

TESIS

**EFEK PEMBERIAN SUSPENSI CANGKANG TELUR
TERHADAP FIBROSIS PARU PADA TIKUS PUTIH (*RATTUS
NORVEGICUS*) YANG DIINDUKSI BLEOMISIN**

Disusun dan diajukan Oleh

NUR AMALIA ALIF

P062201025



**PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2023**

HALAMAN PENGANTAR

EFEK PEMBERIAN SUSPENSIF CANGKANG TELUR TERHADAP FIBROSIS PARU PADA TIKUS PUTIH (*RATTUS NORVEGICUS*) YANG DIINDUKSI BLEOMISIN

Tesis

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Magister
Program Studi
Ilmu Biomedik Konsentrasi Fisiologi**

Diajukan Oleh

NUR AMALIA ALIF

P062201025

Kepada

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2023

LEMBAR PENGESAHAN TESIS

EFEK PEMBERIAN SUSPENSI CANGKANG TELUR TERHADAP
FIBROSIS PARU PADA TIKUS PUTIH (*RATTUS NORVEGICUS*) YANG
DIINDUKSI BLEOMISIN

NUR AMALIA ALIF


P062201025


Telah dipertahankan di hadapan panitia ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Magister Program Studi Ilmu Biomedik Fakultas
Pascasarjana Universitas Hasanuddin pada tanggal 15 Februari 2023 dan
dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama

Pembimbing Pendamping



dr. M. Aryadi Arsyad, M. Biomed. Sc., Ph.D
NIP. 19760820 2002121 003


dr. Arif Santoso, Sp.P., Ph.D, FAPSR
NIP. 19770715 2006041 012

Ketua Program Studi

Dekan Sekolah Pascasarjana
Universitas Hasanuddin


dr. Rahmawati, Ph.D., Sp.PD-KHOM., FINASIM, Prof. dr. Budu, Ph.D., Sp.M(K), M.Med.Ed
NIP. 1968021 899903 2 002


dr. Budu, Ph.D., Sp.M(K), M.Med.Ed
NIP. 19661231 199503 1 009

PERNYATAAN KEASLIAN PENELITIAN

Yang bertanda tangan di bawah ini;

Nama : Nur Amalia Alif
NIM : P062201025
Jurusan/Program Studi : Ilmu Biomedik/Fisiologi

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa tesis yang berjudul Efek Pemberian Suspensi Cangkang Telur terhadap Fibrosis Paru pada Tikus Putih yang diinduksi Bleomisin adalah karya ilmiah saya sendiri dan sepanjang pengetahuan saya di dalam naskah tesis ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan/ditulis/diterbitkan sebelumnya, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila dikemudian hari ternyata di dalam naskah tesis ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur jiplakan, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 01 Maret 2023

at Pernyataan



Nur Amalia Alif

PRAKATA

Puji dan syukur penulis ucapkan atas kehadiran Tuhan semesta alam yang telah memberikan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini yang berjudul **"EFEK PEMBERIAN SUSPENSI CANGKANG TELUR TERHADAP FIBROSIS PARU PADA TIKUS PUTIH (*RATTUS NORVEGICUS*) YANG DIINDUKSI BLEOMISIN"**

Penyusunan tesis ini untuk memenuhi persyaratan untuk memperoleh gelar magister pada Program Studi Ilmu Biomedik Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin dengan segala tahapan dan persyaratan yang harus dipenuhi, adapun kendala yang ada syukur Alhamdulillah senantiasa hadir pertolongan dan kemudahan dari Allah

Selama penyusunan tesis ini tidak sedikit kendala yang menghadang. Namun berkat bimbingan dan arahan dari berbagai pihak dan tentunya tak terlepas dari pertolongan Allah, hal tersebut dapat penulis hadapi. Semoga Allah senantiasa membalas dengan kebaikan yang jauh lebih banyak.

Terima kasih yang sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada: Drs. Amiruddin, SE dan Dra. Marlinah dengan segala keterbatasan selalu hadir memberi dukungan dan semangat dalam proses penyusunan tesis ini. Selain itu Terimakasih sebesar-besarnya kepada **dr. M. Aryadi Arsyad, M.BiomSc, Ph.D** selaku pembimbing utama yang telah berkontribusi besar, terutama meluangkan waktu, pikiran dan tenaganya dalam membimbing, mengarahkan dan membantu penulis serta memberikan saran serta solusi. Kemudian kepada **dr. Arif Santoso, Sp.P(K), Ph.D, FAPSR** sebagai dosen pembimbing yang telah memberi arahan dan masukan dalam proses penelitian hingga penyusunan tesis ini. Tak lupa pula kepada Bapak/Ibu dosen pascasarjana beserta Staf Sekolah Pascasarjana atas pelayanan, bantuan, dan ilmu yang telah diberikan selama penulis menempuh pendidikan di pascasarjana Universitas Hasanuddin.

Penulis berharap tesis ini dapat bermanfaat bagi para pembaca. Penulis menyadari bahwa pada tesis ini masih ada banyak kekurangan, oleh karena itu kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan untuk perbaikan tesis ini di masa mendatang.

Makassar, 15 Februari 2023



Nur Amalia Alif

ABSTRAK

NUR AMALIA ALIF. *Efek Pemberian Suspensi Cangkang Telur Terhadap Fibrosis Paru pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Bleomisin (supervised by **M. Aryadi Arsyad** and **Arif Santoso**).*

Fibrosis paru merupakan kelainan paru yang memperlihatkan adanya pembentukan jaringan parut dengan melibatkan infiltrasi sel inflamasi, proliferasi fibroblas, reactive oxygen species (ROS) beserta penumpukan matriks ekstraselular yang berlebihan pada jaringan parenkim paru. Kandungan kalsium karbonat yang tinggi pada cangkang telur disebutkan memiliki sifat anti-inflamasi dan sifat anti-fibrotik. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan efek anti-fibrotik dan anti-inflamasi suspensi cangkang telur terhadap model fibrosis paru tikus. Penelitian eksperimental dengan desain post-test only control group menggunakan *Rattus norvegicus* jantan galur Wistar dengan berat badan 200-250 g sebanyak 25 ekor tikus dibagi dalam 5 kelompok ($n=5$) yaitu kelompok kontrol negatif (K1) diberi cmc 0,5%, kontrol positif (K2) yang diinduksi bleomisin secara intratracheal dan kelompok perlakuan yang diberi suspensi cangkang telur dengan dosis bertingkat yaitu P1 (6.13mg/kg BB), P2 (10.0 mg/kg BB), dan P3 (26.0 mg/kg BB). Dalam penelitian ini dilakukan pemeriksaan histopatologi paru yang di analisis menggunakan metode modifikasi Ashcroft dan perhitungan Neutrofil Limfosit Rasio (NLR). Hasil penelitian menunjukkan gambaran histopatologi paru pada K1 tidak ditemukan adanya fibrosis sedangkan pada kelompok K2 terbentuk fibrosis paru derajat 6 hingga 7 dengan massa fibrotik besar $\geq 50\%$ lapang pandang. Penurunan luas area fibrosis pada kelompok P1 dan P2 menjadi derajat 4 hingga 5, sedangkan kelompok P3 derajat fibrosis 2 hingga 3. Hasil ini menunjukkan luas area fibrosis paru berkurang dengan bertambahnya dosis suspensi cangkang telur. Nilai NLR untuk semua kelompok dinyatakan dalam batas normal (<4). Kesimpulan: suspensi cangkang telur memiliki efek anti-fibrotik dan efek anti-inflamasi pada model fibrosis paru tikus akibat induksi bleomisin.

Kata kunci: *bleomisin, fibrosis, histologi, NLR*



ABSTRACT

NUR AMALIA ALIF. *Effect of Eggshell Suspension on Pulmonary Fibrosis in Bleomycin-Induced White Mice (*Rattus Norvegicus*) (supervised by M. Aryadi Arsyad and Arif Santoso).*

Pulmonary fibrosis is a lung disorder that exhibits the formation of scar tissue involving inflammatory cell infiltration, fibroblast proliferation, reactive oxygen species (ROS), and excessive accumulation of extracellular matrix in the lung parenchyma. The high content of calcium carbonate in eggshells is expected to have anti-inflammatory and anti-fibrotic properties. This study aims to examine the anti-fibrotic and anti-inflammatory effects of eggshell suspension on a rat pulmonary fibrosis model. This experimental study with a post-test-only control group design used 25 male Wistar rats with a body weight of 200-250 g, which were divided into 5 groups (n = 5), namely the negative control group (K1) was administered with 0.5% CMC, positive control (K2) induced by intratracheal bleomycin, and the treatment group which was given eggshell suspension with graded doses namely P1 (6.13 mg/kg BB), P2 (10.0 mg/kg BB), and P3 (26.0 mg/kg BB). In this study, a histopathological examination of the lungs was carried out, which was analyzed using the modified Ashcroft method and calculating the Neutrophil Lymphocyte Ratio (NLR). The histopathological findings of the lungs in K1 did not show any fibrosis, while in group K2, pulmonary fibrosis developed grade 6 to 7 with large fibrotic masses ($\geq 50\%$ of the visual field). The fibrosis reduction in the P1 and P2 groups became grade 4 to 5, while in the P3 group, the fibrosis grade was 2 to 3. These results indicated that the area of pulmonary fibrosis decreased with increasing doses of eggshell suspension. NLR values for all groups expressed within normal limits (< 4). Conclusion: eggshell suspension has anti-fibrotic and anti-inflammatory effects in a rat lung fibrosis model induced by bleomycin.

