

**PENGARUH PEMBERIAN PROBIOTIK *LEUCONOSTOC*
MESENTEROIDES TERHADAP EKSPRESI *INTERLEUKIN-10*
PADA BRONKUS TIKUS ASMA KRONIK**

Skripsi

untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai gelar Sarjana Kedokteran



Disusun Oleh:

Putri Hany Lestari

30101800142

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG**

2022

Skripsi

**PENGARUH PEMBERIAN PROBIOTIK *LEUCONOSTOC
MESENTEROIDES* TERHADAP EKSPRESI *INTERLEUKIN-10*
PADA BRONKUS TIKUS ASMA KRONIK**

Diajukan oleh
Putri Hany Lestari
30101800142

Telah disetujui oleh :

Pembimbing I

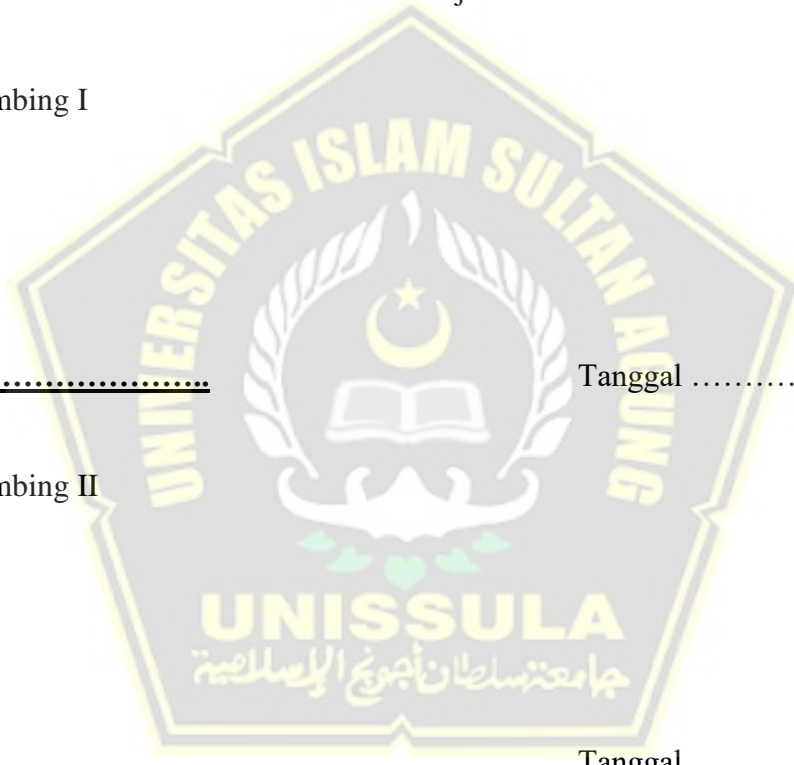
.....

Tanggal

Pembimbing II

.....

Tanggal



SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama : Putri Hany Lestari

NIM : 30101800142

Dengan ini menyatakan bahwa karya ilmiah berjudul:

PENGARUH PROBIOTIK *LEUCONOSTOC MESENEROIDES*

TERHADAP EKSPRESI IL-10 PADA BRONKUS TIKUS ASMA KRONIK

Adalah benar hasil karya saya dan penuh kesadaran bahwa saya tidak melakukan tindakan plagiasi atau mengambil alih seluruh atau sebagian besar karya tulis orang tanpa menyebutkan sumbernya. Jika saya terbukti melakukan tindakan plagiasi, saya bersedia menerima sanksi sesuai dengan peraturan yang berlaku.

Semarang, 19 Agustus 2022

UNISSULA
جامعته سلطان أبجوج الإسلامية (Putri Hany Lestari)

PRAKATA

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, berkat rahmat dan karunia-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pengaruh Pemberian Probiotik *Leuconostoc Mesenteroides* Terhadap Ekspresi IL-4 Pada Bronkus Tikus Asma Kronik”.

Dalam menyelesaikan skripsi ini, penulis banyak mendapat dukungan dan bantuan dari berbagai pihak, baik secara moral maupun materil. Untuk itu, dalam kesempatan ini penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, SH., Sp.KF, selaku dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
2. dr. Pujiati Abbas, Sp.A., selaku dosen pembimbing 1 dan Dr. dr. Susilorini, Sp.PA., M.Si.Med. selaku dosen pembimbing 2 yang telah memberikan ide, banyak meluangkan waktu, tenaga, dan pikirannya untuk membimbing dan mengarahkan penulis untuk menyelesaikan penulisan skripsi ini.
3. Dr. dr. Chodidjah, M.Kes selaku dosen penguji 1 dan Ibu Dina Fatmawati, S.Si., M.Sc selaku dosen penguji 2 yang telah banyak memberikan masukan dan arahan untuk skripsi ini.
4. Seluruh staff kariawan FK Unissula dan staff Rumah Sakit Islam Sultan Agung Semarang yang ikut serta dalam membantu menyelesaikan penulisan skripsi ini.
5. Kedua orang tua penulis, Bapak Latip dan Ibu Musriyah serta keluarga besar Syifa Alesya Lestari yang selalu memberikan kasih sayang, doa, nasihat,

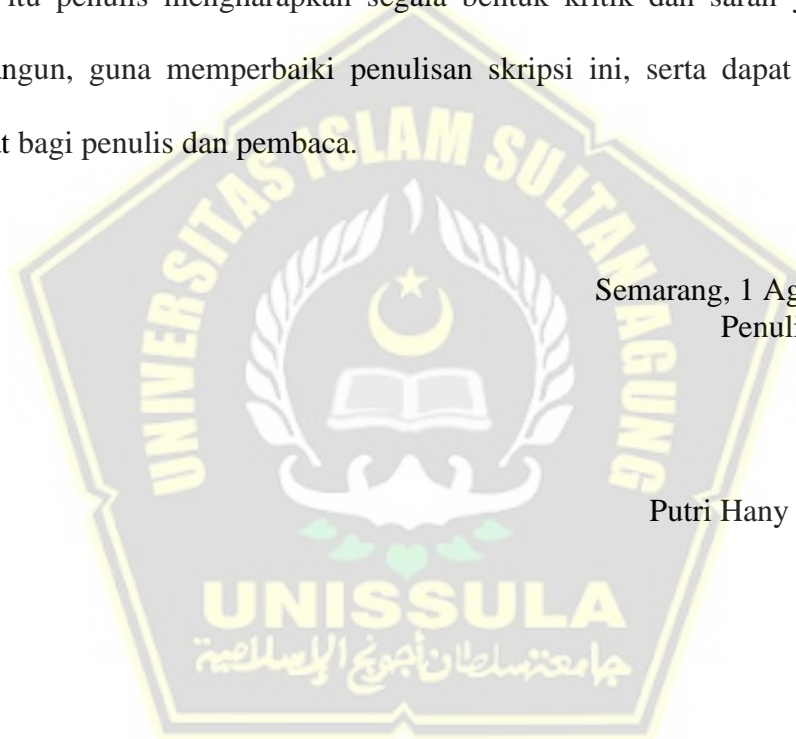
harapan, serta kesabaran yang luar biasa dalam setiap langkah penulis, yang merupakan anugrah terbesar yang menyertai langkah penulis.

6. Adik penulis, Syifa Alesya Lestari yang telah memberikan doa dan dukungan untuk kelancaran penulisan skripsi ini.
7. Teman seperjuangan skripsi Elma Nafiana Yahya, Ummi khamidah dan Irkham raffi zaen yang telah berjuang dan banyak mensupport saya.

Dalam penulisan skripsi ini masih banyak kesalahan dan kekurangan, karena itu penulis mengharapkan segala bentuk kritik dan saran yang bersifat membangun, guna memperbaiki penulisan skripsi ini, serta dapat memberikan manfaat bagi penulis dan pembaca.

Semarang, 1 Agustus 2022
Penulis

Putri Hany Lestari



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
SURAT PERNYATAAN.....	iii
PRAKATA.....	iv
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR SINGKATAN	viii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
INTISARI.....	xii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang Masalah.....	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.3.1. Tujuan Umum	4
1.3.2. Tujuan Khusus	4
1.4. Manfaat Penelitian	5
1.4.1. Manfaat Teoritis	5
1.4.2. Manfaat Praktis	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1. Asma	6
2.2. Interleukin-10.....	7
2.2.1. Karakteristik.....	7
2.2.2. Mekanisme IL-10 pada Asma	9
2.2.3. Peran IL-10 pada <i>Gut Lung Axis</i>	10
2.2.4. Fungsi IL-10.....	11
2.3. Probiotik <i>Leucosnotoc Mesenteroides</i>	12
2.4. <i>Dysbiosis</i> Asma.....	14
2.5. <i>Gut-Lung Axis</i>	18
2.6. Tikus <i>Sprague Dawley</i>	21

2.7.	Tikus Model Asma Kronik	22
2.8.	Mekanisme Kerja Probiotik <i>Leuconostoc mesenteroides</i> pada Asma ..	24
2.9.	Kerangka Teori.....	26
2.10.	Kerangka Konsep	27
2.11.	Hipotesis.....	27
BAB III METODE PENELITIAN.....		28
3.1.	Jenis dan Rancangan Penelitian	28
3.2.	Variabel dan Definisi Operasional	28
3.2.1.	Variabel	28
3.2.2.	Definisi Operasional.....	29
3.3.	Subjek Penelitian.....	30
3.3.1.	Kriteria Subjek Penelitian	30
3.3.2.	Besar Sampel.....	31
3.4.	Instrumen dan Bahan Penelitian.....	32
3.4.1.	Instrumen Penelitian.....	32
3.4.2.	Bahan Penelitian.....	32
3.5.	Cara Penelitian	33
3.5.1.	Perlakuan Hewan Coba.....	33
3.5.2.	Pembuatan Preparat Histopalogi Bronkus	35
3.5.3.	Cara Membaca <i>Slide</i>	37
3.6.	Tempat dan Waktu	38
3.7.	Analisis Hasil	38
3.8.	Alur Penelitian	39
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN		40
4.1.	Hasil Penelitian	40
4.2.	Pembahasan.....	43
BAB V SIMPULAN DAN SARAN		48
5.1.	Simpulan	48
5.2.	Saran.....	48
DAFTAR PUSTAKA		50
LAMPIRAN.....		56

DAFTAR SINGKATAN

AHR	: <i>airway hyperresponsiveness</i>
APC	: <i>antigen presenting cells</i>
BAL	: bakteri asam laktat
CO ₂	: karbon dioksida
CD	: <i>cluster differentiation</i>
EDTA	: <i>Ethylene diamine tetra-acetic acid</i>
IFN- γ	: interferon-gamma
IgE	: immunoglobulin E
IHC	: imunohistokimia
IL	: interleukin
NK	: <i>natural killer</i>
NF- κ B	: <i>nuclear factor kappa-beta</i>
OVA	: ovalbumin
PAPDI	: Persatuan Dokter Paru Indonesia
PgE	: <i>prostaglandin E</i>
PAU	: Pusat Studi Pangan dan Gizi (PAU)
Th	: T helper
Treg	: T regulator
TLR2	: <i>toll like receptor 2</i>
UGM	: Universitas Gadjah Mada
WHO	: <i>World Health Organization</i>

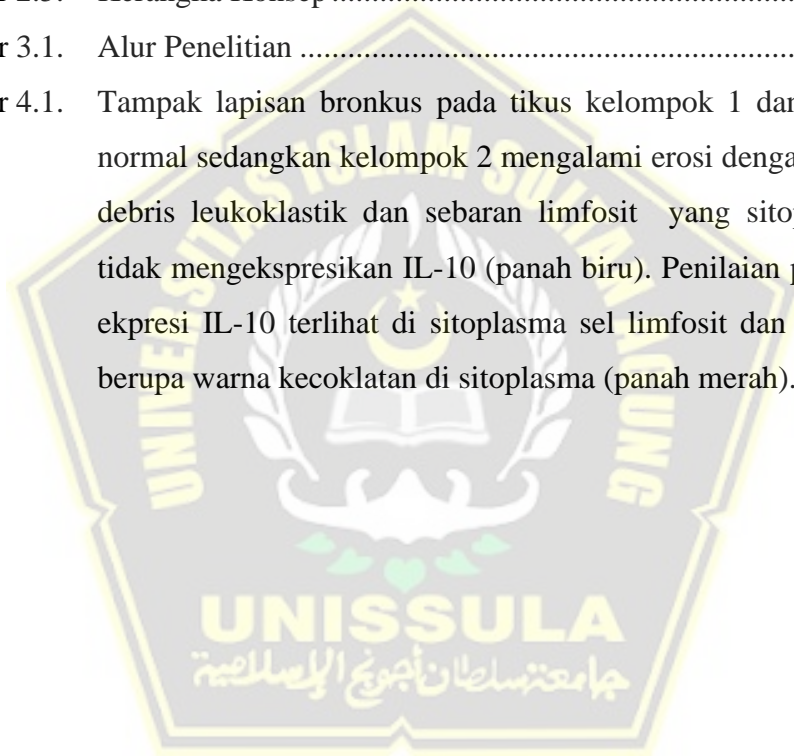
DAFTAR TABEL

Tabel 4.1.	Hasil Perhitungan Hotspot Score Ekspresi IL-10 pada Bronkus	42
Tabel 4.2.	Hasil Nilai Rerata Proporsi Ekspresi IL-10 pada Bronkus (%)	42
Tabel 4.3.	Hasil analisis normalitas, homogenitas, dan <i>Kruskal Wallis</i> ekspresi IL-10 Bronkus	43



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Skema Asimilasi Nutrisi Makanan oleh Mikrobioma Usus dan Pengaruhnya terhadap Organ Distal.....	16
Gambar 2.2.	<i>Crosstalks</i> antar <i>kingdom</i> mikrobiota dan kompartemen pada sumbu aksis paru (Enaud <i>et al.</i> , 2020)	20
Gambar 2.3.	Skema Protokol Sensitisasi dan Challenging Induksi Asma pada Tikus.....	24
Gambar 2.4.	Kerangka Teori.....	26
Gambar 2.5.	Kerangka Konsep	27
Gambar 3.1.	Alur Penelitian	39
Gambar 4.1.	Tampak lapisan bronkus pada tikus kelompok 1 dan 3 , masih normal sedangkan kelompok 2 mengalami erosi dengan sisa-sisa debris leukoklastik dan sebaran limfosit yang sitoplasmanya tidak mengekspresikan IL-10 (panah biru). Penilaian positif bila ekspresi IL-10 terlihat di sitoplasma sel limfosit dan makrofag, berupa warna kecoklatan di sitoplasma (panah merah).	41



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Hasil Analisa Statik.....	56
Lampiran 2.	<i>Ethical Clearance</i>	60
Lampiran 3.	Surat Keterangan Selesai Penelitian.....	61
Lampiran 4.	Surat Bebas Pinjam Laboratorium	62
Lampiran 5.	Undangan Seminar Hasil Penelitian.....	63



INTISARI

Asma kronik membutuhkan pengobatan jangka panjang dan jenis obat yang diberikan kadang dalam bentuk kombinasi sehingga poten menimbulkan efek samping. Alternatif pengobatan asma kronik menjadi diperlukan diantaranya menggunakan probiotik *Leuconostoc mesenteroides* dengan kandungan eksopolisakarida (EPS) yang dapat bermanfaat antiinflamasi. *Marker* inflamasi misalnya interleukin-10 (IL-10) yang bersumber dari sel T helper 2 (Th2), salah satu jalur mekanisme inflamasi yang mendasari asma. Tujuan penelitian mengetahui pengaruh pemberian *Leuconostoc mesenteroides* pada ekspresi IL-10 pada bronkus tikus asma kronik.

