

**PEMAPARAN SALIVA MANUSIA TERHADAP AKTIVASI ENZIM *MATRIX MET
ALLOPROTEINASE 9 (MMP-9) PADA PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEA
R CELLS (PBMCs) PENDERITA INFARK
MIOKARD AKUT (IMA) SECARA *IN VITRO****

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Umum**



Oleh :

NYDYA PARAHITA

0910710011

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2013



HALAMAN PENGESAHAN
TUGAS AKHIR

PEMAPARAN SALIVA MANUSIA TERHADAP AKTIVASI ENZIM *MATRIX MET
ALLOPROTEINASE 9 (MMP-9) PADA PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEA
R CELLS (PBMCS) PENDERITA INFARK
MIOKARD AKUT (IMA) SECARA IN VITRO*

Oleh :

Nydia Parahita
NIM: 0910710011

Telah diuji pada
Hari : Kamis
Tanggal : 14 Februari 2013

Dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji I

dr. Cholid Tri Tjahjono, M.Kes., SpJP
NIP. 19620724 198903 1 002

Penguji II/Pembimbing I

Penguji III/Pembimbing II

Dr. dr. I Ketut Gede Muliarta, SpPA
NIK. 09347226

Dr. dr. Retty Ratnawati, M.Sc.
NIP. 1955020 1198503 2 001

Mengetahui,
Ketua Jurusan Kedokteran

Prof. Dr. dr. Teguh Wahyu Sardjono, DTM&H, M.Sc., SpParK
NIP. 19520410 198002 1001



Tugas Akhir ini saya persembahkan kepada Mama dan Papa, untuk cinta yang tanpa batas.

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum wr. wb.

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas rahmat, karunia serta hidayah yang senantiasa tercurah, sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul "Pemaparan Saliva Manusia terhadap Aktivasi Enzim *Matrix Metalloproteinase 9* (MMP-9) pada *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMCs) Penderita Infark Miokard Akut (IMA) secara *In Vitro*". Tak lupa penulis sampaikan shalawat serta salam terhadap junjungan kita Nabi Muhammad Saw.

Penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. dr. I Ketut Gede Muliarta, SpPA selaku dosen pembimbing yang telah memberikan dukungan dan bantuan, serta membimbing dengan penuh kesabaran.
2. Dr. dr. Retty Ratnawati, M.Sc. selaku dosen pembimbing kedua yang telah memberikan dukungan dan bantuan, serta membimbing dengan penuh kesabaran.
3. Keluarga tercinta (Ir. Joko Wahono, Dra. Elfi Lutfiati, Astri Isnaini Dewi) atas segala perhatian, kasih sayang, bantuan, dan doa demi kesuksesan saya.
4. Tim Peneliti (Risa Ramadhiani, Bramantyo Aji Wicaksono, I Putu Juniarta, dan Neshya Ruriana Putri) atas kerjasama dan bimbingannya.
5. Staf Laboratorium Sentral Biomedik, Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, dan Laboratorium Farmasi Universitas Airlangga Surabaya atas bantuan dan dukungannya.
6. Segenap tim pengelola tugas akhir, terutama Dr. Dra. Sri Winarsih, Apt., MSi., dan dr. Soemardini, MPd selaku koordinator Mata Kuliah Metodologi Riset angkatan 2009.

7. Teman-teman Pendidikan Dokter FKUB 2009, dan semua teman-teman lainnya atas persahabatan, persaudaraan, dan kenangan indah lainnya.

8. Seluruh pihak yang telah memberikan bantuan moril maupun materiil demi penyelesaian tugas akhir ini.

Meskipun penulis telah mencurahkan segala kemampuan demi kesempurnaan tugas akhir ini, namun penulis menyadari segala kekurangan dan keterbatasan. Oleh karena itu, saran dan kritik yang membangun merupakan masukan yang sangat berarti demi penyempurnaan karya selanjutnya. Akhirnya, semoga tugas akhir ini dapat menambah wawasan para pembaca.

Wassalamu'alaikum wr. wb.

Malang, 9 Januari 2013

Penulis



ABSTRAK

Parahita, Nydia. 2013. **Pemaparan Saliva Manusia terhadap Aktivasi Enzim *Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9)* pada *Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs)* Penderita Infark Miokard Akut (IMA) secara *In Vitro***. Tugas Akhir, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pembimbing: (1) Dr. dr. I Ketut Gede Muliarta, SpPA, (2) Dr. dr. Retty Ratnawati, M.Sc.

Infark Miokard Akut (IMA) merupakan nekrosis miokard yang diakibatkan oleh iskemia. Rupturnya *fibrous cap* pada plak aterosklerosis merupakan penyebab utama terjadinya IMA. Peningkatan produksi *Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9)*, yang telah terbukti terjadi pada penderita IMA, dapat mendegradasi jaringan ikat kolagen tipe IV yang ada dalam *fibrous cap*. Enzim ini disekresikan oleh sel mononuklear dan makrofag sebagai proMMP-9 dan memerlukan proses aktivasi untuk menjadi MMP-9. Proses aktivasi ini bergantung pada adanya ion *zinc*. Saliva mengandung banyak protein, salah satunya adalah histatin-5. Histatin-5 memiliki rantai HEXXH yang merupakan *zinc binding motif*. Oleh karena itu, histatin-5 memiliki kemampuan untuk menghambat aktivasi enzim-enzim yang bergantung pada keberadaan ion *zinc*, termasuk MMP-9. Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan efek pemaparan saliva murni terhadap aktivasi MMP-9 pada *Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs)* penderita IMA secara *in vitro*. Sampel darah diambil dari pasien IMA dan diisolasi monositnya. PBMCs tersebut dibagi menjadi lima kelompok, yaitu PBMCs yang diinduksi APMA dan diberi EDTA (K-), PBMCs yang diinduksi APMA (K+), PBMCs yang diinduksi APMA dan dipapar saliva murni dengan konsentrasi histatin-5 sebanyak 5, 10, dan 15 μM (P1, P2, P3). *Biotinylated gelatin-coated microtiter plate* digunakan untuk mengukur aktivasi MMP-9, data dianalisis menggunakan *One-way Anova*. Hasil menunjukkan bahwa aktivasi MMP-9 pada kelompok P1, P2, dan P3 menurun secara signifikan dibanding kelompok K+ ($p=0,011$; $p=0,008$; $p=0,009$). Kesimpulan dari penelitian ini adalah bahwa pemaparan saliva murni pada PBMCs penderita IMA dapat menurunkan aktivasi MMP-9 secara *in vitro* dengan konsentrasi histatin-5 efektif sebanyak 5 μM .

Kata kunci: IMA, Saliva Manusia, Histatin-5, MMP-9

ABSTRACT

Parahita, Nydia. 2013. *In Vitro Exposure Of Human Salivary Towards Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9) Activation on Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) Obtained from Acute Myocardial Infarction (AMI) Patients*. Final Assignment, Faculty of Medicine Brawijaya University. Supervisors: (1) Dr. dr. I Ketut Gede Muliartha, SpPA, (2) Dr. dr. Retty Ratnawati, M.Sc.

Acute Myocardial Infarction (AMI) is myocardial necrosis caused by ischemia. Rupture of fibrous cap in atherosclerotic plaque is the main cause of AMI. Increasing production of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), which had been proved in AMI patients, can degrade type IV collagen contained in fibrous cap. This enzyme is secreted by mononuclear cells and macrophages as proMMP-9 and needs activation to be MMP-9. The activation depends on zinc ions. Saliva contains of many proteins, one of them is histatin-5. Histatin-5 contains HEXXH chain which is zinc binding motif. Therefore, histatin-5 has the ability to inhibit zinc-dependent enzymes activation, such as MMP-9. The purpose of this study was to determine the effect of in vitro whole saliva exposure towards MMP-9 activation on Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) obtained from AMI patients. Blood was obtained from AMI patients and isolated into PBMCs. PBMCs were divided into five groups, they were PBMCs induced by APMA and given EDTA (C-), PBMCs induced by APMA (C+), PBMCs induced by APMA and exposed by whole saliva with histatin-5 concentration of 5, 10, and 15 μ M (P1, P2, P3). Biotinylated gelatin-coated microtiter plate was used to assess the activation of MMP-9, the data were analyzed by One-way Anova. The result showed that the activation of MMP-9 in P1, P2, and P3 groups decreased significantly compared to C+ group ($p=0,011$; $p=0,008$; $p=0,009$). The conclusion of this study is that in vitro whole saliva exposure on Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) isolate obtained from AMI patients could decrease MMP-9 activation with effective histatin-5 concentration of 5 μ M.

Keywords: AMI, Whole Saliva, Histatin-5, MMP-9

DAFTAR ISI

Halaman Judul	i
Halaman Persetujuan	ii
Halaman Peruntukan	iii
Kata Pengantar	iv
Abstrak	vi
Abstract	vii
Daftar Isi	viii
Daftar Gambar	x
Daftar Skema	xi
Daftar Tabel	xii
Daftar Lampiran	xiii
BAB I PENDAHULUAN	01
1.1 Latar Belakang	01
1.2 Rumusan Masalah Penelitian	04
1.3 Tujuan Penelitian	04
1.4 Manfaat Penelitian	05
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	06
2.1 Infark Miokard Akut (IMA)	06
2.1.1 Definisi Infark Miokard Akut (IMA)	06
2.1.2 Patofisiologi Infark Miokard Akut (IMA)	06
2.1.2.1 Pembentukan Plak Ateroma	06
2.1.2.2 Ruptur Plak	08
2.1.2.3 Pembentukan Trombus dan Oklusi Pembuluh Darah	08
2.1.3 Tanda dan Gejala Infark Miokard Akut (IMA)	09
2.1.4 Diagnosis Infark Miokard Akut (IMA)	10
2.1.5 Penatalaksanaan Infark Miokard Akut (IMA)	13



2.2 4-Aminophenylmercuric Acetate (APMA)	14
2.2.1 Definisi 4-Aminophenylmercuric Acetate (APMA)	14
2.2.2 Mekanisme APMA dalam Menginduksi Aktivasi MMP-9	14
2.3 <i>Matrix Metalloproteinase 9</i> (MMP-9)	14
2.3.1 Definisi dan Karakteristik <i>Matrix Metalloproteinase 9</i> (MMP-9)	14
2.3.2 Aktivasi proMMP-9 Menjadi MMP-9	16
2.3.3 MMP-9 pada Penderita IMA	17
2.4 Saliva	18
2.5 Histatin-5	18
2.5.1 Definisi dan Manfaat Histatin-5	18
2.5.2 Histatin-5 sebagai <i>Zinc Chelating Agent</i>	19
BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	20
3.1 Kerangka Konsep	20
3.2 Penjelasan Kerangka Konsep	21
3.3 Hipotesis Penelitian	22
BAB IV METODE PENELITIAN	23
4.1 Rancangan Penelitian	23
4.2 Populasi dan Sampel	24
4.2.1 Populasi Penelitian	24
4.2.2 Sampel Penelitian	24
4.2.3 Teknik Pengambilan Sampel	25
4.3 Tempat dan Waktu Penelitian	25
4.4 Variabel Penelitian	26
4.5 Definisi Operasional	26
4.6 Alat dan Bahan Penelitian	27
4.6.1 Alat dan Bahan Ekstraksi Saliva	27
4.6.2 Alat dan Bahan Pengukuran Kadar Histatin-5	27
4.6.3 Alat dan Bahan Isolasi <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> (PBMCs)	28

4.6.4 Alat dan Bahan Pengukuran Konsentrasi dan Aktivasi MMP-9	28
4.7 Metode Pengumpulan Data	28
4.7.1 Pengambilan dan Pengujian Kadar Histatin-5 dalam Saliva	28
4.7.2 Isolasi <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> (PBMCs)	29
4.7.3 Prosedur Pengukuran Konsentrasi MMP-9	31
4.7.4 Prosedur Pengukuran Aktivasi MMP-9	32
4.8 Pengolahan Data	33
4.8.1 Pengumpulan Data	33
4.8.2 Analisis Data	34
BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA	35
5.1 Hasil Penelitian	35
5.2 Analisis Data	38
5.2.1 Uji Normalitas Data	38
5.2.2 Uji Homogenitas Varian	38
5.2.3 Uji <i>One-way Anova</i>	39
5.2.4 Uji <i>Post Hoc</i> LSD	40
BAB VI PEMBAHASAN	42
BAB VII PENUTUP	46
7.1 Kesimpulan	46
7.2 Saran	46
DAFTAR PUSTAKA	47
LAMPIRAN	50



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Patogenesis Aterosklerosis	07
Gambar 2.2 Proses Aktivasi proMMP-9 Menjadi MMP-9	16
Gambar 5.1 Grafik Hasil Pengukuran Kadar MMP-9 dalam PBMCs	35
Gambar 5.2 Grafik Hasil Pengukuran Kadar Histatin-5 dalam Saliva	36
Gambar 5.3 Grafik Hasil Pengukuran Aktivasi MMP-9 dalam PBMCs Setelah Dipapar Saliva	37

