

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

***EFFECT OF EGGHELL SUSPENSION ADMINISTRATION AGAINST  
PULMONARY FIBROSIS OF WHITE RATS (*RATTUS NORVEGICUS*)  
BLEOMYCIN-INDUCED***

**Nur Amalia Alif<sup>1</sup>, Aryadi Arsyad<sup>2</sup>, Arif Santoso<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Program Studi Ilmu Biomedik Sekolah Pascasarjana, Fakultas Kedokteran,  
Universitas Hasanuddin, Makassar, Indonesia

<sup>2</sup>Departemen Fisiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin, Makassar, Indonesia

<sup>3</sup>Departemen Pulmonologi dan Kedokteran Respirasi, Fakultas Kedokteran,  
Universitas Hasanuddin, Makassar, Indonesia

email: [aryadi.arsyad@med.unhas.ac.id](mailto:aryadi.arsyad@med.unhas.ac.id)

**Abstrak**

Fibrosis paru adalah gangguan paru-paru yang menunjukkan pembentukan jaringan paru yang melibatkan infiltrasi sel inflamasi, proliferasi fibroblas, spesies oksigen reaktif (ROS) dan akumulasi matriks ekstraseluler yang berlebihan di parenkim paru-paru. Kebaruan dalam penelitian ini karena meneliti tentang efek pemberian suspensi cangkang telur terhadap fibrosis paru tikus putih yang diinduksi bleomisin. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan efek anti-fibrotik dan anti-inflamasi dari suspensi kulit telur pada model fibrosis paru tikus. Penelitian percobaan dengan rancangan post-test only control group menggunakan wirar jantan *Rattus norvegicus* dengan berat 200-250 g sebanyak 25 ekor tikus dibagi menjadi 5 kelompok (n = 5). Pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan histopatologi paru-paru yang dianalisis menggunakan metode *Ashcroft* yang dimodifikasi dan menghitung *Neutrophil Lymphocyte Ratio* (NLR). Hasil penelitian menunjukkan bahwa gambaran histopatologis paru-paru pada K1 tidak menemukan fibrosis sedangkan pada kelompok K2 fibrosis paru berkembang derajat 6 hingga 7 dengan massa fibrotik besar  $\geq 50\%$  bidang visual. Pengurangan luas fibrosis pada kelompok P1 dan P2 menjadi derajat 4 sampai 5. Sedangkan, pada kelompok P3 derajat fibrosis adalah 2 sampai 3. Hasil ini menunjukkan bahwa area fibrosis paru menurun dengan meningkatnya dosis suspensi kulit telur. Nilai NLR untuk semua kelompok dinyatakan dalam batas normal ( $<4$ ). Kesimpulan bahwa suspensi kulit telur memiliki efek anti-fibrotik dan anti-inflamasi pada model fibrosis paru-paru tikus yang disebabkan oleh bleomycin.

**Kata Kunci:** Bleomisin; Fibrosis; Histologi; NLR.

**Abstract**

*Pulmonary fibrosis is a lung disorder that indicates the formation of lung tissue involving infiltration of inflammatory cells, the proliferation of fibroblasts, reactive oxygen species (ROS), and excessive accumulation of the extracellular matrix in the lung parenchyma. The novelty of this study is that it examines the effect of eggshell suspension administration on bleomycin-induced white rat pulmonary fibrosis. This study aims to prove eggshell suspension's anti-fibrotic and anti-inflammatory effects in models of rat pulmonary fibrosis. In this study, a histopathological examination of the lungs was carried out, which was analyzed using the modified Ashcroft method and calculated the Neutrophil Lymphocyte Ratio (NLR). The experimental research with a post-test-only control group design using *Rattus norvegicus* male wire weighing 200-250 g, as many as 25 mice divided into five groups (n = 5). The results showed that the histopathological picture of the lungs in K1 did not find fibrosis. Reduction of fibrosis area in groups P1 and P2 to degrees 4 to 5. In contrast, in the K2 group, pulmonary fibrosis developed degrees 6 to 7 with a sizeable fibrotic mass of  $\geq 50\%$  visual field. Meanwhile, in the P3 group, the degree of fibrosis is 2 to 3. These results show that the area of pulmonary fibrosis decreases with increasing doses of eggshell suspension. NLR values for all groups are expressed within normal limits ( $<4$ ). The conclusion is that eggshell suspension has anti-fibrotic and anti-inflammatory effects on a model of rat lung fibrosis caused by bleomycin.*

**Keywords:** bleomycin; Fibrosis; Histology; NLR.

## 1. PENDAHULUAN

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 (1). Fibrosis paru merupakan 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 yang dapat menyebabkan gangguan fungsi paru (2)(3). Fibrosis paru disebabkan oleh inflamasi, trauma, idiopatik seperti pneumonia, efusi pleura, empiema, tuberkulosis, asbestosis, *interstitial lung disease/idiopathicpulmonary fibrosis*, obat golongan ergot, sitotoksik, radiasi dan pascakemoterapi. Selain itu penyakit jaringan ikat sistemik, hemotoraks dan pascatorakotomi juga sering menjadi penyebab fibrosis (4)(5).