Keywords: *bleomycin, fibrosis, histology, NLR*



DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL.....	i
HALAMAN PENGANTAR.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN PENELITIAN.....	iv
PRAKATA.....	v
ABSTRACT.....	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Tinjauan Tentang Fibrosis Paru.....	6
2.2 Tinjauan Tentang Cangkang Telur Ayam	9
2.3 Tinjauan tentang Bleomisin.....	14
2.4 Tinjauan tentang Hewan Coba.....	17
2.5 Tinjauan tentang Histopatologi.....	20
2.6 Tinjauan tentang Neutrofil limfosit rasio (NLR).....	23

2.7	Kerangka Konsep	26
2.8	Hipotesis Penelitian	27

BAB III METODE PENELITIAN.....	28
3.1 Preliminary Study.....	28
3.2 Rancangan Penelitian utama	29
3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian	30
3.4 Populasi dan Teknik Sampel.....	30
3.5 Definisi Operasional dan Variabel.....	31
3.6 Alat dan Bahan Penelitian	33
3.7 Prosedur Kerja	34
3.8 Izin Penelitian dan Kelayakan Etik	36
3.9 Pengolahan dan Analisis Data	36
3.10 Alur Penelitian	38
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	39
4.1 Hasil Penelitian	39
4.1.1. Hasil Preliminary Study.....	39
4.1.2 Eksperimen Utama.....	40
4.2 Pembahasan.....	44
BAB V PENUTUP	53
5.1 Kesimpulan	54
5.2 Saran	54
DAFTAR PUSTAKA.....	55
LAMPIRAN.....	61

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Nutrisi Cangkang Telur.....	12
Tabel 2.2. Karakterisasi Skala Modifikasi Ashcroft.....	22
Tabel 3.1. Defenisi Operasional.....	31
Tabel 4.1. Histopatologi Preliminary Study.....	39
Tabel 4.2. Rata-Rata Neutrofil Limfosit Rasio (Nlr).....	43

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Gambaran Paru Dengan Bleomisin.....	17
Gambar 2.2. Fibrosis Paru Dengan Modifikasi Skala Ascroft.....	21
Gambar 2.3. Tingkat Peradangan Berdasarkan Nilai NLR.....	23
Gambar 2.4. Kerangka Teori.....	26
Gambar 2.5. Gambar Kerangka Konsep.....	27
Gambar 3.1. Skema Desain Penelitian.....	29
Gambar 3.2. Alur Penelitian.....	38
Gambar 4.1. Diagram Rata-Rata Derajat Fibrosis.....	40
Gambar 4.2. Histologi Paru Tikus Kelompok Kontrol	41
Gambar 4.3. Histologi Paru Tikus Semua Kelompok	41
Gambar 4.4. Diagram Rata-Rata NLR Pada Tiap Kelompok.....	43

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Fibrosis paru adalah penyakit paru-paru kronis yang ditandai dengan adanya peradangan dan perkembangan deposisi matriks ekstraseluler yang berlebihan hingga berdampak hilangnya fungsi paru-paru yang ireversibel (Degryse et al., 2010). Kelainan berupa terbentuknya jaringan parut (*scar*) yang melibatkan infiltrasi sel inflamasi, proliferasi fibroblas, *reactive oxygen species* (ROS) serta penumpukan matriks ekstra selular yang berlebihan ke jaringan parenkim paru sehingga menyebabkan gangguan fungsi paru disebut fibrosis paru (Zhao et al., 2020). Fibrosis paru disebabkan oleh inflamasi, trauma, idiopatik seperti pneumonia, efusi pleura, emfisema, tuberkulosis, asbestosis, *interstitial lung disease/idiopathic pulmonary fibrosis*, obat golongan ergot, sitotoksik, radiasi, pascakemoterapi dan penyakit jaringan ikat sistemik, hemotoraks / pascatorakotomi juga menjadi salah satu penyebab terjadinya fibrosis (Salem et al., 2014).

Fibrosis paru disebabkan oleh produksi kolagen yang berlebihan, dan TGF- β (transforming growth factor) adalah faktor yang memiliki potensi pro-fibrotik yang besar dengan merangsang ekspresi kolagen. Fibrogenesis dipengaruhi oleh berbagai sitokin, di antaranya (TGF)- β yang merupakan stimulator produksi kolagen. Sejumlah penelitian telah mengklarifikasi jalur keterlibatan TGF- β dalam ekspresi gen matriks ekstraseluler (ECM) serta patogenesis fibrosis. Stres oksidan, yang dihasilkan dari produksi ROS yang berlebihan dan cacat atau penipisan, pertahanan antioksidan, adalah salah satu mekanisme utama yang termasuk dalam patogenesis fibrosis paru. (Chu et al., 2017)

Data yang diperoleh oleh yayasan fibrosis paru memperkirakan bahwa fibrosis paru mempengaruhi 1 dari 200 orang dewasa di atas usia 65 tahun di AS. Sekitar 50.000 kasus baru didiagnosis setiap tahun dan sebanyak 40.000 orang Amerika meninggal karena fibrosis paru setiap tahun. Episode inflamasi pada pasien fibrotic terkait dengan perkembangan penyakit, sementara penelitian lain mengaitkan perkembangan penyakit dengan kapasitas sel epitel yang berasal dari miofibroblas, sehingga menginduksi proliferasi dan aktivasi fibroblas. Selain

itu, fibroblast yang teraktivasi menghasilkan banyak sitokin dan kolagen yang berkontribusi pada remodeling paru (Brochetti et al., 2017).

Bleomisin adalah agen kemoterapi yang diketahui menyebabkan fibrosis paru sebagai efek samping yang jarang terjadi pada manusia yang menjalani terapi dengan agen ini untuk kanker. Bleomisin menyebabkan kerusakan oksidatif pada deoksiribosa timidilat dan nukleotida lain yang menyebabkan pemutusan rantai tunggal dan ganda pada DNA, yang menyebabkan cedera paru (Lucarini et al., 2020).

Bleomisin menginduksi reaksi respon inflamasi yang mengakibatkan cedera paru-paru melalui deposisi kolagen (MMP-7 dan hidroksirolin) di jaringan paru-paru, Bleomisin menginduksi peningkatan yang signifikan pada tingkat TNF- α , IL-1 β , LM meningkatkan ekspresi protein NF- κ B (p65) dalam sitoplasma, Bleomisin merupakan antibiotik glikopeptida yang secara konvensional digunakan sebagai terapi antikanker. MMP-7 mengaktifkan TGF- β , factor pertumbuhan fibrogenik potensial yang menginduksi fibrosis paru dan mendorong kontraksi fibroblast kolagen. Patogenesis fibrosis paru dapat dipicu oleh cedera sel epitel paru oleh rangsangan fibrogenik, sehingga penting untuk peradangan paru, yang dikendalikan oleh beberapa jenis sel dan sitokin. TGF- β 1 dapat mendorong fibroblast paru untuk mensekresi kolagen atau menginduksi transformasi fibroblast menjadi miofibroblas yang mengekspresikan—smooth muscle actin (α -SMA), keduanya merupakan langkah penting dalam patogenesis fibrosis paru (Abidi et al., 2017).

Bleomisin menginduksi pelepasan ROS dan RNS dengan mengikat DNA dan besi, mengakibatkan kerusakan DNA. Interaksi Bleomisin dan DNA disarankan untuk memulai respon inflamasi dan perubahan proliferasi fibro melalui sitokin yang menghasilkan augmentasi kolagen di paru-paru. Selain itu, Bleomisin menyebabkan penipisan pertahanan antioksidan endogen, yang pada gilirannya menyebabkan kerusakan jaringan alveolar yang diinduksi ROS dan RNS (Raish et al., 2018).

Struktur cangkang telur unggas terdiri dari cangkang dan membran dan mewakili sekitar 10% dari berat telur. Struktur cangkang telur yang berkapur sebagian besar terdiri dari kalsium karbonat (CaCO₃) dan matriks organik yang terdiri dari protein, glikoprotein dan proteoglikan (Verma et al., 2019). Cangkangnya terdiri dari kolom kalsit yang disusun dalam dua bagian: bagian utama dengan sisi yang kira-kira sejajar (lapisan palisade) dan bagian kecil yang

membentuk ujung bagian dalam yang membulat (lapisan kerucut mamilari) yang melekat pada serat membran cangkang. Lapisan terluar dari kulit telur ayam merupakan kutikula, dibentuk oleh vesikel yang mengandung protein >85% (Arnold et al., 2021).

Peningkatan produksi telur di dunia dari 2009 hingga 2019 diamati (lebih dari 30%) dan Pada tahun 2008, produksi telur di negara-negara Uni Eropa berada di urutan kedua dengan lebih dari 6,5 juta ton, antara Cina di tempat pertama dan Amerika Serikat di tempat ketiga. Di Polandia, konsumsi rata-rata tahunan telur ayam lebih dari 200 unit per kapita. Tidak hanya konsumsi telur yang tinggi tetapi juga dari tempat penetasan, industri rumah tangga dan makanan berkontribusi pada tingginya jumlah cangkang telur sebagai limbah. Berat kulit telur sekitar 9-12% dari total berat telur Cangkang telur ini dapat menjadi ancaman pencemaran lingkungan jika tidak dimanfaatkan dan hanya menjadi limbah (Arnold et al., 2021).

Studi (M.M. Cordeiro & T. Hincke, 2012) menyatakan dalam penelitiannya bahwa cangkang telur mengandung kalsium karbonat (CaCO_3) yang tinggi, sedangkan (Febrianti & Musiam, 2020) dan (Pittas et al., 2007) menyebutkan bahwa kalsium karbonat memiliki daya anti inflamasi dengan mengurangi sitokin pro inflamasi, didukung oleh penelitian (Vuong et al., 2017) yang menyebutkan bahwa cangkang telur menekan peradangan dengan meningkatkan sekresi sitokin anti-inflamasi IL-10 sementara fraksi karbohidrat mengurangi sekresi sitokin pro-inflamasi IL-1 β dan IL-6. Juga, fosforilasi subunit p65 dan p50 dari NF- κ B, serta NLS.

Masalah terbesar fibrosis paru yaitu pengobatan yang tidak efektif. Setiap pengobatan telah menunjukkan efek positif dalam stabilisasi penyakit atau dalam peningkatan kualitas hidup. Lini pertama terapi farmakologis didasarkan pada anti-inflamasi. Dengan demikian, antiinflamasi steroid, seperti kortikosteroid, digunakan karena mekanisme kerjanya yang luas (Brochetti et al., 2017).

