

**PENGARUH PEMBERIAN PROBIOTIK *LACTOBACILLUS BREVIS*
TERHADAP EKSPRESI IL-17 PADA BRONKUS TIKUS
ASMA KRONIK
(Studi Eksperimental pada Tikus *Sprague-Dawley*)**

Skripsi
untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai gelar Sarjana Kedokteran



Oleh :
Irkham Rafi Zaen
30101800084

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG
2023**

SKRIPSI

PENGARUH PEMBERIAN PROBIOTIK *LACTOBACILLUS BREVIS* TERHADAP EKSPRESI IL-17 PADA BRONKUS TIKUS ASMA KRONIK (Studi Eksperimental pada Tikus *Sprague-Dawley*)

Yang dipersiapkan dan disusun oleh

Irkham Rafi Zaen

30101800084

telah dipertahankan di depan Dewan Penguji
pada tanggal 24 Januari 2023
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Susunan Tim Penguji

Pembimbing I

Dr. dr. Hj. Pujiati Abbas, Sp.A

Anggota Tim Penguji I

Dr. dr. Hj. Chodijah, M.Kes

Pembimbing II

Dr. dr. Susilorini, Sp.PA., M.Si.Med

Anggota Tim Penguji II

dr. Masfivah, Sp.MK., M.Si.Med

Semarang, 9 Februari 2023

Fakultas Kedokteran

Universitas Sultan Agung

Dekan,



Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, S.H., Sp. KF

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama : Irkham Rafi Zaen

NIM : 30101800084

Dengan ini menyatakan bahwa karya ilmiah berjudul:

**“PENGARUH PEMBERIAN PROBIOTIK *LACTOBACILLUS BREVIS*
TERHADAP EKSPRESI IL-17 PADA BRONKUS TIKUS ASMA KRONIK**

(Studi Eksperimental pada Tikus *Sprague-Dawley*)”

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, 20 Januari 2023

Yang menyatakan,




Irkham Rafi Zaen

PRAKATA

Assalamu 'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh,

Alhamdulillahirrabbilalamin, puji syukur kehadiran Allah SWT atas limpahan ridho, nikmat dan rahmat-Nya serta sholawat dan salam kepada Rasulullah Nabi Muhammad SAW sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “PENGARUH PEMBERIAN PROBIOTIK *LACTOBACILLUS BREVIS* TERHADAP EKSPRESI IL-17 PADA BRONKUS TIKUS ASMA KRONIK (Studi Eksperimental pada Tikus *Sprague-Dawley*)”.

Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar sarjana kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang. Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan ucapan banyak terima kasih kepada:

1. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, Sp.KF.,SH., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
2. Dr. dr. Hj. Pujiati Abbas, Sp.A. dan Dr. dr. Susilorini, Sp.PA., M.Si.Med. selaku dosen pembimbing I dan II yang telah sabar meluangkan waktu dan pikiran untuk mengarahkan dan membimbing penulis hingga terselesaikannya skripsi ini.
3. Dr. dr. Hj. Chodidjah, M.Kes. dan dr. Masfiah, Sp.MK., M.Si.Med. selaku dosen penguji I dan II yang telah sabar meluangkan waktu dan pikiran untuk mengarahkan dan menguji penulis hingga terselesaikannya skripsi ini.

4. Ibu Azizah Hikma Safitri, S.Si., M.Si. selaku dosen wali yang telah sabar meluangkan waktu memberikan dukungan dan motivasi kepada penulis untuk menyelesaikan skripsi ini.
5. Laboratorium PSPG-PAU UGM beserta staf, Laboratorium Patologi Anatomi FK UNS beserta staf, Bagian Unit Skripsi FK Unissula (Dr. Rita Kartika Sari, S.KM., M.Kes., Pak Sahid dan Bu Rochmah), yang telah membantu dalam penelitian ini.
6. Orang tua serta adik penulis, dr.Zaenuri, drg.Sjarifa, Fadhil Muslim Zaen, Nada Raihan Firda Zaen yang telah memberikan doa, kasih sayang, fasilitas, dan dukungan yang tiada henti selama penyusunan skripsi ini.
7. Teman seperjuangan skripsi penelitian payung Elma Nafiana Yahya, Umami Khamidah dan Putri Hany Lestari yang telah berjuang dan banyak mendukung saya selama penyusunan skripsi ini.
8. Rizky Ramadhani Putri, Rowaida Putri Anggraily Bian, Fitri Damayanti, Arvin Naufal Wafi, Wildan Chanieful Wajih, Mohammad Hifni Aziz, dan Rahmawati Nur Pangestu, sahabat tercinta seperjuangan selama menjalani studi sarjana kedokteran hingga hari tua yang telah banyak membantu dan mendukung selama penyusunan skripsi ini.
9. Semua pihak yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu yang telah memberikan dukungan, semangat, dan doa untuk penulis.

Sebagai akhir kata dari penulis, penulis hanya bisa berharap semoga Skripsi ini dapat bermanfaat.

Wassalamu'alaikum Warahamatullahi Wabarakatuh.

Semarang, 20 Januari 2023
Penulis,

Irkham Rafi Zaen

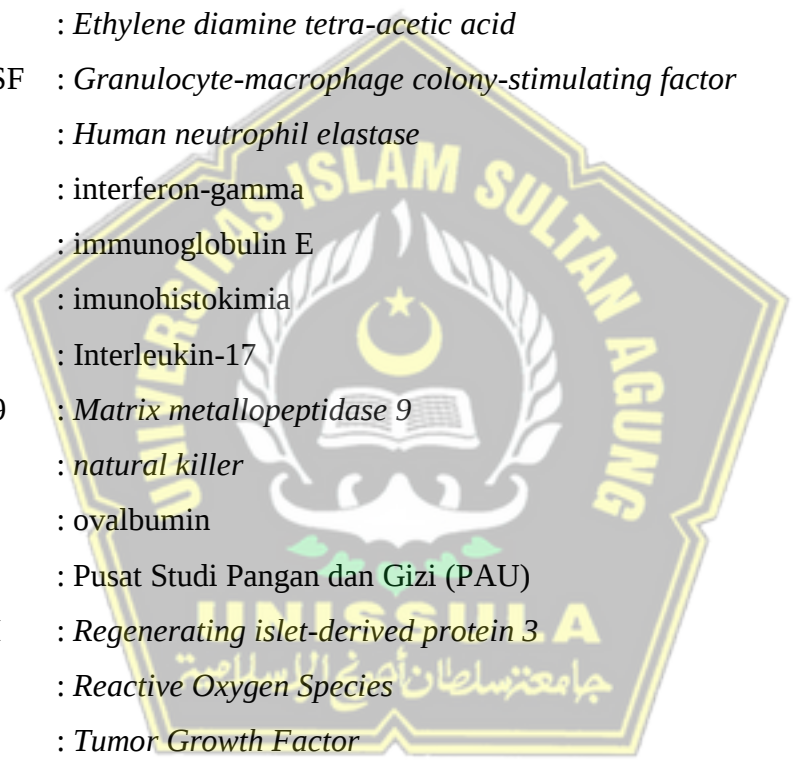


DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
SURAT PERNYATAAN.....	iii
PRAKATA.....	iv
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR SINGKATAN	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
INTISARI.....	xiii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	5
1.3. Tujuan Penelitian.....	5
1.3.1. Tujuan Umum.....	5
1.3.2. Tujuan Khusus.....	5
1.4. Manfaat Penelitian.....	6
1.4.1. Manfaat Teoritis.....	6
1.4.2. Manfaat Praktis.....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1. Interleukin-17.....	7
2.1.1. Hubungan IL-17 dengan Asma	8
2.2. Asma	11
2.3. Konsep <i>Gut-Lung Axis</i>	12
2.4. Probiotik <i>Lactobacillus brevis</i>	15
2.5. Pengaruh Probiotik Terhadap Mekanisme Asma	17
2.6. Tikus Model Asma.....	19
2.7. Kerangka Teori	22
2.8. Kerangka Konsep.....	22

2.9. Hipotesis	22
BAB III METODOLOGI PENELITIAN.....	23
3.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	23
3.1.1. Jenis Penelitian.....	23
3.1.2. Rancangan Penelitian	23
3.2. Variabel dan Definisi Operasional.....	24
3.2.1. Variabel.....	24
3.2.2. Definisi Operasional.....	24
3.3. Populasi dan Sampel.....	26
3.3.1. Populasi.....	26
3.3.2. Sampel.....	27
3.4. Instrumen dan Bahan Penelitian	27
3.4.1. Instrumen.....	27
3.4.2. Bahan Penelitian.....	28
3.5. Cara Penelitian.....	28
3.5.1. Teknik Pembuatan Preparat	30
3.5.2. Teknik Pembacaan Slide	33
3.6. Tempat dan Waktu.....	33
3.6.1. Tempat.....	33
3.6.2. Waktu.....	34
3.7. Analisis Hasil.....	34
3.8. Alur Penelitian	35
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	36
4.1 Hasil Penelitian.....	36
4.2 Pembahasan.....	41
BAB V SIMPULAN DAN SARAN	46
5.1. Simpulan	46
5.2. Saran	47
DAFTAR PUSTAKA	48
LAMPIRAN	55

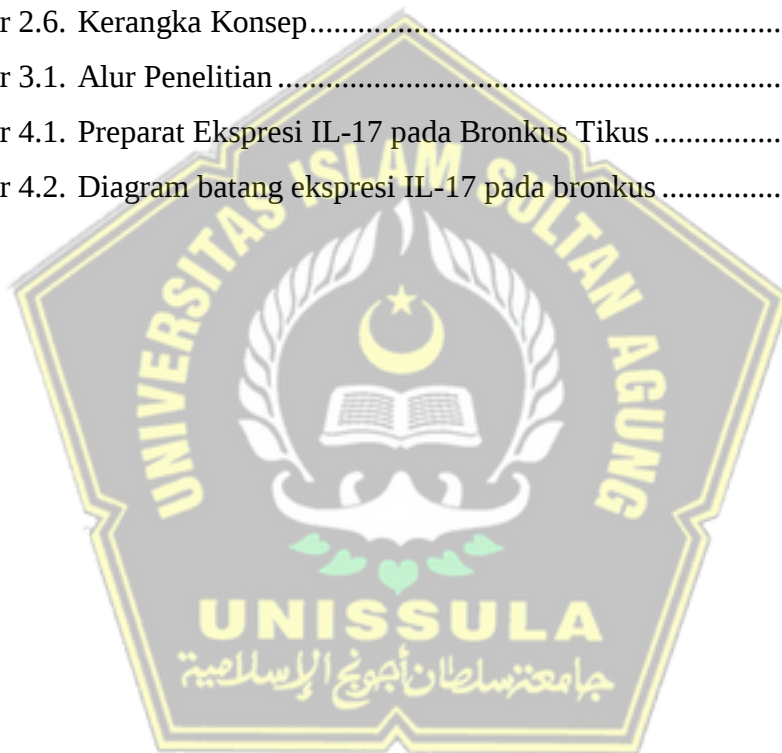
DAFTAR SINGKATAN



AHR	: <i>airway hyperresponsiveness</i>
Al(OH) ₃	: Alumunium hidroksida
APC	: <i>antigen presenting cells</i>
BAL	: bakteri asam laktat
CDC	: <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CO ₂	: karbon dioksida
EDTA	: <i>Ethylene diamine tetra-acetic acid</i>
GM-CSF	: <i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HNE	: <i>Human neutrophil elastase</i>
IFN-γ	: interferon-gamma
IgE	: immunoglobulin E
IHC	: imunohistokimia
IL-17	: Interleukin-17
MMP-9	: <i>Matrix metallopeptidase 9</i>
NK	: <i>natural killer</i>
OVA	: ovalbumin
PAU	: Pusat Studi Pangan dan Gizi (PAU)
REGIII	: <i>Regenerating islet-derived protein 3</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
TGF	: <i>Tumor Growth Factor</i>
Th-17	: T helper 17
TNF	: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
Treg	: T regulator
UGM	: Universitas Gadjah Mada
WHO	: <i>World Health Organization</i>

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Peran IL-17 dalam Patogenesis Asma	11
Gambar 2.2. Figur <i>Gut-Lung Axis</i>	15
Gambar 2.3. <i>Lactobacillus brevis</i> dengan pewarnaan Gram dan perbesaran kuat.....	17
Gambar 2.4. Tikus <i>Sprague-Dawley</i>	21
Gambar 2.5. Kerangka Teori	22
Gambar 2.6. Kerangka Konsep.....	22
Gambar 3.1. Alur Penelitian	35
Gambar 4.1. Preparat Ekspresi IL-17 pada Bronkus Tikus	37
Gambar 4.2. Diagram batang ekspresi IL-17 pada bronkus	40



DAFTAR TABEL

Tabel 4.1. Hasil perhitungan <i>Hotspot Score</i> ekspresi IL-17 pada bronkus.....	38
Tabel 4.2. Hasil uji deskriptif dan parametrik ekspresi IL-17 pada bronkus	38



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Hasil Pembacaan <i>Hotspot Score</i> Preparat IL-17 di Bronkus.....	55
Lampiran 2.	Hasil Uji Deskriptif	56
Lampiran 3.	Hasil Uji Normalitas & Homogenitas sebelum transformasi	58
Lampiran 4.	Hasil Uji Normalitas & Homogenitas setelah transformasi	59
Lampiran 5.	Hasil Uji <i>One-way ANOVA</i> & <i>Post Hoc</i> LSD	60
Lampiran 6.	Surat <i>Ethical Clearance</i>	61
Lampiran 7.	Surat Ijin Penelitian	62
Lampiran 8.	Surat Ijin Penggunaan Laboratorium.....	63
Lampiran 9.	Surat Selesai Penelitian	64
Lampiran 10.	Surat Pelaksanaan Ujian Hasil.....	65



INTISARI

Asma adalah peradangan kronis dan obstruksi saluran pernapasan bawah, jenis pengobatan standar memiliki efek samping, sehingga perlu terapi alternatif dengan probiotik. *Lactobacillus brevis* merupakan bakteri gram positif yang dapat mengurangi keparahan hipersensitivitas tipe-I. Interleukin-17 berperan menentukan derajat keparahan asma. Interleukin-17 juga berperan dalam *airway remodelling* serta kontraksi otot polos. Tujuan penelitian mengetahui pengaruh pemberian *Lactobacillus brevis* pada ekspresi IL-17 pada bronkus tikus asma kronik.