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 (6).

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 (7).

Studi (8) menyatakan dalam penelitiannya bahwa cangkang telur mengandung kalsium karbonat (CaCO<sub>3</sub>) yang tinggi, sedangkan (9) dan (10) menyebutkan bahwa kalsium karbonat memiliki daya anti inflamasi dengan mengurangi sitokin pro inflamasi, didukung oleh penelitian (11) 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 $\beta$  dan IL-6. Juga, fosforilasi dari subunit p65 dan p50 dari NF- $\kappa$ 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 (6).

Studi yang dilakukan oleh (7) 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 (12) 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. (13) menyatakan bahwa membrane cangkang telur memiliki Efek anti-fibrotik, Sedangkan Penelitian oleh (14) dengan suplementasi oral membrane cangkang telur secara efektif menghasilkan pengurangan sitokin pro inflamasi pada tikus.

Berdasarkan uraian diatas menunjukkan bahwa cangkang telur yang mengandung kalsium karbonat yang tinggi dengan sifat antiinflamasi dan antifibrotiknya dapat di terapkan dalam penanganan fibrosis paru yaitu dengan harapan dapat 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.

## 2. METODE

Metode pengumpulan data

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dengan berat badan 200-250g 25 ekor dibagi kedalam 5 kelompok (n = 5) diantaranya yaitu kelompok kontrol negatif (cmc), kelompok kontrol positif (bleomisin dan cmc), kemudian kelompok perlakuan dengan dosis bertingkat yaitu kelompok dosis rendah 6,13mg/kg BB, dosis sedang 10,0mg.kg BB dan dosis tinggi 26,0mg/kgBB. Subjek dirawat didalam laboratorium terkontrol suhu, tekanan udara, kelembaban, dan siklus gelap dan terang setiap 12 jam serta diberi pakan standar dan minum secara ad libitum di Laboratorium Universitas Negeri Makassar. Proses penelitian dilakukan dengan mengikuti Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Edition 8, oleh Institute for Laboratory Animal Research 2011 dan disetujui oleh komisi etik Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin (Nomor: 350/UN4.6.4.5.31/PP36/2022).

Induksi fibrosis dilakukan dengan cara tikus dipuasakan selama 24 jam kemudian kelompok dosis tunggal diberi Bleomisin 2,2 mg/kgBB pada hari ke-1 secara intratracheal. Setelah itu dilakukan nekropsi dan pengangkatan jaringan di hari ke-29. Pemberian perlakuan dengan suspensi cangkang telur di berikan selama seminggu pada hari ke-22 sampai hari ke-28 dengan menggunakan sonde.

Tiap hewan coba dari masing-masing kelompok dieutanasia dibawah anestesi ringan menggunakan eter kemudian dilanjutkan

dengan pembedahan bagian abdomen untuk mengangkat organ parunya. Spesimen yang terfiksasi selanjutnya didehidrasi kedalam alkohol bertingkat, dijernihkan dalam xilol bertingkat, ditanam pada paraffin, dipotong tipis  $\pm 5 \mu\text{m}$ , dan diwarnai dengan hematoxylin dan eosin (H&E). Seluruh perbandingan dan perubahan histologi paru diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran lensa objektif 10x. Gambaran fibrosis di analisis menggunakan skala modifikasi Ashcroft (15).

Metode analisis data

Analisis Statistik dilakukan dengan program SPSS versi 26.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). Data yang terkumpul diuji normalitasnya menggunakan uji *Shaphiro-Wilk* jika nilai  $p > 0.05$  dinyatakan terdistribusi normal *Kolmogorov-Smirnov*. Uji homogenitas data menggunakan uji *Levene's Test*. Data homogen dengan nilai  $p > 0.05$ .

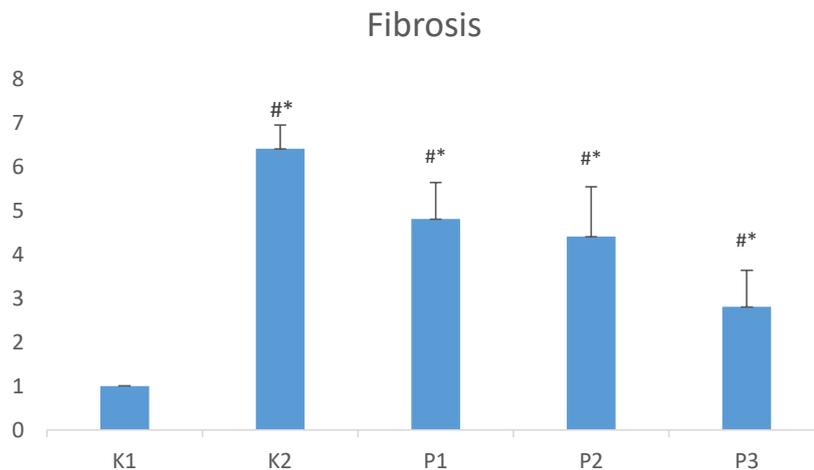
Analisis yang digunakan untuk menguji perbedaan rerata dari variabel dua kelompok (kelompok kontrol dan kelompok perlakuan) adalah uji T (*Independen T-test*) dengan tingkat pemaknaan 5% ( $p < 0.05$ ) jika data terdistribusi normal. Selain itu, akan digunakan jenis analisis uji komparabilitas menggunakan *Mann-Whitney* jika data tidak terdistribusi normal.