Penelitian eksperimental dengan *posttest only control group design*. Subjek penelitian 18 tikus Sprague Dawley betina dibagi tiga kelompok: K-I, tikus normal; K1-II, tikus asma kronik; K-III, tikus asma kronik dengan pemberian *Leuconostoc mesenteroides*. Pembuatan asma kronik dilakukan melalui induksi 10µg ovalbumin (OVA) dicampur dengan 1 mg aluminium hidroksida (Al(OH)₃) dalam NaCl 0,9% diberikan secara intraperitoneal (i.p) sebanyak 2 kali (hari 1 dan hari 14) dilanjutkan dengan paparan OVA 1% dalam NaCl 0,9% secara inhalasi menggunakan aerosol selama 30 menit setiap 3x/minggu selama 6 minggu. Pemberian *Leuconostoc mesenteroides* dilakukan segera pasca inhalasi OVA. Ekspresi IL-10 diperiksa dari jaringan bronkus yang distaining dengan imunohistokimia dan dinilai menggunakan metode *hotspot score*, berikutnya dianalisis dengan uji Kruskal Wallis.

Rerata ekspresi IL-10 kelompok K-I: 11,8%, sedangkan pada K-II dan K-III masing-masing sebesar 0,3% dan 7,1%. Uji Kruskal Wallis didapatkan nilai $p=0,106$ artinya tidak terdapat perbedaan ekspresi IL-10 pada bronkus tikus antar kelompok.

Kesimpulan menunjukkan pemberian *Leuconostoc mesenteroides* tidak berpengaruh pada ekspresi IL-10 pada bronkus tikus asma kronik.

Kata kunci: Asma kronik, *Leuconostoc mesenteroides*

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Asma merupakan gangguan inflamasi kronik pada saluran napas yang pada proses terjadinya melibatkan berbagai sel inflamasi seperti leukotrin, eosinofil, sel mast dan lain-lain (Infodatin, 2015). Asma kronik dapat menyebabkan bronkospasme sehingga menyebabkan susah nafas dan kebutuhan kunjungan ke unit gawat darurat ataupun rawat inap jika serangannya menjadi parah (Baratwidjaja & Rengganis, 2013). Asma kronik membutuhkan pengobatan jangka panjang dan jenis obat yang diberikan kadang dalam bentuk kombinasi sehingga poten dapat menimbulkan efek samping (Lutfiyati *et al.*, 2015). Alternatif pengobatan asma kronik menjadi diperlukan diantaranya menggunakan probiotik, yaitu mikrobiota hidup yang bila diberikan dalam jumlah memadai dapat memberikan manfaat kesehatan bagi *host* atau inang (Lestari & Helmyati, 2018). Salah satu jenis probiotik yaitu *Leuconostoc mesenteroides* yaitu bakteri asam laktat (BAL) yang memiliki eksopolisakarida (EPS) yang dapat bermanfaat antiinflamasi. Salah satu marker inflamasi yaitu interleukin-10 (IL-10) yang sumber utamanya adalah sel T helper 2 (Th2) (Saraiva *et al.*, 2020). Th2 menjadi salah satu jalur mekanisme inflamasi yang mendasari terjadinya asma (Sinyor & Perez, 2021). Inflamasi menjadi target penatalaksanaan asma, sementara pemanfaatan *Leuconostoc mesenteroides* pada pasien asma yang

dapat diamati dari kadar IL-10 masih terbatas sehingga penelitian ini penting dilakukan.

Insiden (kasus baru) dan prevalensi (kasus yang sudah ada) asma meningkat dengan cepat. Menurut *World Health Organization* (WHO) ada sekitar 262 juta penduduk dunia pada tahun 2019 yang terkena asma dan 461 ribu diantaranya meninggal (WHO, 2021). Angka kematian akibat asma tersebut lebih tinggi jika dibandingkan dengan angka kematian pada tahun 2015 yaitu sebanyak 383 ribu jiwa (Deswindra *et al.*, 2018). Peningkatan prevalensi terjadi akibat perubahan gaya hidup dan peningkatan polusi udara. Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) tahun 2013 melaporkan prevalensi asma di Indonesia adalah 4,5% dari populasi, dengan jumlah kumulatif kasus asma sekitar 11.179.032. Asma berpengaruh pada disabilitas dan kematian dini terutama pada anak usia 10-14 tahun dan orang tua usia 75-79 tahun. Diluar usia tersebut kematian dini berkurang, namun lebih banyak memberikan efek disabilitas. Asma menurut Persatuan Dokter Paru Indonesia (PDPI) termasuk dalam 14 besar penyakit yang menyebabkan disabilitas di seluruh dunia (PDPI, 2018). Pengobatan asma dengan probiotik *Leuconostoc mesenteroides* perlu dikembangkan dan penelitian ini termasuk dalam penelitian besar tentang manfaat probiotik tersebut pada pengobatan asma.

Mekanisme inflamasi yang mendasari terjadinya asma terjadi melalui jalur imunologis yang biasanya didominasi oleh immunoglobulin E (IgE) dan aktivasi sel T *helper* (Th) dan jalur saraf autonom. Alergen yang

dikenali oleh *antigen presenting cells* (APC) diperkenalkan kepada sel Th yang berikutnya akan mensekresi interleukin (IL) atau sitokin dan memicu sel plasma membentuk immunoglobulin seperti IgE, serta sel-sel inflamasi lain seperti mastosit, makrofag, sel epitel, eosinofil, neutrofil, trombosit serta limfosit untuk mengeluarkan mediator-mediator inflamasi (Sinyor & Perez, 2021). Dasar penatalaksanaan asma yaitu melalui penghambatan inflamasi, dan terkait dengan hal tersebut peran antiinflamasi beberapa jenis probiotik pada model asma telah dilakukan. Pemberian probiotik berpengaruh pada kadar IgE dan IL-4 pada penderita asma anak (Pujiati, 2016). Pada beberapa penelitian sebelumnya probiotik *Lactobacillus rhamnosus* dapat digunakan dalam pengobatan asma (Segers & Lebeer, 2014), karena dapat mencegah reaksi inflamasi dengan cara menurunkan kadar sel T helper (Th), menekan sekresi sitokin terutama interferon- γ (IFN- γ) (Sagar *et al.*, 2014), meningkatkan kadar sel T regulator (Treg) yang dapat mencegah produksi dari sitokin dan sel Th (Thomas *et al.*, 2011). Mikrobiota probiotik lainnya yang poten untuk pengobatan asma yaitu *Leuconostoc mesenteroides* yang menghambat produksi sitokin (IL-4 dan IL-13) serta eosinofil pada model asma yang diinduksi ovalbumin dan sekresi mukus pada alergi serta inflamasi, juga disebut sebagai makanan sehat bagi pencegahan dan penatalaksanaan asma bronkial (Hyeong-gyu *et al.*, 2011). Penggunaan kombinasi *Leuconostoc mesenteroides* dengan *Lactobacillus brevis* pada penelitian terdahulu dapat meningkatkan ekspresi IL-10 pada ileum tikus model asma secara bermakna (Pujiati *et al.*, 2021).

Penelitian mengenai probiotik sejauh ini masih belum banyak dilakukan, khususnya yang membahas *Leuconostoc mesenteroides* secara tunggal terhadap ekspresi kadar IL-10 pada bronkus tikus model asma kronik, oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut guna mengetahui pengaruh pemberian probiotik *Leuconostoc mesenteroides* terhadap kadar IL-10 pada bronkus tikus model asma kronik.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian pada latar belakang di atas maka dapat di dirumuskan suatu permasalahan sebagai berikut: “Bagaimana pemberian probiotik *Leuconostoc mesenteroides* terhadap ekspresi IL-10 pada bronkus tikus asma kronik?”.

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh pemberian probiotik *Leuconostoc mesenteroides* terhadap ekspresi IL-10 pada bronkus tikus (*Sprague Dawley*) asma kronik

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Mengetahui ekspresi IL-10 pada bronkus tikus *Sprague Dawley* normal.
2. Mengetahui ekspresi IL-10 pada bronkus tikus *Sprague Dawley* asma kronik.

3. Mengetahui ekspresi IL-10 pada bronkus tikus *Sprague Dawley* asma kronik yang diberi probiotik *Leuconostoc mesenteroides*.
4. Mengetahui perbandingan ekspresi IL-10 pada bronkus antar tikus *Sprague Dawley* normal, asma kronik, dan asma kronik yang diberi probiotik *Leuconostoc mesenteroides*.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Diperoleh hasil ilmiah tentang potensi probiotik *Leuconostoc mesenteroides* pada pengobatan asma kronik.

1. Sebagai pengetahuan mengenai terapi penyakit asma.
2. Sebagai tambahan ilmu mengenai *Leuconostoc mesenteroides*.
3. Sebagai acuan dalam penelitian yang akan datang mengenai terapi penyakit asma.

1.4.2. Manfaat Praktis

1. Bagi klinis

Memberikan informasi mengenai kemungkinan penggunaan probiotik *Leuconostoc mesentroides* pada manajemen asma kronik.

2. Bagi masyarakat

Membantu penderita asma mencegah dan mengurangi kekambuhan penyakit asma menggunakan probiotik yang mengandung *Leuconostoc mesentroides*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Asma

Asma adalah penyakit inflamasi kronik saluran napas yang mengakibatkan reaktifitas berlebihan bronkus oleh beragam stimulasi seperti kesulitan bernapas akibat penyempitan saluran napas/bronkokonstriksi, penebalan dinding saluran napas serta peningkatan produksi mukus akibat perubahan aliran udara ekspirasi Asma dicirikan dengan gejala episodik berulang meliputi mengi, sesak napas, napas pendek, serta batuk yang dapat berubah-ubah dalam hal kejadian, frekuensi maupun intensitasnya yang umumnya muncul dan sering menjadi parah/berat di malam hari atau jelang pagi hari (Askar, 2020).

Hal-hal yang terkait dengan asma seperti serangan, kejadian, keparahan dan mortalitas akibat asma dipengaruhi oleh berbagai faktor, meliputi (Askar, 2020):

1. Faktor *host*, yang meliputi jenis kelamin, ras, hiperresponsif seluruh nafas serta status gizi.
2. Faktor lingkungan, yang meliputi: alergen dalam rumah (tungau debu, hewan peliharaan, kecoak, jamur), alergen luar rumah (serbuk sari, jamur), paparan pekerjaan (karyawan pabrik, kru angkutan), asap rokok, polutan udara, infeksi saluran napas baik yang disebabkan oleh virus, bakteri ataupun parasit, serta status sosial ekonomi rendah, dan juga obat-obatan.

2.2. Interleukin-10

2.2.1. Karakteristik

Interleukin-10 (IL-10) adalah sitokin antiinflamasi yang berperan penting membatasi respon imun host terhadap patogen, sehingga mencegah kerusakan host dan mempertahankan homeostasis jaringan normal (Iyer & Cheng, 2012). Konsekuensi dari aktivitas pembatasan respon imun host terhadap patogen oleh IL-10 dapat berkontribusi pada infeksi kronis (Howes *et al.*, 2014). Disregulasi IL-10 juga dikaitkan dengan peningkatan imunopatologi sebagai respons terhadap infeksi serta peningkatan risiko pengembangan berbagai penyakit autoimun (Iyer & Cheng, 2012).

Interleukin-10 terutama dihasilkan oleh sel Th2, juga berasal dari CD4⁺ dan CD8⁺ sel T, *lineage myeloid* dan limfoid, makrofag, sel dendritik, neutrofil, sel mast, eosinofil, sel B, dan sel-sel epitel (Saraiva *et al.*, 2020). IL-10 memiliki peran ganda pada respon imun yaitu supresif dan promotif. Peran supresif ditunjukkan oleh rantai asam amino IL-10 yang homolog dengan FcεRI, sehingga menyebabkan IL-10 menekan ekspresi dan/atau fungsi berbagai sitokin inflamasi seperti IFN-γ, TNF, IL-1, dan IL-6 pada monosit dan sel T. Peran supresif ditunjukkan peningkatan respon imun melalui peningkatan produksi imunoglobulin oleh sel B, sitotoksitas terhadap sel *natural killer* (NK) dan CD8⁺ sel T serta proliferasi timosit (Nagata & Nishiyama, 2021).

Sitokin IL-10 menurut fungsinya dibedakan atas tiga subkelompok yaitu sitokin yang hanya mengandung IL-10 yang mentarget respon imun bawaan dan adaptif dan berfungsi immunosupresif untuk mereduksi kerusakan jaringan akibat respon inflamasi berlebih dan tidak terkontrol terutama pada tahap resolusi infeksi dan inflamasi serta memelihara homeostasis mikroba usus. Kelompok kedua terdiri atas subfamili sitokin IL-20 meliputi IL-19, 20, 22, 24 dan 26 yang berperan utama pada jaringan sel epitel dan sel stroma untuk mempromosikan mekanisme pertahanan bawaan yang mengontrol seluler patogen ekstraselular serta melindungi integritas barrier dan hemostasis jaringan dengan cara meningkatkan proliferasi, remodeling, dan perbaikan berbagai jaringan dan organ. Kelompok berikutnya yaitu sitokin subfamili IL-28 terdiri atas IL-28A dan B serta IL-29 atau yang juga dikenal sebagai IFN- γ 2, IFN- γ 13 and IFN- γ 1. IL-10 juga dikenal sebagai *cytokine synthesis inhibitor factor* (CSIF) karena menggambarkan kegiatan pemurnian aktivasi CD4+ sel Th 2 (Ouyang & O'Garra, 2019).

IL-10 dibedakan menurut kesamaan struktur, reseptor yang biasa digunakan, dan pensinyalan *downstream* (Ouyang & O'Garra, 2019). Semua famili sitokin IL-10 terdiri atas 6 α -heliks (A-F) dan lengkung penghubung dengan 4 heliks domain globuler yang terikat pada reseptor sitokin tipe 2 (Rofii *et al.*, 2010).

2.2.2. Mekanisme IL-10 pada Asma

IL-10 berperan pada pengendalian inflamasi alergi saluran napas. Kadar IL-10 cairan lavage bronkoalveolar pada penderita asma dan sekresi IL-10 oleh makrofag alveolar adalah rendah dan menjadi determinan dari keparahan asma, sehingga peningkatan IL-10 pada asma alergi menunjukkan keberhasilan strategi terapi. IL-10 dapat bertindak langsung pada sel T regulator dan sel T helper tipe 17 (Th17). IL-10 memberikan efek langsung pada sel Th2, meregulasi survival sel Th2 dan tingkat keparahan inflamasi saluran napas alergi yang dimediasi oleh Th2 (Coomes *et al.*, 2017).