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



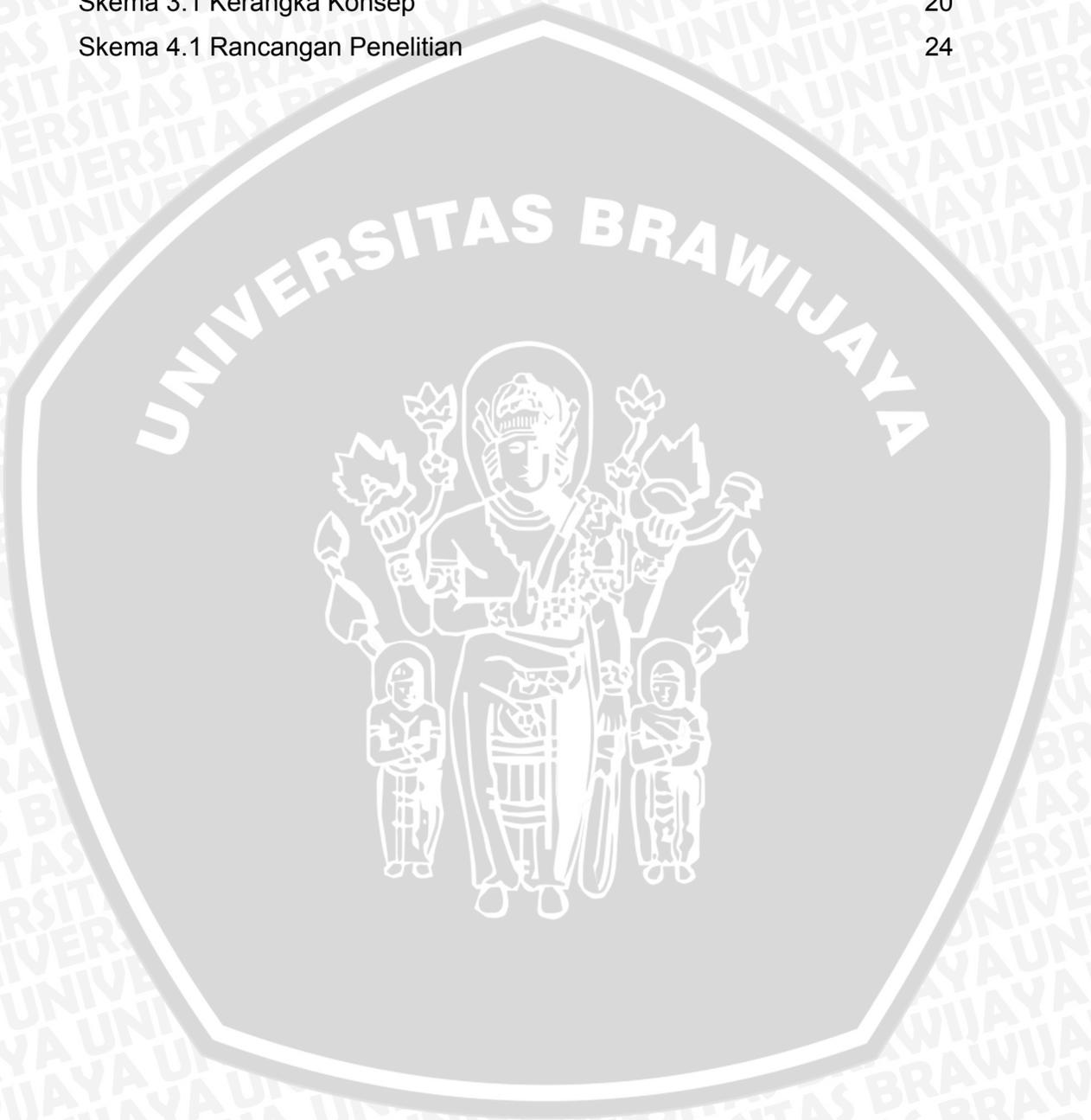
DAFTAR SKEMA

Skema 3.1 Kerangka Konsep

20

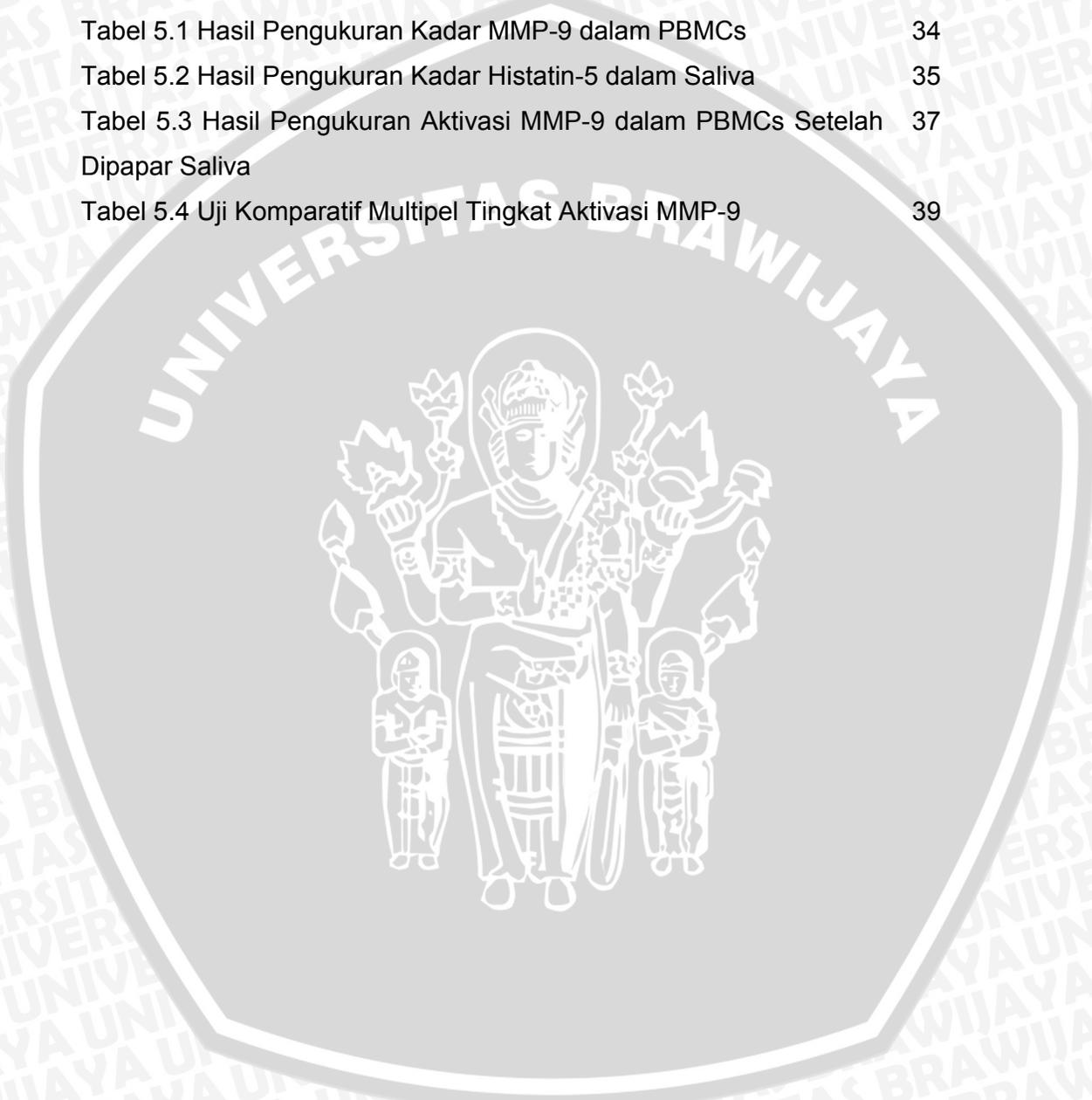
Skema 4.1 Rancangan Penelitian

24



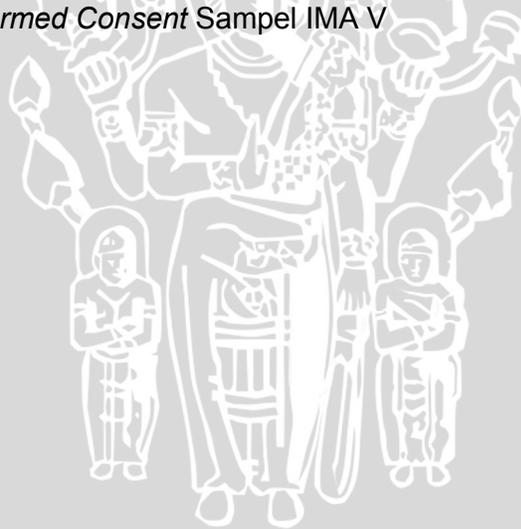
DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Enzim Biomarker Kerusakan Miokard	12
Tabel 5.1 Hasil Pengukuran Kadar MMP-9 dalam PBMCs	34
Tabel 5.2 Hasil Pengukuran Kadar Histatin-5 dalam Saliva	35
Tabel 5.3 Hasil Pengukuran Aktivasi MMP-9 dalam PBMCs Setelah Dipapar Saliva	37
Tabel 5.4 Uji Komparatif Multipel Tingkat Aktivasi MMP-9	39



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Hasil Uji Normalitas Data	50
Lampiran 2.	Penentuan Transformasi Data	51
Lampiran 3.	Hasil Uji Normalitas Setelah Transformasi 1 (akar)	52
Lampiran 4.	Hasil Uji Normalitas Setelah Transformasi 2 (1/n)	53
Lampiran 5.	Hasil Uji Homogenitas Data dan One-way Anova (1/n)	54
Lampiran 6.	Hasil Uji Post Hoc LSD	55
Lampiran 7.	<i>Informed Consent</i> Sampel IMA I	56
Lampiran 8.	<i>Informed Consent</i> Sampel IMA II	57
Lampiran 9.	<i>Informed Consent</i> Sampel IMA III	58
Lampiran 10.	<i>Informed Consent</i> Sampel IMA IV	59
Lampiran 11.	<i>Informed Consent</i> Sampel IMA V	60



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Infark miokard akut (IMA) merupakan nyeri angina pada infark jantung akut, umumnya lebih berat dan lebih lama (30 menit atau lebih) (Majid, 2007). Berdasarkan penelitian WHO, diperoleh data bahwa 20% kasus kematian di seluruh dunia diakibatkan oleh penyakit yang didasari oleh aterosklerosis, salah satunya adalah IMA. Dilaporkan bahwa lebih dari setengah dari jumlah kematian setiap tahun di Amerika disebabkan oleh aterosklerosis, dan lebih dari 500.000 orang meninggal setiap tahun karena IMA. Di Indonesia, dilaporkan angka kematian yang disebabkan oleh penyakit-penyakit kardiovaskuler semakin meningkat setiap tahunnya (Atinia, 2006).

Proliferasi sel otot polos berperan dalam patogenesis pembentukan plak aterosklerosis. Proliferasi tersebut diatur oleh *N-cadherin* melalui modulasi *signaling β -catenin*. Pemberian enzim *Matrix Metalloproteinase 9* (MMP-9) menyebabkan hilangnya *N-cadherin* dan meningkatkan *signaling β -catenin*. Hal tersebut menstimulasi proliferasi sel otot polos (Dwivedi *et. al.*, 2009).

Ruptur *fibrous cap* plak aterosklerosis merupakan penyebab utama *myocardial infarction* dan *stroke*. Plak aterosklerosis yang mempunyai *fibrous cap* tipis, rasio makrofag yang lebih tinggi dibanding sel otot polos, dan *fibrous cap* yang mempunyai sedikit struktur kolagen, merupakan plak

yang mempunyai resiko besar untuk ruptur. Peningkatan produksi protease yang berasal dari sel inflamatori, salah satunya *Matrix Metalloproteinase* (MMP), akan mendegradasi kolagen yang berperan dalam rupturnya plak aterosklerosis. Pada plak aterosklerosis tikus dan plak aterosklerosis manusia yang mempunyai resiko besar ruptur, terjadi peningkatan MMP-1, MMP-3 dan MMP-9. Peningkatan MMP-8 dan MMP-9 juga meningkatkan resiko ruptur dibandingkan plak *stable* karotis (Newby, 2007).

MMP-9 merupakan proteinase yang dapat mendegradasi komponen *extracellular matrix* (ECM), seperti kolagen tipe IV, V, VII, dan X. Selain itu juga mendegradasi proteoglikan dan elastin yang tidak bisa didegradasi oleh MMP lain. MMP-9 disekresi oleh sel *fibroblast*, sel *endothel*, sel polimorfonuklear, keratinosit, dan makrofag. Namun, makrofag merupakan sumber utama MMP-9. Enzim ini disekresi dalam bentuk pro-enzim (*zymogen*) dan membutuhkan aktivasi untuk dapat bekerja. Proses aktivasi proMMP-9 membutuhkan peran penting dari komponen *zinc* (proses ini dijelaskan lebih detil pada Bab Tinjauan Pustaka) (Chrestella, 2009, Xu *et. al.*, 2004). Inhibisi pada MMP-9 merupakan pendekatan terapi untuk penyakit yang terkait dengan enzim ini, termasuk IMA. Salah satu caranya adalah dengan memberikan *zinc chelating agent* sehingga menghambat aktivasi proMMP-9 menjadi MMP-9 dan mencegahnya mendegradasi *fibrous cap* (Meli *et. al.*, 2003, Gusman *et. al.*, 2001, Visse dan Nagase, 2003).

Sementara itu, saliva merupakan fluida yang dihasilkan tubuh dan berperan penting dalam pengaturan kesehatan rongga mulut dan proteksi gigi. Fungsi saliva di antaranya adalah perlindungan permukaan jaringan pada rongga mulut oleh lapisan *mucin* saliva dan *proline-rich glycoprotein*,

peningkatan mineralisasi, penghambatan demineralisasi, pencegahan perlekatan mikroorganisme pada *enamel pellicle* dan penghambatan pertumbuhannya, serta sebagai penyangga asam melalui *salivary bicarbonate/carbonate buffer system*. Saliva mengandung komponen antimikroba seperti laktoferin, lisosim dan peroksidase, juga peptida seperti *cathelicidin LL-37*, α dan β -*defensins*, histatin, dan peptida kationik kaya histidin (Wei, 2008).

Histatin pada saliva secara struktural berhubungan erat dengan peptida kationik kaya histidin yang merupakan komponen utama sistem pertahanan tubuh nonimun dalam rongga mulut. Histatin 1, 3, dan 5 adalah histatin terbanyak yang diproduksi sel acinar kelenjar saliva mayor manusia. Secara *in vitro*, histatin-5 (terdiri dari 24 asam amino) merupakan yang paling toksik terhadap *Candida albicans* pada konsentrasi fisiologisnya (15—30 μ M). Histatin-5 juga memiliki aktivitas fungistatik dan fungisidal terhadap *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Saccharomyces cerevisiae*, dan *Cryptococcus neoformans*. Kelebihan histatin-5 juga terlihat dari kemampuannya melawan galur fungi tersebut yang telah resisten terhadap obat golongan *azole* dan *amphotericin* (Wunder *et. al.*, 2004).

Pada penelitian Gusman *et. al.* (2001), telah ditemukan bahwa histatin-5 mengikat ion-ion metal, terutama *zinc*. Hal tersebut didukung oleh fakta bahwa histatin-5 mengandung rantai HEXXH yang dikenal sebagai *zinc binding motif* pada banyak protein. Rantai ini terdapat pada residu 15—19 dari histatin-5, dan oleh karenanya tidak terdapat di histatin 1 dan 3. Penemuan tersebut menyoroti sifat histatin-5 yang baru diketahui sebagai inhibitor *zinc-dependent enzymes*. Secara konsep, kemampuan histatin

dalam mengikat ion metal ini menjadikannya mampu mengganggu protein atau enzim yang membutuhkan *zinc* sebagai kofaktor atau bagian integral dari struktur (Gusman *et. al.*, 2001).

Berdasarkan pertimbangan di atas, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pemberian histatin 5 dalam saliva murni sebagai inhibitor aktivasi enzim MMP-9 yang dapat menjadi dasar perlindungan terhadap IMA dengan menguji penurunan aktivasi MMP-9 pada *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMCs) penderita IMA yang diinduksi APMA secara *in vitro*.

1.2 Rumusan Masalah Penelitian

Apakah pemberian histatin 5 dalam saliva murni pada *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMCs) penderita Infark Miokard Akut (IMA) dapat menurunkan aktivasi *Matrix Metalloproteinase 9* (MMP-9) secara *in vitro*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan bahwa pemberian saliva pada *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMCs) penderita Infark Miokard Akut (IMA) dapat menurunkan aktivasi *Matrix Metalloproteinase 9* (MMP-9) secara *in vitro*.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengukur dan membandingkan kadar MMP-9 pada PBMCs penderita IMA dan orang normal.
2. Mengukur konsentrasi histatin-5 dalam saliva penderita IMA.
3. Mempelajari dosis konsentrasi optimum pemaparan histatin-5 dalam saliva murni pada PBMCs penderita IMA dalam menurunkan aktivasi MMP-9 secara *in vitro*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Ilmiah

Menambah khasanah konsep dasar tentang pencegahan perkembangan lebih lanjut pada penderita angina pektoris dengan menggunakan histatin-5 dan sebagai referensi untuk penelitian lebih lanjut secara *in vivo*.

1.4.2 Manfaat Umum

Sebagai dasar teori untuk kemungkinan pencegahan perkembangan penderita angina pektoris menjadi IMA dengan menggunakan histatin-5 sehingga mampu meningkatkan taraf kesehatan masyarakat.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Infark Miokard Akut (IMA)

2.1.1 Definisi Infark Miokard Akut (IMA)

Infark Miokard Akut (IMA) merupakan sindroma klinik yang timbul akibat kerusakan jaringan miokard karena ketidakseimbangan antara penyaluran dan kebutuhan oksigen (Malinrungi, 2003).