### 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

#### Hasil pemeriksaan Histopatologi

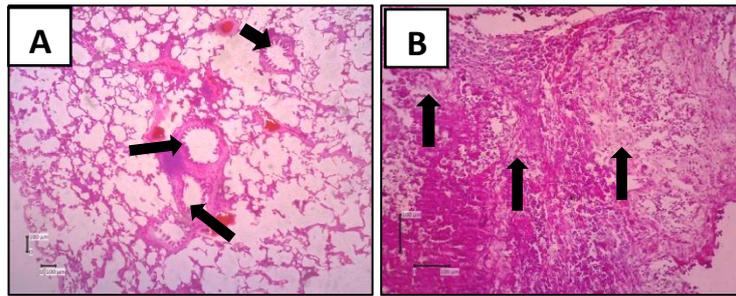
Pembuatan preparat histopatologi dilakukan pada hari ke-29 dengan pengambilan sampel melalui tindakan nekropsi. Adapun hasil pengamatan yang diperoleh sebagai berikut :

Perbandingan rata-rata derajat fibrosis paru tikus pada tiap kelompok dapat dilihat pada grafik dalam gambar 3.1



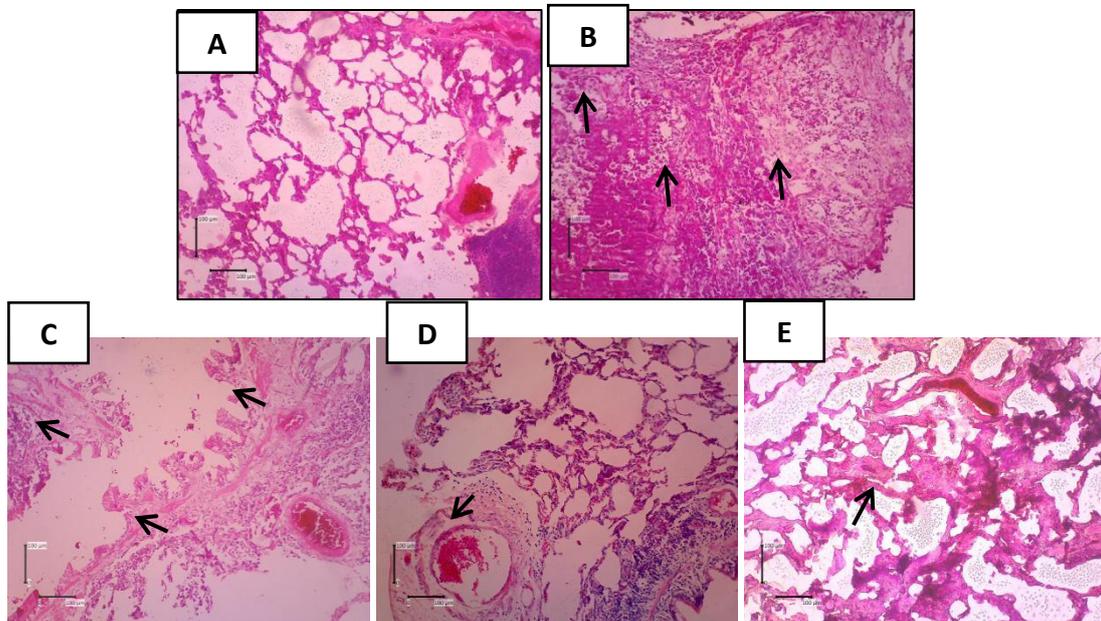
Gambar 3.1. Diagram rata-rata derajat fibrosis paru pada tiap kelompok (K1; kontrol negatif cmc 0,5%, K2;kontrol positif bleomisin 2,2 mg/kg BB, P1;bleomisin + suspensi cangkang telur 6.13mg/kgBB, P2;bleomisin + suspensi cangkang telur 10.0mg/kgBB, P3;bleomisin + suspensi cangkang telur 26.0mg/kgBB). Simbol # menunjukkan  $p < 0.05$  (signifikan) terhadap kontrol negatif (K1) dan tanda \* menunjukkan  $p < 0.05$  (signifikan) terhadap kontrol positif (K2).

Perbandingan gambaran histologi paru tikus antara kelompok kontrol negative dan kontrol positif dapat dilihat dalam gambar 3.2



Gambar 3.2. Gambar A memperlihatkan gambaran histologi paru tikus kelompok kontrol negatif (K1) yang diberi CMC 0,5%. Panah hitam menunjukkan bronkioulus. Pada gambar B merupakan kelompok kontrol positif (K2). Panah hitam menunjukkan fibrosis, massa fibrotik besar,  $\geq 50\%$  lapang pandang, kerusakan struktur sangat luas (HE, Pembesaran 40X).