Penelitian eksperimental dengan *post test only control group design*. Subjek penelitian berjumlah 18 tikus *Sprague Dawley* betina dirandomisasi dan dibagi menjadi tiga kelompok (K): (K-) tikus kontrol, (K+) tikus model asma kronik, (Kp) tikus model asma kronik + *Lactobacillus brevis*. Sensitasi asma dengan 10µg OVA + 1mg Al(OH)₃ melalui injeksi intraperitoneal di hari ke-0 dan hari ke-14 dilanjutkan dengan inhalasi OVA 3x/minggu dari hari ke 21-63. *Lactobacillus brevis* dengan dosis 2×10^8 cfu/ml diberikan setiap hari dari hari ke 21-63. Ekspresi IL-17 diperiksa dari jaringan bronkus dengan pewarnaan imunohistokimia dan dinilai menggunakan metode *hotspot score*. Data di analisis dengan uji *One-way ANOVA*.

Hasil rerata ekspresi IL-17 yaitu (K-) $1,83 \pm 2,56$; (K+) $60,33 \pm 43,98$; (Kp) $16,17 \pm 12,76$. Hasil uji *One-way ANOVA* ($p < 0,05$) menunjukkan perbedaan dengan nilai signifikansi 0,001. Hasil uji *Post Hoc LSD* ($p < 0,05$) menunjukkan perbedaan bermakna antar semua kelompok yaitu nilai signifikansi (K-) dengan (K+) 0,001; (K-) dengan (Kp) 0,030; dan (K+) dengan (Kp) 0,004.

Kesimpulan penelitian ini *Lactobacillus brevis* berpengaruh secara signifikan terhadap ekspresi IL-17 pada bronkus tikus asma kronik.

Kata kunci : *Lactobacillus brevis*, Ovalbumin (OVA), Aluminium Hidroksida (Al(OH)₃), Interleukin-17 (IL-17), Asma

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Asma adalah penyakit peradangan kronis pada saluran pernapasan bawah yang diakibatkan oleh obstruksi dan inflamasi pada saluran napas sehingga mengganggu proses pernapasan. Pada individu yang terkena asma, biasanya menyebabkan suara napas mengi, sesak napas, dada sesak, dan batuk. Asma juga meningkatkan respons bronkus terhadap stimulan (Mims *et al*, 2015). Penyakit asma dapat menyerang semua kelompok usia mulai dari anak-anak hingga lansia (Tuomisto *et al.*, 2015). Berdasarkan hasil beberapa penelitian yang telah dilakukan, terdapat peran IL-17 dalam menentukan derajat keparahan asma. Tingginya ekspresi IL-17 dalam sputum serta mukosa saluran napas, menunjukkan tingkat derajat asma yang parah. Selain itu, IL-17 juga memiliki peran dalam *airway remodelling* serta kontraksi otot polos (Chesné *et al*, 2020). Tatalaksana asma yang sering diberikan masih berupa tatalaksana farmakologis. Obat-obat yang sering diberikan sebagai tatalaksana asma antara lain adalah agonis β_2 , kortikosteroid, teofilin, dan antileukotrien. Obat-obatan tersebut memiliki efek samping yang buruk apabila digunakan dalam pengobatan jangka panjang. Efek samping yang timbul dari penggunaan agonis β_2 yaitu, tremor, kram otot, palpitasi, ketegangan, sakit kepala, dan efek samping dari penggunaan kortikosteroid antara lain yaitu, *moon face*, *buffalo hump*, obesitas, kandidiasis, hipokalemia, dan hipertensi, sehingga diperlukan

tatalaksana alternatif asma kronik salah satunya menggunakan probiotik, yaitu mikrobiota hidup yang bila diberikan dalam jumlah memadai dapat memberikan manfaat kesehatan bagi *host* atau inang (Lestari & Helmyati, 2018). *Lactobacillus brevis* merupakan bakteri gram positif dan termasuk jenis bakteri asam laktat yang menunjukkan kemampuan dalam memodulasi sistem imun, sehingga dapat mengurangi tingkat keparahan reaksi hipersensitivitas alergi tipe I dan menunjukkan adanya penurunan kadar IgE serta menghambat sitokin Th2 dan Th17, juga menginduksi produksi sitokin Th1 pada tikus yang diinduksi ovalbumin (Segawa *et al.*, 2008).

Asma menjadi salah satu masalah kesehatan yang serius dan sering kali mendapatkan perhatian di dunia. Prevalensi terjadinya asma di dunia, berdasarkan data dari *Global Initiative for Asthma* pada tahun 2020, berkisar dari 1-22% dari populasi di seluruh negara di dunia. Tercatat ada sekitar 358 juta penderita asma di seluruh dunia. Sebanyak 15-20% kematian orang dewasa disebabkan oleh asma. Setiap tahunnya asma mengakibatkan 495 ribu kematian di dunia. Hasil survei yang dilakukan *The Internasional Study of Asthma and Allergies in Childhood* (ISAAC) di Jakarta, Indonesia menunjukkan bahwa prevalensi anak usia 6-7 tahun adalah 4,1%, sedangkan untuk kelompok usia 13-14 tahun yang diambil di Jakarta Timur pada tahun 2001 menunjukkan prevalensinya 8,9% dan meningkat menjadi 13,4% pada tahun 2008. Data yang dikeluarkan oleh *Central for Disease Control and Prevention* (CDC) di tahun 2020 menyebutkan bahwa prevalensi asma di Amerika Serikat sekitar 25 juta orang penderita asma, dengan prevalensi

anak-anak (<18 tahun) sebanyak 4 juta orang dan kelompok usia sekolah (5-17 tahun) merupakan yang terbesar sebanyak 3 juta. *Central for Disease Control and Prevention* juga menyebutkan bahwa terdapat 4.145 kematian akibat asma di Amerika Serikat pada tahun 2020 dan sebanyak 204 kematian terjadi pada anak-anak dengan kelompok usia 12-17 tahun merupakan kelompok dengan kematian asma terbesar sebanyak 97 kematian. Asma juga merupakan penyakit yang sering ditemui di Indonesia. Hasil dari Riskesdas 2018 yang diselenggarakan oleh Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, prevalensi asma di Indonesia berada di angka 2,4 % dari semua umur penduduk. Terdapat enam provinsi yang mengalami peningkatan prevalensi asma, yaitu provinsi Kepulauan Riau, Bengkulu, Banten, DI Yogyakarta, Jawa Timur, dan Sulawesi Selatan (Kementerian Kesehatan RI, 2018). Laporan dari Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT), asma menjadi penyebab kematian terbanyak keempat atau sekitar 5,6% di Indonesia (Harsismanto *et al.*, 2020).

Proses inflamasi yang menyebabkan terjadinya asma biasanya disebabkan oleh mekanisme hipersensitivitas tipe I yaitu *immunoglobulin E* (IgE) dan aktivasi sel T *helper* (Th) seperti Th1, Th2, dan Th17. Alergen yang masuk nantinya akan dikenali oleh *antigen-presenting cell* (APC) seperti *dendritic cell* (DC) dan *macrophage*, kemudian alergen tersebut diproses dan dipresentasikan kepada sel T yang nantinya akan memicu sel Th untuk sekresi sitokin atau interleukin (IL) dan sel plasma untuk produksi IgE serta mengaktivasi beberapa sel seperti sel mast, eosinofil, neutrofil,

basofil, limfosit untuk memproduksi mediator inflamasi (Mims *et al*, 2015). Penelitian yang dilakukan oleh Ciprandi *et al* (2022), menyatakan bahwa beberapa jenis probiotik seperti *Lactobacillus sp.*, *Bifidobacterium sp.*, dan *Streptococcus thermophilus* dapat menghambat proses inflamasi asma. Probiotik adalah mikrobiota yang memiliki efek menguntungkan untuk kesehatan inangnya jika diberikan dalam dosis yang tepat, baik dalam jangka pendek atau panjang. Penelitian yang dilakukan oleh Abrahamsson *et al* (2014), menyatakan bahwa ada hubungan yang kuat antara jumlah mikrobiota usus yang rendah dengan kejadian asma di masa kanak-kanak. Konsep *Gut-Lung Axis* menunjukkan bahwa mikrobiota komensal pada usus dapat memiliki efek yang jauh pada paru-paru dan sistem organ lainnya (Skalski *et al.*, 2018). Penelitian yang dilakukan oleh Lee *et al* (2013), pemberian probiotik *Lactobacillus brevis* secara oral menunjukkan adanya penurunan kadar IgE serta menghambat produksi Th2 dan Th17 serta menginduksi produksi Th1.

Berdasarkan latar belakang yang telah dijelaskan, hingga saat ini masih sedikit penelitian yang menunjukkan peran serta manfaat probiotik khususnya *Lactobacillus brevis* dalam pengobatan penyakit asma. Dengan demikian, peneliti tertarik untuk melakukan penelitian pengaruh probiotik *Lactobacillus brevis* terhadap ekspresi IL-17 pada bronkus tikus *Sprague-Dawley* yang menderita asma kronik.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian pada latar belakang maka dapat dirumuskan suatu permasalahan sebagai berikut “Bagaimana pengaruh pemberian probiotik *Lactobacillus brevis* terhadap ekspresi IL-17 pada bronkus tikus (*Sprague-Dawley*) asma kronik?”

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh pemberian probiotik *Lactobacillus brevis* terhadap ekspresi IL-17 pada bronkus tikus asma kronik.

1.3.2. Tujuan Khusus

1.3.2.1. Mengetahui ekspresi IL-17 pada bronkus tikus asma kronik kontrol negatif yaitu kelompok yang tidak diinduksi OVA dan tidak diberikan probiotik *Lactobacillus brevis*.

1.3.2.2. Mengetahui ekspresi IL-17 pada bronkus tikus asma kronik kontrol positif yaitu kelompok yang diinduksi OVA tetapi tidak diberikan probiotik *Lactobacillus brevis*.

1.3.2.3. Mengetahui ekspresi IL-17 pada bronkus tikus asma kronik kelompok perlakuan yaitu kelompok yang diinduksi OVA dan diberikan probiotik *Lactobacillus brevis*.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

- 1.4.1.1. Sebagai dasar pengetahuan mengenai pemberian probiotik *Lactobacillus brevis* sebagai terapi komplementer pada penyakit asma
- 1.4.1.2. Sebagai dasar acuan dalam penelitian mengenai pemberian probiotik yang akan datang sebagai terapi komplementer penyakit asma jangka panjang.

1.4.2. Manfaat Praktis

- 1.4.2.1. Bagi klinisi
Memberikan informasi terapi asma kronik menggunakan pemberian probiotik *Lactobacillus brevis* sebagai terapi komplementer jangka panjang.
- 1.4.2.2. Bagi masyarakat
Membantu penderita asma mencegah dan mengurangi kekambuhan penyakit asma menggunakan probiotik *Lactobacillus brevis*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Interleukin-17

Interleukin-17 (IL-17) merupakan sitokin yang berperan dalam sistem kekebalan tubuh untuk melindungi tubuh dari penyakit mikroorganisme seperti jamur, protozoa, dan bakteri. Sitokin ini melindungi dengan cara menginduksi produk-produk gen seperti sitokin (TNF- α & IL-6), anti mikroba, zat radang, serta kemokin. Saat ini diketahui sel Th17 dan IL-17 terlibat dalam proses patogenesis beberapa penyakit imunologi dan inflamasi kronis. Selain itu, IL-17 juga memiliki peran memberi perlindungan terhadap beberapa penyakit keganasan seperti kanker (Onishi *et al*, 2010). Sel Th17 banyak ditemukan pada kelenjar timus, lapisan lamina propria pada mukosa, *synovial cavity*, dan *epithelial barrier* (Wu *et al*, 2018).

Interleukin-17 merupakan sitokin yang disekresikan sel Th17 dan termasuk dalam *glikoprotein disulfida-linked homodimeric* yang terdiri 155 asam amino dengan berat molekul 35 kilo Dalton (Park *et al*, 2010). Selain diproduksi oleh sel Th17, IL-17 juga diproduksi oleh sel T CD8⁺, sel Th2, sel NK, neutrofil, eosinofil, makrofag, dan sel T $\gamma\delta$ (Mason *et al*, 2015). Interleukin-17 memiliki enam varian, yaitu: IL-17A (IL-17), IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (dikenal juga sebagai IL-25), dan IL-17F. Interleukin-17 termasuk dalam sitokin pro-inflamasi karena berperan dalam menginduksi ekspresi mediator inflamasi yang terlibat dalam maturasi,

proliferasi, dan kemotaksis neutrofil (Witowski *et al.*, 2004). Peran IL-17 yang lain adalah mengaktivasi TNF- α , IL-1 β , IL-6, fibroblas, dan makrofag untuk mensekresikan GM-CSF. Sitokin-sitokin inilah yang terlibat dalam perubahan struktur saluran pernapasan (*airway remodelling*) pada paru-paru individu penderita asma (Molet *et al.*, 2001).