Studi oleh (Lucarini et al., 2020) mengenai Efek senyawa hibrida NSAID dalam peradangan dan fibrosis paru yang memiliki efek anti-inflamasi dan anti-fibrotik yang tinggi pada model tikus dari fibrosis paru yang diinduksi bleomisin, dengan menghambat produksi sitokin pro-inflamasi dan pro-fibrotik menjadikannya obat anti-inflamasi yang inovatif dengan mode aksi ganda dan efek samping yang berkurang. Sejalan dengan beberapa peneliti yang membahas mengenai penggunaan terapi anti-inflamasi untuk pengobatan fibrosis paru di antaranya oleh (Nichols et al., 2008) yang menyatakan bahwa di antara terapi yang

terbukti, beberapa penelitian pada hewan dan manusia mendukung penggunaan ibuprofen sebagai terapi kronis untuk penyakit fibrosis paru dimana ibuprofen menghambat migrasi neutrofil ke paru-paru tanpa memperburuk infeksi. (El-Tantawy & Temraz, 2019) menyatakan bahwa membrane cangkang telur memiliki Efek anti-fibrotik, Sedangkan Penelitian oleh (Ruff & DeVore, 2014) dengan suplementasi oral membrane cangkang telur secara efektif menghasilkan pengurangan sitokin pro inflamasi pada tikus.

Berdasarkan uraian diatas menunjukkan bahwa pemanfaatan limbah cangkang telur yang mengandung kalsium karbonat yang tinggi dengan sifat anti-inflamasi dan anti-fibrotiknya dapat di terapkan dalam penanganan fibrosis paru yaitu dengan mengurangi luas area fibrosis paru. Oleh karna itu perlu dilakukan penelitian mengenai efek pemberian suspensi cangkang telur terhadap fibrosis paru tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi Bleomisin untuk melihat histologi paru dan efek antiinflamasi dengan melihat NLR yang terjadi pada tikus wistar model fibrosis paru.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian diatas, maka dirumuskan masalah penelitian:

1. Bagaimana efek pemberian suspensi cangkang telur ayam terhadap gambaran histologi pada paru tikus wistar model fibrosis paru yang diinduksi Bleomisin?
2. Bagaimana efek anti-inflamasi pemberian suspensi cangkang telur ayam pada paru tikus wistar model fibrosis paru yang diinduksi Bleomisin?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini merupakan sebagai berikut:

1.3.1 Tujuan Umum

- a. Untuk mengetahui efek antifibrosis pemberian suspensi cangkang telur ayam pada paru tikus wistar model fibrosis paru
- b. Untuk mengetahui efek antiinflamasi pemberian suspensi cangkang telur ayam pada tikus wistar model fibrosis paru

1.3.2 Tujuan Khusus

- a. Untuk mengetahui pengaruh pemberian suspensi cangkang telur ayam terhadap luas area fibrosis paru pada tikus wistar yang diinduksi bleomisin.

- b. Untuk mengetahui efek antiinflamasi pemberian suspensi cangkang telur ayam dilihat dari jumlah neutrofil dan limfosit tikus wistar model fibrosis paru

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat teoritis

- a. Dapat mengetahui kondisi fungsi paru pada tikus wistar yang diberikan suspensi cangkang telur ayam dilihat dari gambaran histologi paru pada tikus wistar dengan fibrosis paru. Sekaligus diharapkan menjadi dasar pada penelitian selanjutnya terhadap tikus wistar dengan suspensi cangkang telur ayam.
- b. Dapat mengetahui efek antiinflamasi dari pemberian suspensi cangkang telur pada tikus wistar model fibrosis paru sehingga dapat menjadi acuan terhadap penelitian selanjutnya.

1.4.2 Manfaat Aplikatif

Penelitian ini diharapkan bermanfaat untuk memperoleh data tentang efek pemberian suspensi cangkang telur ayam terhadap kondisi fungsi paru dilihat dari gambaran histologi paru pada tikus wistar model fibrosis paru, dan melihat efek anti-inflamasi dari pemberian suspensi cangkang telur serta resiko dari suspensi cangkang telur ayam tersebut terhadap fungsi paru sehingga dapat menjadi landasan untuk mengkonsumsi suspensi cangkang telur ayam atau tidak. Menjadi salah satu alternative untuk mengurangi limbah cangkang telur.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tentang Fibrosis Paru

2.1.1 Fibrosis Paru

Fibrosis paru merupakan kelainan yang ditandai dengan proses inflamasi kompleks yang mengakibatkan proliferasi fibroblast berlebihan dan deposisi progresif jaringan ikat di parenkim paru (El-Sayed & Rizk, 2009). Fibrosis paru merupakan penyakit paru kronis dan progresif. Penyakit ini dapat bersifat idiopatik atau berkembang sebagai komplikasi dari banyak penyakit paru dan sistemik. Hingga setengah dari pasien dengan fibrosis paru merupakan fibrosis paru idiopatik (IPF) ditandai dengan proliferasi fibroblas, akumulasi kolagen yang berlebihan dan deposisi protein matriks ekstraseluler lainnya di dalam interstisial paru yang mengakibatkan hilangnya fungsi paru hingga akhirnya mengalami gagal napas (Kilic et al., 2014).

2.1.2 Epidemiologi

Fibrosis paru merupakan penyakit kronis dan progresif yang ditandai dengan adanya peradangan dan perkembangan deposisi matriks ekstraseluler yang berlebihan yang berpuncak terhadap hilangnya fungsi paru-paru yang ireversibel (Degryse et al., 2010). Data yang diperoleh oleh yayasan fibrosis paru memperkirakan bahwa fibrosis paru mempengaruhi 1 dari 200 orang dewasa di atas usia 65 tahun di AS. Sekitar 50.000 kasus baru didiagnosis setiap tahun dan sebanyak 40.000 orang Amerika meninggal karena lung fibrosis (LF) setiap tahun. Episode inflamasi pada pasien fibrotic terkait dengan perkembangan penyakit, sementara penelitian lain mengaitkan perkembangan penyakit dengan kapasitas sel epitel yang berasal dari miofibroblas, sehingga menginduksi proliferasi dan aktivasi fibroblas. Selain itu, fibroblast yang teraktivasi menghasilkan banyak sitokin dan kolagen yang berkontribusi pada remodeling paru (Brochetti et al., 2017).

Fibrosis paru merupakan stadium akhir dari sekelompok penyakit kronis yang dikategorikan sebagai pneumonia interstisial idiopatik.. Peningkatan jumlah orang yang terkena fibrosis paru di seluruh dunia, dengan meningkatnya angka morbiditas dan mortalitas. Beberapa faktor, termasuk faktor pertumbuhan transformasi (TGF)-b, factor pertumbuhan jaringan ikat (CTGF), factor

pertumbuhan yang diturunkan dari trombosit (PDGF), sitokin inflamasi, kemokin (motif CC) ligan 2/monosit chemo atraktan protein-1 (CCL2) (Salem et al., 2014).

2.1.3 Etiologi

Sejumlah sitokin telah terbukti merangsang kejadian fibrotik dan termasuk TGF- β , factor nekrosis tumor (TNF- α), PDGF, CTGF, endotelin, factor perangsang koloni granulosit-makrofag (GM-CSF), interleukin (IL-1 β), IL-6, IL-10, dan IL-13 (Chen et al., 2020). Studi terbaik dari berbagai sitokin ini pada fibrosis paru merupakan TGF- β . TGF- β isoform memiliki sejumlah efek pada respon seluler termasuk modulasi pertumbuhan sel, migrasi, diferensiasi, dan apoptosis. TGF- β menginduksi diferensiasi myofibroblast, sintesis matriks ekstraseluler dan menghambat pemecahan ECM. TGF- β 1 berlimpah di BALF dan hadir dalam biopsi fokus fibroblastik dari subyek IPF. Ekspresi berlebihan TGF- β 1 pada hewan menginduksi fibrosis paru progresif yang sebagian besar tidak tergantung pada peradangan. TGF- β 1 menghasilkan stress oksidatif dengan induksi produksi ROS dan penurunan ekspresi antioksidan seluler. TGF- β 1 menginduksi produksi ROS dengan aktivasi NADPH oksidase (NOXs) dan melalui disfungsi mitokondria. TGF- β 1 telah terbukti menurunkan ekspresi baik katalase dan mitokondria SOD. Selain itu, TGF- β 1 telah terbukti menurunkan kadar GSH seluler melalui penurunan ekspresi dan aktivitas γ -glutamilsistein ligase (γ -GCL), langkah pembatas kecepatan dalam sintesis GSH (Day, 2008).

Fibrosis paru idiopatik (IPF) merupakan penyakit paru parenkim kronis progresif dengan waktu kelangsungan hidup rata-rata 3-5 tahun setelah diagnosis, terutama mempengaruhi orang tua (Degryse et al., 2010). IPF bermanifestasi dengan sesak napas yang disebabkan oleh olahraga, batuk kering yang persisten dan dispnea, dan ditandai dengan honeycombing yang jelas secara radiologis dan pola histologis pneumonia interstitial biasa. Riwayat alami IPF tetap sama sekali tidak diketahui dan, seperti yang disiratkan oleh istilah 'idiopatik', begitu pula etiologinya. Faktor lingkungan seperti merokok, debu-logam dan faktor genetik (seperti mutasi pada SP-C, ELMOD2, ABCA3 gen dan ketidakstabilan mikrosatelit), serta mekanisme patogenetik terkait usia (panjang telomer, stress oksidatif dan epigenetic (Mouratis & Aidinis, 2011).

Keadaan redoks seluler dan keseimbangan oksidasi dan/ antioksidasi memainkan peran penting dalam patogenesis fibrosis paru. Stres oksidatif menginduksi apoptosis sel struktural dan mengatur sintesis sitokin proinflamasi.

Disregulasi dalam keseimbangan beberapa faktor pertumbuhan yang diinduksi oleh stress oksidatif mungkin memainkan peran utama dalam membedakan antara perbaikan jaringan normal dan patologis. Fibrosis paru berkembang pada sejumlah penyakit klinis, termasuk penyakit paru interstisial dan pneumonia interstisial idiopatik, sebagai bagian dari beberapa penyakit jaringan ikat sistemik dan sindrom penyakit paru interstisial masa kanak-kanak, dan sebagai respons terhadap berbagai jenis cedera paru, termasuk radiasi dan beberapa obat kemoterapi (Salem et al., 2014).