Perbandingan gambaran histologi paru tikus pada tiap kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dapat dilihat dalam gambar 3.3.



Gambar 3.3. Gambaran histologi paru tikus kelompok kontrol (A dan B) dan kelompok perlakuan (C,D dan E). Panah hitam disetiap gambar merupakan penunjukan fibrosis. Gambar A (K1) yang hanya diberi CMC 0.5% dan Gambar B (K2) dengan pemberian bleomisin 2,2mg/kg BB, Sedangkan Gambar C (P1) dengan pemberian bleomisin 2,2 mg/kg BB dan suspensi cangkang telur dosis rendah 6.13 mg/kg BB. Gambar D (P2) dengan pemberian bleomisin 2,2 mg/kg BB dan suspensi cangkang telur dosis sedang 10.0 mg/kg BB. Gambar E (P3) dengan pemberian bleomisin 2,2 mg/kg BB dan suspensi cangkang telur dosis tinggi 26.0 mg/kg BB. Panah hitam menunjukkan area fibrosis (HE, Pembesaran 10X)

Gambar A yang merupakan kelompok kontrol negatif yang hanya diberi CMC 0,5% memperlihatkan tidak adanya fibrosis maka dinyatakan dalam derajat 0. Sedangkan untuk gambar B yaitu kelompok kontrol positif yang

diberi bleomisin 2,2mg/kg BB menunjukkan derajat fibrosis 6-7 dengan distorsi struktur yang parah dan area fibrosa yang besar. Kemudian untuk kelompok perlakuan pada gambar C yang merupakan kelompok

perlakuan dengan pemberian suspensi cangkang telur dosis rendah 6,13mg/kg BB dan gambar D yang merupakan kelompok perlakuan dengan pemberian suspensi cangkang telur dosis sedang 10,0mg/kg BB memperlihatkan gambaran histopatologi paru dalam derajat fibrosis yang sama yaitu derajat fibrosis 4-5. Sedangkan untuk gambar E dengan dosis tinggi 26,0mg/kg BB dinyatakan dalam derajat 2-3 karena menunjukkan terjadinya penebalan dinding sedang tanpa kerusakan nyata pada arsitektur paru.

Analisa histopatologi dilakukan dengan analisis modifikasi Ashcroft dan uji statistik menggunakan Kolmogorov smirnov, lalu dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney U*. Dari uji statistik ditemukan bahwa kelompok P1,P2 dan P3 memiliki perbedaan yang signifikan terhadap K1 dan K2 ( $p < 0,05$ ). Adanya efek yang terjadi pada kelompok perlakuan yang diberi suspensi cangkang telur menyebabkan terjadinya perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.

Hasil histopatologi paru pada hewan coba dalam penelitian ini kemudian di analisis dengan metode modifikasi Ashcroft dan uji statistik menggunakan Kolmogorov smirnov, lalu dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney U*. Dari uji statistik ditemukan bahwa data  $<0,05$  maka data tidak berdistribusi normal. Maka dilanjutkan dengan uji *Mann whitney*, untuk kelompok perlakuan memiliki perbedaan yang signifikan terhadap K1 dan K2 ( $p < 0,05$ ). Yang menunjukkan bahwa kelompok perlakuan dosis tertinggi ini memperlihatkan adanya fibrosis yang tidak terdapat pada K1. Sedangkan antara kelompok

P1 dan P2 didapatkan rata-rata derajat fibrosis yang tidak jauh berbeda, Hal tersebut terjadi karena dosis pemberian suspensi cangkang telur P1 6.13mg/kg BB tidak terlalu jauh berbeda dengan P2 10.0 mg/kg BB. Yang jauh berbeda dengan dosis P3 yaitu 26.0 mg/kg BB. Luas area fibrosis terkecil terlihat pada kelompok perlakuan P3, sedangkan luas area fibrosis terbesar didapatkan pada kelompok kontrol positif yang tidak diberi perlakuan dengan pemberian suspensi cangkang telur. Cangkang telur yang mengandung kalsium karbonat yang tinggi dan disebut bersifat antiinflamasi memberikan efek penyembuhan peradangan yang lebih cepat dan meminimalisir luas area fibrosis yang terbentuk.

Hasil histologi pada kelompok P1 dan P2 yang jauh berbeda dengan P3 mungkin dipengaruhi oleh dosis pemberian suspensi cangkang telur yang terlampaui jauh. Sedangkan hasil P1 dan P2 menunjukkan hasil yang hampir sama karena dosis pemberian suspensi cangkang telur yang tidak jauh berbeda.