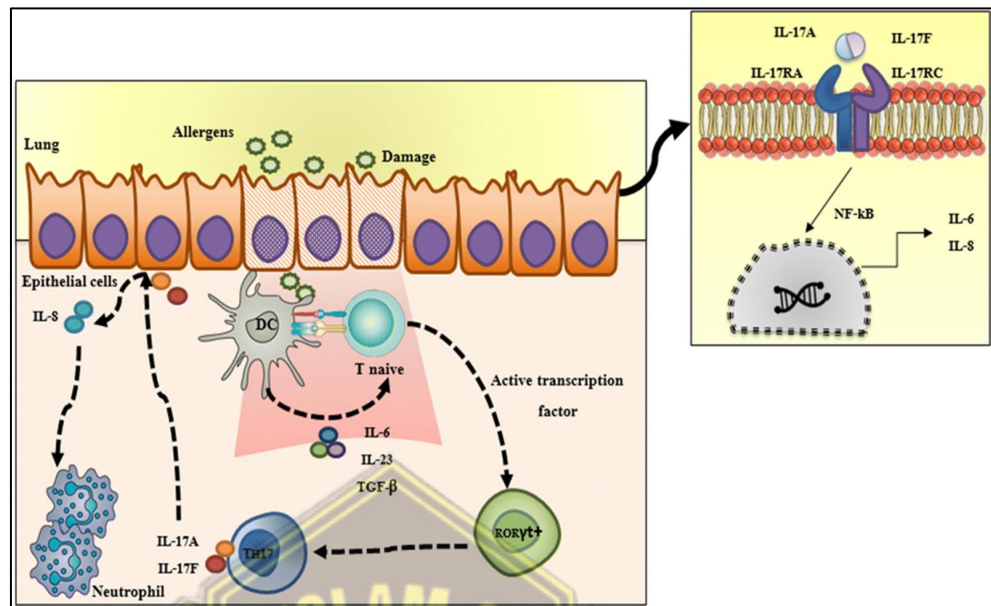
2.1.1. Hubungan IL-17 dengan Asma

Asma merupakan penyakit yang diakibatkan oleh proses peradangan yang dipengaruhi oleh peran sel limfosit T, eosinofil, neutrofil, makrofag, sel mast, dan sel epitel. Pada pasien asma, IL-17 meningkat pada jaringan paru, sputum, darah tepi, dan cairan cairan bilas bronkoalveolar (Kudo *et al.*, 2013). Ketika benda asing memasuki saluran pernapasan terjadi polarisasi respon sel limfosit T terhadap sel *T helper-2* (Th2) yang akan mengekskresikan beberapa sitokin seperti Interleukin-4 (IL-4), IL-5, IL-14 dan juga beberapa sel seperti sel mast, eosinofil, neutrofil, basofil, serta IgE (Mims *et al.*, 2015). Sitokin yang dilepaskan oleh Th2 penting untuk sintesis IgE, produksi kemokin, eosinofilia saluran napas, hiperplasia otot polos, produksi lendir, dan hiperresponsif saluran napas. Adanya inflamasi dan faktor lingkungan mengakibatkan aktivasi sel epitel pernapasan untuk melepaskan *Thymic Stromal Lymphopoietin* (TSLP) yang menarik mediator inflamasi yang lain. Sel dendritik menginduksi diferensiasi sel T menjadi sel Th1, Th2 serta sel Th17 dan diferensiasi ini diperantarai oleh *Signal Transducer and Activator of*

Transcription-3 (STAT3) dan NF- κ B yang diinduksi oleh IL-23 merupakan salah satu molekul yang memberi sinyal untuk diferensiasi sel Th17 dan kunci faktor untuk transkripsi adalah ROR γ t (Kudo *et al.*, 2013). Sel Th2 menginduksi IgE dari sel B dengan menstimulasi IL-4 dan IL-13. IgE berikatan dengan sel mast dan sel basofil kemudian mengseksresikan mediator inflamasi yang meningkatkan respon inflamasi dan menyebabkan bronkokonstriksi. IL-5 yang dihasilkan oleh sel Th2 menyebabkan eosinofilia. Makrofag, eosinofil, sel T dan neutrofil memproduksi mediator inflamasi yang menyebabkan *airway remodelling*, bronkokonstriksi, kerusakan pada saluran pernapasan, dan stimulasi sel epitel akibat inflamasi. Sel Th17 memproduksi IL-17 yang menginduksi sel epitel untuk memproduksi *Chemokine Ligand 2* (CCL2), CCL5, CCL11, IL-6, IL-8, *Tumor Necrosis Factor* (TNF), *Granulocyte and Macrophage Colony Stimulating Factor* (GM-CSF) yang merupakan agen kemotaktik dan mengaktifkan makrofag, neutrofil dan eosinofil.

Sel Th17 juga berperan pada airway remodeling dan menyebabkan hiperresponsivitas pada saluran napas dan terjadinya hiperplasi pada sel goblet. Interleukin-17 yang disekresikan oleh sel Th17 menstimulasi sel epitel dan sel otot polos pada bronkus untuk menghasilkan IL-6, IL-8, GM-CSF, TNF- α , serta GRO- α . IL-17 memiliki peran penting untuk migrasi neutrofil ke dalam saluran

napas. Neutrofil memproduksi sitokin seperti $\text{TNF-}\alpha$, IL-9, $\text{TGF-}\alpha$, $\text{TGF-}\beta$. *Tumor Growth Factor-}\alpha dan $\text{TGF-}\beta$ memiliki peran dalam *airway remodeling* karena $\text{TGF-}\alpha$ merangsang terjadinya proliferasi pada sel epitel, sedangkan $\text{TGF-}\beta$ berperan dalam terjadinya proses diferensiasi, proliferasi, serta proses produksi kolagen fibroblas. Neutrofil menghasilkan ROS, *nitrogen monoxide*, HNE, dan MMP-9 yang berperan dalam kerusakan terhadap jaringan serta ketidaknormalan mekanisme perbaikan. Neutrofil juga mensekresi neutrofil elastase, cathepsin-G, proteinase-3, serta mediator yang menyebabkan degranulasi pada sel goblet dan sel glandula submukosa (Setyowati *et al*, 2016). Penelitian yang dilakukan oleh (Agache *et al.*, 2010) menyebutkan bahwa pasien dengan asma kronik dan persisten memiliki respon yang rendah terhadap kortikosteroid serta neutrofil yang meningkat. Hal tersebut diakibatkan oleh peningkatan IL-17 yang merangsang kemotaksis neutrofil dalam sputum dan cairan bilas bronkoalveolar pasien asma jika dibandingkan dengan pasien yang sehat.*



Gambar 2.1. Peran IL-17 dalam Patogenesis Asma (Silva *et al.*, 2019).

2.2. Asma

Asma merupakan gangguan inflamasi kronik pada saluran nafas yang melibatkan banyak sel-sel inflamasi seperti eosinofil, sel mast, leukotrien dan lain-lain. Inflamasi kronik ini berhubungan dengan hiperresponsif jalan nafas yang menimbulkan episode berulang dari mengi (*wheezing*), sesak nafas, dada terasa berat dan batuk yang dapat berubah-ubah dalam hal kejadian, frekuensi maupun intensitasnya yang umumnya muncul dan sering menjadi parah/berat terutama pada malam dan pagi dini hari. Kejadian ini biasanya ditandai dengan obstruksi jalan napas yang bersifat reversibel baik secara spontan atau dengan pengobatan. Penyakit asma bersifat fluktuatif (hilang timbul) artinya dapat tenang tanpa gejala tidak mengganggu aktifitas tetapi dapat eksaserbasi dengan gejala ringan sampai berat bahkan dapat menimbulkan kematian.

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

1. Faktor pejamu (*host*), terdiri atas, genetik, jenis kelamin, ras, hiperresponsifitas saluran nafas, dan status gizi.
2. Faktor lingkungan, yang meliputi: paparan alergen (tungau debu, hewan peliharaan, kecoak, serbuk sari, jamur, asbestos, logam berat), asap (rokok, polutan udara), infeksi saluran napas baik yang disebabkan oleh virus, bakteri ataupun parasit, serta status sosial ekonomi rendah, dan juga obat-obatan.

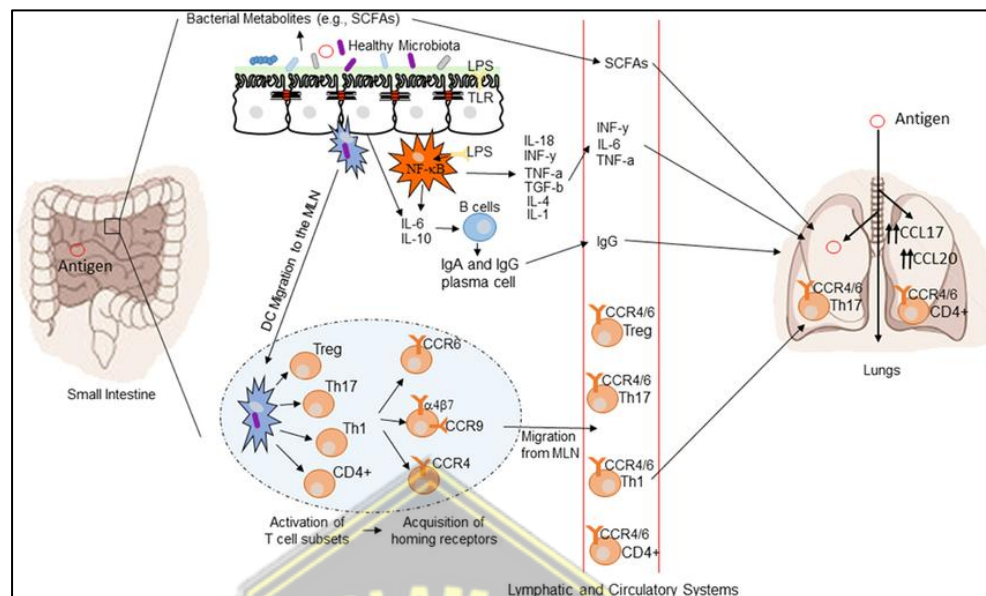
2.3. Konsep *Gut-Lung Axis*

Konsep *Gut-Lung Axis* mengindikasikan adanya hubungan antara efek mikrobiota usus dengan penyakit pada paru-paru (Skalski *et al.*, 2018). Sistem pencernaan manusia merupakan kumpulan dari berbagai organ yang berperan dalam proses pencernaan makanan. Tubuh manusia dihuni oleh triliunan mikrobiota seperti bakteri, fungi, protozoa, dan virus yang tersebar di kulit, usus, mulut, hidung, vagina, saluran pernapasan. Usus adalah bagian tubuh manusia dengan koloni mikrobiota terbanyak (Marsland *et al.*, 2015). Mikrobiota dapat mempertahankan kondisi homeostasis suatu jaringan, hasil ligan dari bakteri komensal serta produk sampingannya dapat mempengaruhi dan meningkatkan sistem kekebalan imun mukosal sehingga melindungi dari infeksi bakteri dan virus. Hasil studi epidemiologi menyatakan bahwa adanya hubungan yang kuat antara perubahan koloni

mikrobiota dengan tingkat kerentanan terhadap penyakit alergi saluran pernapasan seperti asma (Dang *et al*, 2019). Mikrobiota bekerja dengan baik jika dalam kondisi seimbang (*eubiosis*), namun jika dalam kondisi tidak seimbang (*dysbiosis*) maka dapat mengganggu sistem imun tubuh (Elizabeth *et al.*, 2015). Efek yang jauh ini dapat dicapai dengan sistem limfatik mesenterika yang berperan penting sebagai jalur pembawa mikrobiota dan hasil metabolismenya melewati *intestinal mucosal barrier* menuju ke peredaran darah sistemik, kemudian ke paru-paru, sehingga bisa memodulasi respons imun di paru-paru (Enaud *et al.*, 2020).

Hasil akhir dari metabolisme mikroba usus yang memfermentasi karbohidrat yang tidak tercerna seperti serat dan pati resisten akan menghasilkan asam lemak rantai pendek / *short-chain fatty acids* (SCFA). Asam lemak rantai pendek (SCFA) tersusun atas asetat, propionat, dan butirat dengan perbandingan 3:1:1, yang mana asetat merupakan komponen penyusun yang dominan dan diikuti propionat, serta butirat. Jenis bakteri seperti *Lactobacillus sp.* dan *Bifidobacterium sp.* menggunakan laktat yang bereaksi dengan asetat untuk membentuk butirat yang kemudian menyusun SCFA, yang memberikan efek anti inflamasi pada sel imun melalui mekanisme epigenetik seperti inhibisi deasetilase histon terkait butirat / *butyrate-associated histone deacetylase* (HDAC) inhibition. *Short-Chain Fatty Acids* (SCFA) memainkan peranan penting dalam meregulasi diferensiasi sel Treg sehingga SCFA muncul sebagai mekanisme yang menghubungkan mikrobiota usus, nutrisi, dan patogenesis asma. Kerusakan

pada fungsi Treg dapat menyebabkan kegagalan kemampuannya mensupresi respon sel Th2 yang berlebih sehingga mengganggu keseimbangan dan menyebabkan asma. Inhibisi HDAC oleh butirrat dapat meningkatkan diferensiasi sel Treg dan sel dendritik (DC) melalui mekanisme aktivasi *G-protein coupled receptors* (GPCRs) dan reseptor *free fatty acid 2 & 3* (FFA2, FFA3). Butirat mampu memperbaiki peradangan pada usus dengan menghambat aktivasi *Nuclear factor- κ B* (NF- κ B) di limfosit-B dan menginduksi regulasi dari ekspresi *peroxisome proliferator-activated receptor γ* (PPAR γ). Faktor transkripsi dari NF- κ B berikatan dengan inhibitor protein kappa B (I κ B) yang difosforilasi oleh kappa B kinase (IKK), seperti IKK- β / IKK-2, yang mempengaruhi potensi transaktivasi mediator inflamasi sel epitel paru sehingga menyebabkan asma. Butirat juga mensupresi sekresi sitokin pro-inflamasi dan ekspresi GATA3 pada *type-2 innate lymphoid cell* (ILC2) di paru-paru. *Type-2 Innate Lymphoid Cell* (ILC2) berfungsi memproduksi sitokin pro-inflamasi dan hiperekspresi dari faktor transkripsi GATA3 meningkatkan ekspresi ST2 dan reseptor TSLP di ILC2 paru-paru sehingga mengarah ke kejadian asma (Alsharairi *et al*, 2020; McKenzie *et al*, 2014; Stier *et al*, 2017).