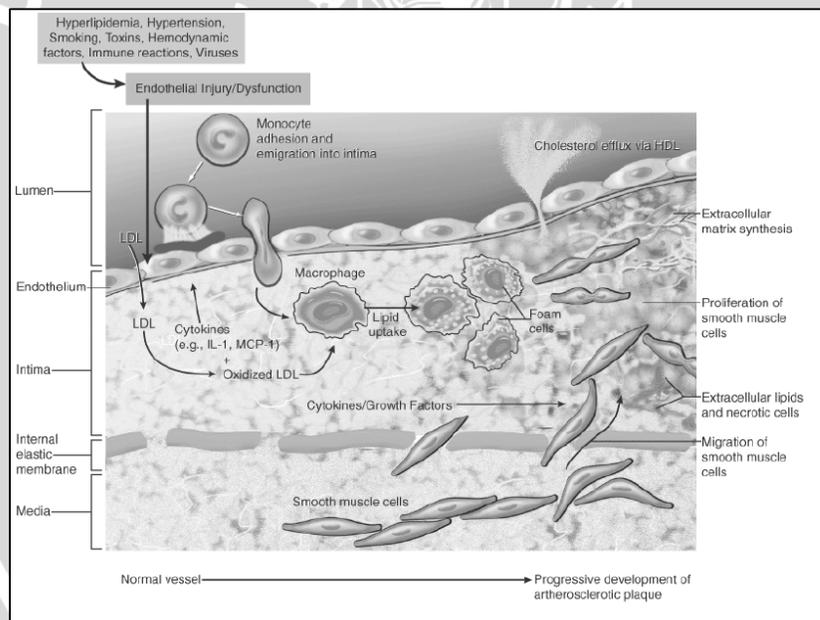
2.1.2 Patofisiologi Infark Miokard Akut (IMA)

IMA dapat disebabkan oleh rupturnya plak aterosklerosis dan pembentukan plak aterosklerosis. Secara singkat patogenesis aterosklerosis meliputi disfungsi endotel, oksidasi LDL, respon imun dan proliferasi otot polos, seperti pada gambar 2.1 (Kumar, 2003).

2.1.2.1 Pembentukan Plak Ateroma

Secara normal, sel endotel tidak dilekati oleh leukosit. Namun, ketika terdapat stimulus proinflamatori, seperti hiperkolestroleemia, obesitas, hiperglikemia, hipertensi, dan merokok, akan terjadi lesi endotelial. Sel endotel akan mengekspresikan molekul adhesi, seperti P-selectin dan vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). Akibatnya, monosit masuk ke tunika intima pembuluh darah. Ketika berada di tunika intima, monosit berubah menjadi makrofag dan memakan lipoprotein (Packard dan Libby, 2008).

Sementara itu, pada lesi endotelial terdapat sitokin-sitokin Th1 sehingga sel T yang teraktivasi akan berubah menjadi sel efektor Th-1 (selular). Hal ini akan mempengaruhi perkembangan plak. Makrofag dan sel T yang masuk ke tunika intima akan terus berubah menjadi foam cell sehingga ateroma semakin besar. Akumulasi foam cell akan membentuk fatty streaks. Sel otot polos kemudian bermigrasi ke tunika intima dan memproduksi Extracellular Matrix (ECM) sebagai respon terhadap growth factor yang dikeluarkan oleh makrofag dan sel endotel. Hal ini menyebabkan plak mengadakan proses kalsifikasi sehingga terjadi stenosis (Packhard dan Libby, 2008).



Gambar 2.1. Patogenesis Aterosklerosis (Kumar *et. al.*, 2003)

2.1.2.2 Ruptur Plak

Perkembangan plak ateroma terjadi dalam periode tahun sampai puluhan tahun. Dua ciri penting plak ateroma adalah adanya *fibrous cap* yang menutupi bagian inti yang kaya lipid. Erosi pada plak aterosklerotik terjadi karena aktivitas enzim *Matrix Metalloproteinase 9* (MMP-9), yang

menyebabkan menipisnya *fibrous cap* yang menutupinya. Protease tersebut dapat menyebabkan rusaknya endotel dan terbentuknya fisura atau rupturnya *fibrous cap*. Derajat erosi endotel dapat berkisar dari minimal sampai ekstensif yang menghasilkan ulserasi plak aterosklerotik. Bagian plak yang sering mengalami kerusakan adalah struktur pada daerah fibromuskuler yang berbatasan dengan dinding pembuluh, atau suatu daerah yang disebut *shoulder region*. Kerusakan permukaan endotel yang cukup dapat menyebabkan terbentuknya trombus, melalui aktivitas platelet pada kaskade koagulasi darah (Muliarta dan Ali, 2004).

2.1.2.3 Pembentukan Trombus dan Oklusi Pembuluh Darah

Pada lokasi ruptur plak, berbagai agonis (kolagen, ADP, epinefrin, serotonin) memicu aktivasi trombosit, yang selanjutnya akan memproduksi dan melepaskan tromboksan A₂ (vasokonstriktor lokal yang poten). Selain itu aktivasi trombosit memicu perubahan konformasi reseptor glikoprotein IIb/IIIa. Setelah mengalami konversi fungsinya, reseptor mempunyai afinitas tinggi terhadap sekuen asam amino pada protein adhesi yang larut (integrin) seperti faktor von Willebrand (vWF) dan fibrinogen, di mana keduanya adalah molekul multivalen yang dapat mengikat 2 platelet yang berbeda secara simultan, menghasilkan ikatan silang platelet dan agregasi (Alwi, 2006).

Kaskade koagulasi diaktivasi oleh pajanan *tissue factor* pada sel endotel yang rusak. Faktor VII dan X diaktivasi, mengakibatkan konversi protrombin menjadi trombin, yang kemudian mengkonversi fibrinogen menjadi fibrin. Arteri koroner yang terlibat kemudian akan mengalami oklusi oleh trombus yang terdiri agregat trombosit dan fibrin (Alwi, 2006). Bila

oklusi tersebut terjadi cukup lama (20—40 menit), akan menyebabkan kerusakan dan kematian sel-sel miokardial (Muliartha dan Ali, 2004).

2.1.3 Tanda dan Gejala Infark Miokard Akut (IMA)

IMA menimbulkan gejala yang unik pada tiap-tiap pasien individual. Derajat simtomnya berkisar dari tidak ada sama sekali sampai kematian mendadak. IMA asimtomatik biasanya diabetik. Berikut ini beberapa simtom karakteristik IMA yang biasa terjadi.

- a. *Chest pain* (nyeri dada), digambarkan sebagai sensasi tekanan pada seluruh atau pada bagian tengah thorax.
- b. Radiasi nyeri dada dapat mencapai rahang atau gigi, pundak, lengan, dan/atau punggung.
- c. Dispnea atau nafas pendek.
- d. Gangguan epigastrik dengan atau tanpa mual dan muntah.
- e. Diaporesis atau berkeringat.
- f. Sinkop atau hampir sinkop (pingsan atau hampir pingsan tanpa adanya penyebab lain).

IMA dapat terjadi kapan saja sepanjang hari, tetapi kebanyakan pada beberapa jam setelah bangun pagi dan/atau setelah melakukan aktivitas fisik. Hampir 50% pasien menderita angina pektoris sebelum mengalami infark (Muliartha dan Ali, 2004).

2.1.4 Diagnosis Infark Miokard Akut (IMA)

Menurut kriteria WHO tahun 1981, yaitu jika minimal ditemukan 2 dari 3 kriteria: nyeri dada khas lebih dari 20 menit, perubahan elektrokardiogram (EKG) yang khas, peningkatan enzim yang menggambarkan kerusakan miokard. Keluhan yang khas yaitu nyeri dada

retrosternal dengan kualitas seperti diremas-remas, ditekan, ditusuk, panas, atau ditindih barang berat. Nyeri dada biasanya dijalarakan ke lengan terutama lengan kiri, leher, bahu, rahang, bahkan punggung dan epigastrium. Lama nyeri biasanya lebih dari 20 menit dan tidak hilang dengan pemberian nitrat-gliserin ataupun istirahat. Nyeri dapat disertai perasaan mual, muntah, berkeringat dingin, berdebar-debar, dan sesak (Malinrungi, 2003).

Perubahan EKG pada penderita IMA cukup spesifik tetapi tidak peka untuk diagnosis pada fase dini. Gambaran perubahan khas muncul 8—12 jam setelah serangan. Gambaran EKG biasanya mengikuti pola evolutif. Infark miokardium terjadi bila terjadi insufisiensi aliran darah koroner menyebabkan kematian jaringan miokardium. Jaringan yang mengalami infark dikelilingi oleh daerah iskemia. Refleksinya pada EKG digambarkan dalam 3 proses, yaitu perubahan gelombang T (iskemik), segmen ST (jaringan memar), dan kompleks QRS (jaringan nekrosis). Penemuan EKG pertama pada infark miokardium transmural adalah elevasi segmen ST pada sadapan di atas daerah infark. Segmen ST secara memiliki lengkungan cembung yang arahnya ke atas. Sadapan yang diletakkan kira-kira 180° dari daerah infark menunjukkan depresi segmen ST timbal balik (*reciprocal*). Gelombang T tegak raksasa ditemukan beberapa jam setelah infark. Penyebab sebenarnya tidak diketahui, mungkin kebocoran kalium intrasel dari sel otot yang rusak ke ruang ekstrasel. Setelah beberapa jam atau hari (sampai 2 minggu), segmen ST kembali ke garis isoelektrik, dan terjadi perubahan gelombang T. Perubahan gelombang T dapat timbul walaupun segmen ST tetap

mengalami deviasi. Gelombang T mulai terbalik pada sadapan yang menunjukkan elevasi segmen ST. Khas gelombang T pada infark adalah simetris dan terbalik. Gelombang T terbalik mungkin mempunyai segmen ST isoelektrik tetapi menunjukkan bentuk cembung ke atas (gelombang T koroner) atau mungkin mempunyai elevasi segmen ST dan konveksitas ke atas (gelombang T *coveplane*). Gelombang T patologis dapat timbul beberapa jam atau hari setelah infark walaupun terdapat perubahan segmen ST atau timbul setelah menjadi isoelektrik. Gelombang Q biasanya timbul sebelum terjadi perubahan gelombang T nyata. Jika gelombang Q patologis tidak dijumpai, diagnosis EKG IMA tergantung pada serangkaian rekaman dan korelatif klinik (Malinrungi, 2003).

Pemeriksaan yang dianjurkan adalah *creatinine kinase* (CKMB) dan *cardiac specific troponin* (cTn) T atau I yang dilakukan secara serial. Peningkatan nilai enzim di atas 2 kali nilai batas atas normal menunjukkan adanya nekrosis jantung (infark miokard).

Tabel 2.1 Enzim Biomarker Kerusakan Miokardium

NAMA ENZIM	KETERANGAN
CKMB	Meningkat setelah 3 jam infark miokard dan mencapai puncak dalam 10—24 jam, kembali normal dalam 2—4 hari. Operasi jantung, miokarditis, dan kardioversi elektrik dapat meningkatkan CKMB.
cTn	Ada 2 jenis, yaitu cTn T dan cTn I. Meningkatkan setelah 2 jam infark miokard dan mencapai puncak dalam 10—24 jam. cTn T masih

terdeteksi setelah 5—14 hari, sedangkan cTn I setelah 5—10 hari.

Mioglobin	Dapat dideteksi 1 jam setelah infark dan mencapai puncak dalam 4—8 jam.
Creatinine kinase (CK)	Meningkat setelah 3—8 jam infark, mencapai puncak dalam 10—36 jam, dan kembali normal dalam 3—4 hari.
Lactic dehydrogenase (LDH)	Meningkat setelah 24—48 jam infark, mencapai puncak dalam 3—6 hari, dan kembali normal setelah 8—14 hari.

(Alwi, 2006)

2.1.5 Penatalaksanaan Infark Miokard Akut (IMA)

Sasaran pengobatan IMA yang pertama adalah menghilangkan rasa sakit dan cemas. Kedua, mencegah dan mengobati sedini mungkin komplikasi (30—40%) yang serius seperti payah jantung, aritmia, *thromboembolism*, perikarditis, ruptur *musculus papillaris*, aneurisma ventrikel, infark ventrikel kanan, iskemia berulang dan kematian mendadak. Untuk sakit diberikan sulfas morphin 2,5-10 mg IV. *Pethidin* kurang efektif dibandingkan *morphin* dan dapat menyebabkan sinus *tachycardia*. Obat ini banyak dipakai pada infark inferior dengan sakit dada dan sinus *bradycardia*. Dosis 25-50 mg dapat diulang sesudah 2-4 jam dengan perlahan-lahan (Djohan, 2004).

Pada sakit dada dengan IMA terutama infark anterior dengan sinus *tachycardia* dan tekanan darah sistolik di atas 100 mmHg, β -Blocker dapat dipakai. Dosis kecil β -Blocker mulai dengan $\frac{1}{2}$ --5 mg IV. Dikatakan bahwa

pemberian β -Blocker dalam 5 jam pertama (bila tidak ada kontra indikasi) dapat mengurangi luasnya infark. Nitrat baik sublingual maupun transdermal dapat dipakai bila sakit dada pada hari-hari pertama. Nifedipin, C-antagonist yang sering dipakai bila diduga penyebabnya adalah spasme koroner, khusus angina sesudah hari ke-2 dan sebelum pulang. Pemberian anti koagulasi hanya pada penderita yang harus diimobilisasi agak lama seperti gagal jantung, syok dan infark anterior yang luas. Sekitar 60—70% dari infark tidak terdapat komplikasi dan dianjurkan penanganan sesudah 2—3 minggu untuk uji latih jantung beban (ULJB) yang dimodifikasikan. Kalau normal, dilakukan rehabilitasi biasa. Tetapi kalau abnormal, diperiksa arteriogram koroner untuk mengetahui tepat keadaan pembuluh darah koronernya agar dapat ditentukan sikap yang optimal (Djohan, 2004).

2.2 4-Aminophenylmercuric acetate (APMA)

2.2.1 Definisi 4-Aminophenylmercuric acetate (APMA)

4-Aminophenylmercuric acetate (APMA) merupakan senyawa merkuri yang telah sering digunakan sebagai aktivator beberapa jenis enzim *Matrix Metalloproteinases* (MMPs), terutama golongan gelatinase yaitu MMP-2 (gelatinase A) dan MMP-9 (gelatinase B) (Gusman *et. al.*, 2001).

2.2.2 Mekanisme APMA dalam Menginduksi Aktivasi MMP-9

APMA dapat menginduksi aktivasi MMP-9 dengan mengakibatkan hilangnya domain NH₂-terminal pada 8—10 kDa. Hal tersebut akan mengganggu interaksi antara *conserved cysteine residue* dengan molekul katalitik *zinc*. Pembebasan *zinc* menyebabkan aktivitas autolitik yang

kemudian mengaktivasi proMMP-9 menjadi MMP-9. Hasil akhir enzim yang telah teraktivasi dengan induksi APMA ini memiliki berat molekul 67 kDa (Shapiro *et. al.*, 1995).

2.3 *Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9)*

2.3.1 Definisi dan Karakteristik *Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9)*

Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9) merupakan *zinc-dependent endopeptidase* yang berperan dalam beberapa macam proses fisiologis dan biokimia. Pada proses angiogenesis, MMP-9 terbukti berperan dalam degradasi membran basalis melalui kemampuannya mendegradasi jaringan ikat kolagen tipe IV, menciptakan molekul bioaktif seperti angiostatin dengan cara memotong plasminogen, dan melepaskan *growth factors* seperti VEGF-A tersekuestrasi di matriks ekstraseluler *heparin sulfate proteoglycans* (Vempati *et. al.*, 2007).