Pemeriksaan histopatologi paru menunjukkan bahwa pada kelompok kontrol negatif dalam pengamatan secara mikroskopis memperlihatkan struktur paru yang normal dan tidak terjadi fibrosis. Analisis berdasarkan metode modifikasi ashcroft dinyatakan dalam derajat 0 bahwa tidak ditemukannya fibrosis pada sebagian besar dinding alveoli dengan struktur paru normal sedangkan kontrol positif menunjukkan terjadinya kerusakan pada struktur paru dimana septum alveoli bervariasi, sebagian besar berubah bentuk. Struktur paru

memperlihatkan massa fibrotik besar,  $\geq 50\%$  lapangan pandang dengan kerusakan struktur yang sangat luas. Dinyatakan termasuk dalam derajat fibrosis 6-7 dimana distorsi struktur yang parah dan area fibrosa yang besar. Kemudian untuk kelompok perlakuan dengan pemberian suspensi cangkang telur dengan dosis rendah dan dosis sedang memperlihatkan septum alveoli yang bervariasi, struktur paru dengan fibrosis  $\geq 10\%$  dan  $\leq 50\%$  lapang pandang, kerusakan struktur meluas maka digolongkan dalam derajat fibrosis 4-5 dengan peningkatan fibrosis dengan kerusakan nyata pada arsitektur paru dan pembentukan pita fibrosa atau massa fibrosa kecil. Sedangkan penurunan derajat

fibrosis yang sangat jauh berbeda dengan kontrol positif yaitu pada kelompok perlakuan dengan dosis tinggi yang memperlihatkan septum alveoli dengan dinding mulai fibrosis, ketebalan  $\geq 3x$  dari normal. Struktur paru, sebagian alveoli membesar, belum terlihat fibrosis. Termasuk dalam derajat 2-3 berdasarkan analisis modifikasi ashcroft dengan penebalan dinding sedang tanpa kerusakan nyata pada arsitektur paru. Maka dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi dosis pemberian suspensi cangkang telur maka besar pula penurunan luas area fibrosis pada paru tikus model fibrosis paru yang diinduksi bleomisin.

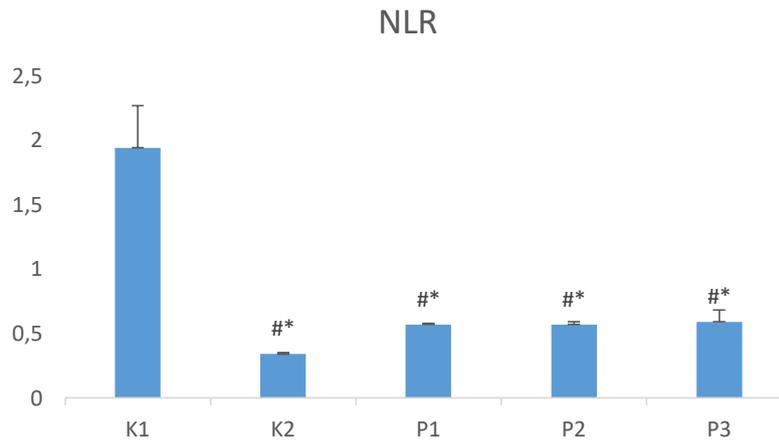
Hasil Pemeriksaan *Neutrofil Limfosit Rasio* (NLR)

Adapun hasil pengamatan yang diperoleh sebagai berikut

Tabel 3.1 Hasil pemeriksaan Neutrofil Limfosit Rasio (NLR)

<b>Kelompok</b>	<b>Rata-rata Limfosit</b>	<b>Rata-rata Neutrofil</b>	<b>Rata-rata NLR</b>	<b>Std. dev</b>
<b>K1</b>	29	55	1.94	<b>0.33</b>
<b>K2</b>	75	25	0.34	<b>0.01</b>
<b>P1</b>	64	37	0.57	<b>0.01</b>
<b>P2</b>	63	36	0.57	<b>0.02</b>
<b>P3</b>	61	36	0.59	<b>0.09</b>

Perbandingan nilai NLR pada tiap kelompok dapat dilihat pada grafik dalam gambar 3.4



Gambar 3.4. Diagram rata-rata NLR pada tiap kelompok (K1; kontrol negatif cmc 0,5%, K2; kontrol positif bleomisin 2,2 mg/kg BB, P1; bleomisin + suspensi cangkang telur 6.13mg/kgBB, P2; bleomisin + suspensi cangkang telur 10.0mg/kgBB, P3; bleomisin + suspensi cangkang telur 26.0mg/kgBB).

Simbol # menunjukkan  $p < 0.05$  (signifikan) terhadap K1 dan K2.

Rata-rata nilai NLR untuk K1 adalah 1.94, untuk K2 adalah 0.34, sedangkan untuk kelompok perlakuan P1, P2, dan P3 menunjukkan nilai NLR yaitu 0.57, 0.57, dan 0.59. Berdasarkan hasil tersebut, nilai NLR terendah ditunjukkan oleh K2, diikuti P1, P2, lalu kelompok P3 dan nilai tertinggi terdapat pada kelompok K1.