Gambar 2.2. Figur *Gut-Lung Axis*
(Samuelson *et al.*, 2015).

2.4. Probiotik *Lactobacillus brevis*

Taksonomi bakteri *Lactobacillus brevis* sebagai berikut :

Kingdom : *Bacteria*
 Divisi : *Firmicutes*
 Kelas : *Bacilli*
 Ordo : *Lactobacillales*
 Famili : *Lactobacillaceae*
 Genus : *Lactobacillus*
 Species : *Lactobacillus brevis*

Lactobacillus brevis adalah bakteri gram positif, termasuk golongan Bakteri Asam Laktat (BAL) *heterofermentatif* yang tumbuh optimal pada suhu 30°C dan pH 4-6 (Feyereisen *et al.*, 2019). Pertumbuhan bakteri asam laktat dapat menghasilkan suatu zat yang disebut bakteriosin yang

mengganggu perkembangbiakan dari bakteri patogen dengan (Aliya *et al.*, 2016). *Lactobacillus sp.* merupakan flora normal yang sering ditemui pada sistem pencernaan (Kusumo, 2012).

Lactobacillus brevis memiliki panjang sekitar 2,0 – 3,0 μm dengan lebar 0,7– 0,1 μm . Bakteri ini berbentuk batang pendek dan lurus. *Lactobacillus brevis* tumbuh secara tunggal maupun membentuk rantai pendek. *Lactobacillus brevis* memproduksi asam laktat-DL dan karbondioksida dari fruktosa dan glukosa. *Lactobacillus sp.* mampu mendegradasi selulosa dan mengubahnya menjadi glukosa dengan menggunakan enzim selulase. (Utama *et al.*, 2018).

Interaksi antara inang dengan *C-type Lectin Receptor* (CLR) dengan mikrobiota usus dalam sistem pencernaan memainkan peranan penting dalam homeostasis sistem imun bawaan. *Lactobacillus brevis* memiliki lapisan permukaan atau *S-layer* yang dapat memodulasi sel T dan *Dendritic Cells* (DC) serta modulasi sitokin anti-inflamasi dan pro-inflamasi. *S-layer* dapat berikatan dengan *Macrophage-inducible C-type lectin receptor* (Mincle) yang merupakan jenis *Syk-coupled* CLR yang berkontribusi pada komensalisme di mukosa. *C-type Lectin Receptor* (CLR) adalah reseptor *pattern recognition* yang berperan penting dalam respon imun bawaan. *S-layer* yang berikatan dengan reseptor Mincle dapat memodulasi GM-CSF dan *Bone Marrow-derived Cell* (BMDC) yang dapat menghasilkan *Dendritic Cells* serta menginduksi produksi sitokin anti-inflamasi seperti IL-10. Interaksi antara *S-layer* dan reseptor Mincle dapat memelihara

keseimbangan sitokin dengan cara memicu sitokin pro-inflamasi dan sitokin anti-inflamasi (Prado Acosta *et al.*, 2021)



Gambar 2.3. *Lactobacillus brevis* dengan pewarnaan Gram dan perbesaran kuat (Teixeira *et al.*, 2014).

2.5. Pengaruh Probiotik Terhadap Mekanisme Asma

Sistem pencernaan memiliki kontribusi penting dalam homeostasis sistem imun bawaan. Probiotik memiliki kemampuan untuk memodulasi sistem imun inangnya dengan cara merangsang respon imun spesifik dan nonspesifik melalui aktivasi makrofag dan peningkatan sitokin, sel NK, IgA dan limfosit-T. Mikrobiota usus berperan dalam sistem kekebalan tubuh untuk memastikan homeostasis dan simbiosis. Koloni mikrobiota di usus sangat dibutuhkan untuk perkembangan sistem imun bawaan dan sistem imun adaptif, serta penting untuk maturasi dari Th1 dan Treg selama masa

kanak-kanak. Ketika bakteri komensal dan patogen seimbang, sel epitel usus mensekresikan mediator REGIII γ , TSLP, IL-33, IL-25 dan TGF- β , yang bertanggung jawab terhadap toleransi pada makrofag dan sel dendritik. Sel dendritik menstimulasi produksi TGF- β dan asam retinoat oleh Treg, yang terkait dengan makrofag dan sel dendritik yang memicu diferensiasi Treg, yang akan menghasilkan zat anti inflamasi di lumen usus. Selain itu, TGF- β memproduksi IgA untuk mengaktifasi sel. (Crovesy *et al.*, 2017)

Dalam keadaan *dysbiosis*, ada ketidakseimbangan antara bakteri komensal dan patogen. Komposisi mikrobiota usus berbeda antara anak dengan penyakit atopik dan anak yang sehat. Anak dengan penyakit atopik memiliki jumlah *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, dan *Bacteroides sp* yang lebih rendah (Shen & Wong, 2016). Hal ini akan menciptakan lingkungan inflamasi, peningkatan mikroba patogen, dan menstimulasi sel epitel usus, sel dendritik, makrofag, dan sitokin inflamasi. Hal ini akan meningkatkan diferensiasi sel Th17 sehingga menyebabkan inflamasi kronis. Sel Th17 bersama dengan sel sistem imun tubuh menghasilkan IL-22, yang mempromosikan ekspresi REGIII γ dan REGIII β , sehingga mengganggu mikrobiota usus. (Crovesy *et al.*, 2017)

Lactobacillus brevis memiliki kecenderungan untuk menginduksi sitokin Th1 dan menghambat sitokin Th2 serta Th17 sehingga dapat menurunkan IL-17 (Owaga *et al.*, 2015). Hasil tersebut mengungkapkan bahwa *Lactobacillus brevis* berguna untuk merepresentasikan proses anti-alergi melalui pemberian oral. Pemberian *Lactobacillus sp* secara oral

efektif sebagai imunomodulator pada tikus yang disensitasi oleh ovalbumin (OVA) yang ditunjukkan dengan adanya penurunan kadar IgE spesifik ovalbumin dan IgE serta menghambat sitokin Th2 dan Th17 serta menginduksi produksi sitokin Th1 (Lee *et al.*, 2013).

2.6. Tikus Model Asma

Tikus digunakan dalam penelitian karena imunoglobulin E (IgE) merupakan antibodi utama terhadap alergi pada tikus. Tikus yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus *Sprague-Dawley* karena lebih tenang dan lebih mudah dalam penanganannya dibandingkan tikus galur lain (Delwatta *et al.*, 2018). Tikus *Sprague-Dawley* betina dipilih karena tikus dengan kelamin betina lebih sensitif terhadap inflamasi alergi di saluran pernapasan dan lebih mudah mengalami *airway remodelling*. Tikus ini akan diinduksi dengan ovalbumin (OVA) sehingga menjadi tikus galur *Sprague-Dawley* model asma (Takeda *et al.*, 2013). Ovalbumin merupakan zat yang menyusun 60-65% putih telur dan memiliki 365 asam amino dengan berat molekul 45kDa. Ovalbumin dapat menginduksi sel Th17 yang dapat meningkatkan sekresi dari IL-17 (Toda & Yoshino, 2016). Pemberian ovalbumin secara oral, inhalasi, dan intraperitoneal dapat menciptakan reaksi hipersensitivitas tipe I dan meningkatkan produksi Th2 serta IgE (Cahiadewi *et al.*, 2016). Untuk meningkatkan proses terjadinya reaksi hipersensitivitas, maka perlu pemberian adjuvan seperti *alumunium hydroxide* ($\text{Al}(\text{OH})_3$). pemberian ovalbumin dan $\text{Al}(\text{OH})_3$ dapat menginduksi reaksi alergi pada bronkus sehingga menimbulkan hiperkontraksi dari otot

polos yang menyebabkan bronkokonstriksi akut (Fixman *et al.*, 2007). Pemberian Al(OH)_3 dapat meningkatkan produksi IL-1 β , IL-17, NLRP3, serta dapat memperpanjang dan menurunkan tingkat penyembuhan mukosa (Vignal *et al.*, 2016). Menurut (Florida, 2022), nilai normal IgE pada manusia usia <1 tahun adalah 0-15 IU/mL, usia 1-5 tahun adalah 0-60 IU/mL, usia 6-9 tahun adalah 0-90 IU/mL, usia 10-15 tahun adalah 0-200 IU/mL, dan pada orang dewasa adalah 0-100 IU/mL.

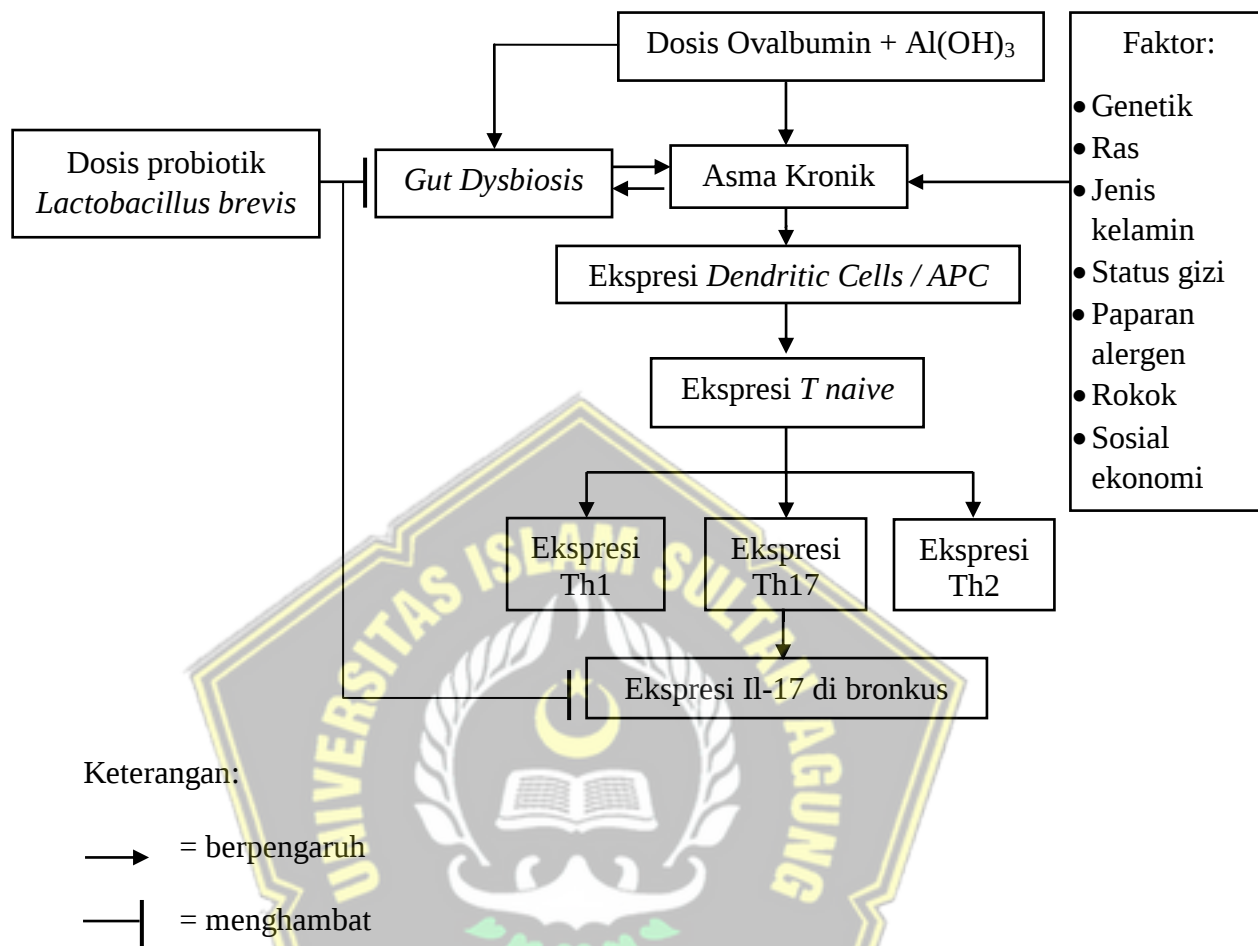
Tikus *Sprague-Dawley* akan disensitasi terlebih dahulu dengan ovalbumin(OVA) dan Al(OH)_3 melalui injeksi intraperitoneal yang dapat memproduksi peningkatan IgE dan perubahan ciri histologi pada jalan napas(Kucharewicz *et al.*, 2008). Antibodi IgE bertanggung jawab terhadap sensitisasi sel mast dan pengenalan antigen reaksi hipersensitivitas secara langsung (Iswanti *et al.*, 2018). Untuk membuat tikus menjadi asma kronik, dilakukan pemaparan inhalasi terus-menerus dan mengembangkan beberapa ciri asma manusia termasuk sensitasi alergen, peradangan alergi yang bergantung pada Th2 ditandai dengan masuknya eosinofilik ke dalam mukosa saluran napas dan hiperresponsivitas saluran pernapasan (Kianmehr *et al.*, 2016). Ovalbumin juga dapat menyebabkan terjadinya ketidakseimbangan flora normal pada usus (*gut dysbiosis*)(Yao *et al.*, 2021).