Respon antiinflamasi IL-10, produksi defektif atau aksi IL-10 berhubungan dengan perkembangan gangguan inflamasi seperti pada penyakit asma kronik. IL-10 yang dihasilkan oleh makrofag interstitial pada asma alergi menghambat inflamasi paru dengan cara meregulasi infiltrasi neutrofil dan produksi sel goblet mukosa melalui penghambatan sitokin Th2 dan Th17. IL-10 yang dihasilkan oleh makrofag menghambat neutrofilik asma sedangkan IL-10 yang berasal dari sel FoxP3⁺ T_{reg} menghambat eosinofilik asma (Kawano *et al.*, 2016). Sitokin Th2 berperan pada inflamasi saluran pernapasan eosinofilik dan respon bronkial berlebihan yang merupakan karakteristik dari asma. Produksi sitokin Th17 meningkat secara spontan pada pasien asma, sedangkan peningkatan produksi

IL-10 pada asma dapat terjadi karena dipicu oleh alergen yang bertindak sebagai mitogen (Sudha *et al.*, 2013).

IL-10 pada asma selain berperan menghambat sel Th2 dan survival eosinofil, juga berperan menghambat aktivasi makrofag/monosit, mengaktifasi sel B, meningkatkan pertumbuhan sel mast, dan menghambat hipereaktifitas bronkus (Surjanto & Purnomo, 2009).

2.2.3. Peran IL-10 pada *Gut Lung Axis*

IL-10 dalam sistem imunitas berfungsi membatasi respon inflamasi untuk menjaga homeostasis mikroba komensal serta mengontrol proses inflamasi terutama pada proses alergi, IL-10 juga dapat menghambat maturasi sel dendritik, eosinophil dan sintesis IgE yang diinduksi oleh IL-4 yang berperan pada manifestasi asma seperti hiperventilasi jalan napas, inflamasi jalan napas, hipersekreksi mucus, fibrosis dan remodeling jalan napas (Ogawa *et al.*, 2008).

Sitokin-sitokin inflamasi pada saluran napas saat serangan asma, dapat juga mengenai pada saluran cerna melalui *Gut-Lung Axis*, dimana terjadi *leaky-gut* sehingga mediator-mediator inflamasi bisa melewati mukosa usus dan melalui pembuluh limfe maupun pembuluh darah dapat sampai ke saluran napas begitupun sebaliknya. Oleh karena itu peningkatan IL-10 yang dapat ditemukan dalam saluran udara asma, juga ditemukan pada mukosa usus dari

individu dengan riwayat asma alergi (Grissell *et al.*, 2005). IL-10 juga teresepresi berlebihan pada mukosa duodenum pada pasien asma terutama pada penderita asma atopik (Lamblin *et al.*, 2001).

2.2.4. Fungsi IL-10

Interleukin 10 (IL-10) memiliki fungsi sebagai promotor yaitu sitokin dengan sifat anti-inflamasi kuat yang berperan utama dalam membatasi respon imun host terhadap patogen, sehingga mencegah kerusakan host dan mempertahankan homeostasis jaringan normal. Sedangkan sebagai supresor ditunjukkan dari disregulasi IL-10 yang dikaitkan dengan peningkatan imunopatologi sebagai respons terhadap infeksi serta peningkatan risiko perkembangan banyak penyakit autoimun. Pada model asma yang diinduksi oleh OVA terjadi defisiensi fenotipe IL-10 yang berdampak pada penurunan imunopatologi. IL-10 mampu menghambat inflamasi saluran napas akibat induksi alergen dan respon non spesifik. Peningkatan kadar IL-10 dapat menghambat respon host terhadap patogenesis mikroba dan mencegah resolusi kerusakan jaringan terkait dan gangguan hemodinamik. Sebaliknya, defisiensi IL-10 dapat menyebabkan perkembangan penyakit autoimun dan peningkatan tumorigenitas (Iyer & Cheng, 2012).

2.3. Probiotik *Leucosnotoc Mesenteroides*

Istilah probiotik berasal dari bahasa Yunani *pro-bios* yang artinya untuk kehidupan. Definisi probiotik dari waktu ke waktu mengalami perkembangan, antara lain didefinisikan sebagai berikut (Lestari & Helmyati, 2018):

- a. Mikrobiota yang digunakan sebagai faktor pendukung pertumbuhan.
- b. Organisme yang membantu aktivitas mikroflora saluran cerna.
- c. Makanan tambahan yang mengandung mikroorganisme hidup yang memiliki pengaruh manfaat membantu memperbaiki keseimbangan mikrobiota normal dalam saluran cerna.
- d. Mikrobiota yang dikultur secara tunggal atau dikombinasikan dengan mikrobiota hidup lainnya dan diberikan kepada manusia atau binatang untuk memperbaiki sifat-sifat mikroflora pada *host*.
- e. Sel mikrobia yang terdapat dalam saluran pencernaan dan memberikan efek kesehatan bagi penggunaannya.
- f. Produk yang mengandung mikrobiota hidup yang dapat mengubah komposisi mikroflora dengan cara membentuk koloni pada kompartemen *host* dan berefek menyetatkan *host*.

Definisi probiotik yang sering digunakan adalah definisi probiotik menurut Organisasi Kesehatan Dunia yaitu mikrobiota hidup yang bila diberikan dalam jumlah memadai dapat memberikan manfaat kesehatan bagi *host* atau inang (Lestari & Helmyati, 2018). *Leuconostoc mesenteroides* adalah probiotik/bakteri asam laktat (BAL) heterofermentatif

yang telah diisolasi dari berbagai sumber. Beberapa strainnya mampu menghasilkan bakteriosin, dan sebagian besar termasuk dalam kelas IIa dan menunjukkan aktivitas anti-*Listeria* (de Paula *et al.*, 2015). *Leuconostoc mesenteroides* merupakan kokkus gram positif, katalase negatif yang biasanya tersusun secara berpasangan atau berantai dan sering ditemukan pada tanaman, susu, serta makanan (Arias & Murray, 2015). Bentuk sel *Leuconostoc mesenteroides* bulat dan tidak motil serta bersifat anaerob fakultatif. *Leuconostoc mesenteroides* tidak membentuk spora, kemoorganotrof dengan suhu optimum pertumbuhan antara 20 – 30°C (Kusmiati & Malik, 2002).

Leuconostoc mesenteroides selain ditemukan pada tumbuhan juga telah terdapat pada susu. *Leuconostoc mesenteroides* dapat berkembang dalam kondisi ekstrim (suhu rendah dan tinggi). Pertumbuhan *Leuconostoc mesenteroides* dalam susu tergolong buruk, terutama bila aktivitas proteolitiknya terbatas sehingga membutuhkan metabolit peptida dari mikroorganisme lain untuk bisa berkembang. *Leuconostoc mesenteroides* dapat menghasilkan metabolit seperti asetaldehida, asetat, dan laktat, yang menentukan sifat produk susu fermentasi. Sifat-sifat tersebut menjadikan *Leuconostoc mesenteroides* sebagai BAL nonstarter lanjut (Issa & Tahergorabi, 2019). *Leuconostoc mesenteroides* memecah glukosa dan menghasilkan sekitar 50% asam laktat, dan 50% lainnya berupa etanol, asam asetat, asetaldehid, diasetil, dan CO₂ (Fauzi *et al.*, 2012)

Taksonomi dari *Leuconostoc mesenteroides* ditunjukkan sebagai berikut:

Kingdom : *Bacteria*
Subkingdom : *Posibacteria*
Phylum : *Firmicutes*
Class : *Bacili*
Order : *Lactobacilales*
Family : *Leuconostocaceae*
Genus : *Leuconostoc*
Species : *Leuconostoc mesenteroides*

2.4. *Dysbiosis* Asma

Perkembangan asma dipengaruhi oleh faktor lingkungan dan faktor eksogen yang bersinergi dengan predisposisi genetik serta bentuk mikrobioma paru terutama selama kelahiran dan di awal kehidupan. Kondisi paru normal mengandung mikrobiota yang meliputi filus *Actenobacteria*, *Bacteriodetes*, serta *Firmicutes*. Akan tetapi *proteinobacteria* yang melimpah yang berasal dari *Haemophilus* dan *Moraxella* dapat mengakibatkan infeksi virus pernapasan serta asma. Ketidakseimbangan mikrobiota (*disbiosis*) tersebut dapat menstimuli aktivasi jalur inflamasi dan berkontribusi terhadap bronkokonstriksi serta hiperresponsif bronkus. Komposisi mikrobiota juga dipengaruhi oleh faktor eksogen. *Disbiosis* mikrobiota usus memiliki pengaruh kuat terhadap patogenesis asma. *Disbiosis* dan penurunan keanekaragaman mikrobiota

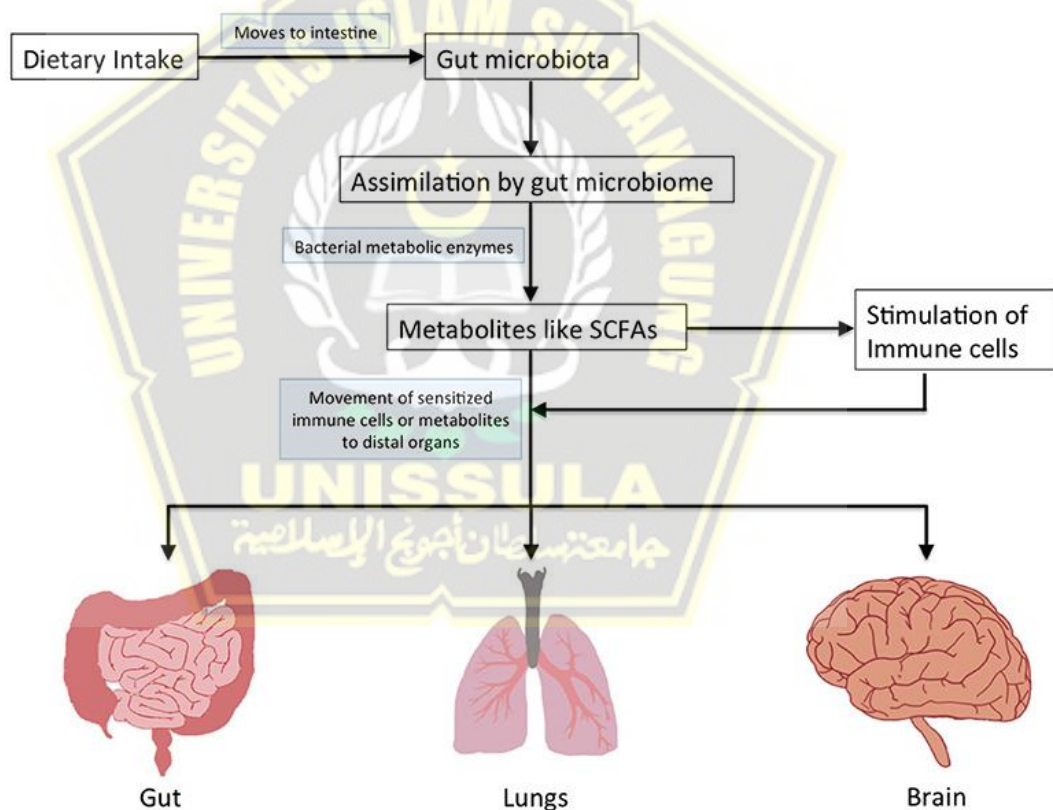
menyebabkan adanya disregulasi *crossstalk* dua arah yang melintasi sumbu usus-paru, menyebabkan suatu hipersensitivitas dan hiperreaktivitas terhadap alergen pernapasan dan makanan (Hufnagl *et al.*, 2020).

Kolonisasi mikroorganisme pada paru-paru manusia terkait erat dengan fungsi anatomi dan fisiologisnya. Mikroorganisme pernapasan memasuki rongga mulut kemudian sampai di paru-paru atau melalui suspensi udara serta partikel mikro yang terhirup. Saluran udara bagian atas dilapisi dengan epitel silindris pernapasan yang ditutupi oleh selaput lendir. Fluktuasi konstan cairan lendir dan aliran udara menentukan keseimbangan antara imigrasi dan eliminasi mikroba. Eliminasi mikroorganisme didukung oleh gerakan mikro mukosiliar dan batuk, yang semuanya dipengaruhi oleh status imun pejamu. Transisi dari saluran pernapasan atas ke bawah serta perubahan gradien tekanan dan suhu dapat mendukung pertumbuhan beberapa komunitas bakteri dengan menciptakan zona anaerobik. Unit paru terkecil, alveolus di ujung cabang bronkial, terdiri dari pneumosit tipe I, lapisan sel epitel skuamosa tipis, dan pneumosit tipe II yang menghasilkan surfaktan paru. Surfaktan tersebut terdiri atas fosfolipid (90%) dan protein seperti protein surfaktan A sampai D, dengan peran bawaan utama membersihkan bakteri dan virus (Hufnagl *et al.*, 2020).

Komunitas mikrobiota usus (*gut microbiota*) memengaruhi fungsi metabolisme serta respon imun tubuh. Diet memainkan peran penting dalam menentukan komposisi mikrobiota usus. Mikrobiota usus membantu dalam mengasimilasi nutrisi makanan yang tidak dapat dicerna. Metabolit yang

dihasilkan oleh mikrobiota tidak hanya memodulasi kekebalan gastro-intestinal, tetapi juga berdampak pada organ distal seperti paru-paru dan otak. Beberapa probiotik dapat berefek menguntungkan pada kesehatan paru-paru (Anand & Mande, 2018).

Komunitas mikrobiota usus memiliki sistem enzimatik untuk menstimulasi berbagai nutrisi diet sehingga menyebabkan pelepasan metabolit yang berperan fungsional pada host. Peran mikrobiota usus dan metabolitnya pada fungsi berbagai organ tubuh dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1. Skema Asimilasi Nutrisi Makanan oleh Mikrobioma Usus dan Pengaruhnya terhadap Organ Distal
Sumber: (Anand & Mande, 2018).

Asam lemak rantai pendek yang dihasilkan oleh mikrobiota usus berperan penting dalam menjaga integritas epitel dan homeostasis mukosa termasuk menstimulasi peralihan IgA dan sel dendritik untuk menghasilkan kadar sitokin anti-inflamasi seperti IL-10 yang lebih tinggi. Dalam sistem kekebalan bawaan, mikrobiota usus memodifikasi fungsi sel penyaji antigen (APC) dari saluran gastrointestinal menjadi berbeda dari APC lain dalam tubuh. Sel dendritik (DC) dari patch Peyer menghasilkan kadar IL-10 yang lebih tinggi daripada DC limpa karena dimediasi oleh bakteri baik yang menginduksi produksi IL-10 dan mencegah sekresi sitokin pro-inflamasi melalui metabolit yang disekresikannya (Salameh *et al.*, 2020).