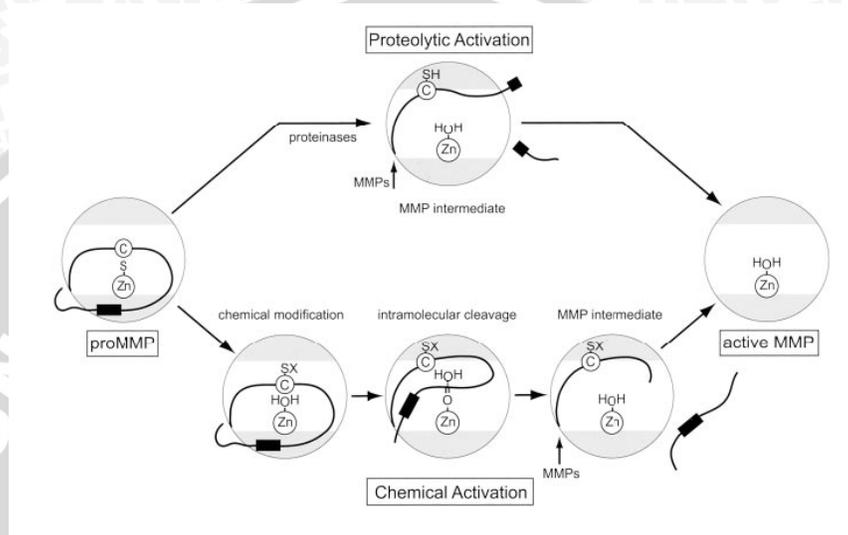
MMP-9 memiliki karakteristik sebagai berikut.

- a. MMP-9 merupakan proteinase yang dapat mendegradasi komponen *extracellular matrix (ECM)*, seperti kolagen tipe IV, V, VII, dan X. Selain itu juga mendegradasi proteoglikan dan elastin yang tidak bisa didegradasi oleh MMP lain.
- b. MMP-9 disekresi dalam bentuk pro-enzim (*zymogen*) dan membutuhkan aktivasi untuk dapat bekerja.
- c. MMP-9 membutuhkan *zinc* dalam proses aktivasinya.

MMP-9 disekresi oleh sel tubuh manusia, seperti sel fibroblast, sel endothel, sel polimorfonuklear, keratinosit, dan makrofag. Namun,

makrofag merupakan sumber utama MMP-9 (Chrestella, 2009, Xu *et. al.*, 2004).

2.3.2 Aktivasi proMMP-9 Menjadi MMP-9



Gambar 2.2 Proses Aktivasi proMMP-9 Menjadi MMP-9 (Visse dan Nagase, 2003)

ProMMP-9 yang disekresikan dalam bentuk inaktif dapat diaktifkan melalui jalur proteinase (Gambar 2.2 bagian atas) atau jalur nonproteolitik (Gambar 2.2 bagian bawah). Pada domain katalitik (lingkaran berwarna abu-abu) dan *active site* (daerah berwarna putih) terdapat *catalytic-site zinc* (lingkaran bertuliskan Zn). ProMMP-9 secara skematis ditampilkan sebagai garis hitam yang mengandung *bait region* (persegi panjang hitam) dan *cysteine switch* (lingkaran bertuliskan C). SH mengindikasikan sulfhidril dari *cysteine*. Aktivasi jalur proteinase dimediasi oleh pemotongan *bait region*. Proses ini mengaktifkan MMP-9 secara parsial. Aktivasi penuh dapat dicapai dengan penghapusan komplit proMMP-9 melalui proses intermolekuler. Aktivasi kimiawi bergantung pada modifikasi *cysteine switch sulfhydryl* (SX), mengakibatkan aktivasi MMP-9 parsial dan pemotongan intramolekuler proMMP-9. MMP-9 teraktivasi sempurna setelah proses

penghapusan sisa proMMP-9 secara intermolekuler. Inhibisi pada MMP-9 merupakan pendekatan terapi untuk penyakit yang terkait dengan enzim ini. Salah satu caranya dengan memberikan *chelating agent zinc* pada *active site* (Meli et. al., 2003, Gusman et. al., 2000, Visse dan Nagase, 2003).

2.3.3 MMP-9 pada Penderita Infark Miokard Akut (IMA)

Proliferasi sel otot polos berperan dalam patogenesis pembentukan plak aterosklerosis. Proliferasi tersebut diatur oleh N-cadherin melalui modulasi signaling β -catenin. Menurut penelitian Dwivedi et. al., pemberian MMP-9 menyebabkan hilangnya N-cadherin dan meningkatkan signaling β -catenin. Hal tersebut menstimulasi proliferasi sel otot polos (Dwivedi et. al., 2009).

Ruptur *fibrous cap* plak aterosklerosis merupakan penyebab utama *myocardial infarction* dan stroke. Plak aterosklerosis yang mempunyai fibrous cap tipis, rasio makrofag yang lebih tinggi dibanding sel otot polos, dan mempunyai sedikit struktur kolagen, merupakan plak yang mempunyai resiko besar untuk ruptur. Peningkatan produksi protease yang berasal dari sel inflamatori, salah satunya *Matrix Metalloproteinase 9* (MMP-9), akan mendegradasi kolagen yang berperan dalam rupturnya plak aterosklerosis. Menurut Newby, pada plak aterosklerosis tikus dan plak aterosklerosis manusia, yang mempunyai resiko besar ruptur, terjadi peningkatan MMP-1, MMP-3 dan MMP-9. Peningkatan MMP-8 dan MMP-9 juga meningkatkan resiko ruptur dibandingkan plak stabil karotis (Newby, 2007).

Menurut penelitian Blankenberg *et. al.*, terjadi peningkatan resiko IMA pada kelompok pasien dengan peningkatan kadar plasma MMP-9. Sedangkan menurut Kelly *et. al.*, dan Xu *et. al.*, konsentrasi plasma MMP-9 pada plasma penderita IMA secara signifikan terbukti lebih tinggi dibandingkan normal (Blankenberg *et. al.*, 2003, Kelly *et. al.*, 2007, Xu *et. al.*, 2004).

2.4 Saliva

Saliva merupakan salah satu dari cairan di rongga mulut yang diproduksi dan diekskresi oleh kelenjar saliva dan dialirkan ke dalam rongga mulut. Saliva terdiri dari 98% air dan selebihnya adalah elektrolit, mukos, dan enzim-enzim. Saliva diekskresikan hingga 0,5-1,5 liter oleh tiga kelenjar mayor dan minor (Hashim, 2010).

Saliva mengandung komponen organik dan komponen anorganik. Komponen anorganik saliva terdiri dari air, bikarbonat, fosfat, sodium, kloride, potasium dan kalsium. Kandungan terbanyak dalam saliva adalah kandungan air dan sodium. Sementara itu, kandungan organik saliva terdiri dari lipid, karbohidrat dan protein. Pada saliva normal terdapat 10-100 µg/mL lipid, sedangkan kandungan normal protein dalam saliva 0,5 sampai 3 mg/mL, yang terdiri dari α -amylase, *cystatins*, *gustin*, *histatins*, *lactoferrine*, *lysozyme*, *mucins*, dan *salivary peroxidase* (Fa'bi'an dan Ferjerdy, 2007).

2.5 Histatin-5

2.5.1 Definisi dan Manfaat Histatin-5

Histatin merupakan famili polipeptida dengan berat molekul rendah, kationik, dan kaya histidin. Protein ini diproduksi di kelenjar parotis dan submandibular/sublingual. Struktur dan fungsinya telah dikenal dengan baik selama dua puluh tahun terakhir. Peptida dominan dari famili histatin adalah histatin 1, 3, dan 5 yang secara berurutan terdiri atas residu 38, 32, dan 24. Masing-masing histatin tersebut menempati konsentrasi 20—30% dari total histatin saliva. Konsentrasi total histatin adalah 30—150 µg/ml dalam sekresi parotis/sublingual/submandibular murni dan turun hingga 2—4 µg/ml dalam saliva murni (Wei, 2008).

Histatin-5 merupakan salah satu protein dalam saliva yang dihasilkan oleh kelenjar parotid, submandibular, dan sublingual. Menurut Baev *et. al.*, Histatin-5 merupakan toksin poten terhadap patogen fungi *Candida albicans* (Baev, 2003). Histatin-5 juga memiliki aktivitas fungistatik dan fungisidal terhadap *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Saccharomyces cerevisiae*, dan *Cryptococcus neoformans*. Kelebihan histatin-5 juga terlihat dari kemampuannya melawan galur fungi tersebut yang telah resisten terhadap obat golongan *azole* dan *amphotericin* (Wunder *et. al.*, 2004).

2.5.2 Histatin-5 sebagai *Zinc Chelating Agent*

Pada beberapa penelitian, telah dibuktikan bahwa histatin-5 mengikat ion-ion metal, terutama *zinc*. Hal tersebut didukung oleh fakta bahwa histatin-5 mengandung rantai HEXXH yang dikenal sebagai *zinc binding motif* pada banyak protein. Rantai ini terdapat pada residu 15—19 dari histatin-5, dan oleh karenanya tidak terdapat di histatin 1 dan 3.

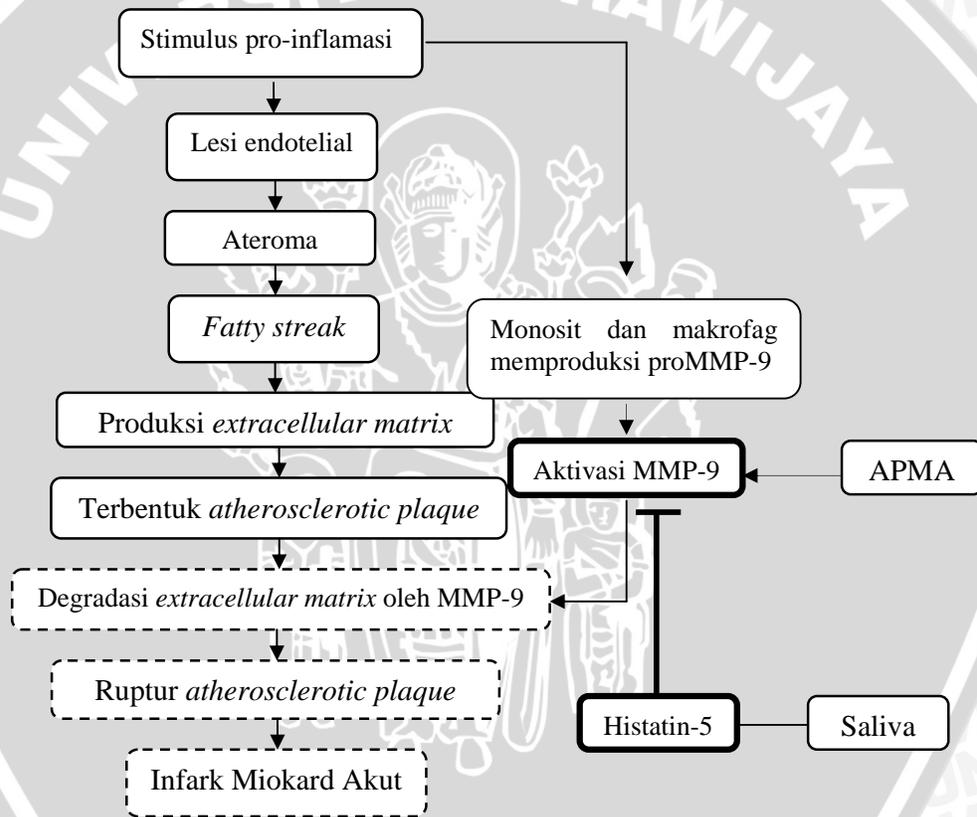
Dengan menggunakan metode *isothermal titration calorimetry*, afinitas ikatan histatin-5 dan *zinc* terukur setinggi $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Penemuan tersebut menyoroti sifat histatin-5 sebagai inhibitor *zinc-dependent enzymes*. Secara konsep, kemampuan histatin dalam mengikat ion metal ini menjadikannya mampu mengganggu protein atau enzim yang membutuhkan *zinc* sebagai kofaktor atau bagian integral dari struktur. Salah satu enzim tersebut adalah MMP-9 yang membutuhkan *zinc* secara mutlak untuk aktivasinya dari bentuk proMMP-9. Histatin-5 menghambat proses aktivasi tersebut dengan mengikat *zinc* dari *catalytic site* proMMP-9 sehingga enzim tersebut inaktif dan tidak mampu mendegradasi kolagen tipe IV (Grogan *et. al.*, 2001, Gusman *et. al.*, 2001, Sun *et. al.*, 2009).



BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Skema 3.1 Kerangka Konsep

Keterangan:

→ : menginduksi

—| : menghambat

□ : variabel yang diukur

□ terjadi jika

diberi perlakuan

3.2 Penjelasan Kerangka Konsep

Secara normal, sel endotel tidak dilekati oleh leukosit. Namun, ketika terdapat stimulus proinflamatori, akan terjadi lesi endotelial. Pada lesi endotelial terdapat sitokin-sitokin Th1 sehingga sel T yang teraktivasi akan berubah menjadi sel efektor Th-1 (selular). Hal ini akan mempengaruhi perkembangan plak. Makrofag dan sel T yang masuk ke tunika intima akan terus berubah menjadi *foam cell* sehingga ateroma semakin besar. Akumulasi *foam cell* akan membentuk *fatty streaks*. Sel otot polos kemudian bermigrasi ke tunika intima dan memproduksi *Extracellular Matrix* (ECM) sebagai respon terhadap *growth factor* yang dikeluarkan oleh makrofag dan sel endotel. *Extracellular Matrix* (ECM) tersebut membentuk *fibrous cap* yang pada akhirnya melengkapi pembentukan *atherosclerotic plaque*.

Plak aterosklerosis yang mempunyai *fibrous cap* tipis, rasio makrofag yang lebih tinggi dibanding sel otot polos, dan mempunyai sedikit struktur kolagen, merupakan plak yang mempunyai resiko besar untuk ruptur. Stimulus pro-inflamatori sekaligus akan merangsang sel-sel monosit dan makrofag untuk memproduksi proMMP-9. Selanjutnya, dalam penelitian ini digunakan APMA sebagai induktor aktivasi proMMP-9 menjadi MMP-9. MMP-9 kemudian akan mendegradasi kolagen tipe IV yang ada pada *fibrous cap*. Hal ini mengakibatkan rupturnya plak aterosklerosis. Ruptur plak aterosklerosis merupakan penyebab utama *myocardial infarction*.

Histatin-5 merupakan salah satu protein dalam saliva yang dihasilkan oleh kelenjar parotid, submandibular, dan sublingual. Histatin-5 juga dapat membentuk kompleks dengan *metal cations*, termasuk *zinc*. Hal ini dapat berfungsi sebagai *chelating agent zinc* pada *active site* proMMP-9, sehingga histatin-5 dapat menghambat aktivasi MMP-9. Terhambatnya aktivasi MMP-9 akan mengurangi degradasi kolagen pada *fibrous cap* sehingga tidak terjadi ruptur dan infark miokard akut dapat dicegah.

