers, C.G., and D. Nishi. 2005. *Feline Bronchial Asthma: Pathophysiology and Diagnosis*. *Compendium Feline Bronchial Asthma*
- Berry, M. A, Hargadon B, Shelley M, Parker D, Shaw DE, Green RH, Bradding P, Brightling CE, Wardlaw AJ, Pavord ID. 2006. Evidence of A Role of Tumor Necrosis Factor Alpha in Refractory Asthma. *N Engl J Med*. 2006 Feb 16;354(7):697-708.
- Bratawijaya, K.G dan R. Iri. 2010. *Imunologi Dasar*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia : Jakarta.
- Busse, W.W. and R.F. Lemanske. 2001. Asthma. *The New England Journal of Med* 344(5) : 350-362.
- Byers, C.G., and N. Dhupa. 2005. *Feline bronchial asthma: pathophysiology and diagnosis*. *Compend Contin Educ Vet*; 27: 418-425.
- Calder, P.C. 2003. Long-chain n-3 fatty acids and inflammation: potential application in surgical and trauma patients. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 36: 433-446
- Calder, P. C. 2009. *Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale*. *Biochimie*. 91, 791–795.
- Cohn, L.A. 2007. How to help the asthmatic cat breathe easy. *Proceedings of the North American Veterinary Conference*. Orlando, Florida. 1267-1269
- Dong, L., H. Li., S. Wang and Y. Li. 2009. Different Dose of Lipopolysaccharides regulate the lung Inflammation of Asthmatic Mice via TLR-4 Pathway in Alveolar Macrophages. *J Asthma*. 2009. Apr;46(3):229-33.



- Elias J.A, C.G. Lee., T. Zheng., B. Ma., R.J. Homer., and Z. Zhu. 2003. New insights into the pathogenesis of asthma. *J Clin Invest* 003;111(3): 291-297.
- Epstein, M.M. 2004. Do Mouse Models of Alergic Asthma Mimic Clinical Disease?. *Int. Arch. Allergy Immunol.*133, 84-100
- Ferraz C.C.R, A. Diogenes., M.A. Henry., and K.M. Hargreaves. 2011. LPS from *Porphyromonas gingivalis* sensitizes capsaicin-sensitive nociceptors. *J Endod*; 37(1): 1 -5.
- Global Asthma Network. 2014. *The Global Asthma Report 2014*. Auckland, New Zealand.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 2006. *Free Radicals in Biology and Medicine, Ed 4*. Clarendon Press. Oxford
- Heriprasetya, D. 2007. Efek Paparan Ovalbumin Aerosol Terhadap Eosinofilia Bronkus pada Mencit Balb/C. *Nexus Medicus, Jurnal Ilmiah Penelitian Medis*. 18(1):8-15.
- Holub, D.J, and B. J. Holub. 2004. *Omega-3 fatty acids from fish oils and cardiovascular disease*. *Molecular and Cellular Biochemistry* 263:217-225.
- Kiara, C. 2013. Alasan Tikus Dipilih sebagai Hewan Percobaan. <http://www.ceritamau.com/cerita/Alasan-Tikus-Dipilih-Sebagai-Hewan-Percobaan> [3 April 2015].
- Koch, C. 2009. *Immunomodulation of The IgE Dependent Immune Response by Docosahexaenoic Acid*. Humboldt-Universität : Berlin.
- Kumar, R.K., C. Harbet and P.S. Foster .2008. *The "classical" ovalbumin challenge model of asthma in mice*. *Curr Drug Targets* 9:485-94.
- Kusriningrum. 2008. *Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.Surabaya
- Kusumawardani, B, P. Pujiastuti , dan D.S Sari. 2010. Uji biokimiawi sistem API 20 A mendeteksi *Porphyromonas gingivalis* isolat klinik dari plak subgingiva pasien periodontitis kronis. *J PDGI*; 59(3): 110-114.
- Mickleorogh, T.D., I.A. Alina., and W. R. Kenneth., 2004. Omega-3 Fatty Acid and Airway Hyporesponsiveness in Asthma. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. Vol 10 6 (1067-1072)
- Muntiha, M. 2001. *Teknik Pembuatan Preparat Histopatologi dari Jaringan Hewan dengan Penggunaan Hematoksin dan Eosin*. Bogor : Balai Besar Penelitian.