Disbiosis mikrobiota usus berhubungan dengan gangguan paru dan infeksi pernapasan, penurunan genus *Bifidobacteria* dan peningkatan *Clostridia* pada usus berhubungan dengan asma di awal kehidupan (Anand & Mande, 2018). Mekanisme seluler sederhana pada asma dan kaitannya dengan mikrobiota terjadi melalui sel-sel Th2 pemicu inflamasi mengikat sel-sel Th2, sel-sel limfoid bawaan tipe 2, sel-sel helper T folikel, sel B tipe 2, eosinofil, dan sel mast sehingga meningkatkan kadar IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, prostaglandin D2 serta CCR8 dalam sputum, BAL, serum juga biopsi bronkial. Sedangkan asma non tipe 2 dicirikan dengan infiltrasi sel Th 1 dan Th17, neutrofil, dan keberadaan interferon tipe I, *inflammasome* NLRP3, serta sitokin IL-1 β dan IL-17 (Barcik *et al.*, 2020).

Asma dicirikan sebagai spektrum fenotipe yang teramati secara klinis serta endotipe atau rentang mekanisme molekuler dan imunologi yang

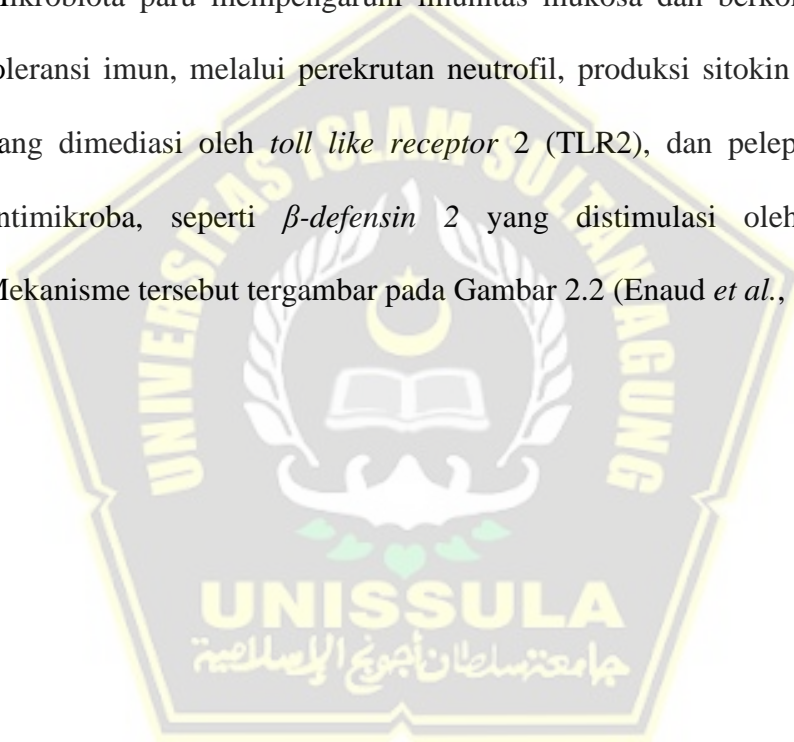
mendasari. Tipe endotipe didasarkan pada mekanisme patofisiologi, sedangkan tipe fenotipe mengacu pada gambaran klinis dan morfologi penyakit. Tipe endotipe atau asma endotipe tipe 2 didasarkan terutama pada respon sel Th2. Asma endotipe tipe 2 biasanya teramati secara klinis sebagai asma alergi onset dini, asma eosinofilik onset lambat, atau asma akibat latihan. Asma non-tipe 2 memiliki mekanisme yang biasanya teramati pada neutrofilik, terkait obesitas, dan fenotipe pausigranulositik (Anand & Mande, 2018).

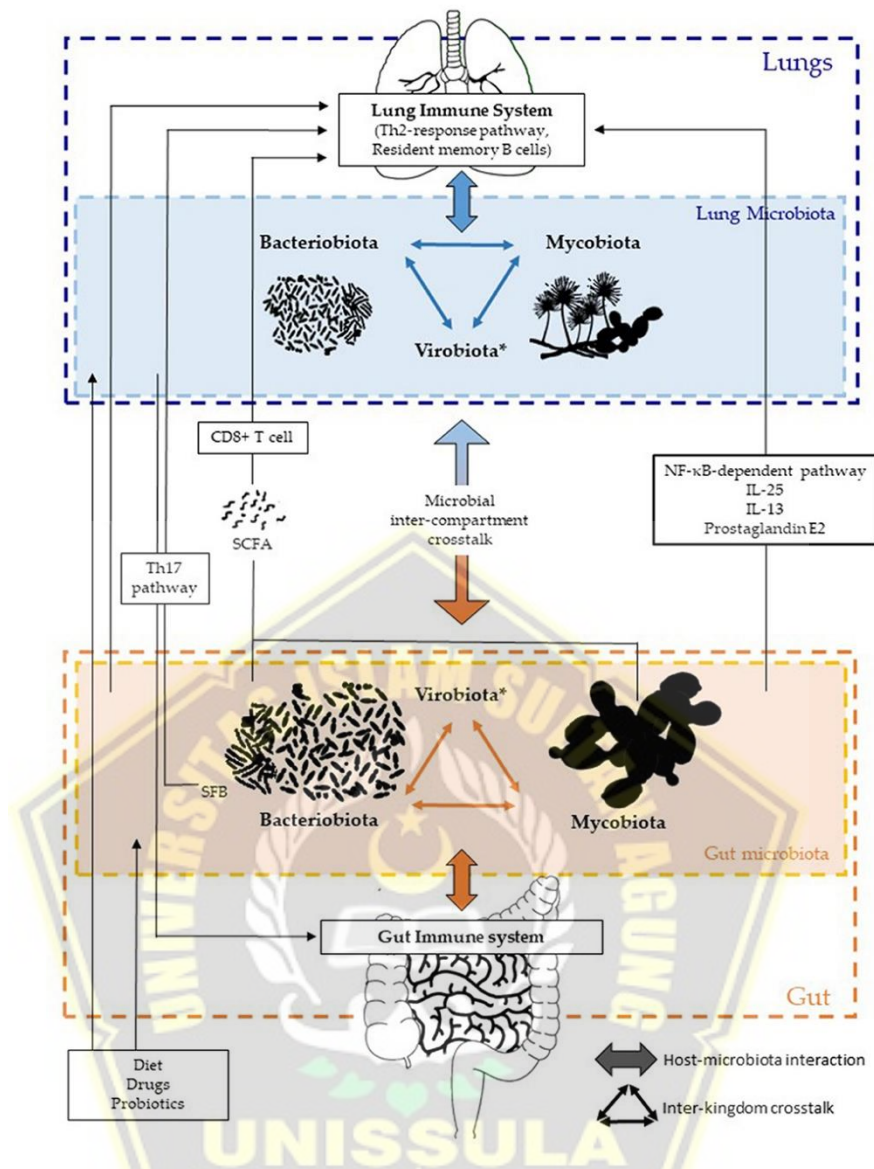
Asupan makanan atau diet dapat memodifikasi inflamasi sistemik. Diet tinggi lemak dan manis atau aneka makanan olahan dapat mempromosikan lingkungan pro-inflamasi karena rendah antioksidan sehingga meningkatkan kerentanan terhadap stres oksidatif, dan kandungan asam lemak jenuh berlimpah yang dapat menyebabkan aktivasi imun bawaan, melalui aktivasi reseptor seperti *toll like receptor 4* (TLR4), yang merangsang kaskade inflamasi NF-kB. Diet sayur dan buah berlaku sebaliknya yaitu menciptakan lingkungan antiinflamasi, karena adanya nutrisi anti-inflamasi seperti asam lemak tak jenuh misalnya, MUFA, omega-3 PUFA dan antioksidan (Guilleminault *et al.*, 2017).

2.5. *Gut-Lung Axis*

Gut-lung axis atau sumbu paru-usus adalah suatu konsep yang memperlihatkan keberadaan sistem komunikasi yang kompleks antara paru-paru dan usus, yaitu komunikasi *bidirectional* atau dua arah (*crosstalks*) antara sistem pernapasan dan sistem saraf pada saluran cerna disertai

dengan adanya interaksi mikroba dan sistem imun. Interaksi mikrobiota ditunjukkan oleh interaksi erat antara bakteribiota, mikrobiota dan virobiota dengan organ baik melalui mekanisme langsung maupun tidak langsung. Interaksi tersebut saling berkesinambungan. Mikrobiota usus mempengaruhi sistem imun usus dan sistem imun paru melalui interaksi lokal atau interaksi jangka panjang yang melibatkan sel T CD8+, T helper 17 (Th17), IL-25, IL-13, *prostaglandin E* (PGE) dan/atau jalur yang berkaitan dengan NF-kB. Mikrobiota paru mempengaruhi imunitas mukosa dan berkontribusi pada toleransi imun, melalui perekrutan neutrofil, produksi sitokin proinflamasi yang dimediasi oleh *toll like receptor 2* (TLR2), dan pelepasan peptida antimikroba, seperti β -*defensin 2* yang distimulasi oleh sel Th17. Mekanisme tersebut tergambar pada Gambar 2.2 (Enaud *et al.*, 2020).





Gambar 2.2. *Crosstalks* antar kingdom mikrobiota dan kompartemen pada sumbu aksis paru (Enaud *et al.*, 2020)

Mikrobiota usus memiliki pengaruh pada fungsi imun terhadap tubuh, termasuk paru-paru. *Gut-lung axis* memiliki konsep bahwa perubahan mikroorganisme pada usus dapat berpengaruh terhadap fungsi imun tubuh. Mikroorganisme dikenali oleh sistem imun pejamu dan dapat mengubah respon imun sistemik atau memproduksi metabolit bioaktif yang diserap ke dalam aliran darah dan memiliki efek farmakologi pada sistem organ,

sehingga komposisi mikroba pada usus juga dapat mempengaruhi fungsi imun paru-paru (Dumas *et al.*, 2018). Mikrobiota usus melakukan komunikasi dengan imunitas saluran napas melalui pensinyalan TLR (Nurliyani, 2021). Pada saat individu terkena infeksi hingga mengakibatkan disbiosis usus, mikrobiota usus akan menghasilkan *inflammasome* yang akan menstimuli migrasi sel-sel dendritik antiinflamasi dari paru-paru dan menginisiasi aktivasi sel T yang akan menghambat perkembangan biakan virus/bakteri penginfeksi. Proses inflamasi yang terjadi tersebut jika tidak terkendali dapat mengakibatkan kondisi patologi pada usus juga perubahan fisiologis paru. Kesehatan usus yang tidak terjaga selain dapat menyebabkan disbiosis usus juga berpotensi berakibat pada translokasi atau ekstensi bakteri dari usus ke paru (Siregar, 2021).

2.6. Tikus *Sprague Dawley*

Tikus *Sprague Dawley* merupakan generasi dari tikus albino yang digunakan secara luas dalam penelitian medis. Tikus ini jinak dan mudah dalam penanganannya. Rata-rata berat badan tikus betina dewasa adalah 250-300 gram sedangkan untuk jantan 450-520 gram. Rentang hidup tikus ini biasanya sekitar 2,5-3,5 tahun. Ciri khas dari tikus ini yaitu memiliki rasio panjang ekor dan tubuh yang lebih tinggi daripada tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar (Gileta *et al.*, 2018).

Tikus *Sprague Dawley* dapat digunakan untuk model asma, hanya saja identifikasi asma dari ekspresi kadar eosinofil lebih rendah daripada di tikus *Brown norwegian* (Pujiati *et al.*, 2021). Selain dari kadar eosinofil,

identifikasi asma pada model asma juga dapat dilihat dari hiperresponsivitas saluran napas, kadar IgE, dan sekresi mukus bronkial (Yu & Chen, 2018).

2.7. Tikus Model Asma Kronik

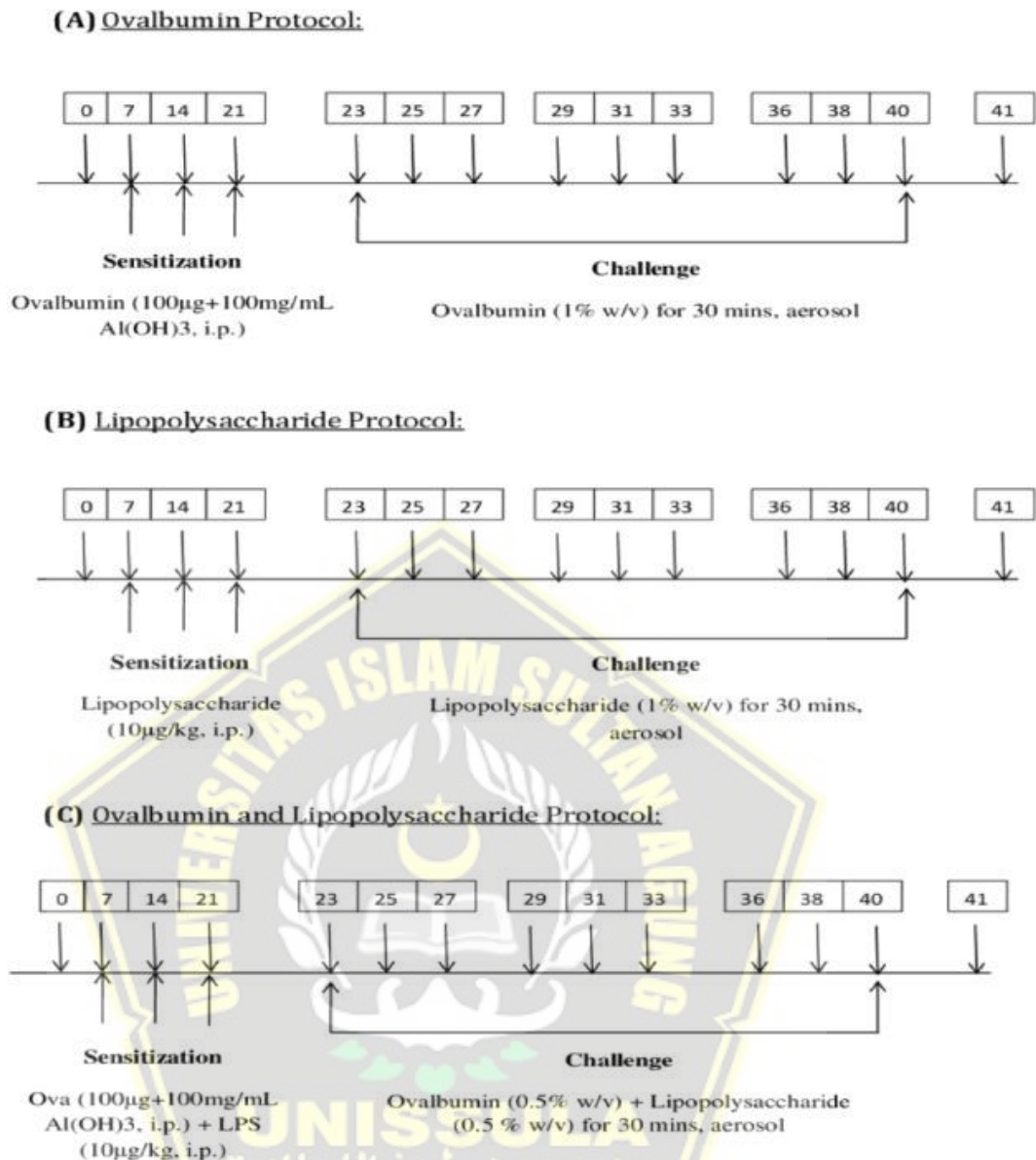
Hewan yang paling sering digunakan dalam model asma adalah mencit dan tikus, karena mereka memiliki gambaran asma alergi pada manusia. Akan tetapi gejala utama asma seperti *airway hyperresponsiveness* (AHR) dan inflamasi dapat lebih mudah diperoleh pada tikus daripada di mencit. Tikus juga lebih mudah ditangani dan lebih besar dari mencit. Jenis tikus model asma yang digunakan yaitu tikus Wistar, Sprague Dawley, Fisher dan Lewis. Dua jenis tikus pertama merupakan yang paling sering digunakan. Ovalbumin (OVA) adalah alergen yang paling umum digunakan untuk sensitisasi alergi (Pérez *et al.*, 2020).