2.1.4 Patofisiologi

Patogenesis fibrosis paru melibatkan beberapa proses yang menyebabkan terjadinya perubahan lingkungan pada alveolar dan proses perbaikan yang abnormal dengan akumulasi fibrosis. Beberapa faktor, termasuk usia, kerentanan genetik, dan agen lingkungan, diketahui berkontribusi terhadap fibrosis paru (Desdiani et al., 2020). Fibroblastik terkait dengan peningkatan kadar beta faktor pertumbuhan transformasi aktif (TGF- β) di paru-paru fibrotik. Sitokin ini merupakan mediator penting dari diferensiasi fibroblast menjadi fenotip miofibroblas. Ekspresi berlebihan dari TGF- aktif β menghasilkan fibrosis paru-paru pada hewan. TGF- β merupakan pengatur utama perbaikan luka dan stimulant produksi ROS di fibroblas. Stres oksidatif sering didefinisikan sebagai ketidakseimbangan antara produksi ROS dan pertahanan antioksidan. Stres oksidatif dapat mendisregulasi pensinyalan sel dan merupakan target potensial untuk pengembangan terapi untuk mengobati fibrosis paru (Day, 2008).

Stres oksidatif merupakan ketidaksetaraan antara produksi radikal bebas dan kemampuan pertahanan antioksidan untuk menangkapnya. Stres oksidatif merupakan salah satu mekanisme utama yang terlibat dalam Patogenesis fibrosis paru. Diyakini bahwa fibrosis paru merupakan hasil dari reaksi patofisiologis terhadap cedera yang dapat disebabkan oleh stimulant seperti radiasi, infeksi, obat-obatan, dan terpapar partikel beracun seperti silika dan asbestos. LF ditandai dengan cedera sel epitel alveolar, infiltrasi sel inflamasi seperti neutrofil dan makrofag dan diferensiasi fibroblast menjadi miofibroblas. Peristiwa ini, akibatnya, menghasilkan deposisi kolagen dan perubahan struktur paru-paru yang menyebabkan penurunan pertukaran gas dan penurunan kompliance paru (Asghar Hemmati et al., 2013).

Respons pertama Fibrosis paru setelah cedera merupakan peradangan. Makrofag dan neutrofil alveolar yang teraktivasi terakumulasi di saluran

pernapasan bagian bawah, melepaskan jumlah spesies oksigen reaktif yang berbahaya dan keragaman sitokin yang berbahaya. Neutrofil yang teraktivasi juga dapat melepaskan myeloperoksidase (MPO), suatu enzim yang berinteraksi dengan hidrogenperoksida (H_2O_2), untuk membentuk radikal hidroksil yang sangat beracun. Dalam hal ini, target penghambatan peradangan, stress oksidatif, dan pelepasan sitokin merupakan titik strategis yang mungkin untuk intervensi terapeutik (Kilic et al., 2014). IPF diperkirakan berasal dari cedera epitel berulang dan apoptosis, diikuti oleh re-epitelisasi yang tidak memadai dan penyembuhan luka yang menyimpang. Respon fibrotik yang menyimpang merupakan transforming growth factor (TGF), sitokin profibrotik utama, dan myofibroblast, tipe sel efektor kunci dari deposisi matriks ekstraseluler yang berlebihan dan arsitektur paru yang terdistorsi, yang merupakan ciri khas IPF (Mouratis & Aidinis, 2011).

Fibrosis mengganggu struktur dan fungsi pertukaran gas paru-paru. Fibroblas sebagian besar bertanggung jawab atas peningkatan kolagen dan sintesis matriks dan deposisi yang terjadi pada fibrosis paru. Asal usul fibroblast paru selama fibrosis paru belum didefinisikan dengan baik, tetapi sumber potensial termasuk proliferasi fibroblast interstisial paru yang menetap, diferensiasi sel progenitor dari sumsum tulang, dan transisi sel epitel ke fenotipe fibroblas, suatu proses yang disebut epitel-mesenkim transisi (EMT) (Tanjore et al., 2009). Tempat proliferasi berkontribusi pada populasi fibroblast paru. Selain itu, penelitian pada hewan telah menunjukkan bahwa selama fibrosis paru yang diinduksi secara eksperimental, sebagian fibroblast paru muncul dari sel progenitor sumsum tulang dan fibrosit berkontribusi pada proses fibrogenik (Peng et al., 2018).

Fibrosis merupakan manifestasi paling parah dari fibrosis paru, yang disebabkan oleh produksi kolagen yang berlebihan, dan TGF- β merupakan faktor yang diakui yang memiliki potensi pro-fibrotik yang besar dengan merangsang ekspresi kolagen. Ekspresi kolagen yang berlebihan diamati baik pada tikus yang diinduksi Bleomisin dan sel yang diobati dengan TGF- β (Abidi et al., 2017).

2.2 Tinjauan Tentang Cangkang Telur Ayam

2.2.1 Pembentukan Cangkang Telur Ayam

Kulit telur terbentuk selama perjalanan telur melalui saluran telur, dengan berbagai lapisan kulit telur dirakit secara berurutan saat telur melewati sektor saluran telur yang berurutan. Setelah pembuahan ovum di infundibulum dan sekresi albumen di magnum, sel telur memasuki tanah genting 2 sampai 3 jam

setelah ovulasi. Di isthmus, sel granular mensekresi berbagai komponen membran cangkang seperti kolagen tipe X. Sebagian besar deposisi kalsium dalam cangkang telur terjadi di kelenjar cangkang telur (ESG). Sekitar 5 sampai 6 g CaCO₃ disimpan ke dalam kulit telur ayam selama pembentukannya (Lavelin et al., 2000).

Struktur cangkang telur unggas terdiri dari cangkang dan membran dan mewakili sekitar 10% dari berat telur. Cangkang merupakan struktur berkapur yang sebagian besar terdiri dari CaCO₃ (95%) dan matriks organik yang terdiri dari protein, glikoprotein dan proteoglikan (3,5%) (Verma et al., 2019). Cangkangnya terdiri dari kolom kalsit yang disusun dalam dua bagian: bagian utama dengan sisi yang kira-kira sejajar (lapisan palisade) dan bagian kecil yang membentuk ujung bagian dalam yang membulat (lapisan kerucut mamilari) yang melekat pada serat membran cangkang. Lapisan terluar dari kulit telur ayam merupakan kutikula, dibentuk oleh vesikel yang mengandung protein >85% (Arnold et al., 2021).

Membran cangkang telur ditemukan di antara putih telur dan cangkang yang terkalsifikasi, dan dianggap memainkan peran penting dalam menentukan asal dan ultra struktur cangkang terkalsifikasi. Serat kolagen dari membran cangkang telur disusun menjadi dua membran individu: bagian dalam tipis yang terletak di atas putih telur (albumen), dan membran luar tebal yang menempel pada cangkang. Membran cangkang telur terdiri dari kolagen ikatan silang (I, V dan X), glikosaminoglikan (GAG), protein putih telur (Ovotransferrin, Lisozim) dan protein matriks cangkang telur (Ovocalyxin-36). Hidroksiprolin, hidroksilisina dan desmosin terdeteksi dalam hidrolisat asamnya (M.M. Cordeiro & T. Hincke, 2012).

2.2.2 Kandungan Cangkang Telur

Cangkang telur terdiri dari CaCO₃ sebanyak 94%-97% dalam kulit 1 butir telur yang setara dengan 1,5 gram kalsium. Kemudian adapun kandungan lainnya seperti fosfor, magnesium dan sejumlah kecil natrium, kalium, seng, mangan, besi, dan tembaga. Kulit telur dapat berasal dari bermacam-macam hewan seperti ayam dan bebek (Vuong et al., 2017). Kulit telur ayam negeri (*Gallus domesticus*) mengandung 96,9% CaCO₃. Warna pada kulit telur ayam yang berbeda-beda tidak memberi pengaruh yang bermakna dalam komposisi kulit telur tersebut (Jaya N M et al., 2021).

Cangkang telur ayam terdiri dari cangkang yang telah terkalsifikasi, membran dalam dan luar pada cangkang telur. Membran ini berperan dalam menahan albumen dan mencegah penetrasi bakteri. Membran cangkang juga

berpengaruh dalam pembentukan cangkang telur. Cangkang telur dan membran cangkang mengandung protein sebagai konstituen utama dengan sejumlah kecil karbohidrat dan lipid (Lavelin et al., 2000). Asam uronat dalam kulit telur dan melaporkan korelasi yang signifikan antara kandungan asam uronat dan kekuatan pecah cangkang. Asam uronat merupakan gula penyusun glikosaminoglikan. Bahan organik kulit telur mengandung dua glikosaminoglikan termasuk asam hialuronat dan kopolimer kondroitin sulfat dermatan sulfat. Asam sialat merupakan karbohidrat lain yang ditemukan dalam membran kulit telur (Nakano T et al., 2003).

Cangkang telur disebut sebagai lapisan keras yang melindungi telur dari lingkungan sekitarnya. Cangkang ini berbentuk keras serta memiliki kandungan kalsium yang cukup tinggi (Chakraborty S & Santa D, 2019). Cangkang telur termasuk dalam limbah rumah tangga yang sampai saat ini belum dimanfaatkan secara maksimal. Saat ini cangkang telur hanya digunakan sebagai bahan baku industri kerajinan tangan. Setiap telur memiliki 10.000 – 20.000 pori-pori sehingga diperkirakan dapat menyerap suatu solut dan dapat digunakan sebagai adsorben. Produksi telur ayam ras di Indonesia pada tahun 2009 sebesar 1.071.398 ton. Jika rata-rata berat telurnya 60 gram maka kulit telur yang dihasilkan dalam setahun merupakan 107.139 ton. Beratnya setara dengan 100.710,66 ton kalsium karbonat, 4.285,56 ton magnesium karbonat dan 1.339,25 ton kalsium fosfat (Lakkakula et al., 2016).

Kandungan gizi pada cangkang telur menurut para kimiawi bahwa, cangkang telur tersusun oleh bahan anorganik 95,1%, protein 3,3% dan air 1,6%. Komposisi kimia dari kulit telur terdiri dari protein 1,71%, lemak 0,36%, air 0,93%, serat kasar 16,21%, abu 71,34% (Lavelin et al., 2000).

Berikut ini merupakan tabel nutrisi cangkang telur yang dapat dilihat pada tabel 2.1

Tabel 2.1 Nutrisi Cangkang Telur (Chakraborty S & Santa D, 2019).