Uji normalitas menunjukkan nilai signifikansi  $p < 0.05$  yang bermakna bahwa data tidak berdistribusi normal sehingga dilanjutkan dengan uji homogenitas yang menunjukkan signifikansi  $0.000 < 0.05$  yang berarti data tidak homogen. Maka dari itu dilakukan uji Mann whitney. Hasil uji Mann whitney menunjukkan bahwa kelompok K1 (kontrol negatif) memiliki perbedaan yang signifikan dengan kelompok K2 (kontrol positif) dengan nilai  $p < 0.05$  (berbeda nyata) yang disebabkan oleh adanya pemberian induksi bleomisin pada kelompok kontrol positif. Berdasarkan uji Mann whitney P1, P2

dan P3 memiliki perbedaan yang signifikan terhadap kelompok K2 dengan nilai  $p < 0.008$  (berbeda nyata). Hal ini kemungkinan terjadi dikarenakan kelompok perlakuan dengan pemberian suspensi cangkang telur memberi efek antiinflamasi sehingga kelompok perlakuan memiliki perbedaan yang signifikan terhadap kelompok kontrol positif.

Hasil pengamatan nilai NLR yang didapatkan dalam penelitian kali ini digunakan sebagai penanda inflamasi, kemudian melihat pengaruh yang didapatkan dari pemberian suspensi cangkang telur dengan tiga dosis bertingkat pada hewan coba.

Inflamasi merupakan sebuah proses mediasi sistem imun bawaan yang diatur oleh sitokin dan kemokin proinflamasi, seperti TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18, GM-SCF, IL-8, dan MIP1a. Berdasarkan fungsinya, NLR dapat diklasifikasikan menjadi dua kategori utama, non – inflammasome dan pembentuk inflammasome. NLR yang tidak meradang

dapat dikategorikan lebih lanjut menjadi regulator NF- $\kappa$ B dan faktor transkripsi. Beberapa NLR, seperti NLRP12, telah dilaporkan memainkan peran antiinflamasi dan proinflamasi tergantung pada kondisi percobaan atau jenis rangsangan. Selain itu, beberapa NLR bertindak sebagai faktor transkripsi, seperti CIITA dan NLRC5, yang secara tidak langsung mengatur respon imun dengan mengatur ekspresi MHC II dan I pada APC (16).

Hasil pengamatan nilai NLR memperlihatkan bahwa K1 tidak mengalami peradangan dan termasuk dalam kategori normal dengan NLR  $1.94 > 1$ , sedangkan K2 menunjukkan nilai NLR rendah yaitu 0.34 yang dikarekan menurunnya kadar neutrofil dan meningkatnya kadar limfosit. Kemudian P1, P2 dan P3 memiliki nilai NLR masing-masing 0.57, 0.57 dan 0.59. Dengan begitu penelitian ini sejalan dengan penelitian oleh Ruff & DeVore, (2014) dengan suplementasi oral membrane cangkang telur secara efektif menghasilkan pengurangan sitokin pro inflamasi pada tikus. selain itu penelitian oleh (11) 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 $\beta$  dan IL-6. Juga, fosforilasi dari subunit p65 dan p50 dari faktor nuklir- $\kappa$ B, serta lokalisasi nuklir.

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 (17).

Respon awal setelah pemberian bleomisin yaitu terjadinya peradangan. Peradangan akut yang terjadi membuat terjadinya peningkatan jumlah neutrofil dalam darah hewan coba. Menurut Guyton and Hall, (1997) peradangan akut ditandai dengan peningkatan akut jumlah neutrofil dalam darah (Neutrofilia) yang disebabkan oleh produk peradangan yang memasuki aliran darah, kemudian diangkut ke sumsum tulang, dan neutrofil yang tersimpan dalam sumsum akan menggerakkan neutrofil-neutrofil ke sirkulasi darah. Hal ini membuat lebih banyak lagi neutrofil yang tersedia di area jaringan yang meradang. Namun, pada fase proliferasi akhir atau remodeling awal limfosit meningkat.

Fase inflamasi mengalami proses vasodilatasi yang menyebabkan peningkatan aliran darah ke daerah luka yang dibatasi oleh sel darah putih untuk melakukan pertahanan melawan bakteri dan debris. Kemudian sel fagosit masuk ke daerah luka dan mengeluarkan faktor angiogenesis yang merangsang pembentukan anak epitel sehingga dapat berlanjut ke fase proliferasi, dimana fibroblast mensintesis kolagen dan substansi dasar lainnya, kemudian terjadi pembentukan jaringan granulasi. Selanjutnya masuk ke fase remodeling yaitu terbentuknya kolagen yang baru dan mengubah bentuk luka dimana terbentuknya jaringan scar/parut dan akan berkurang secara bertahap pada aktivitas

seluler dan vaskularisasi jaringan yang mengalami perbaikan (18).

Cangkang telur telah diminati oleh banyak peneliti dan dibuktikan oleh pakar ilmiah bahwa cangkang telur memberikan berbagai manfaat mulai dari bidang pertanian, kesenian hingga bidang kesehatan. Bidang kesehatan khususnya, hasil sintesis cangkang telur dapat dijadikan sebagai bahan biomaterial untuk sintesis tulang dan gigi, karena cangkang telur kaya akan kalsium karbonat yang dapat disintesis menjadi kalsium hidroksiapatit. Cangkang telur juga dapat dimanfaatkan sebagai antibakteri. Pemanfaatan cangkang telur dalam bidang kesehatan dinilai aman dan bebas dari resiko alergi serta dapat menjadi solusi bagi pemerintah dalam penanganan masalah limbah lingkungan (19). Kemudian karena kandungannya yang memiliki kalsium karbonat yang tinggi maka cangkang telur memiliki potensi memberikan efek antiinflamasi yang sejalan dengan penelitian oleh Pittas et al., (2007) yang menyebutkan bahwa kalsium karbonat memiliki daya anti inflamasi dengan mengurangi sitokin pro inflamasi.