Protokol sensitisasi dan tantangan antigen pada mencit dilakukan dengan cara melakukan sensitisasi 25 µg OVA secara injeksi subkutan dilarutkan dalam 2 mg alumunium hidroksida (Al(OH)₃) dalam 200 µL *phosphate-buffered saline* (PBS). Injeksi subkutan dilakukan pada hari ke-0, 7, 14, dan 21 diikuti dengan inhalasi OVA (20/50 µL OVA dalam PBS) yang dilakukan pada hari ke-33 dan 35. Inhalasi OVA diulang dua hari per minggu selama 3 bulan (Choi *et al.*, 2018).

Model asma pada tikus juga mengembangkan anti-OVA IgE antibodi dilakukan dengan cara sensitisasi OVA diberikan secara intraperitoneal (i.p.) pada hari pertama dalam larutan 500 µL yang mengandung 20 mg tawas dengan atau tanpa 50 µg *B. pertussis* toxin (Bpt). Pada hari ke-7

kembali diinjeksikan secara i.p. injeksi 500 L suspensi yang mengandung 50 g OVA dalam tawas 20 mg. Pada hari ke-27, darah diambil dari vena safena untuk menguji produksi IgE spesifik dan karena semua tikus mensintesis IgE anti-OVA, pada hari ke-29 diberikan 300 μ L OVA secara intranasal (i.n) (tetes demi setetes dalam dua muatan pipet otomatis 200 μ L pada hewan yang diimobilisasi) juga 5 atau 50 mg/mL OVA (Pérez *et al.*, 2020).

Model asma kronik juga dapat dilakukan dengan lipopolisakarida (LPS) atau kombinasi antara OVA dan LPS. Sensitisasi OVA (100 μ g/kg, dilarutkan dalam 100 mg/mL Al(OH)₃ secara i.p), LPS yang digunakan sebanyak 10 μ g/kg secara i.p, dan kombinasi OVA dengan LPS (100 μ g/kg dan 10 μ g/kg i.p) dilakukan pada hari ke-7, 14 dan 21 dan dilanjutkan dengan pemberian challenge berupa OVA (1% w/v yang dilarutkan dalam 100 mg/mL AlOH), LPS (1% w/v dalam saline), serta OVA dan LPS (masing-masing 0,5% w/v yang dilarutkan dalam 100 mg/mL Al(OH)₃ dan saline) selama 30 menit dalam tiga kali per minggu selama tiga minggu. Pada penggunaan kombinasi OVA-LPS diberikan jeda waktu 10 menit untuk sensitisasi antara OVA dan LPS. Perlakuan *challenge* dilakukan dengan menempatkan tikus dalam kandang plastik berdiameter 70 cm dan tinggi 40 cm dilekatkan pada nebulizer. Tingkat *nebulizer* untuk pengiriman aerosol disarankan 0,22 mL/menit. Protokol sensitisasi dan *challenge* ditunjukkan pada Gambar 2.3 berikut (Thakur *et al.*, 2019):



Gambar 2.3. Skema Protokol Sensitisasi dan Challenging Induksi Asma pada Tikus

Sumber: (Thakur *et al.*, 2019).

2.8. Mekanisme Kerja Probiotik *Leuconostoc mesenteroides* pada Asma

Probiotik memodulasi respons imun inflamasi bawaan dan adaptif, sering digunakan sebagai suplemen makanan untuk memberikan manfaat kesehatan pada gangguan gastrointestinal. Probiotik dapat berfungsi sebagai imunomodulator dan aktivator jalur pertahanan inang. Selain itu, probiotik

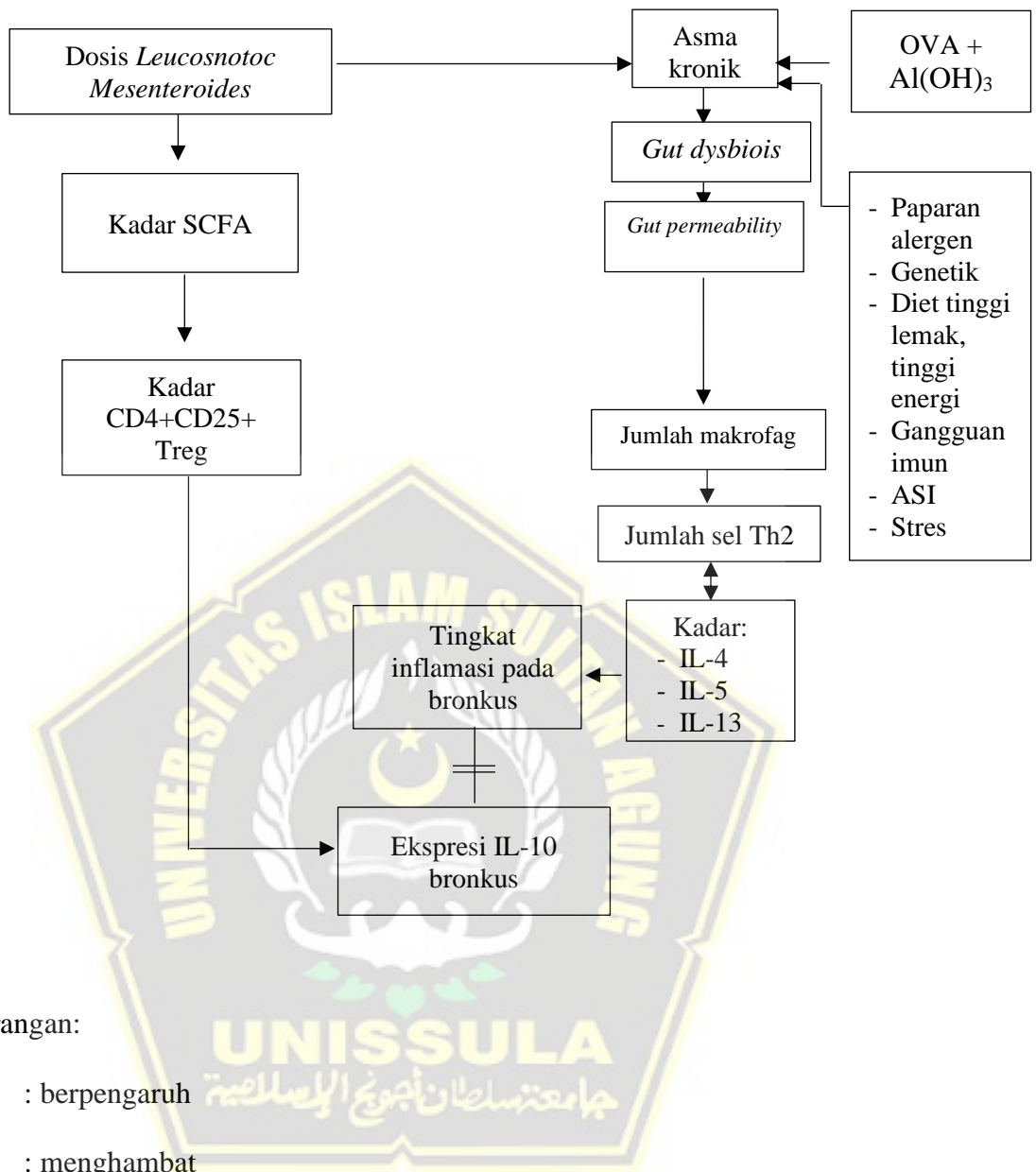
oral dapat memodulasi respon imun pada sistem pernapasan (Huang *et al.*, 2022).

Probiotik *Leuconostoc mesenteroides* dapat menghambat perkembangan dan gejala asma serta kejadian alergi melalui asam laktat yang dihasilkan. Bakteri asam laktat dapat meringankan inflamasi saluran napas akibat alergi melalui modulasi keseimbangan sel Th1 dan Th2 (IL-4, IL-5, IL-13), serta meningkatkan sel Treg (Ai *et al.*, 2016). Peningkatan sel Treg terjadi akibat stimulasi sel-sel dendritik oleh BAL sehingga Treg berdiferensiasi menjadi CD4⁺ Foxp3⁺ Treg dan memproduksi IL-10 (Eslami *et al.*, 2020). Penghambatan Th2 terjadi induksi IL-10 (Niers *et al.*, 2005).

Bakteri asam laktat juga dapat menghambat infiltrasi inflamasi, hiperplasia sel goblet, *remodelling* saluran napas, dan kadar sitokin-sitokin proinflamasi serta kemokin pada cairan lavage bronkoalveolar, menghambat produksi IgE, total kolagen dan aktivitas MMP-9 (Jin *et al.*, 2020). Selain BAL, probiotik juga mengandung biosurfaktan seperti glikolipid, kompleks lipid-polisakarida, fosfolipid, asam mikoleat, lipoprotein, atau lipopeptida. Surfaktan tersebut juga meningkatkan produksi IL-10 (Jenab *et al.*, 2020).

Probiotik memproduksi asam lemak rantai pendek (SCFA) yang berikutnya bekerja pada sel T melalui *G-protein-coupled receptor* (GPR43) dan melindungi tikus dari inflamasi usus dengan memperluas sel Treg kolon. SCFA juga mempromosikan generasi sel Treg usus dari sel T CD4⁺ naif melalui mekanisme epigenetik intrinsik sel T (Mennini *et al.*, 2017).

2.9. Kerangka Teori



Keterangan:
 → : berpengaruh
 == : menghambat
 ↔ : jalur umum

Gambar 2.4. Kerangka Teori

2.10. Kerangka Konsep



Gambar 2.5. Kerangka Konsep

2.11. Hipotesis

Terdapat pengaruh pemberian probiotik *Leuconostoc mesenteroides* terhadap ekspresi IL-10 pada bronkus tikus (*Sprague Dawley*) asma kronik.



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian eksperimental terhadap tikus Sprague Dawley sebagai hewan coba, dengan rancangan *posttest only control group design*, yaitu penelitian dengan pemberian intervensi yang sebenarnya dimana pengambilan/pengukuran data dilakukan di akhir intervensi.

Penelitian ini diujicobakan pada 18 ekor tikus yang dibagi secara acak dalam tiga kelompok dan tiap-tiap kelompok terdiri dari enam ekor tikus, yaitu:

K 0 : (X₀) → O₀

K 1 : (X₁) → O₁

K 2 : (X₂) → O₂

Keterangan :

K0 : Kelompok tikus tanpa perlakuan (Kelompok kontrol)

K1 : Kelompok tikus yang diberi perlakuan I

K2 : Kelompok tikus yang diberi perlakuan II

X₀ : Tanpa perlakuan

X₁ : Perlakuan dengan ovalbumin (tikus *Sprague Dawley* model asma)

X₂ : Perlakuan Tikus *Sprague Dawley* model asma + *Leuconostoc mesenteroides*

O₀ : Pengamatan hasil kelompok kontrol

O₁ : Pengamatan hasil pada kelompok asma

O₂ : Pengamatan hasil pada kelompok asma + *Leuconostoc mesenteroides*

3.2. Variabel dan Definisi Operasional

3.2.1. Variabel

3.2.1.1. Variabel Bebas

Probiotik *Leuconostoc mesenteroides*

3.2.1.2. Variabel Terikat

Ekspresi IL-10 pada bronkus tikus model asma kronik

3.2.2. Definisi Operasional

3.2.2.1. Probiotik *Leuconostoc mesenteroides*

Probiotik *Leuconostoc mesenteroides* adalah bakteri gram positif, katalase negatif, dengan morfologi seperti kokus yang diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi Pusat Studi Pangan dan Gizi (PAU) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Dosis pemberian ke tikus sebesar 2×10^8 cfu/ml secara peroral. Pemberian probiotik *Leuconostoc mesenteroides* dilakukan satu kali setiap hari segera setelah proses paparan OVA secara inhalasi (Pujiati *et al.*, 2021).

Skala: nominal

3.2.2.2. Ekspresi IL-10 pada bronkus tikus model asma kronik

Ekspresi IL-10 pada bronkus tikus model asma kronik adalah jumlah IL-10 yang terekspresi pada sitoplasma mukosa jaringan bronkus tikus yang dicat dengan IL-10 antibody (Bioss) yang dibaca menggunakan Mikroskop cahaya (OLYMPUS CX21) pada pembesaran 400x yang dihubungkan dengan kamera *imaging optilab viewer*, dan dihitung metode *hotspot score* pada sel yang terwarnai coklat.

Skala: rasio

3.2.2.3. Ovalbumin

Ovalbumin adalah fosfoglukoprotein monomer dengan berat molekul 43 – 45 Kd yang dibuat dari putih telur ayam untuk membuat model asma kronik pada hewan coba. Ovalbumin yang digunakan pada penelitian ini adalah Sigma Ovalbumin (A5503-1G) sebanyak 10 μ g dicampur dengan 1 mg aluminium hidroksida ($Al(OH)_3$) yang dilarutkan dalam NaCl 0,9% dan diberikan secara intraperitoneal (i.p) sebanyak dua kali yaitu pada hari ke-1 dan ke-14, dilanjutkan dengan inhalasi 1% OVA dalam normal salin (NaCl 0,9%) menggunakan *nebulizer* dari hari ke-21 sampai ke-63 selama 30 menit setiap 3 kali/minggu.

Skala: nominal

3.3. Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah tikus *Sprague Dawley* yang diperoleh dari Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi (PAU) Universitas Gadjah Mada (UGM) Yogyakarta.

3.3.1. Kriteria Subjek Penelitian

Subjek penelitian yang akan digunakan untuk penelitian ini harus memenuhi kriteria berikut:

3.3.1.1. Kriteria Inklusi

- a. Jenis kelamin betina, karena memiliki respon lebih baik terhadap alergen daripada tikus jantan (Blacquièrè *et al.*, 2010)
- b. Umur 6 – 8 minggu
- c. Berat badan ± 300 gram
- d. Dalam kondisi sehat (mata bersinar, bulu tidak kusam, nafsu makan baik)

3.3.1.2. Kriteria Eksklusi

- a. Tikus dengan cacat fisik
- b. Tikus sakit/mati saat penelitian
- c. Tikus yang sudah pernah digunakan untuk penelitian

3.3.2. Besar Sampel

Besar sampel dalam penelitian ini sebanyak 18 ekor tikus yang dibagi menjadi 3 kelompok tikus yaitu 1 kelompok kontrol dan 2 kelompok perlakuan dengan ovalbumin tanpa pemberian probiotik dan perlakuan ovalbumin dengan pemberian probiotik. Sampel tiap kelompok diambil secara random dengan masing-masing kelompok sebanyak 6 ekor tikus. Jumlah sampel hewan coba menurut WHO pada penelitian eksperimental yaitu minimal jumlah sample pada tiap kelompok adalah 5 ekor tikus.