NutrisiCangkangtelur	(%berat)
Air	29 – 35
Protein	1,4 – 4
Lemak murni	0,10 – 0,20
Abu	89,9 – 91,1
Kalsium	35,1 – 36,4
Kalsiumkarbonat (CaCO ₃)	90,9
Fosfor	0,12
Sodium	0,15 – 0,17
Magnesium	0,37 – 0,40
Pottasium	0,10 – 0,13
Sulfur	0,09 – 0,19
Alanin	0,45
Arginin	0,56 – 0,57

Beberapa komponen selain kalsium, yang juga terkandung pada kulit telur dapat menimbulkan efek terhadap tubuh. Kandungan Sr, F, Cu, dan Se memiliki efek positif dalam metabolisme tulang. Bubuk kulit telur sendiri juga bermanfaat dalam mengurangi nyeri, kekakuan, dan sebagai pencegahan dan pengobatan osteoporosis (Chaudhary et al., 2006). Kolagen pada membran kulit telur telah dibuktikan menunjukkan reaksi alergi yang rendah. Kolagen ini juga dapat digunakan dalam produksi kosmetik. Kulit telur juga disebut sebagai sumber mineral yang kaya, karena berfungsi sebagai eksipien farmasi, bahan dasar untuk mengembangkan sediaan obat dan gigi, aditif makanan dan suplemen kalsium, komponen pupuk pertanian, serta sebagai komponen implan tulang (Jaya N M et al., 2021).

2.2.3 Manfaat Cangkang Telur

Cangkang telur dinyatakan telah memberi manfaat dalam kehidupan yang dibuktikan oleh para pakar ilmiah, mulai dari bidang pertanian, kesenian hingga bidang kesehatan. Dalam bidang kesehatan khususnya, hasil sintesis cangkang telur dijadikan sebagai bahan biomaterial untuk sintesis tulang dan gigi, karena cangkang telur kaya akan kalsium karbonat yang dapat disintesis menjadi kalsium hidroksiapatit. Selain itu, cangkang telur juga digunakan sebagai antibakteri. Sampai saat ini penggunaan cangkang telur dalam bidang kesehatan dinilai aman dan bebas dari resiko alergi. Pemanfaatan cangkang telur ini juga dapat menjadi

solusi bagi pemerintah dalam penanganan masalah limbah lingkungan (Stapane et al., 2020).

2.2.4 Hubungan Penggunaan Cangkang Telur

Fibrosis paru memperlihatkan kelainan berupa terbentuknya jaringan parut (*scar*) sehingga menyebabkan terjadinya gangguan fungsi paru (Zhao et al., 2020). Fibrosis paru dapat menimbulkan penyakit paru restriktif yang berat hingga gagal napas. Penyakit ini disebabkan oleh inflamasi, trauma, idiopatik, obat golongan ergot, sitotoksik, radiasi dan pasca kemoterapi (Salem et al., 2014).

Studi (M.M. Cordeiro & T. Hincke, 2012) menyatakan dalam penelitiannya bahwa cangkang telur terbentuk terutama dari CaCO_3 yang tinggi, berhubungan dengan penelitian (Febrianti & Musiam, 2020) dan (Pittas et al., 2007) yang menyebutkan bahwa kalsium karbonat memiliki daya anti inflamasi dengan mengurangi sitokin pro inflamasi, selain itu penelitian oleh (Vuong et al., 2017) juga menyebutkan bahwa cangkang telur menekan peradangan dengan meningkatkan sekresi sitokin anti-inflamasi IL-10 sementara fraksi karbohidrat mengurangi sekresi sitokin pro-inflamasi IL-1 β dan IL-6. Juga, fosforilasi dari subunit p65 dan p50 dari faktor nuklir- κB , serta lokalisasi nuklir. Selain itu penelitian menurut (Sumardi E et al., 2020) menyatakan bahwa terdapat hubungan yang signifikan antara kadar kalsium serum dengan fungsi paru.

Studi yang dilakukan oleh (Lucarini et al., 2020) mengenai efek senyawa hibrida NSAID dalam peradangan dan fibrosis paru yang memiliki efek anti-inflamasi dan anti-fibrotik yang tinggi pada model tikus dari fibrosis paru yang diinduksi bleomisin, dengan menghambat produksi sitokin pro-inflamasi dan pro-fibrotik menjadikannya obat anti-inflamasi yang inovatif dengan mode aksi ganda dan efek samping yang berkurang. Sejalan dengan beberapa peneliti yang membahas mengenai penggunaan terapi anti-inflamasi untuk pengobatan fibrosis paru di antaranya oleh (Nichols et al., 2008) yang menyatakan bahwa di antara terapi yang terbukti, beberapa penelitian pada hewan dan manusia mendukung penggunaan ibuprofen sebagai terapi kronis untuk penyakit paru-paru cistic fibrosis (CF) dimana ibuprofen menghambat migrasi neutrofil ke paru paru tanpa memperburuk infeksi. Sedangkan menurut Tantawy&Abeer.,(2019) membran cangkang telur memiliki Efek anti-fibrotik, kemudian penelitian oleh (Ruff & DeVore, 2014) menyatakan bahwa dengan suplementasi oral membran cangkang telur secara efektif menghasilkan pengurangan sitokin proinflamasi pada tikus.

Membran cangkang telur terutama terdiri dari protein berserat seperti Kolagen Tipe I. Namun, membrane cangkang telur juga telah terbukti mengandung komponen bioaktif lainnya, yaitu glikosaminoglikan (misalnya dermatan sulfat, kondroitinsulfat, dan asam hialuronat (Ruff & DeVore, 2014). ESM dapat memberikan efek anti-fibrotik dengan menekan stress oksidatif dan mempromosikan degradasi Kol dengan menghambat transformasi HSC, berpotensi melalui modulasi baru PPARC-Jalur pensinyalan interaksi EDN1 (El-Tantawy & Temraz, 2019).

2.3 Tinjauan tentang Bleomisin

Pemberian induksi bleomisin sudah sering dilakukan. Bleomisin digunakan untuk menginduksi terjadinya fibrosis paru umumnya pada mamalia kecil seperti tikus wistar yang diberikan secara intratracheal atau intrapleural dengan posisi dekubitus lateral kanan. Fibrosis paru pada hewan kecil dinilai secara histologi, yang umumnya dianalisis menggunakan metode modifikasi *Ashcroft scale*. Skala yang telah dimodifikasi ini memiliki korelasi yang lebih baik jika dibandingkan dengan gambaran CTscan (Desdiani et al., 2020).

Bleomisin (BLM) dapat diberikan secara intraperitoneal, intravena, subkutan atau intratrakeal namun intravena dan intratrakeal merupakan rute yang lebih umum digunakan. Khususnya, ada kekhawatiran yang muncul tentang model bleomisin mengenai reproduktifitasnya yang tinggi dan kemampuan untuk meniru fenotipe seperti Fibrosis paru dan fitur histologis yang diamati pada pasien yang diobati dengan bleomisin. Model Fibrosis paru ini dapat dibagi menjadi tiga tahap termasuk cedera, peradangan dan fibrosis (Li & Kan, 2017).

Induksi bleomisin ini digunakan untuk mengetahui fisiologi atau mekanisme yang berhubungan dengan fibrosis paru. Dalam penelitian pemberian obat, model bleomisin adalah system *in vivo* yang paling umum digunakan. Telah disebutkan oleh beberapa pakar ilmiah bahwa bleomisin dapat menginduksi paru sehingga menghasilkan respons inflamasi akut. Maka fase inflamasi dan perubahan fibrotik yang ditimbulkan memperlihatkan beberapa ciri patologis yang sama dengan penderita IPF. Perubahan molekular yang terjadi selama fase fibrosis belum pernah dinilai secara langsung. TGF β sangat berperan sebagai pemicu dalam proses remodeling, namun kontribusinya terhadap pengembangan penyakit IPF saat ini belum diketahui secara lengkap. Heterogenitas penyakit di antara pasien termasuk tingkat perkembangannya belum jelas, apakah model Bleomisin secara

akurat mencerminkan mekanisme penyakit untuk semua pasien IPF (Chaudhary et al., 2006).

Aplikasi BLM intratrakeal segera mendorong pelepasan sitokin proinflamasi seperti faktor nekrosis tumor- α (TNF- α), IL-1 β , IL-6 (juga, profibrotik), dan IL-8. Selanjutnya, peradangan sembuh dan fibrosis terdeteksi selama periode transisi 3 hari berikutnya. Perubahan fibrotik terjadi sekitar 9 hari setelah aplikasi BLM. Tahap akhir (fibrotik) bertahan selama 3-4 minggu setelah pemberian BLM dan ditandai dengan deposisi matriks ekstraseluler yang intens, menghasilkan jaringan fibrotik. Oleh karena itu, penelitian yang berkaitan dengan fibrosis paru yang diinduksi BLM diklasifikasikan sebagai pencegahan ketika agen yang diuji diberikan sebelum BLM dan sebagai terapi ketika diberikan 7 hari setelah BLM (Chu et al., 2017).

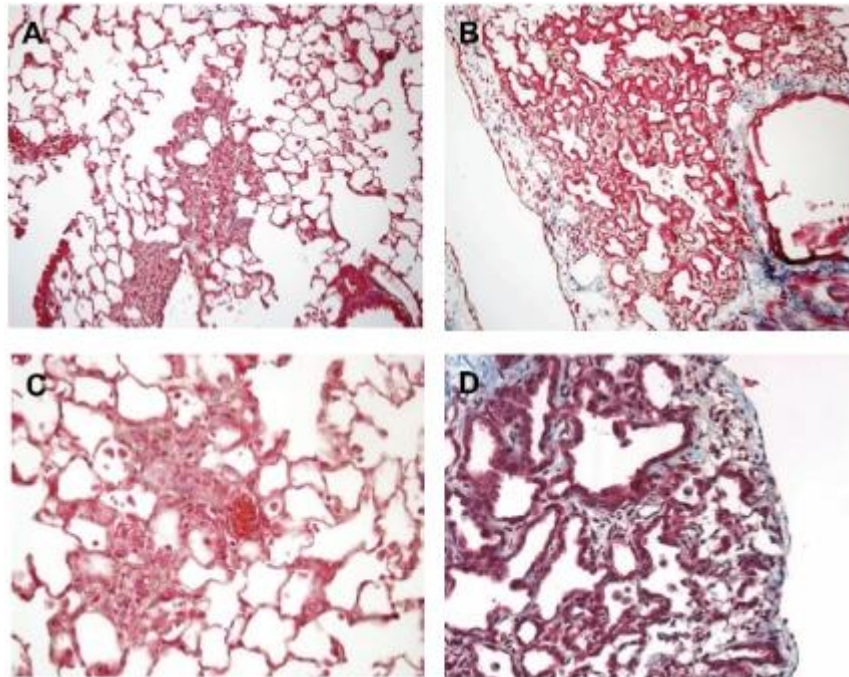
Rute pemberian yang paling umum adalah intratrakeal, umumnya menyebabkan respon inflamasi dan peningkatan apoptosis epitel selama 7 hari pertama, mirip dengan cedera paru akut (ALI). Ini diikuti oleh 3 hari masa transisi, di mana peradangan sembuh dan fibrosis terdeteksi. Tahap fibrotik bertahan sampai 3-4 minggu pasca BLM dan ditandai dengan deposisi matriks ekstraseluler yang berlebihan, menyebabkan terbentuknya area fibrosis (Mouratis & Aidinis, 2011).