Gambar 2.4. Tikus *Sprague-Dawley*
(Taconic Biosciences, 2017)

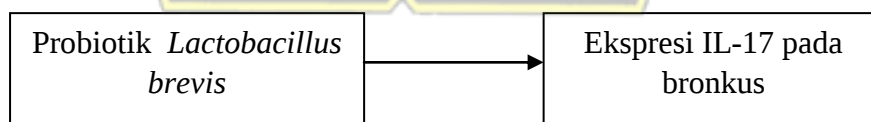


2.7. Kerangka Teori



Gambar 2.5. Kerangka Teori

2.8. Kerangka Konsep



Gambar 2.6. Kerangka Konsep

2.9. Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah terdapat pengaruh dalam pemberian *Lactobacillus brevis* terhadap ekspresi IL-17 pada bronkus tikus asma kronik.

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

3.1.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan bersifat eksperimental dengan menggunakan hewan uji coba berupa tikus *Sprague-Dawley*.

3.1.2. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *post test only control group design* yaitu rancangan penelitian yang dibagi dalam tiga kelompok yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif serta kelompok perlakuan yang diberikan perlakuan pemberian probiotik. Penelitian ini diujicobakan kepada 18 ekor tikus *Sprague-Dawley* yang dibagi secara acak dalam tiga kelompok dan tiap-tiap kelompok terdiri dari enam ekor tikus, yaitu:

K- : (X-) → O-

K+ : (X+) → O+

Kp : (Xp) → Op

Keterangan :

K- : Kelompok kontrol negatif

K+ : Kelompok kontrol positif

Kp : Kelompok perlakuan

X- : Tanpa perlakuan

X+ : Perlakuan dengan induksi ovalbumin + Al(OH)₃

Xp : Perlakuan dengan induksi ovalbumin + Al(OH)₃ dan pemberian probiotik *Lactobacillus brevis*.

O- : Pengamatan hasil kelompok kontrol negatif

O+ : Pengamatan hasil pada kelompok kontrol positif

Op : Pengamatan hasil pada kelompok perlakuan

3.2. Variabel dan Definisi Operasional

3.2.1. Variabel

3.2.1.1. Variabel Bebas

Lactobacillus brevis

3.2.1.2. Variabel Terikat

Ekspresi IL-17

3.2.2. Definisi Operasional

3.2.2.1. *Lactobacillus brevis*

Lactobacillus brevis adalah golongan bakteri Gram positif, yang termasuk dalam kelompok bakteri asam laktat yang menghasilkan asam laktat sebagai produk utama dari metabolisme glukosa. Bakteri ini berbentuk batang (basil), tidak membentuk spora, katalase negatif, bersifat anaerob, dan non motil. Probiotik *Lactobacillus brevis* diberikan ke tikus dengan dosis sebesar 2×10^8 cfu/ml (Fang *et al.*, 2009). Untuk mendapatkan dosis bakteri sebesar 2×10^8 cfu/ml maka dilakukan isolasi dengan menggunakan campuran medium *De Man, Rogosa, Sharpe Agar* (MRSA) dan 1% kalsium karbonat (CaCO_3) pada cawan petri. Larutan yang berisi *Lactobacillus brevis* diencerkan dengan faktor 10^5 atau 10^6 kemudian diambil dengan pipet dan diinokulasikan kedalam cawan petri berisi medium, kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C lalu dilakukan penghitungan

jumlah koloni bakteri per mL (Kautsar *et al.*, 2015). Dosis pemberian probiotik pada tikus adalah 1mL peroral tiap pemberian dan diberikan mulai hari ke-21 s.d. hari ke-63.

Skala data : nominal

3.2.2.2. Ekspresi IL-17

Ekspresi IL-17 yang didapat dengan antibodi merk Abclonal pada sitoplasma mukosa bronkus diamati menggunakan mikroskop cahaya merk Olympus CX21 dengan perbesaran 400x (lensa *ocular* 10x, lensa *objective* 40x) yang terhubung dengan kamera OptiLab dan perangkat lunak *OptiLab imaging viewer*. Pengecatan ekspresi IL-17 di bronkus menggunakan metode imunohistokimia. Metode *scoring* yang digunakan adalah *Hotspot score* yaitu jumlah proporsi sel yang menunjukkan tanda-tanda immunoreaktivitas sel yang ditandai dengan warna kecoklatan dibagian sitoplasma sel radang di bronkus yang diamati pada lima lapang pandang (Robertson *et al.*, 2020). Ekspresi IL-17 pada preparat diukur pada hari ke-69.

Skala data: rasio.

3.3. Populasi dan Sampel

3.3.1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah tikus *Sprague-Dawley* betina yang diperoleh dari Laboratorium Gizi Penelitian Antar Universitas (PAU) Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada (UGM) Yogyakarta.

3.2.1.1. Kriteria inklusi sebagai berikut :

1. Galur tikus : Tikus *Sprague-Dawley*. Tikus yang sehat adalah tikus dengan kondisi mata jernih serta bersih, tidak ada cacat pada tubuh dan anggota gerak, tidak ada bekas luka, bulu tikus tidak mudah rontok dan kusam, aktif bergerak, dan nafsu makan yang baik.
2. Jenis kelamin : betina
3. Berat badan : ± 300 gram
4. Usia : 1,5-2 bulan

3.2.1.2. Kriteria eksklusi sebagai berikut :

1. Tikus yang sakit sebelum penelitian.
2. Tikus yang terlihat cacat.
3. Tikus yang sebelumnya pernah digunakan untuk eksperimen lain.

3.2.1.3. Kriteria *drop out* sebagai berikut :

1. Tikus yang mati selama masa penelitian.
2. Tikus yang sakit selama masa penelitian.

3.3.2. Sampel

Besar sampel dalam penelitian ini sebanyak 18 ekor tikus *Sprague-Dawley* yang dibagi menjadi 3 kelompok tikus yaitu 1 kelompok kontrol tanpa perlakuan dan 2 kelompok perlakuan dengan tikus model asma tanpa pemberian probiotik dan perlakuan tikus model asma dengan pemberian probiotik. Sampel tiap kelompok diambil secara acak dengan masing-masing kelompok sebanyak 6 ekor tikus. Pertama, tikus diberikan label angka nomor 1 sampai 18, kemudian tikus dibagi dalam tiga kelompok secara acak tanpa sesuai urutan angka. Jumlah sampel hewan coba menurut WHO pada penelitian eksperimental yaitu minimal jumlah sampel pada tiap kelompok adalah 5 ekor tikus. Untuk mengantisipasi terjadinya *lost of follow* maka ditambahkan 1 ekor tikus untuk setiap kelompok (WHO, 2000).

3.4. Instrumen dan Bahan Penelitian

3.4.1. Instrumen

1. *Compressor Nebulizer*
2. Spuit 1cc dengan jarum ukuran 27G
3. Jarum sonde tikus
4. Instrumen bedah hewan (pisau *bistoury*, *scalpel*, pinset *chirurgis*, pinset anatomis, gunting)
5. Instrumen untuk pembuatan preparat bronkus
6. Mikroskop Olympus CX21

7. Kamera OptiLab
8. Kandang paparan tertutup (27cm × 20cm × 9cm)

3.4.2. Bahan Penelitian

1. Tikus *Sprague-Dawley*
2. Ovalbumin
3. Alumunium Hidroksida ($\text{Al}(\text{OH})_3$)
4. Ketamin 100mg
5. NaCl 0,9%
6. Bahan pembutaan preparat bronkus
7. Larutan penyangga formaldehida 10%
8. Larutan hidrogen peroksida (H_2O_2) 3%
9. Larutan *phosphate buffered saline* (PBS) pH 7,2 - 7,4
10. *Blocking* serum
11. Pengecatan *immunohistochemistry* (IHC)
12. Antibodi IL-17 merk Abclonal
13. Streptavidin
14. Larutan substrat peroksida *diaminobenzidin* (DAB)
15. Probiotik *Lactobacillus brevis*

3.5. Cara Penelitian

Tikus diadaptasikan terlebih dahulu selama satu minggu di laboratorium dan diberikan pakan diet standar serta air minum. Semua tikus ditempatkan dalam satu kandang. Setelah dilakukan adaptasi di kandang

selama satu minggu, tikus dibagi dalam tiga kelompok secara acak yaitu kelompok kontrol negatif (K-) yang tidak mendapat perlakuan; kelompok kontrol positif (K+) yang mendapatkan paparan ovalbumin dan kelompok perlakuan (Kp) yang mendapatkan paparan ovalbumin serta diberikan *L. brevis* peroral.

Tikus betina yang berumur 1,5-2 bulan pada umumnya berat badan sudah diketahui berkisar 200-300 gram, namun penimbangan berat badan tikus tetap dilakukan. Hal ini bertujuan untuk lebih memastikan bahwa tikus yang digunakan pada penelitian ini memang mempunyai berat badan berkisar 200-300 gram atau mempunyai berat badan yang seragam. Penimbangan berat badan ini juga bertujuan agar dosis pemberian ovalbumin lebih tepat. Setelah dilakukan penimbangan berat badan, tikus mulai diberi perlakuan. Untuk membuat tikus mengalami asma maka tikus disensitisasi dengan 10µg ovalbumin (OVA) dan 1mg Al(OH)₃ dalam 0,5cc NaCl 0,9% secara *intraperitoneal* (i.p) pada hari ke-0 dan diulangi lagi dengan cara yang sama di hari ke-14. Pemaparan dengan ovalbumin aerosol (secara inhalasi menggunakan *nebulizer*) dilakukan pada hari ke-21 sampai ke-63, tikus disensitasi inhalasi 1% OVA dalam normal saline (NaCl 0,9%). Aerosol diberikan selama 30 menit setiap 3 kali tiap minggunya selama 6 minggu dalam kandang paparan tertutup. Perlakuan untuk membuat tikus model asma juga dilakukan pada kelompok K+ dan Kp.

Kemudian, kelompok perlakuan (Kp), selain diberi perlakuan OVA&Al(OH)₃ pada hari ke-0 dan hari ke-14 secara *intraperitoneal*, serta

diberi perlakuan inhalasi OVA aerosol 3 kali tiap minggu dari hari ke-21 s.d. hari ke-63, tikus kelompok perlakuan juga diberi 1ml probiotik *Lactobacillus brevis* secara peroral yang diberikan setiap hari dari hari ke-21 s.d. hari ke-63. Hari ke-64 tikus diterminasi dengan injeksi intraperitoneal ketamine 200 µg/g (Locke *et al.*, 2007).

Setelah tikus dikorbankan, selanjutnya dilakukan pengumpulan sampel untuk pembuatan preparat. Untuk memastikan bahwa tikus sudah dalam keadaan asma kronik dapat dilihat dengan adanya indikator yang dapat diamati seperti penebalan otot polos di saluran napas, deposisi kolagen subepitel, dan fibrosis jaringan subepitel saluran napas (Ren Yuan *et al.*, 2017). Jaringan bronkus yang diberikan pewarnaan *immunohistochemistry* (IHC) digunakan untuk mengukur ekspresi IL-17.

3.5.1. Teknik Pembuatan Preparat

Teknik pembuatan preparat histopatologis bronkus (Muthmainah, 2011).

- a. Jaringan bronkus diambil.
- b. Fiksasi

Jaringan bronkus direndam dalam larutan fiksasi formaldehida (CH_2O) selama kurang lebih 3 jam.

- c. Dehidrasi

Jaringan bronkus direndam dalam alkohol 70% selama 24 jam, kemudian dalam alkohol 80% sebanyak 3 kali masing – masing 30 menit, alkohol 90% sebanyak 3 kali masing – masing

30 menit dan alkohol 96% sebanyak 2 kali masing – masing selama 15 menit.

d. *Clearing*

Jaringan bronkus direndam dalam *xylol* selama 15 menit.

e. *Embedding*

Jaringan bronkus direndam dalam *xylol* selama 24 jam pada suhu kamar kemudian direndam dalam parafin cair sebanyak empat kali dengan tiap perendaman 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.

f. *Pemotongan*

Blok parafin dipotong menggunakan mikrotom dengan ketebalan 3-4 μ m kemudian diletakkan pada *object glass* yang dilapisi *poly-L-lysine*, dan selanjutnya dinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam supaya jaringan melekat dengan baik.

g. *Deparafinisasi* :

- 1) Direndam dalam *xylol* I selama 5 menit
- 2) Direndam dalam *xylol* II selama 5 menit
- 3) Direndam dalam *xylol* III selama 5 menit
- 4) Direndam dalam *xylol* IV selama 5 menit

- 5) Direndam dalam alkohol 96% selama 5 menit
- 6) Direndam dalam alkohol 90% selama 5 menit
- 7) Direndam dalam alkohol 80% selama 5 menit
- 8) Direndam dalam alkohol 70% selama 5 menit
- 9) Dicuci dengan aquadest selama 5 menit
- h. Tetesi dengan hidrogen peroksida (H_2O_2) 3% selama 20 menit.
- i. Cuci dengan air mengalir selama 5 menit.
- j. Cuci lagi dengan aquadest selama 5 menit.
- k. Cuci dengan PBS selama 2×5 menit.
- l. Retrival antigen dilakukan pada microwave oven dengan Tris-EDTA pH 9 pada suhu tinggi sampai mendidih kemudian dilanjutkan pada suhu rendah hingga menit ke-10.
- m. Setelah dingin cuci dengan PBS selama 2×5 menit
- n. Tetesi dengan *blocking* serum selama 10 menit.
- o. Tiriskan, kemudian tetesi dengan antibodi yang telah disiapkan. Inkubasi pada suhu $4^\circ C$ selama 18 jam.
- p. Cuci dengan PBS selama 2×5 menit
- q. Tetesi dengan biotin selama 15 menit.
- r. Cuci dengan PBS selama 2×5 menit
- s. Tetesi dengan streptavidin selama 10 menit.
- t. Cuci dengan PBS selama 2×5 menit
- u. Pemberian substrat enzim peroksidase diaminobenzidin selama 3-5 menit

- v. Cuci dengan air bersih yang mengalir selama 10 menit.
- w. Tetesi dengan IHC selama 4 menit .
- x. Cuci dengan air mengalir selama 10 menit.
- y. Keringkan dengan diangin-anginkan kemudian ditutup dengan *deckglass*.
- z. Dilakukan pembacaan slide preparat dengan menggunakan mikroskop.