3.4. Instrumen dan Bahan Penelitian

3.4.1. Instrumen Penelitian

3.4.1.1. Alat compressor *nebulizer* merk “*CompMisk*” (model 40-105-000, USA).

3.4.1.2. Alat suntik merk Terumo, kemasan steril untuk sekali pakai, ukuran 1 ml dengan panjang jarum ½ inci dan kaliber 27 G yang digunakan untuk injeksi intraperitoneal dan sonde tikus.

3.4.1.3. Alat bedah hewan (*scalpel*, pinset, gunting)

3.4.1.4. Alat pembuatan preparat bronkus

3.4.1.5. Mikroskop cahaya *OLYMPUS CX21*

3.4.2. Bahan Penelitian

3.4.2.1. Tikus *Sprague Dawley*

3.4.2.2. Ovalbumin, menggunakan Sigma Ovalbumin (A5503-1G)

3.4.2.3. Alumunium Hidroksida, menggunakan Sigma Alumunium hidroksida (A5503-250ML)

3.4.2.4. Ketamin 100 mg

3.4.2.5. NaCl 0,9%

3.4.2.6. Bahan pembuatan preparat bronkhus

3.4.2.7. Alkohol absolut, 95%, 80%, 70%, 50%.

3.4.2.8. Xylol

3.4.2.9. Parafin

3.4.2.10. Aquadest

3.4.2.11. PBS pH 7,2 - 7,4

3.4.2.12. Metanol H₂O₂ 3%

3.4.2.13. Substrat enzim peroksidase : DAB

3.4.2.14. Streptavidin

3.4.2.15. Bloking serum

3.4.2.16. Pengecatan imunohistokimia (IHC)

3.4.2.17. Buffer Formalin 10%

3.4.2.18. IL-10 anti-body merk "Bioss"

3.5. Cara Penelitian

3.5.1. Perlakuan Hewan Coba

1. Tikus dipelihara dalam kandang pada ruangan ber-AC dengan suhu antara 25-28 °C oleh tenaga yang sudah berpengalaman dan mendapat diet berupa makanan standar dan minuman berupa air RO (*reverse osmosis*) *ad libitum*.
2. Tikus diadaptasikan terlebih dahulu selama satu minggu di laboratorium. Tiap kelompok tikus ditempatkan dalam satu kandang. Sehari sesudah adaptasi selesai, tikus dibagi dalam tiga kelompok secara random yaitu:
 - a. Kelompok kontrol (K-I) tanpa perlakuan
 - b. Kelompok perlakuan I (K-II) dipapar OVA
 - c. Kelompok perlakuan II (K-III) dipapar OVA dan diberi probiotik *Leuconostoc mesenteroides* peroral segera setelah paparan inhalasi OVA

3. Pengacakan dilakukan dengan memberikan nomor pada tiap-tiap tikus, kemudian membuat nomor undian sesuai dengan jumlah tikus dari nomor 1 hingga 18, enam nomor yang keluar pertama dimasukkan dalam kelompok K-I, diikuti enam nomor berikutnya sebagai K-II dan enam nomor sisanya sebagai K-III.
4. Berat badan tikus ditimbang terlebih dahulu untuk memastikan kisaran berat badan di 300 gram dan untuk memastikan ketepatan dosis pemberian OVA dan $Al(OH)_3$.
5. Sensitisasi asma kronik dengan larutan OVA dilakukan secara intraperitoneal (i.p) sebanyak dua kali yaitu pada hari ke-1 dan diulang lagi dengan cara yang sama pada hari ke-14, dilanjutkan dengan pemaparan OVA secara aerosol (secara inhalasi menggunakan *nebulizer*) pada hari ke-21, hari berikutnya sampai hari ke-63 tikus disensitasi inhalasi 1% OVA dalam normal salin (NaCl 0,9%), aerosol selama 30 menit setiap 3 kali/minggu selama 6 minggu. Sensitisasi dengan OVA ini dilakukan pada K-II dan K-III.
6. Induksi OVA dinyatakan berhasil jika tikus mengalami hiperresponsif saluran napas, peningkatan sekresi bronkial mukus, peningkatan kadar IgE atau eosinofil (Yu & Chen, 2018).
7. *Leuconostoc mesenteroides* diberikan peroral segera setelah proses paparan OVA secara inhalasi pada K-III.

8. Pada hari ke-64 tikus diterminasi dengan injeksi intraperitoneal ketamine 200 $\mu\text{g/g}$ (Locke *et al.*, 2007).

3.5.2. Pembuatan Preparat Histopatologi Bronkus

Pembuatan preparat histopatologis bronkus dilakukan sebagai berikut:

1. Jaringan bronkus diambil dan difiksasi/direndam dalam larutan formalin buffer selama ± 3 jam.
2. Proses dehidrasi dilakukan dengan cara merendam jaringan bronkus dalam alkohol 70% selama satu malam, dilanjutkan dengan merendam dalam alkohol 80% sebanyak 3x masing-masing selama 30 menit, direndam lagi dalam alkohol 90% sebanyak 3x masing-masing 30 menit dan alkohol 96% sebanyak 2x masing-masing selama 15 menit.
3. Proses *clearing* dilakukan dengan cara merendam bronkus dalam xylol selama 15 menit.
4. Proses *embedding* dilakukan dengan cara merendam bronkus dalam campuran xylol parafin selama satu malam pada suhu kamar, dalam parafin cair sebanyak 4x masing-masing selama 15 menit. Tahap akhir embedding adalah pembuatan jaringan bronkus dalam bentuk blok, yaitu dengan memasukkan jaringan bronkus dalam parafin cair dan dibiarkan sampai parafin membeku sehingga terbentuk blok yang keras dan mudah untuk diiris dengan mikrotom.

5. Blok parafin dipotong setebal 4-5 mikron dan meletakkannya *pada slides poly-L-lysine* selanjutnya dinkubasi pada suhu 37⁰C selama 1 malam (agar lebih merekat pada slides).
6. Proses deparafinisasi dilakukan dengan cara merendam blok parafin dalam xylol I, II, III, dan IV masing-masing selama 5 menit, dilanjutkan dengan merendam blok dalam alkohol absolut, dan alkohol 95%, 70% masing-masing selama 5 menit dilanjutkan dengan mencuci blok dengan aquadest selama 5 menit.
7. Endogenous peroksidase metanol H₂O₂ 3% diteteskan selama 20 menit pada blok, dilanjutkan dengan pembilasan pada air mengalir selama 5 menit, membilas lagi dengan dengan aquadest selama 5 menit, dan dengan PBS selama 2 x 5 menit.
8. Melakukan retrieval antigen pada oven microwave dengan Tris EDTA pH 9 pada suhu tinggi sampai mendidih kemudian dilanjutkan pada suhu rendah hingga menit ke-10.
9. Pembilasan dengan PBS selama 2 x 5 menit setelah dingin, dilanjutkan dengan meneteskan bloking serum selama 10 menit, meniriskan dan meneteskan antibodi serta menginkubasi pada suhu 40°C selama 18 jam.
10. Membilas ulang dengan PBS selama 2 x 5 menit, menetesi dengan biotin selama 15 menit, membilas lagi dengan PBS selama 2 x 5 menit dan meneteskan streptavidin selama 10 menit.

11. Pembilasan ulang dengan PBS selama 2 x 5 menit, ditambahkan substrat enzim peroksidase DAB selama 3-5 menit, dibilas lagi dengan air mengalir selama 10 menit, ditetesi imunohistokimia selama 4 menit, kembali dibilas dengan air mengalir selama 10 menit.
12. Mounting dan penutupan dengan deckglass dilanjutkan dengan pembacaan slide menggunakan mikroskop cahaya.

3.5.3. Cara Membaca Slide

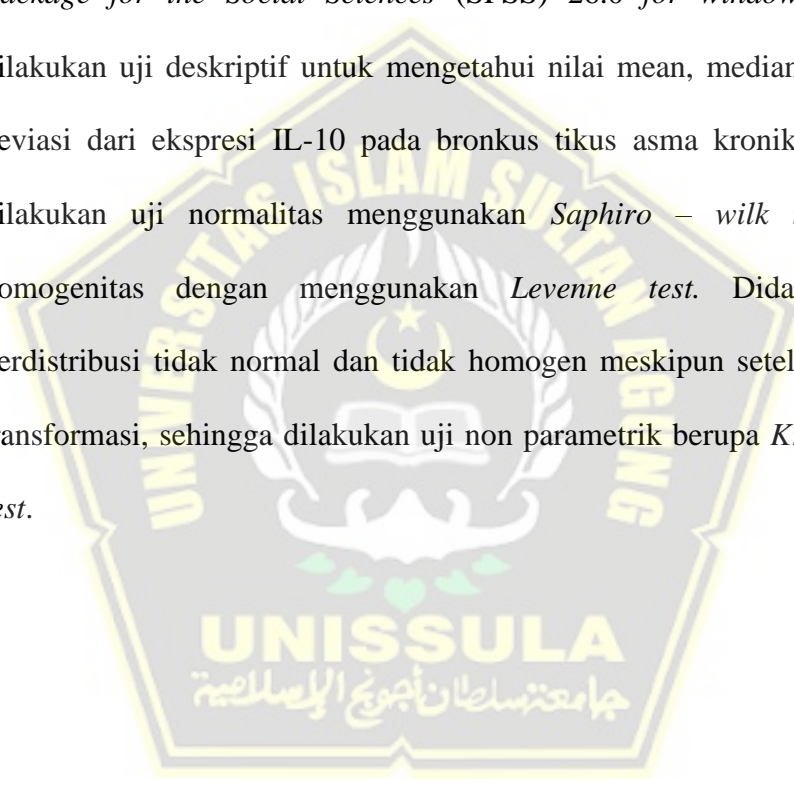
Seluruh bagian preparat dilihat dengan mikroskop cahaya menggunakan pembesaran 100x (lensa *objective* 10x, lensa *ocular* 10x) untuk menentukan letak bronkus yang akan dibaca. Ekspresi IL-10 dihitung dengan metode hotspot yaitu didasarkan pada jumlah warna coklat yang dihasilkan dari pewarnaan IL-10. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop cahaya *OLYMPUS CX21* pada pembesaran 400x (lensa *objective* 40x, lensa *ocular* 10x) dibagi menjadi 5 lapang pandang. Ekspresi IL-10 dihitung pada masing-masing lapang pandang dan dihitung rata-ratanya. Pembacaan dilakukan di laboratorium Patologi Anatomi RSI Sultan Agung Semarang oleh satu orang dokter spesialis Patologi Anatomi.

3.6. Tempat dan Waktu

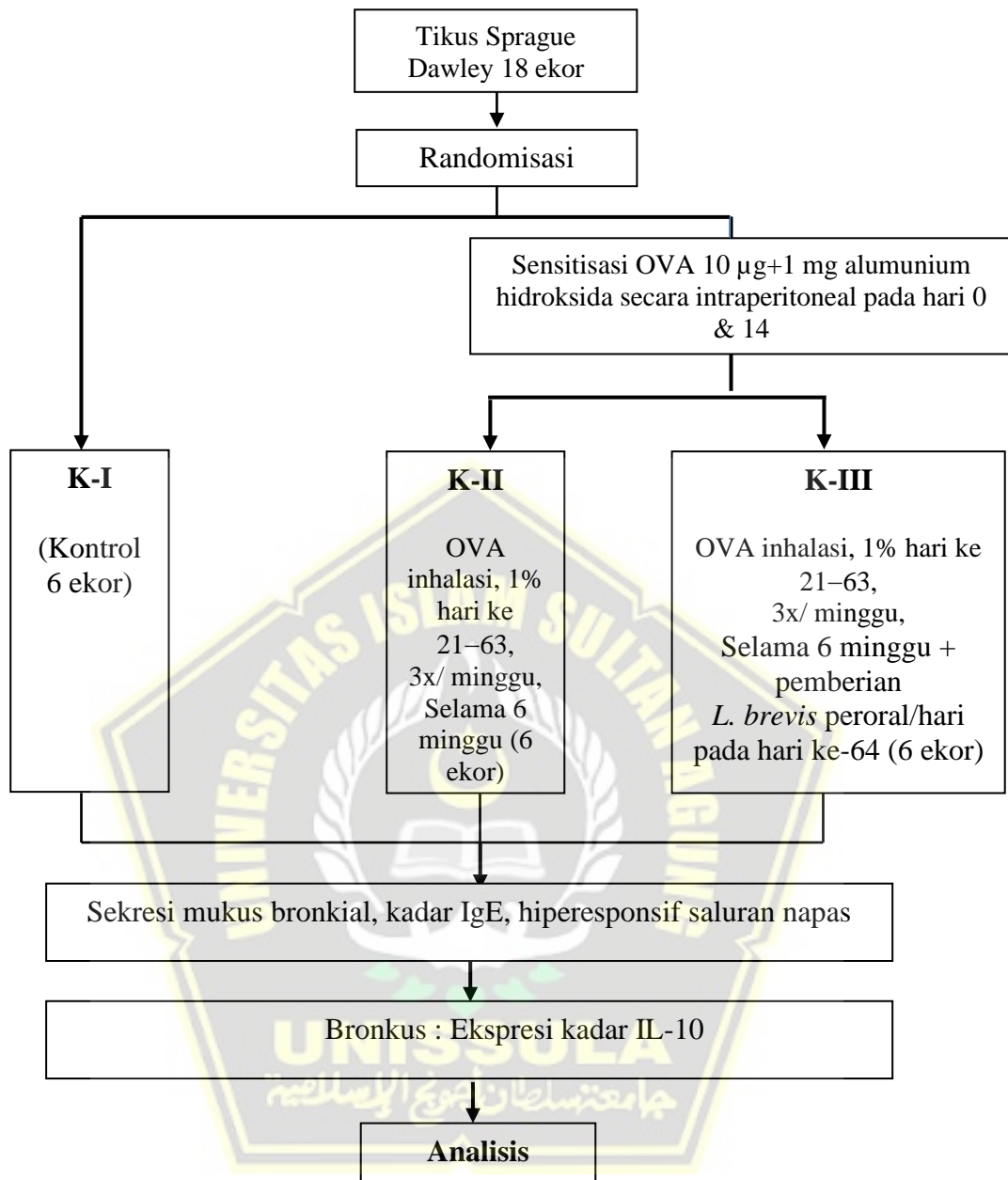
Penelitian akan dilakukan di Laboratorium Pusat Studi Pangan (PAU) dan Gizi Universitas Gadjah Mada (UGM) Yogyakarta yang dilakukan selama 2 bulan sejak bulan Maret – April 2022.