Hasil penelitian Chu et al (2017), menyebutkan bahwa untuk menentukan dosis optimal bleomisin sulfat, 10 ekor tikus Wistar jantan per kelompok diinjeksi secara intratrakeal dengan bleomisin sulfat 0,05-2,75 mg/kg dalam 300 μ l saline menggunakan kateter (diameter dalam 0,5 mm, diameter luar 1,0 mm) melalui saluran hidung. Setelah 21 hari, hewan dibunuh dengan injeksi Narcoren intraperitoneal yang mematikan. Pewarnaan kolagen dan ekspresi penanda profibrotik dianalisis. Kemudian Dosis 2,2 mg/kg didapatkan untuk menghasilkan fibrosis paru yang kuat dan tanpa efek pada kelangsungan hidup hewan atau berat badan.

Respon awal induksi bleomisin memperlihatkan banyak ditemukannya sel neutrofil yang dengan cepat berkurang seiring waktu dan digantikan dengan meningkatnya jumlah limfosit dan makrofag pada saluran napas. Kemudian setelah 35 hari, jumlah sel pada *Bronchoalveolar lavage* (BAL) tikus yang telah diberi bleomisin kembali normal sehingga memperlihatkan hasil yang sama dengan kelompok kontrol. Sedangkan Pemberian bleomisin berulang disebut

berperan dalam meningkatkan infiltrasi sel inflamasi pada BAL tikus (Desdiani et al., 2020).

Bleomisin menginduksi reaksi respon inflamasi yang mengakibatkan cedera paru-paru melalui deposisi kolagen (MMP-7 dan hidroksiprolin) di jaringan paru-paru, Bleomisin menginduksi peningkatan yang signifikan pada tingkat TNF- α , IL-1 β , LM meningkatkan ekspresi protein NF- κ B (p65) dalam sitoplasma, bleomisin merupakan antibiotik glikopeptida yang secara konvensional digunakan sebagai terapi antikanker. MMP-7 mengaktifkan TGF- β , faktor pertumbuhan fibrogenik potensial yang menginduksi fibrosis paru dan mendorong kontraksi fibroblast kolagen. Patogenesis fibrosis paru dapat dipicu oleh cedera sel epitel paru oleh rangsangan fibrogenik, sehingga penting untuk peradangan paru, yang dikendalikan oleh beberapa jenis sel dan sitokin. TGF- β 1 merupakan sitokin profibrogenik yang paling poten. TGF- β 1 dapat mendorong fibroblast paru untuk mensekresi kolagen atau menginduksi transformasi fibroblast menjadi miofibroblas yang mengekspresikan–smooth muscle actin (α -SMA); keduanya merupakan langkah penting dalam patogenesis fibrosis paru. Bleomisin menginduksi pelepasan ROS dan RNS dengan mengikat DNA dan besi, mengakibatkan kerusakan DNA. Interaksi Bleomisin dan DNA disarankan untuk memulai respon inflamasi dan perubahan proliferasi fibro melalui sitokin yang menghasilkan augmentasi kolagen di paru-paru. Selain itu, bleomisin menyebabkan penipisan pertahanan antioksidan endogen, yang pada gilirannya menyebabkan kerusakan jaringan alveolar yang diinduksi ROS dan RNS (Raish et al., 2018).



Gambar 2.1. Gambaran Paru dengan Bleomisin (Degryse et al., 2010)

Keterangan: Bagian paru-paru bernoda biru trichrome post bleomycin. A dan C: area fibrosis yang tidak merata dicatat pada bagian paru-paru yang diwarnai trichrome dari tikus 2 minggu setelah dosis tunggal 0,04 unit bleomycin. B dan D: sebaliknya, fibrosis lebih menonjol pada bagian paru-paru yang diwarnai trichrome dari tikus 2 minggu setelah dosis berulang di minggu ke-8 0,04 unit bleomycin. Selanjutnya, hyperplasia sel epitel alveolar (AEC) menonjol dengan model berulang. Pembesaran dalam A dan B, 40; perbesaran di C dan D, 400 (Degryse et al., 2010).

2.4 Tinjauan tentang Hewan Coba

Model hewan yang paling sering digunakan untuk mempelajari patogenesis dan pengobatan IPF dan fibrosis paru terkait merupakan model fibrosis paru yang diinduksi bleomisin pada hewan pengerat seperti tikus putih. Bleomisin diberikan secara intratrakeal langsung ke paru-paru, yang menginduksi cedera paru-paru dari pembelahan DNA yang dimediasi bleomisin. Respon inflamasi yang dihasilkan menyebabkan kerusakan pada epitel saluran napas, aktivasi fibroblas, dan fibrosis berikutnya. Banyak agen yang menargetkan jalur pensinyalan yang beragam seperti pensinyalan EGFR dan PDGFR, agen antiinflamasi seperti obat antiinflamasi nonsteroid dan kortikosteroid, sitokin, antioksidan, antikoagulan, berbagai terapi gen, dan antagonis angiotensin II, menghambat fibrosis sangat efektif dalam model ini (Chaudhary et al., 2006).

Tikus telah terbukti menjadi model hewan yang paling banyak digunakan karena murah dan mudah dipelihara, memiliki kemiripan dengan organism manusia dan ada alat genetik yang memungkinkan manipulasi yang tidak mungkin dilakukan pada organisme lain (Mouratis & Aidinis, 2011).

Relatif terhadap tikus jantan, tikus betina memiliki morbiditas dan mortalitas yang lebih besar dalam menanggapi bleomisin. Selain itu paru-paru tikus betina menunjukkan fibrosis interstisial yang lebih parah dan luas dibandingkan tikus jantan menurut pemeriksaan histopatologi. Lebih lanjut, jaringan paru-paru wanita menunjukkan derajat inflamasi dan fibrosis paru yang lebih tinggi yang disertai dengan tingkat deposisi kolagen paru yang lebih tinggi yang dinilai dari kandungan hidroksi prolin paru. Peningkatan respons fibrotik pada tikus betina ini juga tercermin dalam tingkat mRNA yang lebih tinggi untuk prokolagen-1 (SAYA), - 1 (III), serta peningkatan ekspresi sitokin fibrogenik yang lebih besar. Secara keseluruhan, temuan ini memberikan dukungan untuk kesimpulan bahwa ada perbedaan tergantung gender yang signifikan dalam respons terhadap cedera paru-paru, dan bahwa jenis kelamin perempuan dapat mewakili factor risiko untuk pengembangan fibrosis paru yang lebih parah. Mekanisme untuk perbedaan yang diamati ini mungkin melibatkan faktor genetik, sistem kekebalan, atau hormonal (Kermani M G et al., 2005).

2.4.1 Tikus Putih

Hewan coba yang digunakan merupakan hewan yang dikembang biakkan dengan tujuan untuk digunakan sebagai hewan uji coba. Selama bertahun tahun tikus telah sering digunakan dalam berbagai macam penelitian medis. Hal tersebut karena tikus mudah berkembang biak, biaya yang murah serta mudah untuk mendapatkannya (El-Zeftawy et al., 2020).

Tikus merupakan hewan laboratorium yang umumnya digunakan dalam penelitian dan percobaan yaitu untuk mempelajari pengaruh obat-obatan, toksisitas, metabolisme, embriologi ataupun dalam mempelajari tingkah laku (Rabolli et al., 2011). Tikus termasuk hewan mamalia, maka dari itu dampaknya terhadap suatu perlakuan mungkin tidak jauh berbeda dibanding dengan mamalia lainnya (Ruff & DeVore, 2014).

Klasifikasi tikus putih (*Rattus norvegicus*) merupakan sebagai berikut (Abidi et al., 2017) :

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Subfilum	: Vertebrata
Kelas	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Subordo	: Odontoceti
Familia	: Muridae
Genus	: <i>Rattus</i>
Species	: <i>Norvegicus</i>

Tikus ini ditempatkan dalam genus *Rattus*, famili Muridae, ordo Rodentia, spesies *Rattus norvegicus* serta masuk dalam kelas Mamalia. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) berasal dari Asia Tengah dan penggunaannya telah menyebar luas di seluruh dunia (Rabolli et al., 2011). Tikus putih merupakan strain albino dari *Rattus norvegicus*. Tikus memiliki beberapa galur yang merupakan hasil pembiakkan sesama jenis atau persilangan. Bobot badan tikus jantan pada umur dua belas minggu mencapai 240 gram sedangkan betinanya mencapai 200 gram. Tikus memiliki lama hidup berkisar antara 4 – 5 tahun dengan berat badan umum tikus jantan berkisar antara 267 – 500 gram dan betina 225 – 325 gram (MacKinnon et al., 2012) .

Tikus termasuk hewan mamalia, oleh sebab itu dampaknya terhadap suatu perlakuan mungkin tidak jauh berbeda dibanding dengan mamalia lainnya. Selain itu tikus juga memiliki kesamaan fisiologis dengan manusia, siklus hidup yang relatif pendek, jumlah anak per kelahiran banyak, variasi sifat-sifatnya tinggi dan mudah dalam penanganan (Misharin et al., 2017).

