

**Ekspresi *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α) dan
Gambaran Histopatologi Kulit Mencit pada Uji
Biokompabilitas Respon Imun Akut
Dinding Jantung *Acellular*
Pasca Perlakuan Teknik
*Antigen Removal***

SKRIPSI

Oleh:
SONYA BUDIARTO
125130101111047



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2016**

**Ekspresi *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α) dan
Gambaran Histopatologi Kulit Mencit pada Uji
Biokompabilitas Respon Imun Akut
Dinding Jantung *Acellular*
Pasca Perlakuan Teknik
*Antigen Removal***

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:
SONYA BUDIARTO
125130101111047



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2016

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Ekspresi *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α) dan
Gambaran Histopatologi Kulit Mencit pada Uji
Biokompabilitas Respon Imun Akut
Dinding Jantung *Acellular*
Pasca Perlakuan Teknik
*Antigen Removal***

Oleh:
SONYA BUDIARTO
125130101111047

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 20 Oktober 2016
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. Agung Pramana W.M., M.Si
NIP. 19650616 199111 1 001

drh. Dvah Ayu OAP., M.Biotech
NIP. 19841026 200812 2 004

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : SONYA BUDIARTO

NIM : 125130101111047

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulis Skripsi berjudul: **Ekspresi *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α) dan Gambaran Histopatologi Kulit Mencit pada Uji Biokompabilitas Respon Imun Akut Dinding Jantung *Acellular* Pasca Perlakuan Teknik *Antigen Removal***

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub diisi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 25 Oktober 2016

Yang menyatakan,

(SONYA BUDIARTO)

125130101111047

repository.ub.ac.id

Ekspresi *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α) dan Gambaran Histopatologi Kulit Mencit pada Uji Biokompabilitas Respon Imun Akut Dinding Jantung *Acellular* Pasca Perlakuan Teknik *Antigen Removal*

ABSTRAK

Infark miokardium adalah kerusakan permanen pada jantung, yang dapat menyebabkan nekrosis otot jantung. Miokardium yang mengalami nekrosis dapat digantikan dengan pembentukan jaringan otot jantung baru berupa jaringan *bottom up* yang menggunakan *xenograft* sebagai *scaffold*. *Xenograft* memiliki *xenoantigen* yang dapat dihilangkan dengan kombinasi teknik deselularisasi dan *antigen removal*. Salah satu respon penolakan kekebalan tubuh adalah inflamasi yang ditandai dengan munculnya sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α yang menginduksi infiltrasi sel imun untuk mendegradasi jaringan implan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui ekspresi TNF- α pada jaringan miokardium domba yang diimplantasikan pada subkutan mencit yang diberi perlakuan kombinasi teknik deselularisasi dan *antigen removal* serta untuk mengetahui gambaran histopatologi kulit mencit. Penelitian ini menggunakan mencit *Balb/C* jantan, umur 6-8 minggu serta segmen dinding jantung ventrikel kiri dari domba (15x15x2 mm). Total segmen jantung yang dibutuhkan sebanyak 18 yang kemudian dibagi menjadi 3 kelompok yaitu kelompok kontrol (sampel segar), kelompok deselularisasi, dan kelompok *antigen removal*. Kelompok deselularisasi menggunakan 0,1% SDS dan kelompok *antigen removal* menggunakan 100 mM DTT dan 100 mM KCl. Hasil penelitian pada kelompok segar (tanpa perlakuan) menunjukkan gambaran histopatologi kulit dengan ditandai adanya infiltrasi sel radang di daerah implan, sedangkan pada kelompok dengan perlakuan teknik deselularisasi dan kombinasi teknik *antigen removal* secara berturut-turut menunjukkan penurunan infiltrasi sel radang. Hasil penelitian menunjukkan bahwa teknik *antigen removal* secara signifikan ($p < 0,05$) dapat menurunkan ekspresi TNF- α sebesar 95,68 %. Kesimpulan dari penelitian ini adalah kombinasi teknik deselularisasi dan *antigen removal* dapat menurunkan ekspresi TNF- α dan mengurangi infiltrasi sel radang pada histopatologi kulit mencit *Balb/C*.

Kata kunci: *scaffold*, *xenograft*, *antigen removal*, TNF- α , histopatologi kulit

Expression of *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α) and the Skin Histopathology Overview Mice on Acute Immune Response Biocompatibility Test to Ovine Heart Wall Post-Treatment Antigen Removal Techniques