3.5.2. Teknik Pembacaan Slide

Slide atau preparat dilihat dengan mikroskop cahaya Olympus CX21. Seluruh bagian preparat dilihat dengan pembesaran 100× (lensa *objective* 10×, lensa *ocular* 10×) untuk menentukan letak bronkus yang nantinya akan dibaca. Pengamatan dengan mikroskop dengan pembesaran 400× (lensa *objective* 40×, lensa *ocular* 10×). Pengamatan ini dibantu dengan kamera OptiLab dan perangkat lunak *OptiLab Viewer*.

3.6. Tempat dan Waktu

3.6.1. Tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Gizi Penelitian Antar Universitas (PAU) Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada (UGM) Yogyakarta.

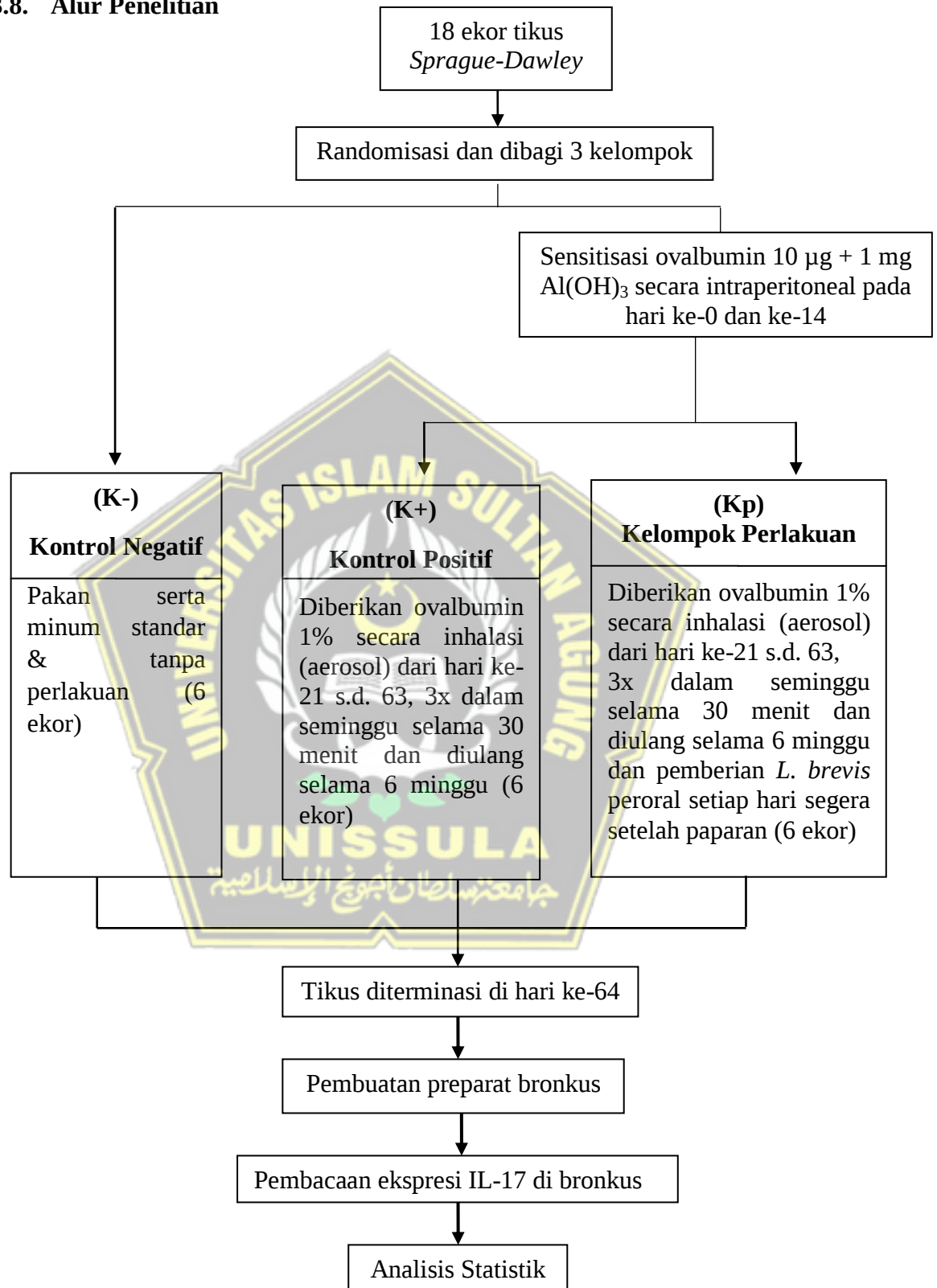
3.6.2. Waktu

Penelitian ini dilakukan selama 2 bulan (September 2022 – Oktober 2022)

3.7. Analisis Hasil

Pengolahan analisis data dilakukan menggunakan *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 26.0 for Windows* dan $p < 0,05$ dipilih sebagai tingkat signifikansinya. Data yang didapat diinput, ditabulasi, dan diedit. Data ekspresi IL-17 dalam bronkus tikus, kemudian dianalisis menggunakan uji deskriptif nilai *mean*, median, dan standar deviasi. Setelah itu, data diuji kembali dengan uji normalitas menggunakan *Saphiro-Wilk Test* ($p > 0,05$) dan uji homogenitas menggunakan *Levenne Test* ($p > 0,05$). Didapatkan hasilnya tidak normal dan tidak homogen maka dilanjutkan dengan transformasi data menggunakan Log_{10} dan kembali diuji normalitas dan homogenitas sehingga didapatkan hasilnya data berdistribusi normal dan homogen, kemudian data dilakukan uji parametrik *One Way ANOVA (Analysis of variance)* ($p < 0,05$) dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Test LSD (Least Significant Difference)* ($p < 0,05$).

3.8. Alur Penelitian



Gambar 3.1. Alur Penelitian

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

Penelitian mengenai pengaruh *Lactobacillus brevis* terhadap ekspresi IL-17 pada bronkus tikus dilaksanakan di Laboratorium Gizi Pusat Studi Pangan dan Gizi (PSPG) PAU Universitas Gadjah Mada (UGM) Yogyakarta yang berlangsung selama 64 hari. Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental dengan rancangan penelitian *post test only control group design* menggunakan tikus *Sprague-Dawley* betina sebagai hewan coba. Penelitian ini menggunakan 18 ekor tikus berumur 6-8 minggu dengan berat ± 300 gram yang dibagi dan dirandomisasi menjadi 3 kelompok dan tiap kelompoknya berisi 6 ekor tikus. Kelompok pertama adalah kelompok kontrol negatif (K-) yang tidak diberi perlakuan, kelompok kedua yaitu kelompok kontrol positif (K+) yang diberi perlakuan dengan OVA inhalasi 1% pada hari ke-21 s.d. hari ke-63 sebanyak 3 kali tiap minggu selama 6 minggu agar menghasilkan tikus model asma kronik, dan kelompok ketiga yaitu kelompok perlakuan (Kp) yang diberi perlakuan dengan OVA inhalasi 1% pada hari ke-21 s.d. hari ke-63 sebanyak 3 kali tiap minggu selama 6 minggu dan ditambah dengan probiotik *Lactobacillus brevis* peroral setiap hari selama 6 minggu dengan dosis sebesar 2×10^8 cfu/ml. Pada tikus ini telah dilakukan pemeriksaan validasi asma dengan menggunakan tolok ukur IgE. Pembacaan rerata kadar IgE serum pada kelompok kontrol negatif (K-) tanpa sensitasi OVA didapatkan hasil 61,1

ng/mL, pada kelompok kontrol positif (K+) dan kelompok perlakuan (Kp) dengan sensitasi OVA didapatkan hasil 74,9 ng/mL, sehingga terbukti bahwa sensitasi OVA pada tikus dalam penelitian ini dapat membuat tikus mengalami asma dan peningkatan kadar IgE serum. Pada hari ke-64 tikus diterminasi dan dilakukan pengambilan jaringan bronkus untuk proses pembuatan preparat.



Gambar 4.1. Preparat Ekspresi IL-17 pada Bronkus Tikus

Preparat bronkus kemudian diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya *Olympus CX-21* yang dilengkapi dengan kamera *OptiLab* dan dihubungkan dengan komputer yang sudah terpasang perangkat lunak *OptiLab Viewer*. Pengamatan dilakukan dengan perbesaran lensa okuler 10×, dan perbesaran lensa objektif 4×, 10×, dan 40×. Ekspresi IL-17 diukur dengan menghitung jumlah sel yang sitoplasmanya berwarna kecoklatan

yang sudah dilakukan pengecatan *imunohistokimia* dan dilakukan skoring dengan metode *hotspot score*.

Tabel 4.1. Hasil perhitungan *Hotspot Score* ekspresi IL-17 pada bronkus

Kelompok	(n)	Tikus						Total
		I	II	III	IV	V	VI	
K-	6	6	4	0	0	1	0	11
K+	6	49	51	135	74	53	0	362
Kp	6	3	5	12	38	20	19	97

Keterangan: (n) = jumlah tikus

Tabel 4.1 menunjukkan ekspresi IL-17 pada sampel preparat histopatologis jaringan bronkus dengan menggunakan *hotspot score* di ketiga kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif (K-), kelompok kontrol positif (K+) dan kelompok perlakuan (Kp). Metode skoring *hotspot* merupakan skoring pada sampel preparat dengan mengitung jumlah proporsi sel yang mengalami tanda-tanda imunoreaktivitas yaitu sel yang memiliki sitoplasma berwarna kecoklatan pada sel-sel radang pada bronkus. Hasil perhitungan *hotspot score*, kemudian dilakukan analisis deskriptif.

Tabel 4.2. Hasil uji deskriptif dan parametrik ekspresi IL-17 pada bronkus

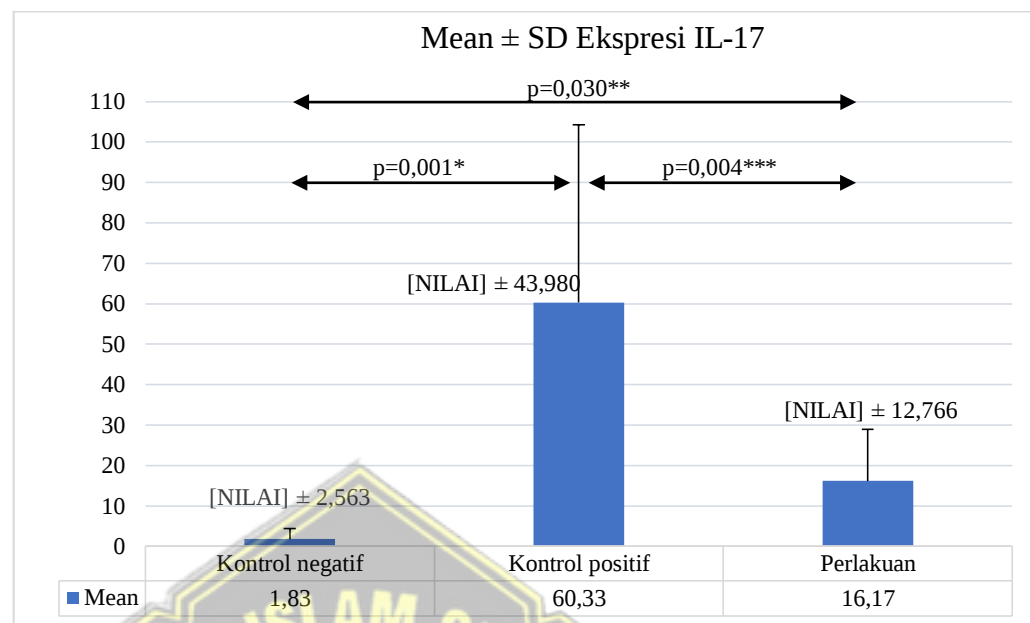
Kelompok	(n)	Mean	SD	Min	Maks	ANOVA ($p<0,05$)
K-	6	1,83	2,563	0	6	
K+	6	60,33	43,980	0	135	0,001*
Kp	6	16,17	12,766	3	38	

Keterangan: * = signifikan ($p<0,05$); (n) = jumlah tikus

Tabel 4.2 menunjukkan bahwa *mean* ekspresi IL-17 pada bronkus kelompok kontrol positif (K+) adalah yang paling tinggi dengan *mean* nilai proporsi sebesar 60,33; kemudian diikuti oleh kelompok perlakuan (Kp)

dengan *mean* nilai proporsi sebesar 16,83; dan terakhir adalah kelompok kontrol negatif (K-) dengan *mean* nilai proporsi sebesar 1,83. Kelompok kontrol negatif (K-) yang tidak mendapatkan perlakuan memiliki nilai standar deviasi sebesar 2,56; kelompok kontrol positif (K+) yang mendapatkan perlakuan OVA memiliki nilai standar deviasi sebesar 43,98; kemudian kelompok perlakuan (Kp) yang mendapatkan perlakuan OVA dan pemberian probiotik memiliki nilai standar deviasi sebesar 12,76. Data *hotspot score* IL-17 kemudian dilakukan uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* ($p > 0,05$) karena jumlah sampel ≤ 30 dan uji homogenitas *Levenne Test* ($p > 0,05$), serta dilakukan uji parametrik *One-Way ANOVA*.