Pertambahan bobot badan tikus dapat mencapai 5 g/ekor/hari, tikus jantan tua dapat mencapai bobot badan 500 g, tetapi tikus betina jarang lebih dari 350 g. Kebutuhan pakan bagi seekor tikus setiap harinya kurang lebih sebanyak 10% dari bobot tubuhnya jika pakan tersebut berupa pakan kering dan dapat ditingkatkan sampai 15% dari bobot tubuhnya jika pakan yang dikonsumsi berupa pakan basah. Kebutuhan minum seekor tikus setiap hari kira-kira 15-30 ml air. Jumlah ini dapat berkurang jika pakan yang dikonsumsi sudah banyak mengandung air (Cardiovascular & Pathology, n.d.).

2.5 Tinjauan tentang Histopatologi

Fibrosis paru-paru manusia telah digambarkan secara histopatologis sebagai sekelompok pneumonia interstitial termasuk pneumonia interstitial biasa (UIP), juga dikenal sebagai fibrosis paru idiopatik (IPF), pneumonia interstitial deskuamasi (DIP), penyakit paru interstitial bronkiolitis pernapasan (RB), pneumonia interstitial limfoid (LIP), pneumonia pengorganisasian kriptogenik (OP), kerusakan alveolar difus (DAD) atau pneumonia interstitial akut (AIP), dan pneumonia interstitial nonspesifik (NSIP). Variasi besar ditemukan antara prognosis pneumonia interstitial yang berbeda. NSIP, DIP, RB, dan LIP memiliki mortalitas 5 tahun kurang dari 10% dan biasanya responsive terhadap pengobatan kortikosteroid. IPF dan AIP memiliki prognosis yang buruk dengan mortalitas 5 tahun > 60% dan umumnya tidak responsive terhadap pengobatan (Day, 2008).

Perbaikan jaringan rusak merupakan mekanisme biologi dasar yang melibatkan penggantian sel dan jaringan rusak setelah jejas, dan merupakan proses penting untuk kelangsungan hidup. Jika proses ini terhambat maka akan berkembang menjadi jaringan parut yang menetap, ditandai dengan akumulasi komponen matriks ekstraselular seperti asam hialuronat, fibronektin, proteoglikan dan kolagen interstitial pada jaringan paru yang luka (Tanjore et al., 2009).

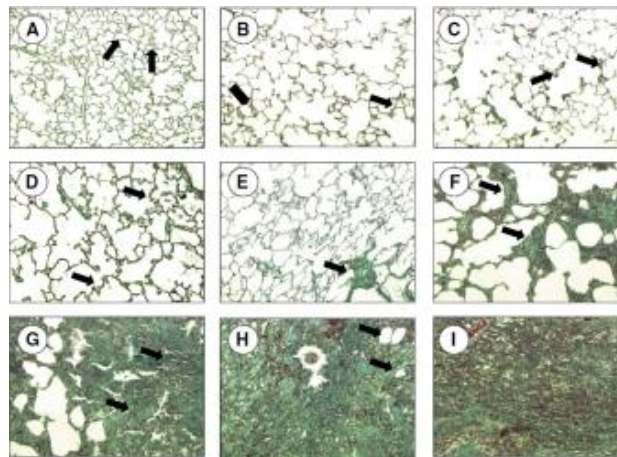
Penyembuhan luka terdiri atas 4 tahap yaitu fase koagulasi, fase inflamasi, fase proliferasi dan migrasi fibroblast serta fase remodeling. Fibrosis paru pada hewan kecil secara histologi, dinilai dengan menggunakan modifikasi *Ashcroft scale*. Skala yang sudah dimodifikasi ini memiliki korelasi yang lebih baik dengan gambaran CTscan dibandingkan dengan skala Ashcroft konvensional. Model fibrosis paru yang diinduksi oleh Bleomisin, digunakan untuk mengetahui mekanisme yang berkaitan dengan fibrosis paru. Model Bleomisin merupakan sistem *in vivo* yang paling umum digunakan untuk meneliti pemberian obat. Penilaian histologist lesi fibrosa dilakukan dengan menggunakan sistem penilaian semikuantitatif buta yang diadopsi oleh Ashcroft untuk tingkat dan tingkat keparahan peradangan dan fibrosis pada parenkim paru (Desdiani et al., 2020).

Tingkat keparahan peradangan dikategorikan sebagai salah satu dari berikut ini: Tingkat 0, tidak adanya peradangan; Grade 1, peradangan minimal; Derajat 2, peradangan minimal sampai sedang; Derajat 3, inflamasi sedang dengan penebalan dinding alveolus; Grade 4, peradangan sedang hingga

parah; dan Grade 5, peradangan parah dengan adanya folikel (Chaudhary et al., 2006).

Tingkat keparahan fibrosis interstisial ditentukan dengan menggunakan system penilaian, yang dijelaskan oleh Ashcroft Seluruh bagian paru-paru diamati pada 100 pembesaran, dan skor berkisar antara 0 (normal) dan 8 (fibrosis total) ditetapkan. Kategori fibrosis paru merupakan sebagai berikut: Grade 0, paru-paru normal; Grade 1, penebalan fibrosa minimal pada dinding alveolus atau bronkus; Derajat 2-3, penebalan dinding sedang tanpa kerusakan nyata pada arsitektur paru; Derajat 4-5, peningkatan fibrosis dengan kerusakan nyata pada arsitektur paru dan pembentukan pita fibrosa atau massa fibrosa kecil; Grade 6-7, distorsi struktur yang parah dan area fibrosa yang besar, "paru-paru sarang lebah" ditempatkan dalam kategori ini; dan Grade 8, obliterasi fibrotik total lapangan. Skor rata-rata dari semua bagian diambil sebagai skor fibrosis dari bagian paru-paru itu (Abidi et al., 2017).

Gambaran fibrosis dengan modifikasi skala ashcroft dapat dilihat dalam gambar 2.2



Gambar. 2.2. Gambaran fibrosis paru dengan modifikasi skala Ashcroft (Hubner et al., 2008)

Adapun metode analisis yang digunakan memiliki Karakterisasi skala modifikasi *Ashcroft* yang dapat dilihat dalam tabel 2.2

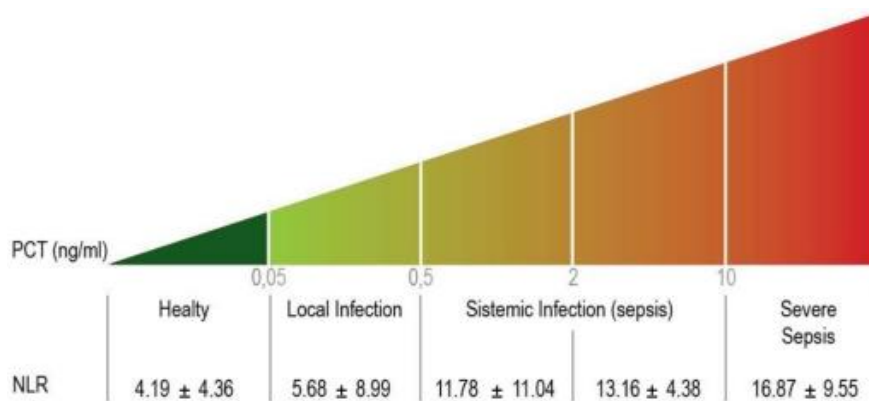
Tabel 2.2 Karakterisasi skala modifikasi *Ashcroft* (Hubner et al., 2008)

Derajat fibrosis	Sampel foto	Skala modifikasi
0	Gambar A	Septum alveoli: tidak ditemukan fibrosis pada sebagian besar dinding alveoli. Struktur paru normal
1	Gambar B	Septum alveoli: fibrosis terbatas, ketebalan septum $\leq 3x$ dari normal. Struktur paru sebagian alveoli membesar, belum terlihat fibrosis
2	Gambar C	Septum alveoli: fibrosis tampak jelas, ketebalan septum $\geq 3x$ dari normal. Struktur paru sebagian alveoli membesar, belum terlihat fibrosis
3	Gambar D	Septum alveoli: dinding mulai fibrosis, ketebalan $\geq 3x$ dari normal. Struktur paru: sebagian alveoli membesar, belum terlihat fibrosis
4	Gambar E	Septum alveoli: bervariasi. Struktur paru: <i>single fibrotic masses</i>
5	Gambar F	Septum alveoli: bervariasi. Struktur paru <i>confluent fibrotic masses</i> , $\geq 10\%$ dan $\leq 50\%$ lapangan pandang, kerusakan struktur meluas
6	Gambar G	Septum alveoli: bervariasi, sebagian besar berubah bentuk. Struktur paru: massa fibrotik besar, $\geq 50\%$ lapangan pandang, kerusakan struktur sangat luas
7	Gambar H	Septum alveoli: tidak berbentuk. Struktur paru: alveoli bergabung dengan massafibrosis, masih tampak gelembung udara

8	Gambar I	Septum alveoli: tidak berbentuk. Struktur paru: <i>completeobliteration with fibrotic masses</i>

2.6 Tinjauan tentang Neutrofil limfosit rasio (NLR)

NLR dihitung sebagai rasio antara jumlah absolut neutrofil (ANC) dan jumlah absolut limfosit, Signifikansi penanda inflamasi sistemik ini dapat dijelaskan dengan peran neutrofil dalam mempromosikan peradangan dan akibatnya lingkungan yang memadai untuk pertumbuhan tumor. Neutrofil mempromosikan remodeling matriks ekstraseluler dan perkembangan tumor dengan mengaktifkan berbagai macam penanda inflamasi seperti faktor pertumbuhan endotel vaskular dan faktor anti-apoptosis seperti faktor nuklir kappa-penambah rantai cahaya sel B yang diaktifkan. Sebaliknya, jumlah limfosit mencerminkan aktivasi sistem kekebalan tubuh dan akibatnya menghambat proliferasi tumor dan migrasi (Galvano et al., 2020).



Gambar 2.3. Tingkat peradangan berdasarkan nilai NLR (Gurol et al., 2015).

NLR berfungsi dengan berasosiasi dengan protein lain dan melalui banyak adaptor yang saling berinteraksi. NLR dapat membentuk inflamasi untuk melepaskan IL-18 dan IL-1 β , yang merupakan sitokin proinflamasi dan terkait dengan perbaikan dan regenerasi sel. Selain itu, NLR dapat mengatur jalur pensinyalan NF- κ B, STAT3, MAPK, dan AKT dengan cara yang tidak tergantung pada inflamasi (Zhu & Cao, 2017).