3.3 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan latar belakang dan kerangka konsep, peneliti memiliki hipotesis bahwa pemberian histatin 5 dalam saliva manusia pada *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMCs) penderita Infark Miokard Akut (IMA) dapat menurunkan aktivasi *Matrix Metalloproteinase 9* (MMP-9) secara *in vitro*.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan *desain true experimental in vitro* dengan metode *Randomized Posttest Only Control Group Design* untuk mengetahui efektivitas pemberian histatin 5 dalam saliva murni terhadap aktivasi MMP-9 pada PBMCs penderita IMA. Pada penelitian ini akan dilakukan pemaparan histatin 5 dalam saliva murni pada PBMCs darah penderita IMA dengan 3 kelompok dosis yang berbeda, 1 kelompok kontrol positif, dan 1 kelompok kontrol negatif. Besarnya dosis pemberian didasarkan pada eksperimen pendahuluan. Banyaknya pengulangan adalah sebagai berikut (Gusman *et. al.*, 2001).

$$p(n-1) \geq 16$$

p : jumlah kelompok perlakuan

n : jumlah pengulangan untuk setiap kelompok perlakuan dan n

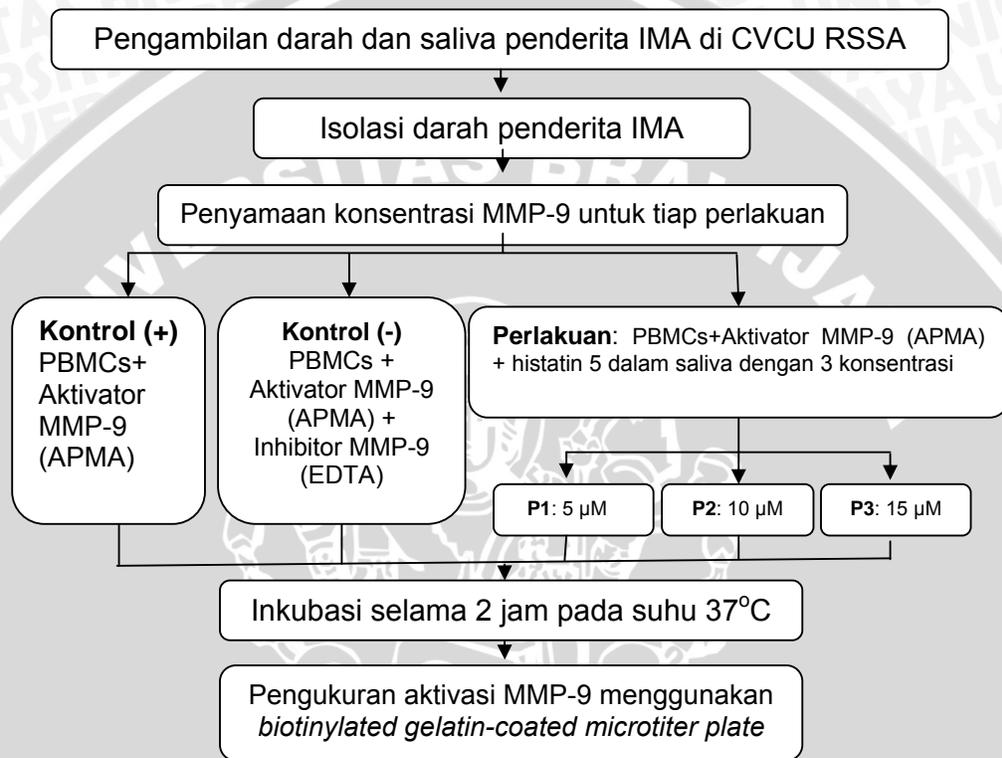
harus bilangan bulat

$$5(n-1) \geq 16$$

$$n-1 \geq 3,2$$

$$n \geq 4,2 \approx 5$$

Pada penelitian ini dilakukan pengulangan sebanyak 5 kali. Secara skematis desain penelitian ini dapat digambarkan sebagai berikut.



Skema 4.1 Rancangan Penelitian

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi Penelitian

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah MMP-9 dari PBMCs pada darah penderita IMA dan darah orang normal (bukan penderita IMA) sebagai pembanding.

4.2.2 Sampel Penelitian

Penelitian ini membagi sampel dalam 5 kelompok perlakuan, yaitu :

1. Kelompok kontrol positif (K+): isolasi PBMCs darah penderita IMA yang diberikan APMA sebagai aktivator MMP-9, tanpa pemberian saliva murni.
2. Kelompok kontrol negatif (K-): PBMCs darah penderita IMA yang diberikan APMA sebagai aktivator MMP-9 dan EDTA sebagai inhibitor poten MMP-9, tanpa pemberian saliva murni.
3. Kelompok perlakuan 1 (P1): PBMCs darah penderita IMA yang diberikan APMA sebagai aktivator MMP-9 dan pemberian saliva murni dengan konsentrasi histatin-5 5 μ M.
4. Kelompok perlakuan 2 (P2): PBMCs darah penderita IMA yang diberikan APMA sebagai aktivator MMP-9 dan pemberian saliva murni dengan konsentrasi histatin-5 10 μ M.
5. Kelompok perlakuan 3 (P3): PBMCs darah penderita IMA yang diberikan APMA sebagai aktivator MMP-9 dan pemberian saliva murni dengan konsentrasi histatin-5 15 μ M.

4.2.3 Teknik Pengambilan Sampel

1. Sejumlah 3 mL darah orang normal diperoleh dari mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan 3 mL darah 5 penderita IMA diperoleh dari CVCU RSSA Malang.
2. Darah dimasukkan ke *heparin vacuntainer*.

3. *Peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) diisolasi menggunakan *Ficoll-Hypaque gradient centrifugation*, kemudian diaspirasi *Buffy coat* dan dicuci menggunakan *Hanks Balanced Salt Solution* (HBSS) sebanyak 2 kali.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Airlangga Surabaya, Laboratorium Sentral Biomedik dan Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Februari hingga April 2011.

4.4 Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah saliva murni dengan 3 konsentrasi pemberian.

2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivasi MMP-9 pada tiap kelompok perlakuan.

4.5 Definisi Operasional

1. Penderita IMA yang darahnya diambil dalam penelitian ini adalah penderita yang dirawat di CVCU RSSA dan telah dinyatakan terdiagnosis positif IMA (baik STEMI maupun NSTEMI)

berdasarkan adanya gejala nyeri dada dengan atau tanpa penyebaran ke rahang, gigi, pundak, dan lengan; dispnea; gangguan epigastrik; diaporesis; dan sinkop atau hampir sinkop. Selain itu, telah dilakukan pemeriksaan elektrokardiografi dan biomarker IMA.

2. Saliva yang digunakan dalam penelitian ini adalah saliva yang berasal dari 5 subjek penderita IMA (subjek yang sama untuk pengambilan darah penderita IMA) yang memiliki kesehatan mulut tanpa gingivitis atau kondisi oral lainnya. Saliva murni diperoleh dengan cara pengambilan saliva utuh dengan cara ekspektorasi, kemudian disentrifugasi.
3. Histatin 5 merupakan protein yang terkandung dalam saliva, memiliki kemampuan sebagai fungisidal, fungsistatik, dan *zinc chelating agent*.
4. PBMCs berasal dari darah bukan penderita IMA dan darah penderita IMA, yang kemudian diproses seperti prosedur penelitian. PBMCs yang sudah siap diberi perlakuan dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu 1 kontrol negatif, 1 kontrol positif, dan 3 kelompok perlakuan dengan konsentrasi pemaparan histatin 5 yang berbeda-beda.
5. MMP-9 merupakan enzim protease yang disekresi oleh sel tubuh manusia, seperti sel fibroblast, sel endothel, sel polimorfonuklear, keratinosit, dan makrofag dalam bentuk proMMP-9 dan

mempunyai kemampuan untuk mengikat dan membutuhkan proses aktivasi yang bergantung pada keberadaan ion *zinc* untuk dapat aktif mendegradasi komponen *extracellular matrix* (ECM), seperti kolagen tipe IV, V, VII, dan X.

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Alat dan Bahan Ekstraksi Saliva

Alat yang dibutuhkan untuk ekstraksi saliva yaitu *swab* dan tabung reaksi. Sedangkan, bahan yang dibutuhkan yakni saliva yang berasal dari orang dengan mulut sehat.

4.6.2 Alat dan Bahan Pengukuran Kadar Histatin-5

Pengukuran Kadar Histatin-5 memerlukan *assay plates* 20 mL, 2 *standards*, *sample diluents* 20 mL, *assay diluents A* 10 mL, *assay diluents B* 10 mL, *detection reagent A* 120 μ L, *detection reagent B* 120 μ L, *wash buffer (25xconcentrate)* 30 mL, *substrate* 10 mL, *deionized or distilled water*, dan *stop solution* 10 mL. Sedangkan, alat yang diperlukan adalah 5 *plate sealers for 96 wells*, *luminometer*, *pipette and pipette tips*, dan *EP tube*.

4.6.3 Alat dan Bahan Isolasi PBMCs

Alat yang dibutuhkan dalam proses isolasi PBMCs adalah *spuit* 10 mL, *vacutainer* heparin, dan tabung sentrifugasi. Sedangkan, bahan-bahannya berupa darah normal maupun milik penderita IMA, *Hank's Buffer Salt Solution* (HBSS), dan *Histopaque 1077* 2 mL.

4.6.4 Alat dan Bahan Pengukuran Konsentrasi dan Aktivasi MMP-9

Alat yang dibutuhkan dalam proses pengukuran aktivitas MMP-9 dengan metode ELISA adalah mikropipet, *ependorf*, *blue tip*, *falcon* 15 mL, *yellow tip*, dan *microtiter plate 96 well*. Sedangkan, bahan-bahannya berupa supernatan kultur PBMCs, *coating buffer*, PBST-T 0.05%, *blocking buffer*, SA-HRP, antibodi MMP-9, *antihuman-biotin*, TMB, dan NaOH 3N.

4.7 Metode Pengumpulan Data

4.7.1 Pengambilan dan Pengujian Kadar Histatin-5 dalam Saliva

Sebanyak 5 mL *Whole Saliva* yang berasal dari 5 penderita IMA dan 1 bukan penderita IMA diambil pada jam 10.00-11.00 atau 1 jam setelah makan terakhir dengan cara pengeluaran secara pasif yang dibantu dengan mengunyah permen lemon berasa asam. Saliva ditampung pada tempat yang telah berisi 1 mL PMSF konsentrasi 1 mM dan 1 mL EDTA konsentrasi 2,5 mM. Kemudian sampel disimpan dalam suhu 4°C. Selanjutnya sebanyak 1 mL dari campuran tersebut dipisahkan dan dibawa menuju Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya untuk diukur kadar histatin-5.

Sampel tersebut diukur kadar histatin-5 menggunakan *Human Histatin-5 ELISA KIT EIAab*. Adapun langkah-langkah pengukuran Histatin-5 adalah:

- (1) sampel tersebut disentrifugasi pada 14000 x g selama 10 menit pada suhu 4°C;
- (2) ditambahkan 100 µL *standard* dan sampel tiap *well*nya, tutup dengan *plate sealer* dan inkubasi selama 2 jam pada suhu 37°C;
- (3) cairan tersebut disingkirkan dari tiap *well*, jangan dicuci;
- (4) *detection reagent A* 100 µL ditambahkan ke tiap *well*, kemudian ditutup dengan *plate sealer* dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C, dicampurkan secara perlahan sampai warnanya merata;
- (5) setiap *well* diaspirasi dan dicuci dengan *wash buffer* (400 µL), dilakukan pengulangan 3 kali, kemudian plate tersebut dibalik dan diberikan pukulan ringan pada bagian belakang plate dengan alas tissue bersih;
- (6) 100 µL *detection reagent B* ditambahkan ke tiap *well*, ditutup dengan *plate sealer* dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C;
- (7) selanjutnya langkah (5) dan (6) diulangi, lalu ditambahkan 90 µL *substrate solution* ke tiap *well*, ditutup dengan *plate sealer* dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C dengan syarat terlindung dari udara;
- (8) 50 µL *stop solution* ditambahkan ke tiap *well*, kemudian absorbansi dibaca dengan *microplate reader* pada gelombang 450 nm.

(Sugimoto *et. al.*, 2006)

4.7.2 Isolasi *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMCs)

Darah dalam penelitian ini berasal dari penderita IMA yang dirawat di *Cardio Vascular Care Unit* (CVCU) Rumah Sakit Saiful Anwar Malang. Penentuan IMA didasarkan pada anamnesis, pemeriksaan fisik, dan pemeriksaan tambahan seperti EKG dan *cardiac marker*. Pengambilan darah dilakukan sesegera mungkin setelah serangan. Darah yang diambil sebanyak 6 mL dengan menggunakan spuit 10 mL yang kemudian diletakkan pada *vacutainer* heparin. Selanjutnya PBMCs dalam darah tersebut diisolasi dalam waktu kurang dari 6 jam karena dikhawatirkan akan berakibat pada viabilitas PBMCs.

Metode isolasi dilakukan di Laboratorium Sentral Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Adapun langkah isolasi PBMCs adalah:

- (1) 6 mL darah disentrifugasi untuk dipisahkan serumnya;
- (2) ditambahkan *Hank's Buffer Salt Solution* (HBSS) ke sediaan sel darah dengan perbandingan 1:1, kemudian dihomogenkan;
- (3) campuran darah tersebut dipindah ke dalam tabung sentrifugasi yang telah berisi 2 mL Histopaque 1077;
- (4) tabung tersebut lalu disentrifugasi pada 1400 rpm selama 30 menit, pada hasilnya akan terbentuk 3 lapisan (dari atas ke bawah), yaitu HBSS, *buffycoat* (berisi sel *mononuclear* dan sel *granulocyte*), dan sel darah merah;

- (5) lapisan HBSS dibuang, lalu *buffycoat* ditampung ke dalam tabung sentrifugasi yang bersih dan dibuang sel darah merahnya;
 - (7) *buffycoat* dicuci dengan HBSS dan disentrifugasi pada kecepatan 700 rpm selama 10 menit;
 - (8) langkah (7) diulangi 3 kali;
 - (9) pelet *buffycoat* diresuspensi dengan 1 mL HBSS;
 - (10) pelet tersebut diinkubasi di *plate cultur* selama 1 jam dalam inkubator dengan suhu 37°C dan kadar CO₂ 5%;
 - (11) supernatan yang berisi neutrofil/sel granulosit diaspirasi dan dibilas perlahan dengan HBSS sebanyak 1 satu kali, sel yang tertinggal pada dasar *plate* tersebut merupakan PBMCs;
 - (12) PBMCs diinkubasi dalam HBSS selama 18 jam di inkubator dengan suhu 37°C dan kadar CO₂ 5%;
 - (13) supernatan yang mengandung MMPs dipanen dan disimpan pada suhu -80°C.
- (Muliartha *et. al.*, 2006)

4.7.3 Prosedur Pengukuran Konsentrasi MMP-9

Pengukuran konsentrasi MMP-9 dilakukan dengan metode ELISA untuk membandingkan konsentrasi MMP-9 pada penderita IMA dan pada orang normal. Langkah-langkahnya sebagai berikut.

- (1) Antigen (PBMCs) dilarutkan dalam *coating buffer* dengan perbandingan 1:50, kemudian dilakukan *coating* antigen pada *plate* ELISA.

- (2) Plate ELISA diinkubasi selama semalam dengan suhu 4°C, kemudian dicuci dalam PBS-Tween 3x3 menit.
- (3) Kemudian diblok dengan *blocking buffer* (BSA 1% dalam PBS).
- (4) Setelah itu, diinkubasi selama 1--1,5 jam dalam suhu ruangan, kemudian dicuci dengan dalam PBS-Tween 3x3 menit.
- (5) Kemudian, di-*coating* dengan antibodi MMP-9 dengan inkubasi dengan suhu 4°C selama semalam, kemudian dicuci PBST 3x3 menit.
- (6) Setelah itu, di-*coating* dengan *antihuman-biotin*, kemudian diinkubasi dalam suhu ruangan selama 1 jam, dan dicuci dengan PBST 3x3 menit.
- (7) Tambahkan substrat PNPP dalam dietanolamin 10%.
- (8) Inkubasi dengan suhu ruangan selama 30 menit.
- (9) Baca PNPP yang terikat antibodi sekunder
- (10) Tambah NaOH 3M sebagai *stop reaction*.
- (11) 15 menit kemudian, baca dengan ELISA *reader* pada gelombang $\lambda 405$ nm.

(Loftus *et. al.*, 2000)

4.7.4 Prosedur Pengukuran Aktivasi MMP-9

Pengukuran aktivasi MMP-9 dilakukan menggunakan *biotinylated gelatin-coated microtiter plate* yang telah dilakukan oleh Gusman *et al.* pada tahun 2000. Aktivasi MMP-9 dilihat berdasarkan

kemampuan proteolitik melepas ikatan kompleks gelatin-biotin.