Data penelitian yang diperoleh merupakan data yang berdistribusi secara normal dan homogen dengan nilai uji normalitas *Shapiro-Wilk* kelompok kontrol negatif (K-) adalah 0,415; kelompok kontrol Positif (K+) adalah 0,082; kelompok perlakuan (Kp) adalah 0,724; serta nilai dari uji homogenitas *Levenne Test* adalah 0,224; selanjutnya dari data tersebut dilakukan uji hipotesis menggunakan uji parametrik *one-way ANOVA* dan didapatkan hasil 0,001 ($p < 0,05$). Sehingga dapat disimpulkan bahwa pengaruh *Lactobacillus brevis* terhadap ekspresi IL-17 pada bronkus tikus memiliki hubungan yang signifikan. Data penelitian kemudian diuji dengan *Post Hoc Test LSD (Least Significant Difference)* untuk mencari nilai beda nyata terkecil antar kelompok penelitian.



Gambar 4.2. Diagram batang ekspresi IL-17 pada bronkus

Keterangan Gambar 4.2 :

- * = Uji Post Hoc LSD ($p < 0,05$) kelompok kontrol negatif (K-) dengan kelompok kontrol positif (K+) signifikan dengan nilai $p = 0,001$. Hasil uji ANOVA ($p < 0,05$) signifikan dengan nilai $p = 0,001$.
- ** = Uji Post Hoc LSD ($p < 0,05$) kelompok kontrol negatif (K-) dengan kelompok perlakuan (Kp) signifikan dengan nilai $p = 0,030$. Hasil uji ANOVA ($p < 0,05$) signifikan dengan nilai $p = 0,001$.
- *** = Uji Post Hoc LSD ($p < 0,05$) kelompok kontrol positif (K+) dengan kelompok perlakuan (Kp) signifikan dengan nilai $p = 0,004$. Hasil uji ANOVA ($p < 0,05$) signifikan dengan nilai $p = 0,001$.

Gambar 4.2 memperlihatkan bahwa kelompok kontrol negatif (K-) memiliki nilai *mean* dan standar deviasi sebesar $1,83 \pm 2,56$; sedangkan kelompok kontrol positif (K+) memiliki nilai *mean* dan standar deviasi sebesar $60,33 \pm 43,98$; kemudian kelompok perlakuan memiliki nilai *mean* dan standar deviasi sebesar $16,17 \pm 12,76$.

4.2 Pembahasan

Penelitian eksperimental mengenai pengaruh pemberian probiotik *Lactobacillus brevis* terhadap ekspresi IL-17 pada bronkus tikus asma kronik telah selesai dilaksanakan menggunakan metode *post-test only control group design* dengan menggunakan 18 ekor tikus *Sprague-Dawley* betina yang terbagi secara *random* dalam 3 kelompok dan tiap kelompoknya berjumlah 6 ekor. Terdapat kelompok kontrol negatif (K-) sebagai kelompok kontrol yang tidak diberi perlakuan dan hanya diberikan pakan diet standar. Kelompok kontrol positif (K+) diberikan perlakuan dengan ovalbumin (OVA) agar tikus menjadi asma dan tidak diberikan perlakuan probiotik. Kelompok perlakuan (Kp) diberikan perlakuan OVA agar tikus menjadi asma dan dilakukan pemberian probiotik *Lactobacillus brevis*.

Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian untuk mencari dan mengidentifikasi kegunaan probiotik *Lactobacillus brevis* sebagai terapi komplementer pada penyakit asma kronik. Penelitian ini mengidentifikasi manfaat probiotik *Lactobacillus brevis* dalam memodulasi sistem imun khususnya pada ekspresi sitokin pro-inflamasi IL-17 yang berada pada bronkus tikus model asma. Ekspresi IL-17 pada bronkus akan menghasilkan sel radang yang berwarna kecoklatan pada bagian sitoplasma di bronkus.

Berdasarkan hasil analisis data, diketahui bahwa kelompok kontrol positif (K+) yang diinduksi dengan OVA memiliki nilai *mean* ekspresi IL-17 yang tertinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif dan kelompok perlakuan. Ovalbumin (OVA) merupakan protein yang terdapat

dalam putih telur memiliki kemampuan untuk memodulasi sistem imun sehingga dapat menginduksi dan meningkatkan IL-17. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Toda & Yoshino (2016) yang menyatakan bahwa tikus yang diinduksi oleh ovalbumin memiliki kadar ekspresi IL-17 yang signifikan dikarenakan ovalbumin menginduksi sel Th17 yang dapat meningkatkan sekresi IL17. Penelitian (Toda & Yoshino, 2016) dilakukan selama 21 hari dengan dosis 100µg ovalbumin dan 500µL Al(OH)₃. Induksi ovalbumin juga mempengaruhi peningkatan neutrofil akibat migrasi neutrofil yang dimediasi oleh IL-17 (Zenobia & Hajishengallis, 2016).

Ekspresi IL-17 kelompok perlakuan (Kp) yang diberikan probiotik *Lactobacillus brevis* memiliki nilai yang lebih rendah apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (K+) dikarenakan pemberian *Lactobacillus brevis* yang dapat menurunkan ekspresi IL-17. Hal tersebut dikarenakan *Lactobacillus brevis* mampu untuk menginduksi sitokin Th1, menghambat sitokin Th2, serta Th17 sehingga dapat menyebabkan penurunan ekspresi IL-17 (Owaga *et al.*, 2015). Hasil tersebut sejalan dengan penelitian (Lee *et al.*, 2013) yang menyebutkan bahwa pemberian *Lactobacillus sp* secara oral efektif sebagai imunomodulator pada tikus yang disensitasi oleh ovalbumin (OVA) yang ditunjukkan dengan adanya penurunan kadar IgE spesifik ovalbumin dan IgE serta menghambat sitokin Th2 dan Th17 serta menginduksi produksi sitokin Th1. Penelitian yang dilakukan (Lee *et al.*, 2013) menunjukkan hasil yang sejalan dengan penelitian ini, dengan

pemberian 20µg + 20mg Al(OH)₃ secara intraperitoneal pada hari ke-0 dan ke-14, serta pemberian 2mg ovalbumin peroral setiap 2 hari selama 3 minggu. Penelitian yang dilakukan oleh (Chen *et al.*, 2015) yang menyebutkan bahwa pemberian probiotik *Lactobacillus sp* dapat menurunkan hiperresponsivitas imun akibat IL-17 & IL-23 yang diproduksi oleh Th17 serta menghambat sekresi sitokin proinflamasi IL-17 dengan menurunkan regulasi IL-23 dan TGF-β1 yang diperlukan untuk diferensiasi dan stabilisasi sel Th17. Penelitian yang dilakukan oleh (Lim *et al.*, 2016) menyebutkan bahwa pemberian *Lactobacillus brevis* dapat menghambat aktivasi makrofag dan mengembalikan keseimbangan Th17 dan Treg. Penelitian ini juga menyebutkan bahwa pemberian *Lactobacillus brevis* menghambat diferensiasi sel splenosit menjadi sel Th17 (Lim *et al.*, 2016). Hasil ini sejalan dengan dengan penelitian (Jang *et al.*, 2013) yang menyatakan bahwa pemberian probiotik *Lactobacillus brevis G-101* mampu menghambat aktivasi NF-κB dan hambat polarisasi makrofag dengan cara menginhibisi jalur IRAK1/NF-κB, MAPK, serta AKT dengan mempolarisasi makrofag M1 menjadi mirip makrofag M2. Penelitian yang dilakukan oleh (Sredkova *et al.*, 2021) mengatakan bahwa perlakuan terapi dengan probiotik *Lactobacillus brevis* dan *Xylooligosaccharides*(XOS) pada tikus yang diinduksi 100µg *Collagen type-II* (CII) dari *Bovinae*, dapat menurunkan IL-17, IL-6, TNF-α, dan IFN-γ, serta dapat meningkatkan sitokin anti-inflamasi seperti IL-10, dan TGF-β, sehingga dapat disimpulkan dari penelitian yang dilakukan oleh (Sredkova *et al.*, 2021), bahwa probiotik

dapat memodulasi sistem imun, dan kemampuan tersebut bergantung pada *strain* probiotik dan substrat tempat probiotik tumbuh sehingga dapat menghasilkan imunomodulasi yang berbeda. Kemampuan imunomodulasi probiotik juga didukung oleh asupan nutrisi serta pola makan inangnya (Sredkova *et al.*, 2021). Penelitian yang dilakukan oleh (Susilorini *et al.*, 2020) dengan metode *Tahniq* menggunakan kurma Ajwa pada tikus galur Wistar, menyebutkan bahwa metode *Tahniq* mengarah kepada kekebalan imun pada bayi dengan mentransfer kolonisasi mikrobioma pada saliva orang dewasa ke dalam usus bayi untuk menghasilkan kolonisasi bakteri komensal yang baik seperti *Lactobacillus sp* dan *Bacteroides sp* yang sangat penting untuk menstimulasi efektor dan regulator sel T, dan mempengaruhi diferensiasi sel T, terutama Treg yang diinduksi / *induced Treg* (i-Treg), serta menstimulasi maturasi *dendritic cell* (DC) sehingga dapat menginduksi proliferasi dan diferensiasi dari limfosit sel CD8⁺T sistemik dan peningkatan regulasi ekspresi IL-12 sebagai sitokin anti-inflamasi.

Berdasarkan hasil analisis data lanjutan, terdapat perbedaan bermakna antar tiap kelompok penelitian. Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian *Lactobacillus brevis* dapat menurunkan ekspresi IL-17 pada bronkus tikus asma kronik akan tetapi pemberian *Lactobacillus brevis* sebagai probiotik belum mampu menurunkan ekspresi IL-17 menjadi normal seperti kelompok kontrol negatif (K-). Hal tersebut dikuatkan dengan nilai *mean* kelompok kontrol negatif yang lebih rendah apabila dibandingkan dengan kelompok perlakuan (Kp).

Keterbatasan dalam penelitian ini adalah tidak dilakukannya pemberian dosis yang bervariasi sehingga tidak dapat mengetahui tingkat efektivitas dari tiap dosis yang diberikan serta variasi durasi waktu pemberian, dan tidak dilakukannya penelitian pada tikus jantan.



BAB V

SIMPULAN DAN SARAN

5.1. Simpulan

- 5.1.1. Terdapat pengaruh pemberian probiotik *Lactobacillus brevis* yang signifikan terhadap ekspresi IL-17 pada bronkus tikus *Sprague-Dawley* asma kronik.
- 5.1.2. Ekspresi IL-17 pada bronkus tikus *Sprague-Dawley* kelompok kontrol negatif (K-) yang tidak diinduksi ovalbumin (OVA) memiliki nilai *mean* sebesar $1,83 \pm 2,563$.
- 5.1.3. Ekspresi IL-17 pada bronkus tikus *Sprague-Dawley* kelompok kontrol positif (K+) yang diinduksi ovalbumin (OVA) dan tidak diberikan probiotik memiliki nilai *mean* sebesar $60,33 \pm 43,980$.
- 5.1.4. Ekspresi IL-17 pada bronkus tikus *Sprague-Dawley* kelompok perlakuan (Kp) yang diinduksi ovalbumin (OVA) dan diberikan probiotik *Lactobacillus brevis* memiliki nilai *mean* sebesar $16,17 \pm 12,766$.
- 5.1.5. Perbandingan ekspresi IL-17 pada bronkus tikus *Sprague-Dawley* antara tikus kelompok kontrol negatif (K-), tikus kelompok kontrol positif (K+), dan tikus kelompok perlakuan (Kp) adalah signifikan.

5.2. Saran

Sesuai dengan keterbatasan dalam penelitian ini, maka saran untuk penelitian berikutnya di masa yang akan datang adalah:

- 5.2.1. Meneliti perbedaan pengaruh pemberian *Lactobacillus brevis* dalam dosis yang bervariasi terhadap ekspresi IL-17 pada bronkus tikus *Sprague-Dawley* asma kronik.
- 5.2.2. Melakukan penelitian pada tikus jantan.