Cangkang telur disebutkan mengandung kalsium karbonat yang sangat tinggi, dimana kalsium karbonat memiliki efek antiinflamasi dengan menekan produksi sitokin proinflamasi. Menurut Vuong et al (2017) bahwa cangkang telur menekan peradangan dengan meningkatkan sekresi sitokin anti-inflamasi IL-10 sementara fraksi karbohidrat mengurangi sekresi sitokin pro-inflamasi IL-1 $\beta$  dan IL-6. Juga, fosforilasi dari subunit p65

dan p50 dari faktor nuklir- $\kappa$ B, serta lokalisasi nuklir. Sedangkan para peneliti telah menyebutkan bahwa induksi fibrosis paru dengan pemberian bleomisin secara intratrakeal segera mendorong pelepasan sitokin proinflamasi seperti factor nekrosis tumor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , IL-6 (juga, profibrotik), dan IL-8. Kemudian terjadi deposisi matriks ekstraseluler yang intens, menghasilkan jaringan fibrotik (20). Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis pemberian suspensi cangkang telur terhadap hewan coba maka semakin berkurang pula derajat fibrosis dan mengurangi tingkat peradangan yang terjadi.

Membran cangkang telur terutama terdiri dari protein berserat seperti Kolagen Tipe I. Namun, membran cangkang telur juga telah terbukti mengandung komponen bioaktif lainnya, yaitu glikosaminoglikan (misalnya dermatan sulfat, kondroitinsulfat, dan asam hialuronat (21). 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 (22). Sedangkan telah kita ketahui bahwa salah satu proses terjadinya fibrosis pada paru yang telah diinduksi menggunakan bleomisin yaitu terjadinya ekspresi berlebihan TGF- $\beta$ 1 pada hewan coba model fibrosis paru yang sebagian besar tidak tergantung pada peradangan. TGF- $\beta$ 1 menghasilkan stress oksidatif dengan induksi produksi ROS dan penurunan ekspresi antioksidan seluler. TGF- $\beta$ 1 menginduksi produksi ROS dengan aktivasi NADPH

oksidase (NOXs) dan melalui disfungsi mitokondria (23). Suspensi cangkang telur dalam penelitian ini berperan dalam menekan stress oksidatif melalui perannya sebagai antifibrotic dan antiinflamasi sehingga membantu mengurangi derajat fibrosis akibat pemberian induksi bleomisin.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat sebagai bahan acuan dan referensi kedepannya untuk lebih mengembangkan penelitian terkait efek pemberian suspensi cangkang telur terhadap fibrosis paru yang diinduksi bleomisin. Hasil penelitian ini juga dapat menjadi bahan pertimbangan untuk mengembangkan cangkang telur sebagai salah satu obat untuk mengurangi fibrosis ataupun inflamasi pada paru.

#### 4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa pemberian suspensi cangkang telur memiliki efek antifibrotik dan antiinflamasi terhadap penurunan luas area fibrosis berdasarkan pemeriksaan histopatologi dan NLR.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada pihak – pihak yang membantu dalam penelitian penelitian ini, sehingga penelitian bisa berjalan dengan lancar.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Degryse AL, Tanjore H, Xu XC, Polosukhin V V., Jones BR, McMahon FB, et al. Repetitive intratracheal bleomycin models several features of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2010 Oct;299(4).
2. Zhao X, Cao Z, Wang R, Liu S. Research Progress in Modeling Methods of Rat Lung Fibrosis. In: *Journal of Physics: Conference Series*. Institute of Physics Publishing; 2020.
3. Hutauruk UR, Yu FJ, Natali O, Nasution SW. Effectiveness Comparison Of Bandotan Leaves With Aloe Vera In Repair Of Burn Wound On Rats Based On Burn Wound Diameter. *Jambura J Heal Sci Res* [Internet]. 2022 Feb 11;4(3):656–67. Available from: <https://ejournal.ung.ac.id/index.php/jjhsr/article/view/12739>
4. Salem MY, El-Azab NE-E, Faruk EM. Modulatory effects of green tea and aloe vera extracts on experimentally-induced lung fibrosis in rats: histological and immunohistochemical study. *J Histol Histopathol*. 2014;1(1):6.
5. Adnan MC, Albert A, Aprilia GA, Mellenia P, Enda S, Linda C, et al. The Effect Of Andaliman Extract (*Zanthoxylum Acanthopodium* Dc) On The Histology Of The Stz-Induced Diabetes Mellitus Rats. *Jambura J Heal Sci Res* [Internet]. 2021 Nov 30;4(1):334–44. Available from: <https://ejournal.ung.ac.id/index.php/jjhsr/article/view/11933>
6. Brochetti RA, Leal MP, Rodrigues R, da Palma RK, de Oliveira LVF, Horliana ACRT, et al. Photobiomodulation therapy improves both inflammatory and fibrotic