Adapun langkah-langkahnya adalah:

- (1) setiap *well* telah dikondisikan dalam keadaan di mana terdapat ikatan kompleks gelatin-biotin;
- (2) disiapkan *supernatant* hasil isolasi monosit yang mengandung MMP-9 dengan kadar dan konsentrasi yang telah disamakan tiap *well*-nya (berdasarkan penelitian pendahuluan);
- (3) *supernatant* didilusi dengan 10,8 nM *enzym buffer* (terdiri dari 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) yang mengandung 0,5 M NaCl dan 5 mM CaCl₂);
- (4) ditambahkan 1 mM 4-aminophenylmercuric acetate (APMA) dan diinkubasi selama 30 menit;
- (5) kemudian ditambahkan saliva yang mengandung histatin-5 dengan 3 konsentrasi (5 µM, 10 µM, dan 15 µM) dan diinkubasi bersama dengan *supernatant* isolasi monosit dan APMA selama 10 menit;
- (6) 50 µl larutan tersebut dimasukkan ke dalam *well* selama 2 jam pada suhu 37°C, dengan rincian: 1. merupakan kontrol negatif yang berisi *supernatant* isolasi monosit dan APMA, 2. merupakan kontrol positif yang berisi *supernatant* isolasi monosit, APMA, dan pemberian EDTA sebanyak 25 mM, 3. merupakan kelompok perlakuan 1 yang berisi *supernatant* isolasi monosit, APMA, dan saliva yang mengandung konsentrasi 5 µM, 4. merupakan kelompok perlakuan 2 yang berisi *supernatant* isolasi monosit,

- APMA, dan saliva yang mengandung konsentrasi 10 μM , dan 5. merupakan kelompok perlakuan 3 yang berisi *supernatant* isolasi monosit, APMA, dan saliva yang mengandung konsentrasi 15 μM ;
- (7) penghentian reaksi menggunakan 200 μl PBS yang mengandung 1% Tween 20 untuk mencuci *microtiter plate* sebanyak 3 kali;
- (8) 50 μl *streptavidin-alkaline phosphate* (1:2, 500 *dilution in water*) ditambahkan ke setiap *well* dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C, kemudian *plate* dicuci sebanyak 4 kali dengan menggunakan 200 μl PBS-Tween;
- (9) 200 μl pNPP yang telah dicampurkan dengan *diethanolamine buffer* (1 mg pNPP per mL *buffer*) ditambahkan pada suhu 37°C selama 20 menit;
- (10) absorbansi dibaca dengan menggunakan *microtiter plate reader* pada gelombang 405 nm.
- (Gusman *et. al.*, 2001)

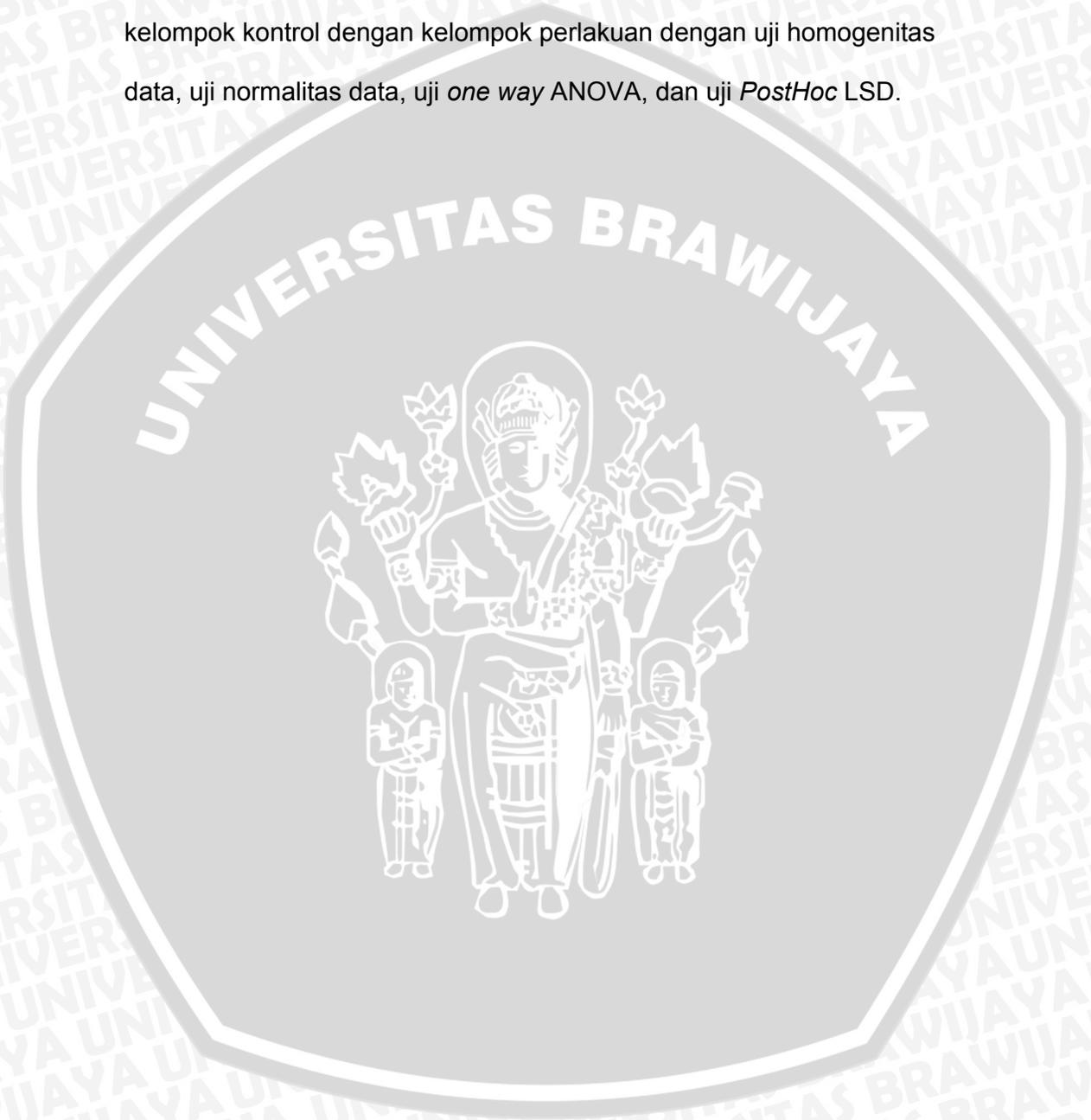
4.8 Pengolahan Data

4.8.1 Pengumpulan Data

Data dalam penelitian ini dikumpulkan dari hasil evaluasi pada kelompok kontrol positif, kelompok kontrol negatif, kelompok perlakuan 1, kelompok perlakuan 2, dan kelompok perlakuan 3.

4.8.2 Analisis Data

Pada penelitian ini, analisis perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan dengan uji homogenitas data, uji normalitas data, uji *one way* ANOVA, dan uji *PostHoc* LSD.



BAB V

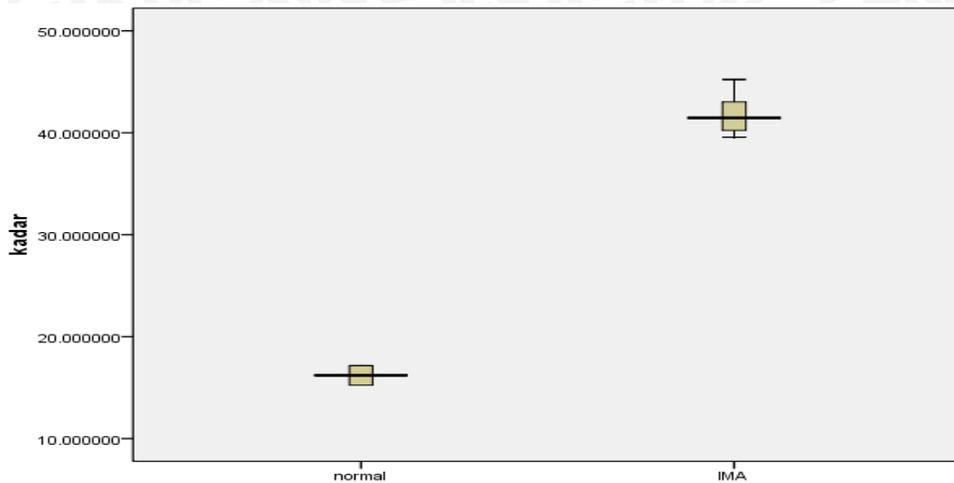
HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA

5.1 Hasil Penelitian

Dalam penelitian ini, terdapat 5 sampel darah yang berasal dari penderita IMA dengan syarat pengambilan darahnya sesegera mungkin setelah serangan. Selanjutnya, dilakukan isolasi PBMCs seperti yang ada pada metode penelitian. Berikut merupakan grafik data hasil ELISA kadar MMP-9 dalam *supernatant* hasil isolasi PBMCs orang normal dan penderita IMA.

Tabel 5.1 Hasil Pengukuran Kadar MMP-9 di PBMCs

SAMPEL	PENGULANGAN	KADAR MMP-9 (ng/ml)
NORMAL	1	15,24561
	2	17,15789
IMA 1	1	40,2345
	2	41,3456
IMA 2	1	45,22807
	2	43,03058
IMA 3	1	42,96491
	2	39,61404
IMA 4	1	41,40351
	2	39,5614
IMA 5	1	41,52632
	2	43,54386



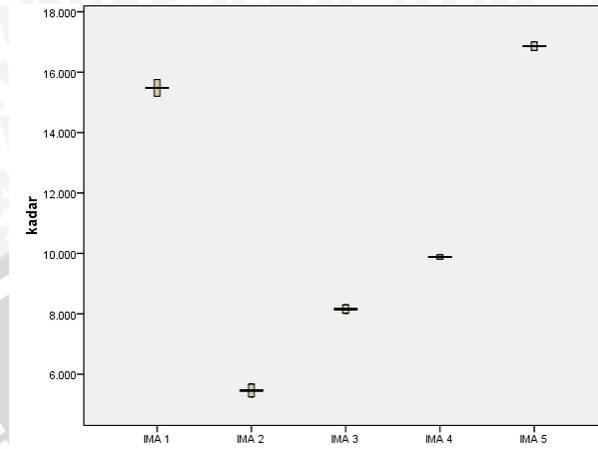
Gambar 5.1 Grafik Hasil Pengukuran Kadar MMP-9

Berdasarkan hasil tes *Mann-Whitney U*, didapatkan nilai $p=0.032$ ($p<0.05$) yang artinya terdapat beda signifikan kadar MMP-9 antara kelompok isolasi PBMCs penderita IMA dan orang normal (tidak menderita IMA).

Sejumlah 5 sampel saliva yang berasal dari penderita IMA diambil untuk diukur kadar histatin-5 dengan ELISA seperti yang ada pada metode penelitian. Berikut merupakan grafik data kadar histatin-5 dalam saliva penderita IMA.

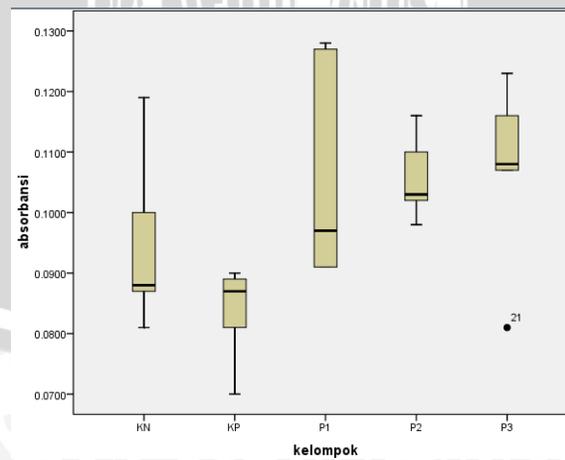
Tabel 5.2 Hasil Pengukuran Kadar Histatin-5 di Saliva

SAMP EL	PENGULANG AN	KADAR HISTATIN-5 (ng/ml)
IMA 1	1	15,202
	2	15,755
IMA 2	1	5,252
	2	5,666
IMA 3	1	8,016
	2	8,292
IMA 4	1	9,812
	2	9,951
IMA 5	1	16,723
	2	16,999



Gambar 5.2 Grafik Hasil Pengukuran Kadar Histatin-5 di Saliva

Setelah MMP-9 dipapar dengan APMA dan dimasukkan ke tiap *well* yang telah diisi *biotinylated gelatin*, saliva yang berisi histatin-5 dipaparkan ke seluruh *well* tersebut dengan 3 dosis konsentrasi histatin-5 yang berbeda untuk setiap kelompok perlakuan. Dengan perlakuan tersebut, diharapkan jumlah *biotinylated gelatin* yang terhitung dengan pengukuran menggunakan *biotinylated gelatin-coated microtiter plate* cukup tinggi sehingga dapat disimpulkan bahwa aktivasi MMP-9 rendah. Berikut merupakan grafik dan tabel data hasil pengukuran aktivasi MMP-9 setelah dipapar saliva.



Gambar 5.3 Grafik Hasil Pengukuran Aktivasi MMP-9 Setelah Dipapar Saliva

Tabel 5.3 Hasil Pengukuran Aktivasi MMP-9 Setelah Dipapar Saliva

SAMPEL	KONTROL NEGATIF	KONTROL POSITIF	PERLAKUAN 1	PERLAKUAN 2	PERLAKUAN 3
IMA I	0.0810	0.0870	0.1270	0.1020	0.0810
IMA II	0.1000	0.0900	0.1280	0.1030	0.1160
IMA III	0.1190	0.0810	0.0910	0.0980	0.1230
IMA IV	0.0870	0.0700	0.0910	0.1100	0.1080
IMA V	0.0880	0.0890	0.0970	0.1160	0.1070

5.2 Analisis Data

Data mengenai pengaruh pemaparan saliva terhadap aktivasi MMP-9 yang diinduksi APMA dianalisis dengan menggunakan analisis statistik SPSS (*Statistical Product and Service Solution*) versi 17.0 dengan metode uji statistika *One-way Anova*.

5.3 Uji Normalitas Data

Uji statistik yang pertama adalah untuk menentukan normalitas data dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Berdasarkan pengujian normalitas data dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk* didapatkan bahwa data untuk semua kelompok mempunyai sebaran tidak normal (Lihat Lampiran 1) dengan nilai $p = 0,337$ (kontrol negatif), $p = 0,189$ (kontrol positif), $p = 0,039$ (perlakuan 1), $p = 0,685$ (perlakuan 2), dan $p = 0,371$ (perlakuan 3), sehingga dapat disimpulkan bahwa data variabel tersebut tidak menyebar mengikuti sebaran normal. Maka analisa data tidak dapat dilakukan dengan menggunakan uji *One-way Anova*, untuk itu perlu dilakukan transformasi data.

Sebelum melakukan transformasi data, diperlukan bentuk transformasi data tepat dengan memperhatikan *slope* dan *power*. Dengan

memperhatikan *slope* ($slope=0,490$) dan *power* ($power=0,510$) data ini (Lihat Lampiran 2), maka didapatkan bentuk transformasi data *square root* (akar). Selanjutnya dilakukan transformasi data dengan *square root*. Setelah melakukan transformasi data, didapatkan bahwa data tidak menyebar mengikuti persebaran normal (Lihat Lampiran 3) dengan nilai $p= 0,402$ (kontrol negatif), $p= 0,166$ (kontrol positif), $p= 0,042$ (perlakuan 1), $p= 0,707$ (perlakuan 2), dan $p= 0,288$ (perlakuan 3). Kemudian dicoba transformasi data *reciprocal* ($1/n$). Setelah melakukan transformasi data, didapatkan bahwa data menyebar mengikuti persebaran normal (Lihat Lampiran 4) dengan nilai $p= 0,605$ (kontrol negatif), $p= 0,109$ (kontrol positif), $p= 0,053$ (perlakuan 1), $p= 0,768$ (perlakuan 2), dan $p= 0,115$ (perlakuan 3).