DAFTAR PUSTAKA

- Agache, I., Ciobanu, C., Agache, C., & Anghel, M. (2010). Increased serum IL-17 is an independent risk factor for severe asthma. *Respiratory Medicine*, 104(8), 1131–1137. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2010.02.018>
- Aliya, H., Maslakah, N., Numrapi, T., Buana, A. P., & Hasri, Y. N. (2016). Pemanfaatan Asam Laktat Hasil Fermentasi Limbah Kubis Sebagai Pengawet Anggur Dan Stroberi. *Bioedukasi: Jurnal Pendidikan Biologi*, 8(2), 23. <https://doi.org/10.20961/bioedukasi-uns.v9i1.3878>
- Alsharairi, N. A. (2020). The role of short-chain fatty acids in the interplay between a very low-calorie ketogenic diet and the infant gut microbiota and its therapeutic implications for reducing asthma. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms21249580>
- Askar, M. (2020). *Patofisiologi untuk Teknologi Laboratorium Medis Buku Ajar* (M. Askar (ed.)). Unit Penelitian Politeknik Kesehatan Makassar.
- Cahiadewi, A. M., Santosa, I. Y., & Suprihati. (2016). Pengaruh Suplementasi Zink Terhadap Jumlah Eosinofil Pada Jaringan Paru Penderita Alergi Studi Eksperimental pada Mencit BALB/c dengan Sensitisasi Ovalbumin. *Suprihati JKD*, 5(4), 265–274.
- CDC. (2020). *Most Recent National Asthma Data*. https://www.cdc.gov/asthma/most_recent_national_asthma_data.htm
- Chen, L., Zou, Y., Peng, J., Lu, F., Yin, Y., Li, F., & Yang, J. (2015). *Lactobacillus acidophilus* suppresses colitis-associated activation of the IL-23/Th17 axis. *Journal of Immunology Research*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/909514>
- Chesné, J. (2020). *IL-17 in Severe Asthma Where Do We Stand ?* 190(10), 1094–1101. <https://doi.org/10.1164/rccm.201405-0859PP>
- Ciprandi, G., & Tosca, M. A. (2022). Probiotics in Children with Asthma. *Children*, 9(7), 1–13. <https://doi.org/10.3390/children9070978>
- Crovesy, L., Gonçalves, D. C., & Trigo, E. L. (2017). Probiotics in allergy treatment: A literature review. *Revista Espanola de Nutricion Humana y Dietetica*, 21(3), 293–299. <https://doi.org/10.14306/renhyd.21.3.361>
- Dang, A. T., & Marsland, B. J. (2019). Microbes, metabolites, and the gut–lung axis. *Mucosal Immunology*, 12(4), 843–850. <https://doi.org/10.1038/s41385-019-0160-6>

- Delwatta, S. L. (2018). *Reference values for selected hematological, biochemical and physiological parameters of Sprague-Dawley rats at the Animal House, Faculty of Medicine, University of Colombo, Sri Lanka - Delwatta - 2018 - Animal Models and Experimental Medicine - Wiley Onl.* <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ame2.12041>
- Elizabeth, F., Hasibuan, B., & Kolondam, B. J. (2015). *Interaction Between Gut Microbiota And The Human Immune System.* <https://dx.doi.org/10.35799/jis.17.1.2017.15221>
- Enaud, R., Prevel, R., Ciarlo, E., Beaufls, 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. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00009>
- Fang, S. Bin, Lee, H. C., Hu, J. J., Hou, S. Y., Liu, H. L., & Fang, H. W. (2009). Dose-dependent effect of *Lactobacillus rhamnosus* on quantitative reduction of faecal rotavirus shedding in children. *Journal of Tropical Pediatrics*, 55(5), 297–301. <https://doi.org/10.1093/tropej/fmp001>
- Feyereisen, M., Mahony, J., Lugli, G. A., Ventura, M., Neve, H., Franz, C. M. A. P., Noben, J. P., O'Sullivan, T., & Van Sinderen, D. (2019). Isolation and characterization of *Lactobacillus brevis* Phages. *Viruses*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/v11050393>
- Fixman, E. D., Stewart, A., & Martin, J. G. (2007). Basic mechanisms of development of airway structural changes in asthma. *European Respiratory Journal*, 29(2), 379–389. <https://doi.org/10.1183/09031936.00053506>
- Florida, U. of. (2022). *Immunoglobulin E (IgE), Total.* <https://pathlabs.ufl.edu/tests/test-directory-i/immunoglobulin-e-ige-total/>
- Harsismanto, J., Padila, P., Andri, J., Andrianto, M., & Yanti, L. (2020). Frekuensi Pernafasan Anak Penderita Asma Menggunakan Intervensi Tiup Super Bubbles dan Meniup Baling Baling Bambu. *Journal of Telenursing (JOTING)*, 2(2 SE-Articles). <https://doi.org/https://doi.org/10.31539/joting.v2i2.1409>
- Iswanti, F. C., Djauzi, S., Sadikin, M., Witarto, A. B., & Yamazaki, T. (2018). Comparison of ovalbumin sensitized mice model for allergy a preliminary study perbandingan mencit yang disensitisasi dengan ovalbumin. *EJournal Kedokteran Indonesia*, 6(3), 183–189. <https://doi.org/10.23886/ejki.6.9906.1>

- Jang, S. E., Hyam, S. R., Han, M. J., Kim, S. Y., Lee, B. G., & Kim, D. H. (2013). Lactobacillus brevis G-101 ameliorates colitis in mice by inhibiting NF- κ B, MAPK and AKT pathways and by polarizing M1 macrophages to M2-like macrophages. *Journal of Applied Microbiology*, 115(3), 888–896. <https://doi.org/10.1111/jam.12273>
- Jeongmin, L., Bang, J., & Woo, H. J. (2013). Immunomodulatory and anti-allergic effects of orally administered Lactobacillus species in ovalbumin-sensitized mice. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(5), 724–730. <https://doi.org/10.4014/jmb.1211.11079>
- Kautsar, R., Arief, I. I., & Suryati, T. (2015). Status of probiotics Lactobacillus plantarum IIA-2C12 of fermented sausage in Rattus norvegicus mice digestive system. *Jurnal Ilmu Produksi Dan Teknologi Hasil Peternakan*, 3(3), 166–170.
- Kementerian Kesehatan RI. (2018). Laporan Riskesdas 2018. *Laporan Nasional Riskesdas 2018*, 53(9), 154–165. [http://www.yankes.kemkes.go.id/assets/downloads/PMK No. 57 Tahun 2013 tentang PTRM.pdf](http://www.yankes.kemkes.go.id/assets/downloads/PMK_No_57_Tahun_2013_tentang_PTRM.pdf)
- Kianmehr, M., Rezaei, A., & Boskabady, M. H. (2016). Effect of carvacrol on various cytokines genes expression in splenocytes of asthmatic mice. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 19(4), 402–410.
- Kucharewicz, I., Bodzenta-lukaszyk, A., & Bucko, W. (2008). Experimental asthma in rats. *Pharmacological Reports*, 60(6), 783–788.
- Kudo, M., Ishigatsubo, Y., & Aoki, I. (2013). Pathology of asthma. *Frontiers in Microbiology*, 4(SEP), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00263>
- Kusumo, P. D. (2012). *Kolonisasi Mikrobiota Normal Dan Pengaruhnya Pada Perkembangan Sistem Imunitas Neonatal*. 29(320), 55–63.
- Lee, J., Bang, J., & Woo, H. J. (2013). Effect of orally administered Lactobacillus brevis HY7401 in a food allergy mouse model. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(11), 1636–1640. <https://doi.org/10.4014/jmb.1306.06047>
- Lestari, L. A., & Helmyati, S. (2018). Definisi, Sejarah, dan Perkembangan Probiotik. In *Peran Probiotik di Bidang Gizi dan Kesehatan* (pp. 1–2, 166). Gadjah Mada University Press.
- Lim, S.-M., Jeong, J.-J., Jang, S.-E., Han, M. J., & Kim, D.-H. (2016). A mixture of the probiotic strains Bifidobacterium longum CH57 and Lactobacillus brevis CH23 ameliorates colitis in mice by inhibiting macrophage activation and restoring the Th17/Treg balance. *Journal of Functional*

Foods, 27, 295–309.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.09.011>

- Marsland, B. J., Trompette, A., & Gollwitzer, E. S. (2015). The gut-lung axis in respiratory disease. *Annals of the American Thoracic Society*, 12(November), S150–S156. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201503-133AW>
- Mason, R. J., Slutsky, A., Murray, J. F., Nadel, J. A., Gotway, M. B., Broaddus, V. C., Ernst, J. D., King, T. E., & Sarmiento, K. F. (2015). *Murray & Nadel's Textbook of Respiratory Medicine E-Book*. Elsevier Health Sciences. <https://books.google.co.id/books?id=Hux1BwAAQBAJ>
- McKenzie, A. N. J. (2014). Type-2 innate lymphoid cells in asthma and allergy. *Annals of the American Thoracic Society*, 11, S263–S270. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201403-097AW>
- Mims, J. W. (2015). Asthma: Definitions and pathophysiology. *International Forum of Allergy and Rhinology*, 5(September), S2–S6. <https://doi.org/10.1002/alr.21609>
- Molet, S., Hamid, Q., Nutku, E., Pagé, N., Olivenstein, R., Elias, J., Chakir, J., & Haven, N. (2001). *IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines*. 430–438. <https://doi.org/10.1067/mai.2001.117929>
- Onishi, R. M., & Gaffen, S. L. (2010). Interleukin-17 and its target genes: Mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology*, 129(3), 311–321. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03240.x>
- Owaga, E., Hsieh, R. H., Mugendi, B., Masuku, S., Shih, C. K., & Chang, J. S. (2015). Th17 cells as potential probiotic therapeutic targets in inflammatory bowel diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9), 20841–20858. <https://doi.org/10.3390/ijms160920841>
- Park, S. J., & Lee, Y. C. (2010). *Interleukin-17 regulation: an attractive therapeutic approach for asthma*. 1–11.
- Prado Acosta, M., Goyette-Desjardins, G., Scheffel, J., Dudeck, A., Ruland, J., & Lepenies, B. (2021). S-Layer From *Lactobacillus brevis* Modulates Antigen-Presenting Cell Functions via the Mincle-Syk-Card9 Axis. *Frontiers in Immunology*, 12(March), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.602067>
- Robertson, S., Acs, B., Lippert, M., & Hartman, J. (2020). Prognostic potential of automated Ki67 evaluation in breast cancer: different hot spot definitions versus true global score. *Breast Cancer Research and Treatment*, 183(1),

161–175. <https://doi.org/10.1007/s10549-020-05752-w>

- Samuelson, D. R., Welsh, D. A., & Shellito, J. E. (2015). Regulation of lung immunity and host defense by the intestinal microbiota. *Frontiers in Microbiology*, 6(OCT). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01085>
- Segawa, S., Nakakita, Y., Takata, Y., & Wakita, Y. (2008). *Effect of oral administration of heat-killed Lactobacillus brevis SBC8803 on total and ovalbumin-specific immunoglobulin E production through the improvement of Th1 / Th2 balance.* 121, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.10.004>
- Setya Utama, C., & Hanim, C. (2018). Catatan Penelitian Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria Cellulolitik Originated from Fermented Cabbage Juice. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*, 7(1), 2018.
- Setyowati, A., & Aphridasari, J. (2016). *Peran Sel T- Helper 17 pada Asma.* 36(4), 257–266. <http://arsip.jurnalrespirologi.org/wp-content/uploads/2017/06/JRI-2016-36-4-257.pdf>
- Shen, S., & Wong, C. H. (2016). Bugging inflammation: role of the gut microbiota. *Clinical & Translational Immunology*, 5(4), e72. <https://doi.org/10.1038/cti.2016.12>
- Silva, M. D. J., De Santana, M. B. R., Tosta, B. R., Espinheira, R. P., Alcantara-Neves, N. M., Barreto, M. L., Figueiredo, C. A., & Costa, R. D. S. (2019). Variants in the IL17 pathway genes are associated with atopic asthma and atopy makers in a South American population. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*, 15(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13223-019-0340-7>
- Skalski, J. H., Limon, J. J., Sharma, P., Gargus, M. D., Nguyen, C., Tang, J., Coelho, A. L., Hogaboam, C. M., Crother, T. R., & Underhill, D. M. (2018). Expansion of commensal fungus *Wallemia mellicola* in the gastrointestinal mycobiota enhances the severity of allergic airway disease in mice. *PLoS Pathogens*, 14(9), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007260>
- Sredkova, P., Batsalova, T., Moten, D., & Dzhambazov, B. (2021). Prebiotics can change immunomodulatory properties of probiotics. *Central European Journal of Immunology*, 45(3), 248–255. <https://doi.org/10.5114/CEJI.2020.101237>
- Stier, M. T., & Peebles, R. S. (2017). Innate lymphoid cells and allergic disease. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 119(6), 480–488. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2017.08.290>

- Susilorini, Suradi, Indarto, D., Wasita, B., & Palupi, P. D. (2020). Immunomodulation of tahnee method in IL-12 and CD8⁺ T-Lymphocyte, an in-vivo study in neonatal rats. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(10), 2645–2650. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.05.046>
- Taconic Biosciences. (2017). Sprague Dawley Rat. Model. *Taconic Biosciences*. <https://www.janvierlabs.com/rodent-research-models-services/research-models/per-species/outbredrats/product/sprague-dawley.html>
- Takeda, M., Tanabe, M., Ito, W., Ueki, S., Konno, Y., Chihara, M., Itoga, M., Kobayashi, Y., Moritoki, Y., Kayaba, H., & Chihara, J. (2013). Gender difference in allergic airway remodelling and immunoglobulin production in mouse model of asthma. *Respirology*, 18(5), 797–806. <https://doi.org/10.1111/resp.12078>
- Teixeira, P. (2014). *Lactobacillus: Lactobacillus brevis*. In *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition* (Second Edi, Vol. 2). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00178-6>
- Toda, T., & Yoshino, S. (2016). Enhancement of ovalbumin-specific Th1, Th2, and Th17 immune responses by amorphous silica nanoparticles. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 29(3), 408–420. <https://doi.org/10.1177/0394632016656192>
- Tuomisto, L. E., Ilmarinen, P., & Kankaanranta, H. (2015). Prognosis of new-onset asthma diagnosed at adult age. *Respiratory Medicine*, 109(8), 944–954. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2015.05.001>
- Vignal, C., Desreumaux, P., & Body-Malapel, M. (2016). Gut: An underestimated target organ for Aluminum. *Morphologie*, 100(329), 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.morpho.2016.01.003>
- Witowski, J., Książek, K., & Jörres, A. (2004). Interleukin-17: A mediator of inflammatory responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(5), 567–579. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3228-z>
- Wu, X., Tian, J., & Wang, S. (2018). Insight into non-pathogenic Th17 cells in autoimmune diseases. *Frontiers in Immunology*, 9(MAY), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01112>
- Yao, L., Yang, P., Lin, Y., Bi, D., Yu, B., Lin, Z., Wu, Y., Xu, H., Hu, Z., & Xu, X. (2021). The regulatory effect of alginate on ovalbumin-induced gut microbiota disorders. *Journal of Functional Foods*, 86(September). <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104727>

Zenobia, C., & Hajishengallis, G. (2016). *inflammation*. 69(1), 142–159.
<https://doi.org/10.1111/prd.12083>.Basic