Neutrofil adalah sel darah putih penanggap pertama yang dimobilisasi ke tempat kerusakan endotel akut atau infeksi. Neutrofil penting dalam peradangan akut dan pertahanan infeksi bakteri dan jamur, aktivitas neutrofil yang meningkat secara kronis dapat menyebabkan kerusakan jaringan. Sedangkan limfosit adalah jenis lain dari sel darah putih pusat respon imun, limfosit merupakan kunci dalam respon terhadap infeksi dan terkait dengan perkembangan penyakit inflamasi dan autoimunitas. NLR diperoleh dari jumlah darah lengkap (biasanya 1.000/-l). Karena jumlah neutrofil dan limfosit adalah standar dalam tes darah rutin, NLR mewakili penanda peradangan yang hemat biaya dan mudah tersedia tetapi tidak spesifik. NLR dikaitkan dengan kejadian, morbiditas, dan mortalitas pada beberapa penyakit sistemik, termasuk penyakit kardiovaskular dan keganasan (Soder et al., 2020).

Jumlah limfosit meningkat mengikuti stres awal dan memediasi respon inflamasi berikutnya. Pandangan tradisional adalah bahwa neutrofilia adalah penyebab utama peningkatan NLR, SIRS, dan prognosis yang buruk, sementara jumlah limfosit tetap statis. limfopenia dalam 24 jam setelah masuk dan limfopenia persisten di luar periode ini merupakan kontributor peningkatan NLR dan prognosis buruk seperti neutrofilia. Ini direplikasi dalam penelitian lain di mana limfopenia persisten merupakan penanda independen peradangan progresif, bakteremia, atau sepsis pada pasien rawat inap darurat dan perawatan intensif. Peradangan yang tidak terkontrol diduga memicu limfopenia melalui redistribusi limfosit dan percepatan apoptosis, dan limfopenia (3% vs 16%) dikaitkan dengan kematian yang lebih tinggi pada pasien dengan syok septik (Suppiah et al., 2013).

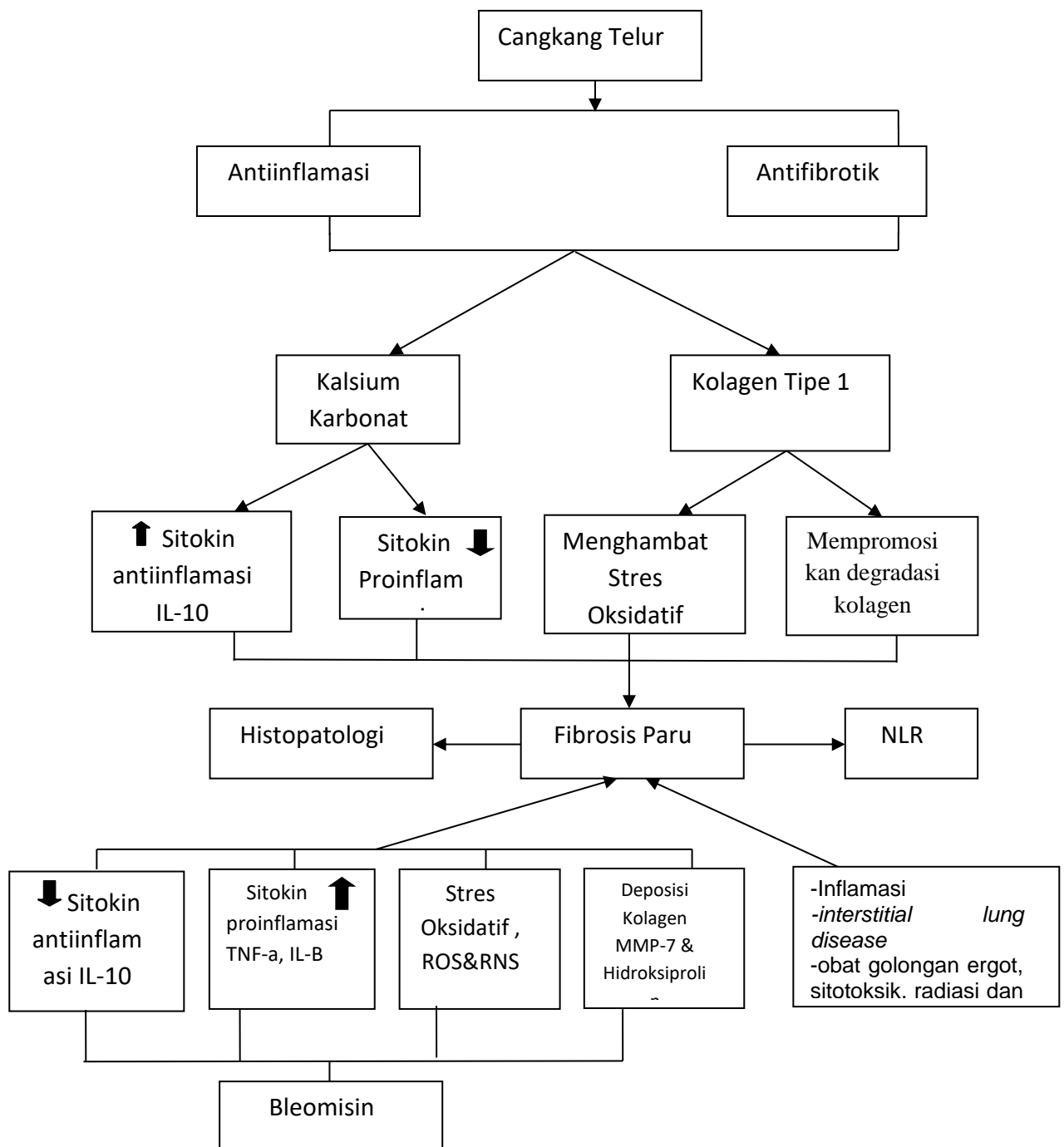
NLR merupakan penanda penting dalam penilaian inflamasi sistemik yang hemat biaya dan dapat dihitung dengan cepat dan mudah. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa NLR lebih tinggi pada pasien dengan AS dan NLR dapat dilihat sebagai penanda yang berguna dalam menunjukkan peradangan dan dalam mengevaluasi efektivitas terapi anti-TNF- α (Gökmen et al., 2015). Anti-fibrotik dan aktivitas anti-inflamasi nintedanib dapat memengaruhi perjalanan klinis penyakit paru-paru penyakit fibrotik seperti IPF (Wollin et al., 2014).

Respon inflamasi neutrofilik berpotensi menjadi penanda penting dari prognosis buruk. NLR merupakan penanda inflamasi subklinis yang mudah diukur, dapat direproduksi, dan tidak mahal. Selain itu, NLR merupakan indikasi dari gangguan imunitas yang diperantarai sel yang terkait dengan peradangan sistemik (Faria et al., 2016).

NLR merupakan indeks yang diperoleh sebagai proporsi neutrofil dan limfosit, yaitu komponen hematologi dari inflamasi sistemik. Dalam penelitian terbaru, NLR telah digunakan bersama dengan penanda inflamasi lainnya dalam menentukan peradangan pada penyakit rematik dan penyakit nonrematik dan telah terbukti menjadi indikator peradangan yang baik (Gökmen et al., 2015). NLR merupakan biomarker inflamasi. Rasio neutrofil terhadap limfosit (NLR) dan indeks inflamasi imun sistemik (SII) merupakan penanda inflamasi yang mungkin mencerminkan potensi antiinflamasi diet (Szymanska et al., 2021).

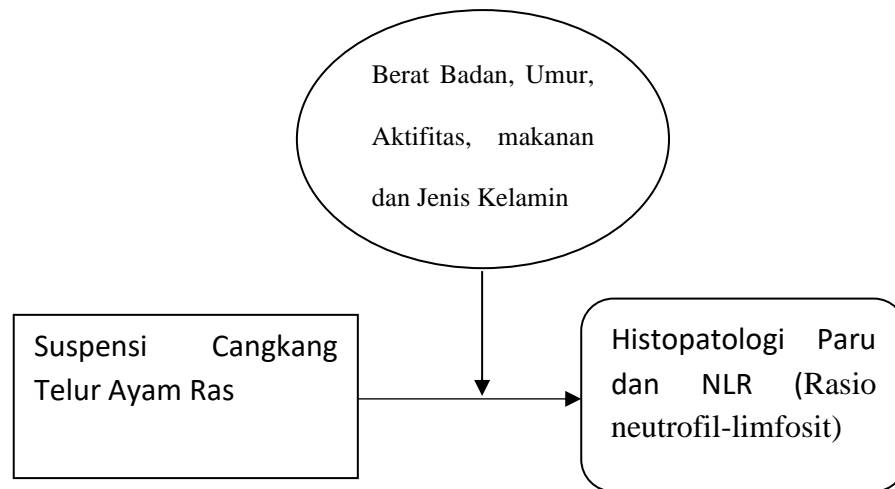
Rasio neutrofil terhadap limfosit (NLR) merupakan indeks untuk evaluasi peradangan, dua variabel yang dapat dengan mudah diperoleh dari tes darah. NLR mengintegrasikan dua jalur kekebalan - neutrofil yang menggambarkan peradangan terus menerus dan limfosit yang menggambarkan jalur regulasi. NLR juga telah banyak digunakan sebagai penanda prognostik untuk penilaian pasien dengan berbagai kanker, termasuk kanker lambung, kanker kolorektal, kanker payudara, kanker paru-paru, kanker ovarium, kanker pankreas dan HCC5-11. Peradangan sistematis memiliki peran yang diakui dalam Patogenesis sirosis lanjut. Dengan demikian, NLR dapat menjadi penanda yang mencerminkan keparahan fibrosis hati (Peng et al., 2018).

2.7 Kerangka Teori



Gambar 2.4 Kerangka Teori

2.8 Kerangka Konsep



Keterangan:

 : Variabel Independen

 : Variabel Kontrol

 : Variabel Dependen

Gambar 2.5 Gambar Kerangka konsep

2.9 Hipotesis Penelitian

2.9.1 Hipotesis Nol (H₀)

Tidak ada pengaruh pemberian suspensi cangkang telur terhadap kerusakan paru pada tikus wistar yang diinduksi Bleomisin.

2.9.2 Hipotesis Alternatif (H_a)

Ada pengaruh pemberian suspensi cangkang telur terhadap kerusakan paru pada Tikus wistar yang diinduksi Bleomisin melalui pengamatan histopatologi paru dan pengukuran NLR.