5.4 Uji Homogenitas Varian

Pada uji homogenitas *Levene* didapatkan bahwa data mempunyai varian yang sama ($p < 0,05$) dengan nilai $p = 0,356$ (Lihat Lampiran 5). Maka analisa data dapat dilakukan dengan menggunakan uji *One-way Anova*.

5.5 Uji *One-way Anova*

Pada uji statistik ini, dapat diketahui apakah terdapat perbedaan tingkat aktivasi MMP-9 yang signifikan antar kelompok. Perbedaan tingkat aktivasi MMP-9 dianggap bermakna jika nilai $p < 0,05$ atau dengan kata lain hipotesis Null ditolak. Hipotesis Null yang diajukan pada uji *One-way Anova* ini adalah "Kelima kelompok mempunyai tingkat aktivasi MMP-9 yang sama". Dari hasil pengujian didapatkan bahwa nilai $p = 0.033$ (Lihat Lampiran 5)

dan berdasarkan hasil tersebut maka hipotesis Null ditolak sehingga dapat disimpulkan bahwa paling tidak terdapat perbedaan tingkat aktivasi MMP-9 pada PBMCs antara dua kelompok yang berbeda.

5.6 Uji *Post Hoc* LSD

Analisis mengenai perbedaan tingkat aktivasi MMP-9 dari kelima kelompok dapat diketahui dalam *Post Hoc Multiple Comparison test*. Metode *Post Hoc* yang digunakan untuk uji *One-way Anova* adalah uji *Post Hoc* LSD. Pada uji *Post Hoc* LSD, suatu data dikatakan berbeda secara bermakna apabila nilai signifikansi $p < 0,05$. Berdasarkan *output* uji tersebut didapatkan hasil sebagai berikut (Lihat Lampiran 6).

Tabel 5.4 Uji *Post Hoc* LSD Aktivasi MMP-9

	K-	K+	P1	P2	P3
K-	-	0,138*	0,219*	0,179*	0,198*
K+	0,138*	-	0,011	0,008	0,009
P1	0,219*	0,011	-	0,903*	0,952*
P2	0,179*	0,008	0,903*	-	0,952*
P3	0,198*	0,009	0,952*	0,952*	-

Keterangan:

Biru : nilai $p < 0,05$ = terdapat perbedaan bermakna antara dua kelompok.

* : nilai $p > 0,05$ = tidak terdapat perbedaan bermakna antara dua kelompok

Dari tabel diatas dapat disimpulkan sebagai berikut.

1. Pada kelompok PBMCs yang diinduksi dengan APMA dan tidak dipapar saliva (K+) mengalami peningkatan aktivasi MMP-9 yang tidak bermakna dibandingkan aktivasi MMP-9 pada isolasi PBMCs kelompok kontrol negatif yang diinduksi dengan APMA dan dihambat dengan EDTA (K-).
2. Pada kelompok isolasi PBMCs yang diinduksi dengan APMA dan dipapar saliva dosis konsentrasi 5 μM , 10 μM dan 15 μM (P1; P2; P3) mengalami

penurunan aktivasi MMP-9 secara bermakna ($p < 0,05$) dibandingkan kelompok kontrol positif (K+).

3. Terdapat penurunan aktivasi MMP-9 yang tidak bermakna antara kelompok isolasi PBMCs kontrol negatif (K-) dengan kelompok isolasi PBMCs yang diinduksi APMA dan dipapar saliva dosis konsentrasi 5 μM , 10 μM dan 15 μM (P1; P2; P3).

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB VI

PEMBAHASAN

APMA merupakan bahan kimia yang telah sering digunakan untuk menginduksi aktivasi MMP-9. Pada penelitian ini, diberikan APMA sebanyak 1 mM pada PBMCs hasil isolasi darah penderita IMA secara *in vitro* dan diinkubasi selama 30 menit untuk menginduksi aktivasi MMP-9, hal ini sesuai dengan metode yang digunakan pada penelitian Shapiro *et. al.* (1995), Gusman *et. al.* (2001) dan Rosenfeldt *et. al.* (2005). Hasil penelitian membuktikan bahwa aktivasi MMP-9 pada kelompok PBMCs yang diinduksi APMA meningkat dibandingkan kelompok tikus PBMCs yang selain diinduksi APMA juga diinhibisi dengan EDTA. Hal ini mendukung penelitian yang dilakukan oleh Shapiro *et. al.* (1995), dan Rosenfeldt *et. al.* (2005) yang menyatakan aktivasi MMP-9 meningkat pada PBMCs yang diinduksi APMA. Semua hasil penelitian di atas mendukung Loftus *et. al.* (2000) dan Blankenberg *et. al.* (2003) yang menyatakan pada proses aterosklerotik yang mengakibatkan IMA terjadi peningkatan kadar MMP-9 aktif. Inhibisi aktivasi MMP-9 dengan cara memberikan *zinc chelating agent*

merupakan cara pencegahan IMA (Grogan *et. al.*, 2001, Gusman *et. al.*, 2001).

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa pemberian saliva manusia yang mengandung histatin-5 dapat menghambat aktivasi MMP-9 yang ditandai tingginya absorbansi *biotinylated gelatin* pada kelompok perlakuan 1, 2, dan 3 yang diberi saliva manusia dengan konsentrasi histatin-5 5, 10, dan 15 μM , dibandingkan dengan kelompok kontrol positif yang diinduksi APMA. Hal ini mendukung penelitian Grogan *et. al.* (2001), Gusman *et. al.* (2001), dan Sun *et. al.* (2009) yang membuktikan bahwa histatin-5 memiliki kemampuan mengikat ion *zinc* dengan afinitas tinggi secara *in vitro*.

Penelitian Guoxian Wei (2008) telah menjabarkan protein yang terkandung dalam saliva, salah satunya histatin-5. Histatin-5 telah banyak digunakan sebagai antifungi karena dapat berperan sebagai fungisidal dan fungistatika. Penggunaan histatin-5 pada penelitian ini didasarkan pada penelitian yang dilakukan oleh Gusman *et. al.* (2001) yang menyatakan bahwa histatin-5 murni merupakan penghambat aktivasi MMP-9 murni secara *in vitro*. Kandungan protein terbanyak dalam saliva adalah histatin 1, histatin 3, dan histatin 5 (Wei, 2008, Sun *et. al.*, 2009).

Histatin-5 telah dibuktikan dapat menghambat aktivasi enzim yang bergantung pada ion *zinc* dengan cara mengikat ion *zinc* tersebut melalui rantai HEXXH yang merupakan *zinc binding motif*

(Grogan *et. al.*, 2001, Sun *et. al.*, 2009). Hal ini sesuai dengan penelitian Gusman *et. al.* (2001) yang membuktikan pemberian histatin-5 murni dapat menurunkan aktivasi MMP-9 murni secara *in vitro*.

Seperti yang telah disebutkan di atas, pemberian histatin-5 dapat berperan sebagai inhibitor aktivasi MMP-9 dengan cara mengikat ion *zinc*, yang bergantung pada dosis pemberian. Menurut Gusman *et. al.* (2001), pemberian histatin-5 dengan konsentrasi 1 μM mulai memberikan efek inhibisi komplit aktivasi MMP-9 secara *in vitro* dengan konsentrasi optimum yang menjadikan aktivasi MMP-9 terhitung nol sebesar 10 μM , maka diperkirakan untuk menimbulkan efek inhibisi aktivasi MMP-9 diperlukan minimal konsentrasi histatin-5 sebanyak 5 μM secara *in vitro*. Pada penelitian ini digunakan dosis konsentrasi histatin-5 dalam saliva sebesar 5, 10, dan 15 μM .

Pada kelompok perlakuan 1, 2, dan 3 didapatkan aktivasi MMP-9 kelompok PBMCs yang diinduksi APMA dan diberikan saliva murni dengan konsentrasi histatin-5 sebesar 5, 10, dan 15 μM menurun secara signifikan dibandingkan dengan kelompok PBMCs yang diinduksi APMA (kontrol positif), hal ini mendukung pernyataan bahwa pemberian konsentrasi histatin-5 sebesar 5, 10, dan 15 μM memberikan efek inhibisi pada aktivasi MMP-9. Pada kelompok perlakuan 2, PBMCs yang diinduksi APMA dan diberi

saliva murni dengan konsentrasi histatin-5 sebesar 10 μM , didapatkan rata-rata aktivasi MMP-9 paling mendekati kelompok normal (kontrol negatif) dengan korelasi terkuat dengan kelompok kontrol positif ($p=0,008$), sehingga dapat dikatakan bahwa dosis efektif pemberian saliva murni adalah dengan konsentrasi histatin-5 sebesar 10 μM .

Pada kelompok perlakuan 3, PBMCs yang diinduksi APMA dan diberikan saliva murni dengan konsentrasi histatin-5 sebesar 15 μM , didapatkan penurunan aktivasi MMP-9 secara signifikan dibanding PBMCs pada kelompok kontrol positif. Hal ini sesuai dengan penelitian Gusman *et. al.* (2001) yang menyatakan pemberian histatin-5 dengan konsentrasi 10–100 μM dapat memberikan efek inhibisi komplit terhadap aktivasi MMP-9. Dalam penelitiannya, Gusman memaparkan histatin-5 murni dengan berbagai konsentrasi pada MMP-9 murni yang diaktivasi oleh APMA.

Pada kelompok perlakuan 1, PBMCs yang diinduksi APMA dan diberikan saliva murni dengan konsentrasi histatin-5 sebesar 5 μM , didapatkan penurunan aktivasi MMP-9 secara signifikan dibandingkan kelompok kontrol positif. Hal ini dapat disebabkan rantai HEXXH (*zinc binding motif*) yang terdapat pada histatin-5 memiliki afinitas yang sangat tinggi terhadap ikatannya dengan ion *zinc*. Meskipun pada penelitian ini tidak diteliti tentang afinitas

ikatan histatin-5 dan ion *zinc*, serta belum ada penelitian yang membuktikan pemberian saliva yang mengandung histatin-5 secara *in vivo*, hal ini menjadi dasar penelitian selanjutnya untuk membuktikan efek inhibisi histatin-5 terhadap aktivasi MMP-9 secara *in vivo*, beserta toksikologi dan dosis aman untuk tubuh.

Penelitian ini memiliki beberapa kelemahan. Salah satunya adalah karena sampel hanya diambil dari lima penderita IMA yang seluruhnya berjenis kelamin pria. Hasil penelitian ini dapat dikatakan tidak atau kurang representatif pada penderita IMA berjenis kelamin wanita. Selain itu, jumlahnya yang hanya lima orang dirasa masih jauh dari cukup untuk dijadikan representasi dari penderita IMA di Indonesia. Untuk itu, peneliti menyarankan penelitian lanjutan dengan sampel yang beragam jenis kelamin dan jumlah lebih banyak sehingga mampu mewakili penderita IMA di Indonesia. Histatin-5 yang terdapat dalam saliva juga masih kurang aplikatif. Hal itu dikarenakan setiap kali ingin mendapatkan histatin-5 harus mengekstraksi saliva pasien. Saat ini, histatin-5 sudah mampu disintesis oleh perusahaan penyedia bahan penelitian dan bahan kimia lainnya. Namun, harganya masih sangat tinggi. Oleh karena itu, peneliti merasa perlu untuk diadakan penelitian lanjutan mengenai sintesis histatin-5 yang aplikatif dan lebih murah.

BAB VII

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan, maka dapat disimpulkan bahwa pemberian saliva murni yang mengandung histatin-5 pada PBMCs penderita IMA dapat menurunkan aktivasi MMP-9 secara *in vitro*.

7.2 Saran

Guna pengembangan keilmuan, diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai :

1. Pengaplikasian histatin-5 pada darah tikus yang diinduksi IMA terhadap penurunan aktivasi MMP-9 secara *in vivo*.
2. Toksikologi dan efek samping dari pemberian histatin-5 pada darah tikus yang diinduksi IMA terhadap penurunan aktivasi MMP-9.
3. Dosis aman pemberian histatin-5 pada darah tikus yang diinduksi IMA terhadap penurunan aktivasi MMP-9 secara *in vivo*.

DAFTAR PUSTAKA

- Alwi, Idrus. 2006. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam: Infark Miokard Akut dengan Elevasi ST*. Jakarta: Departemen Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Atinia, Sri Murwani. 2006. *Chlamydia pneumoniae Penyebab Penyakit- Penyakit Kardiovaskuler*. Malang: Koran Persatuan Dokter Hewan Indonesia.
- Baev Didi, Alberto Rivetta, Xuewei S. Li, Slavena Vylkova, Esther Bashi, Clifford L. Slayman, Mira Edgerton. 2003. *Killing of Candida albicans by Human Salivary Histatin 5 Is Modulated, but Not Determined, by the Potassium Channel TOK1*. American Society for Microbiology 71 (6): 3251—3260.
- Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, Meyer J, Cambien F, Tiret L. 2003. *Atherogene Investigators: Plasma Concentrations and Genetic Variation of Matrix Metalloproteinase 9 and Prognosis of Patients with Cardiovascular Disease*. Circulation 107: 1579—585.
- Chrestella, Jessy. 2009. *Gambaran Imunoekspresi Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9) Pada Lesi-Lesi Prakanker dan Karsinoma Serviks Invasif*. Medan: Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara.
- Djohan, T. Bahri Anwar. 2004. *Patofisiologi Dan Penatalaksanaan Penyakit Jantung Koroner*. Medan: Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara.
- Dwivedi Amrita, Sadie C. Slater, Sarah J. George. 2009. *MMP-9 and -12 Cause N-cadherin Shedding and Thereby b-catenin Signalling and Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation*. Cardiovascular Research Oxford Journals (81): 178—186.
- Fa'bi'an, Tibor K., P'al Fej'erdy, dan P'eter Csermely. 2007. *Saliva in Health and Disease*. Wiley Encyclopedia of Chemical Biology: 1—9.
- Grogan James, C. James McKnight, Robert F. Troxler, Frank G. Oppenheim. 2001. *Zinc and Copper Bind to Unique Sites of Histatin*

5. Federation of European Biochemistry Societies Letters 491 (2001) : 76—80.

Gusman H, Lendenmann U, Grogan J, Troxler RF, Oppenheim FG. 2001. *Is salivary Histatin 5 A Metallopeptide?* Boston: Department of Periodontology and Oral Biology Boston University Goldman School of Dental Medicine.

Gusman Heloisa, James Travis, Eva J. Helmerhorst, JAN Potempa, Robert F. Troxler, dan Frank G. Oppenheim. 2001. *Salivary Histatin 5 Is an Inhibitor of Both Host and Bacterial Enzymes Implicated in Periodontal Disease.* American Society for Microbiology 16 (3): 1402—1408.

Hashim, AB. 2010. *Saliva.* Medan: Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara.

Kelly Dominic, Gillian Cockerill, Leong L. Ng, Matt Thompson, Sohail Khan, Nilesh J. Samani, Iain B. Squire. 2007. *Plasma Matrix Metalloproteinase-9 and Left Ventricular Remodelling After Acute Myocardial Infarction in Man: A Prospective Cohort Study.* European Heart Journal 28 (6): 711—718.

Kumar Vinay, Abul K. Abbas, Nelson Fausto, Richard Mitchell. 2003. *Robbins Basics Pathology.* Philadelphia : Elsevier.