3.7. Analisis Hasil

Analisis hasil penelitian ini dilakukan menggunakan *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 26.0 for windows*. Pertama dilakukan uji deskriptif untuk mengetahui nilai mean, median dan standar deviasi dari ekspresi IL-10 pada bronkus tikus asma kronik. Setelah itu dilakukan uji normalitas menggunakan *Saphiro – wilk test* dan uji homogenitas dengan menggunakan *Levenne test*. Didapatkan data berdistribusi tidak normal dan tidak homogen meskipun setelah dilakukan transformasi, sehingga dilakukan uji non parametrik berupa *Kruskal-Wallis test*.



3.8. Alur Penelitian



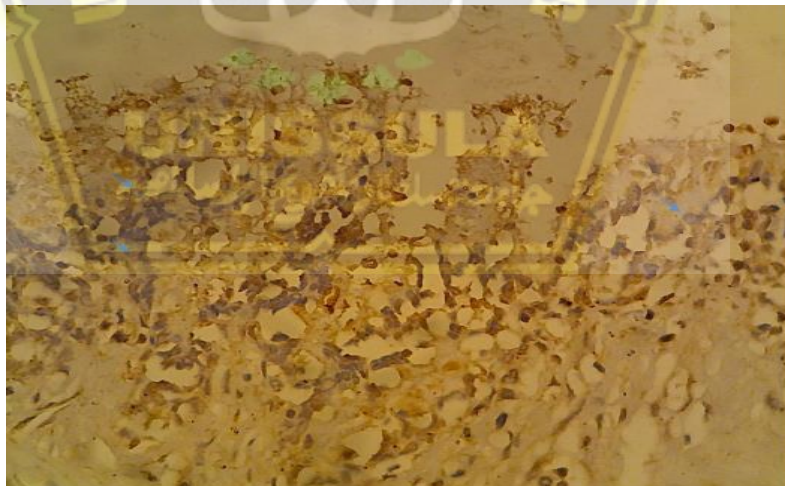
Gambar 3.1. Alur Penelitian

BAB IV

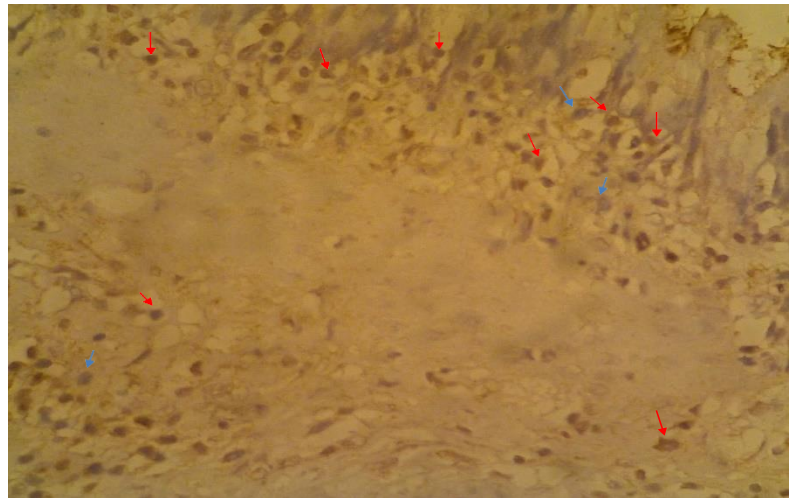
HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Penelitian

Penelitian ini tentang pengaruh pemberian probiotik *Leuconosctoc mesenteroides* terhadap ekspresi IL-10 pada bronkus tikus *Sprague Dawley* asma kronik. Jumlah tikus yang digunakan sebanyak 18 ekor dibagi dalam 3 kelompok (kontrol tanpa perlakuan (K-I), perlakuan I (K-II) dipapar OVA, dan perlakuan II (K-III) dipapar OVA dan diberi probiotik *Leuconosctoc mesenteroides*). Penelitian dilakukan di Laboratorium Pusat Studi Pangan (PAU) dan Gizi Universitas Gadjah Mada (UGM) Yogyakarta selama bulan Maret-April 2022, sedangkan untuk pengamatan/perhitungan ekspresi kadar IL-10 dari preparat histopatologi bronkus menggunakan *hotspot score* dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi FK Unissula Semarang.



K - I



K - II



K - III

Gambar 4.1. Tampak lapisan bronkus pada tikus kelompok 1 dan 3 , masih normal sedangkan kelompok 2 mengalami erosi dengan sisa-sisa debris leukoklastik dan sebaran limfosit yang sitoplasmanya tidak mengekspresikan IL-10 (panah biru). Penilaian positif bila ekspresi IL-10 terlihat di sitoplasma sel limfosit dan makrofag, berupa warna kecoklatan di sitoplasma (panah merah).

Hasil penghitungan ekspresi IL-10 bronkus pada tiap kelompok ditunjukkan pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1. Hasil Perhitungan Hotspot Score Ekspresi IL-10 pada Bronkus

Tikus	Kelompok		
	K-I	K-II	K-III
1	37,6	0	0
2	6	0	0
3	4,8	1,2	23,4
4	18,4	0,4	19
5	0	0	0
6	3,8	0	0

Tabel 4.1 menunjukkan bahwa ekspresi IL-10 pada sampel preparat histopatologis jaringan bronkus di kelompok K-II dan K-III lebih banyak yang tidak teramati, sedangkan pada K-I hampir semua sampel preparat menunjukkan ekspresi IL-10. Hasil perhitungan *hotspot score* berikutnya dilakukan analisis deskriptif didapatkan hasil sebagai berikut:

Tabel 4.2. Hasil Nilai Rerata Proporsi Ekspresi IL-10 pada Bronkus (%)

Kelompok	Rerata	Standar Deviasi	Median	Min-Maks
K-I	11,8	14,11	5,4	0 – 37,6
K-II	0,27	0,48	0,00	0 – 1,2
K-III	7,07	11,03	0,00	0 – 23,4

Tabel 4.2 menunjukkan bahwa ekspresi IL-10 bronkus kelompok K-I adalah yang paling tinggi, diikuti dengan K-III, dan terendah pada K-II. Hasil uji normalitas data didapatkan proporsi ekspresi IL-10 pada kelompok K-II dan K-III tidak berdistribusi normal ($p < 0,05$), dan varian proporsi ekspresi IL-10 di ketiga kelompok uji tersebut juga tidak homogen ($p < 0,05$) (Tabel 4.3).

Tabel 4.3. Hasil analisis normalitas, homogenitas, dan Kruskal Wallis ekspresi IL-10 Bronkus

Kelompok	Rerata (SD) Ekspresi IL-10 (%)	<i>p-value</i>		
		<i>Shapiro Wilk</i>	<i>Levene Test</i>	<i>Kruskal Wallis</i>
K-I	11,8 (14,11)	0,071	0,005	0,106
K-II	0,27 (0,48)	0,003		
K-III	7,07 (11,03)	0,004		

Perbedaan ekspresi IL-10 bronkus antar kelompok diuji dengan *Kruskal Wallis* dan didapatkan nilai *p* sebesar 0,106 dimana nilai tersebut lebih besar dari 0,05 sehingga dinyatakan bahwa tidak terdapat perbedaan ekspresi IL-10 bronkus antar ketiga kelompok.

4.2. Pembahasan

Berdasarkan hasil analisis deskriptif diperoleh hasil bahwa kelompok K-II yaitu kelompok tikus yang dibuat model asma kronik menunjukkan ekspresi IL-10 pada bronkus yang paling rendah. Hasil ini disebabkan karena pada kondisi asma terdapat gangguan regulasi sel Th2 yang merupakan sumber utama dari IL-10 sehingga IL-10 terekspresi rendah. Gangguan regulasi sel Th2 terjadi karena pada kondisi asma terjadi peningkatan IFN- γ (Rajizadeh *et al.*, 2019). Temuan mengenai ekspresi IL-10 yang lebih rendah pada kelompok K-II relevan dengan teori yang dikemukakan oleh (Kubo *et al.*, 2017) bahwa IL-10 berhubungan negatif dengan kejadian dan keparahan penyakit asma. Teori yang dikemukakan oleh Iyer dan Cheng (2012) juga mendukung hasil penelitian ini bahwa pada model asma yang diinduksi oleh OVA terjadi defisiensi fenotipe IL-10 yang dapat berdampak pada penurunan imunopatologi (Iyer & Cheng, 2012).

Penurunan kadar IL-10 pada kelompok tikus asma kronik pada penelitian ini namun demikian tidak signifikan. Hasil ini berbeda dengan yang ditunjukkan pada penelitian terdahulu dimana dilaporkan bahwa kadar IL-10 pada jaringan paru tikus model asma menurun signifikan dibandingkan dengan kondisi normal (Rajizadeh *et al.*, 2019). Perbedaan hasil disebabkan karena prosedur penelitian yang berbeda, penelitian ini melakukan sensitisasi asma kronik dalam 63 hari sebagaimana prosedur dalam penelitian Pujiati *et al.* (2021) sedangkan pada penelitian Rajizadeh *et al.* (2019) menggunakan periode sensitisasi asma kronik selama 42 hari dengan rincian induksi OVA 1 mg + dengan 200 µg Al(OH)₃ yang dilarutkan dalam 0,5 mL PBS selama 7 hari, dan memaparkan OVA 1% dalam ruang tertutup berukuran 40x40x70 cm menggunakan nebulizer selama 30 menit/hari selama 4 minggu. Dosis paparan inhalasi OVA 1% penelitian ini lebih rendah daripada dosis paparan inhalasi OVA pada penelitian Rajizadeh *et al.* (2019) yaitu selama 28 kali atau setiap hari selama 4 minggu sedangkan pada penelitian ini sebanyak 18 kali atau 3x/minggu dalam 6 minggu.

Ekspresi IL-10 pada kelompok K-III yaitu tikus model asma kronik yang diberi probiotik *Leuconostoc mesenteroides* terlihat lebih tinggi jika dibandingkan dengan ekspresi IL-10 pada kelompok K-II meskipun hasilnya tidak signifikan. Hasil ini menandakan bahwa ada potensi positif dari *Leuconostoc mesenteroides* bagi perbaikan asma, karena IL-10 merupakan sitokin protektif pada asma yang berperan dalam mengendalikan

remodeling saluran napas juga menurunkan sintesis kolagen tipe 1 dan proliferasi sel otot polos (Rajizadeh *et al.*, 2019). Pensinyalan IL-10 secara langsung pada sel Th2 dapat membantu regulasi respon alergi saluran napas yang dimediasi oleh Th2 (Coomes *et al.*, 2017).

Probiotik *Leuconostoc mesenteroides* dapat menghambat perkembangan dan gejala asma serta kejadian alergi melalui asam laktat yang dihasilkan. Bakteri asam laktat dapat meringankan inflamasi saluran napas akibat alergi melalui modulasi keseimbangan sel Th1 dan Th2 (IL-4, IL-5, IL-13), serta meningkatkan sel Treg (Ai *et al.*, 2016). Peningkatan sel Treg terjadi akibat stimulasi sel-sel dendritik oleh BAL sehingga Treg berdiferensiasi menjadi CD4⁺ Foxp3⁺ Treg dan memproduksi IL-10 (Eslami *et al.*, 2020). Probiotik juga mengandung biosurfaktan seperti glikolipid, kompleks lipid-polisakarida, fosfolipid, asam mikoleat, lipoprotein, atau lipopeptida yang dapat meningkatkan produksi IL-10 (Jenab *et al.*, 2020).

Eksresi IL-10 pada kelompok tikus asma kronik yang diberi *Leuconostoc mesenteroides* tidak berbeda signifikan dengan ekspresi IL-10 pada kelompok tikus asma kronik. Hasil tersebut disebabkan karena *Leuconostoc mesenteroides* lebih cenderung poten dalam meningkatkan sitokin tipe Th1 yaitu IL-12 dan IFN- γ daripada menginduksi IL-10 dari sel Th2 (Kekkonen *et al.*, 2008). Pada penelitian sebelumnya bahwa pemberian *Leuconostoc mesenteroides* secara tunggal pada model tikus asma kronik dapat meningkatkan kadar IL-10 yang signifikan dibandingkan dengan tikus

model asma kronik (Pujiati *et al.*, 2022). Perbedaan hasil disebabkan karena perbedaan cara pengamatan *outcome*. Penelitian ini menilai ekspresi IL-10 dengan *hotspot score* dari preparat histopatologis bronkus, sedangkan penelitian terdahulu menilai kadar IL-10 serum menggunakan ELISA.

IL-10 adalah sitokin anti-inflamasi utama dalam respon imun alamiah dan adaptif yang berperan menghentikan respon imun/inflamasi yang berlebihan melalui inaktivasi makrofag dan sel T. Sitokin ini merupakan mediator inflamasi lokal dan sistemik dan dapat diproduksi dalam jumlah besar sehingga mudah terdeteksi dalam serum (Darlina & Nurhayati, 2015). Pada kondisi normal, sel epitel bronkus secara konstitutif menghasilkan IL-10 untuk membantu memelihara lingkungan mikro. Epitel bronkus ikut berperan penting dalam mengatur respon imun lokal dengan cara memproduksi IL-10 untuk meminimalkan inflamasi pada paru-paru (Kawano *et al.*, 2016). Pada kondisi asma, terjadi penurunan IL-10 karena sediaan yang ada digunakan untuk merespon inflamasi akibat induksi material alergen. IL-10 bekerja melalui reseptor IL-10 (IL-10R) menstimuli faktor transkripsi STAT1 dan STAT3. Sel epitel bronkus akan tetapi sedikit mengekspresikan IL-10R sehingga kurang responsif terhadap stimuli IL-10 eksogen. IL-10 dan IL-10R terekspresi lebih banyak pada makrofag alveolar (Lim *et al.*, 2004). Alasan tersebut dapat ikut menjelaskan mengapa pengamatan ekspresi IL-10 pada jaringan bronkus pada tikus asma kronik baik yang tidak diberi ataupun diberi probiotik *Leuconostoc mesenteroides* lebih banyak yang tidak ditemukan.

Penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan yaitu pertama: pemberian *Leuconosctoc mesenteroides* baru diberikan dalam dosis yang kurang bervariasi. Kedua: pengamatan ekspresi IL-10 dilakukan oleh satu pengamat. Ketiga: tidak diketahui apakah *Leuconosctoc mesenteroides* yang telah diberikan dapat tumbuh dan mempengaruhi perkembangan mikrobiota di saluran intestinal atau tidak.



BAB V

SIMPULAN DAN SARAN

5.1. Simpulan

- 5.1.1. Pengaruh pemberian probiotik *Leuconostoc mesenteroides* terhadap ekspresi IL-10 pada bronkus tikus *Sprague Dawley* asma kronik tidak signifikan.
- 5.1.2. Rerata ekspresi IL-10 pada bronkus tikus *Sprague Dawley* normal yaitu 11,8%.
- 5.1.3. Rerata ekspresi IL-10 pada bronkus tikus *Sprague Dawley* asma kronik yaitu 0,3%.
- 5.1.4. Rerata ekspresi IL-10 pada bronkus tikus *Sprague Dawley* asma kronik yang diberi probiotik *Leuconostoc mesenteroides* yaitu 7,1%.
- 5.1.5. Perbandingan ekspresi IL-10 pada bronkus antar tikus *Sprague Dawley* normal, tikus asma kronik, dan tikus asma kronik yang diberi probiotik *Leuconostoc mesenteroides* tidak signifikan.