- parameters in experimental model of lung fibrosis in mice. *Lasers Med Sci.* 2017 Nov;32(8):1825–34.
7. Lucarini L, Durante M, Sgambellone S, Lanzi C, Bigagli E, Akgul O, et al. Effects of new nsaid-cai hybrid compounds in inflammation and lung fibrosis. *Biomolecules.* 2020 Sep;10(9):1–20.
  8. M.M. Cordeiro C, T. Hincke M. Recent Patents on Eggshell: Shell and Membrane Applications. *Recent Patents Food, Nutr Agric.* 2012 Oct;3(1):1–8.
  9. Febrianti DR, Musiam S. Aktivitas Anti-Inflamasi Eupatorium inulifolium dan Kalsium Karbonat Pada Tikus Jantan. *J Pharmascience.* 2020;07(01):92–8.
  10. Pittas AG, Harris SS, Stark PC, Dawson-Hughes B. The Effects of Calcium and Vitamin D Supplementation on Blood Glucose and Markers of Inflammation in Nondiabetic Adults. 2007;
  11. Vuong TT, Rønning SB, Suso HP, Schmidt R, Prydz K, Lundström M, et al. The extracellular matrix of eggshell displays anti-inflammatory activities through NF- $\kappa$ B in LPS-triggered human immune cells. *J Inflamm Res.* 2017 Jul;10:83–96.
  12. Nichols DP, Konstan MW, Chmiel JF. Anti-inflammatory therapies for cystic fibrosis-related lung disease. Vol. 35, *Clinical reviews in allergy & immunology.* 2008. p. 135–53.
  13. El-Tantawy WH, Temraz A. Anti-fibrotic activity of natural products, herbal extracts and nutritional components for prevention of liver fibrosis: review. *Archives of Physiology and Biochemistry.* Taylor and Francis Ltd; 2019.
  14. Ruff KJ, DeVore DP. Reduction of pro-inflammatory cytokines in rats following 7-day oral supplementation with a proprietary eggshell membrane-derived product. *Mod Res Inflamm.* 2014;03(01):19–25.
  15. Hübner R-H, Gitter W, Eddine El Mokhtari N, Mathiak M, Both M, Bolte H, et al. Standardized Quantification Of Pulmonary Fibrosis In Histological Samples. *Biotechniques* [Internet]. 2008 Apr;44(4):507–17. Available from: <https://www.future-science.com/doi/10.2144/000112729>
  16. Gharagozloo M, Gris K V., Mahvelati T, Amrani A, Lukens JR, Gris D. NLR-dependent regulation of inflammation in multiple sclerosis- Dependent regulation of inflammation in multiple sclerosis. *Front Immunol.* 2018;8:1–18.
  17. Galvano A, Peri M, Guarini AA, Castiglia M, Grassadonia A, De Tursi M, et al. Analysis of systemic inflammatory biomarkers in neuroendocrine carcinomas of the lung: prognostic and predictive significance of NLR, LDH, ALI, and LIPI score. *Ther Adv Med Oncol.* 2020;12:1–11.
  18. Guyton AC, Hall J. *Textbook of Medical Physiology.* 11th ed. Elsevier

- Saunders; 2006. 309 p. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13813455.2019.1684952>
19. Abidi A, Aissani N, Sebai H, Serairi R, Kourda N, Ben Khamsa S. Protective Effect of Pistacia lentiscus Oil Against Bleomycin-Induced Lung Fibrosis and Oxidative Stress in Rat. *Nutr Cancer* [Internet]. 2017 Apr 3;69(3):490–7. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01635581.2017.1283423>
20. Chu H, Shi Y, Jiang S, Zhong Q, Zhao Y, Liu Q, et al. Treatment Effects Of The Traditional Chinese Medicine Shenks In Bleomycin-Induced Lung Fibrosis Through Regulation Of TGF-Beta/Smad3 Signaling And Oxidative Stress. *Sci Rep* [Internet]. 2017 May 22;7(1):2252. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-02293-z>
21. Ruff KJ, DeVore DP. Reduction Of Pro-Inflammatory Cytokines In Rats Following 7-Day Oral Supplementation With A Proprietary Eggshell Membrane-Derived Product. *Mod Res Inflamm* [Internet]. 2014;03(01):19–25. Available from: <http://www.scirp.org/journal/PaperDownload.aspx?DOI=10.4236/mri.2014.31003>
22. El-Tantawy WH, Temraz A. Anti-Fibrotic Activity Of Natural Products, Herbal Extracts And Nutritional Components For Prevention Of Liver Fibrosis: Review. *Arch Physiol Biochem* [Internet]. 2022 Mar 4;128(2):382–93. Available from:
23. Day BJ. Antioxidants as potential therapeutics for lung fibrosis. Vol. 10, *Antioxidants and Redox Signaling*. 2008. p. 355–70.