Loftus Ian M., A. Ross Naylor, Stephen Goodall, Matthew Crowther, Louise Jones, Peter R. F. Bell, Matthew M. Thompson. 2000. *Increased Matrix Metalloproteinase-9 Activity in Unstable Carotid Plaques: A Potential Role in Acute Plaque Disruption.* Stroke 2000 (31): 40—47.

Majid, Abdul. 2007. *Penyakit Jantung Koroner: Patofisiologi, Pencegahan, dan Pengobatan Terkini.* Medan: Universitas Sumatera Utara.

Malinrungi, Trio Tangkas Wahyu. 2003. *Hubungan Antara Luas Infark Miokard Akut (Berdasarkan Skor Selvester) dengan Ketahanan Hidup Selama 6 Bulan.* Semarang: Bagian Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Rumah Sakit Umum Pusat dr. Kariadi.

Meli, Damian N., Stephan Christen, Stephen L. Leib. 2003. *Matrix Metalloproteinase-9 in Pneumococcal Meningitis: Activation via an Oxidative Pathway.* The Journal of Infectious Diseases 187:1411—1415.

- Muliartha I Gede Ketut dan Muljohadi Ali. 2004. *Pembuatan Probe Diagnostik Penderita Infark Miokard Akut yang Terkait Infeksi Mikroorganisme*. Malang: Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- Muliartha I Gede Ketut, Muljohadi Ali, Purwanto, Ida Susilawati, Sri Murwani, et. al. 2006. *Pembuatan Probe Diagnostik Penderita Infark Miokard Akut yang Terkait Infeksi Mikroorganisme*. Jakarta: Pusat Dokumentasi dan Informasi Ilmiah – Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia.
- Newby. Andrew C. 2007. Role of Metalloproteinases in Plaque Rupture. *International Journal of Gerontology* 1 (3): 103—111.
- Packard, Rene´ R. S. dan Peter Libby. 2008. *Inflammation in Atherosclerosis: From Vascular Biology to Biomarker Discovery and Risk Prediction*. *Clinical Chemistry* 54 (1): 24—38.
- Rosenfeldt MT, Valentino M, Labruzzo S, Scudder L, Pavlaki M, Cao J, Vacirca J, Bahou WF, Zucker S. 2005. *The Organomercurial 4-Aminophenylmercuric Acetate, Independent of Matrix Metalloproteinases, Induces Dose-dependent Activation/Inhibition of Platelet Aggregation*. New York: Department of Medicine, Veterans Affairs Medical Center.
- Shapiro Steven D., Catherine J. Flitszar, Thomas J. Broekelmann, Robert P. Mecham, Robert M. Senior, Howart G. Welgus. 1995. *Activation of the 92-kDa Gelatinase by Stromelysine and 4-Aminophenylmercuric Acetate*. *The Journal of Biological Chemistry* 270 (11): 6351—6356.
- Sugimoto J., Kanehira T., Mizugai H., Chiba I., Morita M. 2006. *Relationship Between Salivary Histatin 5 Levels and Candida CFU Counts in Healthy Elderly*. *Gerodontology* Sep 2006; (23): 164—169.
- Sun Xiuli, Erdjan Salih, Frank G. Oppenheim, Eva J. Helmerhorst. 2009. *Kinetics of Histatin Proteolysis in Whole Saliva and The Effect on Bioactive Domains with Metal-binding, Antifungal, and Wound-healing Properties*. *FASEB Journal* 2009 (23): 1—11.
- Vempati Prakash, Emmanouil D. Karagiannis, Aleksander S. Popel. 2007. *A Biochemical Model of Matrix Metalloproteinase 9 Activation and Inhibition*. *The Journal of Biological Chemistry* 282 (52): 37585—37596.

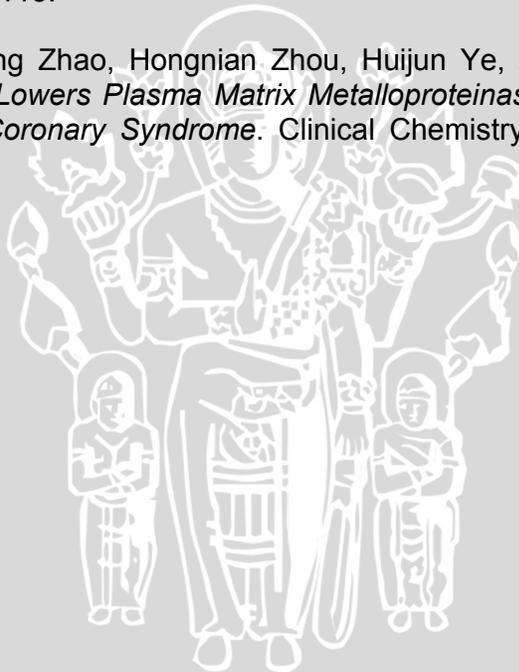
Visse Robert dan Hideaki Nagase. 2003. *Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases Structure, Function, and Biochemistry*. Circulation Research: 827—839.

Wasid, HA. 2010. *Tinjauan Pustaka: Konsep Baru Penanganan Sindrom Koroner Akut*. Purwokerto: SMF Kardiovaskular RSUD Prof. Dr. Margono Soekarjo.

Wei Guoxian. 2008. *Antimicrobial Activity of Human Salivary Mucin-derived Peptides*. Amsterdam: Vrije Universiteit van Amsterdam.

Wunder David, Dong Jin, Baev Didi, Edgerton Mira. 2004. *Human Salivary Histatin 5 Fungicidal Action Does Not Induce Programmed Cell Death in Candida albicans*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 48 (1): 110—115.

Xu Zhumei, Shuiping Zhao, Hongnian Zhou, Huijun Ye, Jiang Li. 2004. *Atorvastatin Lowers Plasma Matrix Metalloproteinase-9 in Patients with Acute Coronary Syndrome*. Clinical Chemistry 50 (4): 750—753.



Lampiran 1

Hasil Uji Normalitas Data

Tests of Normality

nomor	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
post_test 1	.279	5	.200*	.886	5	.337
2	.268	5	.200*	.848	5	.189
3	.296	5	.173	.762	5	.039
4	.252	5	.200*	.943	5	.685
5	.300	5	.161	.893	5	.371

a. Lilliefors Significance Correction

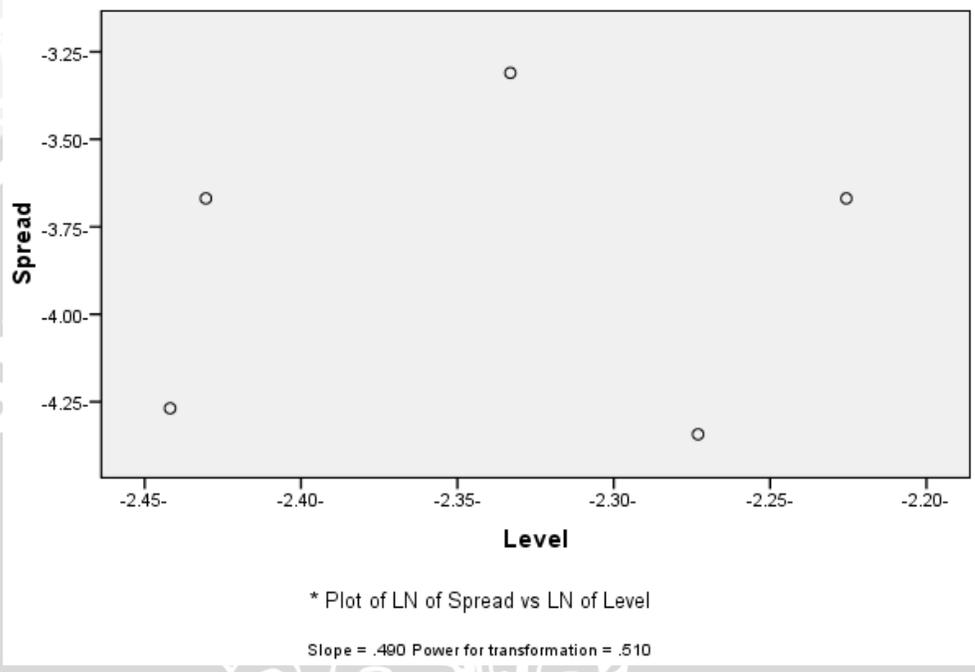
*. This is a lower bound of the true significance.



Lampiran 2

Penentuan Transformasi Data

Spread vs. Level Plot of post_test by Nomor



Slope	Power	Bentuk Transformasi
-1	2	Kuadrat
0	1	Tidak perlu transformasi
0,5	0,5	Akar
1	0	Logaritma
1,5	-0.5	1/square root
2	-1	Resiprokal (1/n)

Lampiran 3

Hasil Uji Normalitas Data Transformasi 1 (akar)

Tests of Normality

nomor	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
post_pil2_akar 1	.275	5	.200*	.898	5	.402
2	.271	5	.200*	.841	5	.166
3	.290	5	.195	.766	5	.042
4	.249	5	.200*	.946	5	.707
5	.312	5	.125	.875	5	.288

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.



Lampiran 4

Hasil Uji Normalitas Data Transformasi 2 (1/n)

Tests of Normality

	nomor	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
postpil2_seperdata	1	.261	5	.200 [*]	.931	5	.605
	2	.276	5	.200 [*]	.816	5	.109
	3	.270	5	.200 [*]	.778	5	.053
	4	.239	5	.200 [*]	.954	5	.768
	5	.347	5	.049	.819	5	.115

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.



Lampiran 5

Hasil Uji Homogenitas Data dan One-way Anova (1/n)

Test of Homogeneity of Variances

postpil2 seperdata

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.166	4	20	.356

ANOVA

postpil2 seperdata

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	25.674	4	6.418	3.258	.033
Within Groups	39.399	20	1.970		
Total	65.073	24			



Lampiran 6

Hasil Uji Post Hoc LSD

Multiple Comparisons

postpil2_seperdata
LSD

(I) nomor	(J) nomor	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-1.3731565-	.8876836	.138	-3.224832-	.478519
	3	1.1266227	.8876836	.219	-.725053-	2.978298
	4	1.2357180	.8876836	.179	-.615958-	3.087393
	5	1.1810852	.8876836	.198	-.670590-	3.032761
2	1	1.3731565	.8876836	.138	-.478519-	3.224832
	3	2.4997793*	.8876836	.011	.648104	4.351455
	4	2.6088745*	.8876836	.008	.757199	4.460550
	5	2.5542417*	.8876836	.009	.702566	4.405917
3	1	-1.1266227-	.8876836	.219	-2.978298-	.725053
	2	-2.4997793*	.8876836	.011	-4.351455-	-.648104-
	4	.1090953	.8876836	.903	-1.742580-	1.960771
	5	.0544625	.8876836	.952	-1.797213-	1.906138
4	1	-1.2357180-	.8876836	.179	-3.087393-	.615958
	2	-2.6088745*	.8876836	.008	-4.460550-	-.757199-
	3	-.1090953-	.8876836	.903	-1.960771-	1.742580
	5	-.0546328-	.8876836	.952	-1.906308-	1.797043
5	1	-1.1810852-	.8876836	.198	-3.032761-	.670590
	2	-2.5542417*	.8876836	.009	-4.405917-	-.702566-
	3	-.0544625-	.8876836	.952	-1.906138-	1.797213
	4	.0546328	.8876836	.952	-1.797043-	1.906308

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

LAMPIRAN 7

Informed Consent Sampel IMA I

Pernyataan Persetujuan untuk Berpartisipasi dalam Penelitian

Saya yang bertandatangan dibawah ini menyatakan bahwa :

1. Saya telah mengerti tentang apa yang tercantum dalam lembar persetujuan diatas dan telah dijelaskan oleh peneliti
2. Dengan ini saya menyatakan bahwa secara sukarela bersedia tidak bersedia*) untuk ikut serta menjadi salah satu penelitian yang berjudul *Prototype Spesific Protection Infark Miokard Akut (IMA) secara in vitro: Upaya Penurunan Angka Kejadian Menggunakan Saliva Murni terhadap Kadar Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9)*

Malang, 9 Maret....., 2011

Peneliti

Saksi,

Yang membuat pernyataan


(Nuchya Parahita)
NIM. 0910710011


(Eko.....)


(.....)

LAMPIRAN 8

Informed Consent Sampel IMA II

Pernyataan Persetujuan untuk Berpartisipasi dalam Penelitian

Saya yang bertandatangan dibawah ini meyakini bahwa :

1. Saya telah mengerti tentang apa yang tercantum dalam lembar persetujuan diatas dan telah dijelaskan oleh peneliti
2. Dengan ini saya menyatakan bahwa secara sukarela (bersedia) tidak bersedia*) untuk ikut serta menjadi salah satu penelitian yang berjudul *Prototype Spesific Protection Infark Miokard Akut (IMA) secara in vitro: Upaya Penurunan Angka Kejadian Menggunakan Saliva Murni terhadap Kadar Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9)*

Malang, 10 Maret, 2011

Peneliti

Saksi,

Yang membuat pernyataan

(Nedyta Parahita)
NIM. 0910710011

(Hko)

(S. H. P. I.)

LAMPIRAN 9

Informed Consent Sampel IMA III

Pernyataan Persetujuan untuk Berpartisipasi dalam Penelitian

Saya yang bertandatangan dibawah ini meyakinkan bahwa :

1. Saya telah mengerti tentang apa yang tercantum dalam lembar persetujuan diatas dan telah dijelaskan oleh peneliti
2. Dengan ini saya menyatakan bahwa secara sukarela (bersedia) / tidak bersedia*) untuk ikut serta menjadi salah satu penelitian yang berjudul *Prototype Specific Protection Infark Miokard Akut (IMA) secara in vitro: Upaya Penurunan Angka Kejadian Menggunakan Saliva Murni terhadap Kadar Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9)*

Malang, 14 Maret, 2011

Peneliti

Saksi,

Yang membuat pernyataan


(Nydia Parahita)
NIM. 0910710011


(Eko)


(Harjono)



LAMPIRAN 10

Informed Consent Sampel IMA IV

Pernyataan Persetujuan untuk Berpartisipasi dalam Penelitian

Saya yang bertandatangan dibawah ini meyakini bahwa :

1. Saya telah mengerti tentang apa yang tercantum dalam lembar persetujuan diatas dan telah dijelaskan oleh peneliti
2. Dengan ini saya menyatakan bahwa secara sukarela (bersedia) tidak bersedia*) untuk ikut serta menjadi salah satu penelitian yang berjudul *Prototype Spesific Protection Infark Miokard Akut (IMA) secara in vitro: Upaya Penurunan Angka Kejadian Menggunakan Saliva Murni terhadap Kadar Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9)*

Malang, 14 Maret, 2011

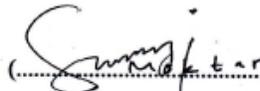
Peneliti

Saksi,

Yang membuat pernyataan


(Nydia Parahita)
NIM. 0910710041


(Eka)


(Sumarta)

LAMPIRAN 11

Informed Consent Sampel IMA V

Pernyataan Persetujuan untuk Berpartisipasi dalam Penelitian

Saya yang bertandatangan dibawah ini meyakini bahwa :

1. Saya telah mengerti tentang apa yang tercantum dalam lembar persetujuan diatas dan telah dijelaskan oleh peneliti
2. Dengan ini saya menyatakan bahwa secara sukarela bersedia) tidak bersedia*) untuk ikut serta menjadi salah satu penelitian yang berjudul *Prototype Spesific Protection Infark Miokard Akut (IMA) secara in vitro: Upaya Penurunan Angka Kejadian Menggunakan Saliva Murni terhadap Kadar Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9)*

Malang, 16 Maret, 2011

Peneliti

Saksi,

Yang membuat pernyataan


(Nydia Parahita)
NIM. 081071001


(Eko)


(.....)