- Padrid P. Asthma. In: August JR (ed). 2010. *Consultations in feline internal medicine*. Philadelphia: WB Saunders; 447-458.
- Pernas, G.S. 2010. Feline Asthma. *Veterinary Focus*. Vol 20 No 2
- Sharma, A, S. Bansal, and R.K. Nagpal. 2003. Lipid Peroxidation in Bronchial Asthma. *Indian Journal of Pediatrics* 70(9) : 715717
- Siriwardhana, N., S. Kalupahana, and N. Moussa, 2012. *Health Benefits of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids : Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid*. *Food and Nutrition Research* 65 (13) : 212-219
- Sirois. 2005. *Laboratory Animal Medicine : Principles and Procedures*. Elsevier. United States of America.
- Stephanie, C., Eisenbarth., A. Damani., Piggott., W. James., Huleatt., Irene Visintin ,Christina A. Herrick, and Kim Bottomly. 2002. *Lipopolysaccharide Enhanced, Toll-Like Receptor 4-Dependent T Helper Cell Type 2 Responses To Inhaled Antigen*. Yale University School of Medicine, New Haven, CT 06520
- Tang, M.L. K, J.W. Wilson, and A.G. Stewart. 2006. *Airway remodeling in Asthma: Current Understanding and Implication For future therapies*. *Pharmacology & Therapeutic*, 112: 474488
- Tasi, A. 2010. Another Furball? It Might Be Feline Asthma. <http://feline-nutrition.org>. [2 Juni 2015]
- Utomo, H. 2012. Rapid Relief Mechanism of Allergic Rhinosinosis after "Assisted Drainage" Therapy. *Journal of Dentistry Indonesia*, 19(3): 57-64
- Valko, M., C.J. Rhodes., J. Moncol., M. Izacovic., and M. Mazur. 2006. Free Radical, metal and antioxidant in oxidative stress induced cancer. *J Chem. Biol Interact*;160. p.1-40.
- Wang, P.L. and Ohura, K. 2002 *Porphyromonas gingivalis* Lipopolysaccharide Signaling in Gingival Fibroblasts-CD14 and Toll-Like Receptors. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 13, 132-142.
- Winarsi H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.
- Yoshino T. *Genotypic and phenotypic characterization of Porphyromonas gingivalis in relation to virulence* [tesis]. 2007.Goteborg: Goteborg University, 2007: 13-5.
- Yustika, A.R, Aulanni'am, dan S, Prasetyawan. 2013. Kadar Malondialdehida (MDA) dan Gambaran Histopatologi Ginjal Tikus Putih (*Rattus*

norvrgicus) Pasca Induksi Cylosporine-A. Kimia Student Journal,1(2):222-228

Yustina AR, K. Suardita, D. Agustin. 2012. Peningkatan jumlah osteoklas pada peradangan periapikal akibat induksi lipopolisakarida *Porphyromonas gingivalis*. *JPB* ; 14(3): 140-4.

Zhang S, Q.Q. Wang, C.F. Zhang, and I. Soo. 2010. Identification of dominant pathogens in periapical lesions associated with persistent apical periodontitis. *Chin J Dent Res*; 13(2): 115-20.

Zosky,G.R, A.N. LarcombE, O.J. White, J.T. Burchell, and D.J. Turner. 2007. Ovalbumin sensitised rat are good model for airway hiperresponsiveness. *Clinical and Experimental Allergy*. 38:829-838. *Journal of Immunology* 179:5748-5749