5.2. Saran

Sesuai dengan keterbatasan penelitian, maka saran untuk penelitian di masa mendatang adalah:

- 5.2.1. Meneliti perbedaan pengaruh pemberian *Leuconostoc mesenteroides* dalam dosis yang bervariasi terhadap ekspresi IL-10 pada bronkus tikus *Sprague-Dawley* model asma kronik.

- 5.2.2.** Melakukan pengamatan ekspresi Il-10 pada bronkus tikus *Sprague-Dawley* model asma kronik oleh beberapa pengamat agar dapat dilakukan uji kesesuaian/kesepakatan.
- 5.2.3.** Meneliti pengaruh pemberian *Leuconosctoc mesenteroides* pada tikus *Sprague-Dawley* model asma kronik terhadap pengendalian disbiosis usus.



DAFTAR PUSTAKA

- Ai, C., Ma, N., Zhang, Q., Wang, G., Liu, X., Tian, F., Chen, P. & Chen, W. 2016. Immunomodulatory effects of different lactic acid bacteria on allergic response and its relationship with in vitro properties. *PLoS ONE*, 11(10): 1–13.
- Anand, S. & Mande, S.S. 2018. Diet, microbiota and gut-lung connection. *Frontiers in Microbiology*, 9(SEP).
- Arias, C.A. & Murray, B.E. 2015. Enterococcus Species, Streptococcus gallolyticus Group, and Leuconostoc Species. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principle and Practice of Infectious Diseases*, 8 ed. Elsevier, hal.2328-2339.e3.
- Askar, M. 2020. *Patofisiologi untuk Teknologi Laboratorium Medis Buku Ajar*. Makassar: Unit Penelitian Politeknik Kesehatan Makassar.
- Baratwidjaja, K.G. & Rengganis, I. 2013. *Mengenal Alergi*. Jakarta: Universitas Indonesia Publishing.
- Barcik, W., Boutin, R.C.T., Sokolowska, M. & Finlay, B.B. 2020. The Role of Lung and Gut Microbiota in the Pathology of Asthma. *Immunity*, 52(2): 241–255. Tersedia di <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.01.007>.
- Choi, J.Y., Lee, H.Y., Hur, J., Kim, K.H., Kang, J.Y., Rhee, C.K. & Lee, S.Y. 2018. TRPV1 blocking alleviates airway inflammation and remodeling in a chronic asthma murine model. *Allergy, Asthma and Immunology Research*, 10(3): 216–224.
- Coomes, S.M., Kannan, Y., Pelly, V.S., Entwistle, L.J., Guidi, R., Perez-Lloret, J., Nikolov, N., Müller, W. & Wilson, M.S. 2017. CD4 + Th2 cells are directly regulated by IL-10 during allergic airway inflammation. *Mucosal Immunology*, 10(1): 150–161.
- Darlina, D. & Nurhayati, S. 2015. Respon Sitokin Pada Kultur Sel Limfosit Sebagai Uji Penting Dalam Pengembangan Vaksin Malaria Iradiasi. *Bulletin ALARA*, 17(1): 1–7.
- Deswindra, M.R., Oktarlina, R.Z. & Bustomi, E.C. 2018. Potensi Agen Probiotik Lactobacillus Rhamnosus Sebagai Modalitas Terapi Asma The Potential of Probiotic Agent Lactobacillus rhamnosus As a Modality of Asthma Therapy. *Majority*, 7(3): 222–227.
- Dumas, A., Bernard, L., Poquet, Y., Lugo-Villarino & Neyrolles, O. 2018. The role of the lung microbiota and the gut–lung axis in respiratory infectious

- diseases. *Cellular Microbiology*, 20(e21966): 1–9.
- Enaud, R., Prevel, R., Ciarlo, E., Beaufils, F., Wieërs, G., Guery, B. & Delhaes, L. 2020. The Gut-Lung Axis in Health and Respiratory Diseases: A Place for Inter-Organ and Inter-Kingdom Crosstalks. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10(February): 1–11.
- Eslami, M., Bahar, A., Keikha, M., Karbalaei, M., Kobylak, N.M. & Yousefi, B. 2020. Probiotics function and modulation of the immune system in allergic diseases. *Allergologia et Immunopathologia*, 48(6): 771–788.
- Fauzi, M., Setiadji & Megawati 2012. Produksi Ragi Kopi Kultur Tunggal: *Leuconostoc mesenteroides* dan *L. paramesenteroides* dari Isolat Bakteri Asam Laktat (BAL) Kopi Luwak. *AGROTEK*, 6(1): 59–68.
- Gileta, A.F., Fitzpatrick, C.J., Chitre, A.S., St. Pierre, C.L., Joyce, E. V., Maguire, R.J., McLeod, A.M., Gonzales, N.M., Williams, A.E., Morrow, J.D., Robinson, T.E., Flagel, S.B. & Palmer, A.A. 2018. Genetic characterization of outbred Sprague Dawley rats and utility for genome-wide association studies. *bioRxiv*, 0–53.
- Guillemainault, L., Williams, E.J., Scott, H.A., Berthon, B.S., Jensen, M. & Wood, L.G. 2017. Diet and asthma: Is it time to adapt our message? *Nutrients*, 9(11): 1–25.
- Howes, A., Gabrysova, L. & O' Garra, A. 2014. Role of IL-10 and the IL-10 Receptor in Immune Responses. *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier.
- Huang, J., Zhang, J., Wang, X., Jin, Z., Zhang, P., Su, H. & Sun, X. 2022. Effect of Probiotics on Respiratory Tract Allergic Disease and Gut Microbiota. *Frontiers in Nutrition*, 9(February): 1–14.
- Hufnagl, K., Pali-Schöll, I., Roth-Walter, F. & Jensen-Jarolim, E. 2020. Dysbiosis of the gut and lung microbiome has a role in asthma. *Seminars in Immunopathology*, 42(1): 75–93.
- Hyeong-gyu, L., Ahn, K., Kyung, K.O., Lee, M., Kim, S., Se-ryang, O., Goo, L.S. & Kim, H. 2011. *Composition comprising Leuconostoc mesenteroides E — 1 of having anti allergy, antiinflammatory and antiasthma activity*. KR101081460B1. Tersedia di <https://patents.google.com/patent/KR101081460B1/en>.
- Infodatin 2015. *You Can Control Your Asma. you can control your Asthma*, .
- Issa, A.T. & Tahergorabi, R. 2019. Milk Bacteria and Gastrointestinal Tract: Microbial Composition of Milk. *Dietary Interventions in Gastrointestinal*

Diseases. Academic Press Elsevier, hal.265–75.

- Iyer, S.S. & Cheng, G. 2012. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Critical Reviews in Immunology*, 32(1): 23–63.
- Jenab, A., Roghanian, R. & Emtiazi, G. 2020. Bacterial natural compounds with anti-inflammatory and immunomodulatory properties (Mini review). *Drug Design, Development and Therapy*, 14: 3787–3801.
- Jin, S.W., Lee, G.H., Jang, M.J., Hong, G.E., Kim, J.Y., Park, G.D., Jin, H., Kim, H.S., Choi, C.Y., Choi, J.H., Lee, S.G., Jeong, H.G. & Hwang, Y.P. 2020. Lactic acid bacteria ameliorate diesel exhaust particulate matter-exacerbated allergic inflammation in a murine model of asthma. *Life*, 10(11): 1–16.
- Kawano, H., Kayama, H., Nakama, T., Hashimoto, T., Umemoto, E. & Takeda, K. 2016. IL-10-producing lung interstitial macrophages prevent neutrophilic asthma. *International Immunology*, 28(10): 489–501.
- Kekkonen, R.A., Kajasto, E., Miettinen, M., Veckman, V., Korpela, R. & Julkunen, I. 2008. Probiotic *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* and *Streptococcus thermophilus* induce IL-12 and IFN- γ production. *World Journal of Gastroenterology*, 14(8): 1192–1203.
- Kemenkes RI 2008. *Keputusan Menteri Kesehatan RI Tentang Pedoman Pengendalian Asma*.
- Kubo, T., Morita, H., Sugita, K. & Akdis, C.A. 2017. Introduction to Mechanisms of Allergic Diseases. *Middleton's Allergy Essentials*. Elsevier, hal.1–27. Tersedia di <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323375795000015>.
- Kusmiati & Malik, A. 2002. Aktivitas Bakteriosin Dari Bakteri *Leuconostoc mesenteroides* Pbac1 Pada Berbagai Media. *Makara Kesehatan*, 6(1): 1–7.
- Lestari, L.A. & Helmyati, S. 2018. Definisi, Sejarah, dan Perkembangan Probiotik. *Peran Probiotik di Bidang Gizi dan Kesehatan*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press, hal.1–2, 166.
- Lim, S., Caramori, G., Tomita, K., Jazrawi, E., Oates, T., Chung, K.F., Barnes, P. & Adcock, I. 2004. Differential expression of IL-10 receptor by epithelial cells and alveolar macrophages. *Allergy*, 59: 505–14.
- Lutfiyati, H., Ikawati, Z. & Wiedyaningsih, C. 2015. Efek Samping Penggunaan Terapi Oral Pada Pasien Asma. *Jurnal Farmasi Sains dan Praktis*, I(1):

21–28.

- Mennini, M., Dahdah, L., Artesani, M.C., Fiocchi, A. & Martelli, A. 2017. Probiotics in asthma and allergy prevention. *Frontiers in Pediatrics*, 5(July): 1–5.
- Nagata, K. & Nishiyama, C. 2021. IL-10 in mast cell-mediated immune responses: Anti-inflammatory and proinflammatory roles. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9).
- Niers, L.E.M., Timmerman, H.M., Rijkers, G.T., Van Bleek, G.M., Van Uden, N.O.P., Knol, E.F., Kapsenberg, M.L., Kimpen, J.L.L. & Hoekstra, M.O. 2005. Identification of strong interleukin-10 inducing lactic acid bacteria which down-regulate T helper type 2 cytokines. *Clinical and Experimental Allergy*, 35(11): 1481–1489.
- Nurliyani 2021. *Imunologi Susu*. Yogyakarta: UGM Press.
- Ouyang, W. & O’Garra, A. 2019. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. *Immunity*, 50(4): 871–891. Tersedia di <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.020>.
- de Paula, A.T., Jeronymo-Ceneviva, A.B., Todorov, S.D. & Penna, A.L.B. 2015. The Two Faces of *Leuconostoc mesenteroides* in Food Systems. *Food Reviews International*, 31(2): 147–71.
- PDPI 2018. *Pers Release Perhimpunan Dokter Paru Indonesia Dalam Rangka Peringatan Hari Asma Sedunia 2018*. klikpdpi.com. Tersedia di <http://www.klikpdpi.com/index.php?mod=article&sel=8437> [Accessed 7 September 2021].
- Pérez, M., Pérez-Cano, F.J., Rodríguez-Lagunas, M.J., Cambras, T., Pastor-Soplin, S., Best, I., Castell, M. & Massot-Cladera, M. 2020. Development and characterization of an allergic asthma rat model for interventional studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11).
- Pujiati, Indarto, D., Susilorini, Hani, S.N., Oktavia, D., Reviono & Soetrisno 2021. The Effect of Combination Probiotic *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus brevis* on IL-10 and IL-17 Expression in Ileum. *Research Unissula*, 1–11.
- Pujiati, P. 2016. Probiotics Effect on Interleukin-4 (IL-4) and Immunoglobulin E (IgE) Levels on Asthmatic Patients. *Sains Medika*, 6(2): 61.
- Pujiati, Soetrisno, Indarto, D. & Reviono 2022. Impact of *Leuconostoc Mesenteroides* and *Lactobacillus Brevis* on Pro-Inflammatory Cytokines in Rat Models with Chronic Asthma. *Journal of Hunan University*

Natural Sciences, 49(4): 300–306.

- Rajizadeh, M.A., Najafipour, H., Fekri, M.S., Rostamzadeh, F., Jafari, E., Bejeshk, M.A. & Masoumi-Ardakani, Y. 2019. Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of myrtenol in the rats with allergic asthma. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 18(3): 1488–1498.
- Rofii, M., Satoto, H. & Harahap, M.S. 2010. Perbandingan Kadar IL-10 Serum dengan dan Tanpa Infiltrasi Levobupivakain pada Nyeri Pasca Insisi. *JAI (Jurnal Anestesiologi Indonesia)*, 2(2).
- Sagar, S., Morgan, M.E., Chen, S., Vos, A.P., Garssen, J., van Bergenhenegouwen, J., Boon, L., Georgiou, N.A., Kraneveld, A.D. & Folkerts, G. 2014. Bifidobacterium breve and Lactobacillus rhamnosus treatment is as effective as budesonide at reducing inflammation in a murine model for chronic asthma. *Respiratory Research*, 15(1): 1–17.
- Salameh, M., Burney, Z., Mhaimed, N., Laswi, I., Yousri, N.A., Bendriss, G. & Zakaria, D. 2020. The role of gut microbiota in atopic asthma and allergy, implications in the understanding of disease pathogenesis. *Scandinavian Journal of Immunology*, 91(3): 1–8.
- Saraiva, M., Vieira, P. & O'Garra, A. 2020. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *Journal of Experimental Medicine*, 217(1): 1–19.
- Segers, M.E. & Lebeer, S. 2014. Towards a better understanding of Lactobacillus rhamnosus GG - host interactions. *Microbial Cell Factories*, 13(Suppl 1): 1–16.
- Sinyor, B. & Perez, L.C. 2021. *Pathophysiology Of Asthma*. Pathophysiology Of Asthma. StatPearls Publishing (Internet). Tersedia di <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551579/>.
- Siregar, F.N.M. 2021. Mikrobiota Usus Dan Gut-Lung Axis Pada Penyakit Paru. *Jurnal Implementa Husada*, 2(2): 173–187.
- Sudha, S., Makant, N., Chaitali, M. & Pramod, V. 2013. Importance of IL-10 and IL-17 cytokines in human asthma as studied by ELISPOT. *International Journal of Medicine and Biomedical Research*, 2(2): 103–112.
- Surjanto, E. & Purnomo, J. 2009. Mekanisme Seluler dalam Patogenesis Asma dan Rinitis. *Jurnal Respirologi Indonesia*, 1–26.
- Thakur, V.R., Khuman, V., Beladiya, J. V., Chaudagar, K.K. & Mehta, A.A. 2019. An experimental model of asthma in rats using ovalbumin and lipopolysaccharide allergens. *Heliyon*, 5(11): e02864. Tersedia di <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02864>.

Thomas, D.J., Husmann, R.J., Villamar, M., Winship, T.R., Buck, R.H. & Zuckermann, F.A. 2011. *Lactobacillus rhamnosus* HN001 attenuates allergy development in a pig model. *PLoS ONE*, 6(2).

WHO 2021. *Asthma*. who.int. Tersedia di <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/asthma>.

Yu, Q.L. & Chen, Z. 2018. Establishment of different experimental asthma models in mice. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 15(3): 2492–2498.