ABSTRACT

Myocardial infarction is an irreversible damage which could cause necrosis of the heart muscle. Necrotic myocardium could be replaced with the formation of new heart muscle tissue with bottom-up approach using xenograft as scaffold. Xenograft has xenoantigen that could be removed by decellularization and antigen removal. One response of immune rejection was inflammation by the emergence marker of proinflammatory cytokine such as TNF- α that induce infiltration of immune cells into degrading the tissue implant. The purpose of this study is to determine the expression of TNF- α of ovine myocardial tissue implanted in subcutaneous tissue of mice treated by combination of decellularization and antigen removal as well as to describe the skin histopathology. This research used male *Balb/C* mice, aged 6-8 weeks and segments of the ovine left ventricular heart wall (15x15x2 mm). Total segment of the heart which required as many as 18 were then divided into 3 groups: control group (fresh samples), decellularization group, and the antigen removal group. Sodium Dodecyl Sulphate 0,1% was used for the decellularization and DTT 100 mM and KCl 100 mM was used for antigen removal. The results of this study on the fresh group showed a histopathology picture of skin with marked infiltration of inflammatory cells in the implant area, whereas in the group treated with the decellularization technique and combination of antigen removal techniques respectively show a decrease in inflammatory cell infiltration. The results showed that antigen removal techniques can significantly ($p < 0.05$) decrease the expression of TNF- α by 95,68 %. The conclusion of this study are combination of decellularization and antigen removal techniques can decrease the expression of TNF- α and reduce inflammatory cell infiltration in the skin histopathology of *Balb/C* mice.

Keywords: scaffold, xenograft, antigen removal, TNF- α , histopathology of skin

KATA PENGANTAR

Puji Syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan kasih dan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul **“Ekspresi *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α) dan Gambaran Histopatologi Kulit Mencit pada Uji Biokompabilitas Respon Imun Akut Dinding Jantung *Acellular* Pasca Perlakuan Teknik *Antigen Removal*”** dengan baik. Penelitian ini adalah bagian dari payung penelitian yang diketuai oleh drh. Fajar Shodiq Permata, M.Biotech serta merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan pada Program Studi Kedokteran Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya.

Dengan penuh rasa hormat dan ketulusan hati, penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada segenap pihak yang secara langsung maupun tidak langsung telah membantu dalam penyusunan skripsi ini. Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Agung Pramana Warih Marhendra, M.Si selaku dosen Pembimbing I atas segala bantuan, bimbingan, kesabaran, nasehat, kesempatan, dan arahan yang diberikan tiada hentinya kepada penulis.
2. drh. Dyah Ayu O.A. Pratama, M.Biotech selaku dosen Pembimbing II atas segala bimbingan, kesabaran, kesempatan, nasehat dan arahan yang diberikan tiada hentinya kepada penulis.

3. drh. Fajar Shodiq Permata, M.Biotech dan drh. Ajeng Aeka N., M.Sc selaku dosen payung penelitian bagi penulis yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk turut serta dalam penelitian, serta sebagai dosen penguji yang telah meluangkan waktu untuk memberikan masukan dan saran yang membangun dan juga drh. Indah Amalia Amri, M.Si selaku dosen payung penelitian.
4. Prof. Dr. Aulanni' am, drh, DES., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya.
5. Keluarga penulis Papa, Mama, Nenek, dan juga Kakak tercinta untuk doa, kasih sayang, dukungan serta pengorbanan baik moril maupun materi yang telah diberikan selama ini.
6. Seluruh staf dan asisten Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya khususnya Bu Nita dan Bu Wahyu serta Pak Bayu yang telah membantu dalam pemeliharaan hewan coba.
7. Seluruh dosen yang telah membimbing dan memberikan ilmu selama menjalankan studi di Program Studi Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
8. Pihak terdekat penulis, sahabat terkasih Ajeng Priwanti, sahabat seperjuangan Lovy, Natasha, Tika, Dini, Hendri, Uba, dan Eki serta teman-teman CEROLAS FKH UB atas segala perhatian, dorongan, dukungan, dan doa yang telah diberikan.
9. Tim Peneliti dan teman seperjuangan Amelda, Bangun, dan Fiktor atas kontribusi, bantuan, semangat, dan kerjasamanya selama penelitian.

10. Program Hibah Kemahasiswaan/Peningkatan Mutu Akademik (PHK/PMA) atas bantuan dana yang telah diberikan kepada kami untuk mendukung proses penelitian kami.
11. Ucapan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, maka kritik dan saran yang membangun dari semua pihak sangat diharapkan demi penyempurnaan selanjutnya.

Akhir kata, penulis berharap semoga Tuhan Yang Maha Esa membalas segala kebaikan serta ketulusan yang telah diberikan. Semoga Tugas Akhir ini dapat memberikan manfaat dan menambah ilmu pengetahuan bukan hanya untuk penulis namun juga untuk pembaca yang lain

Malang, 30 Agustus 2016

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Batasan Masalah	4
1.4 Tujuan Penelitian	5
1.5 Manfaat Penelitian	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Anatomi Jantung	7
2.2 Infark Miokardium	8
2.3 Patofisiologi <i>Acute Myocardial Infarction</i> (AMI)	9
2.4 Respon Imun	9
2.4.1 Respon Imun Bawaan	10
2.4.2 Respon Imun Adaptif	10
2.5 Penolakan Jaringan Transplan	11
2.6 Sitokin dan TNF- α	12
2.7 <i>Allograft</i>	12
2.8 Jaringan <i>Xenogeneic</i>	13
2.9 Teknik Deselularisasi	14
2.10 Teknik <i>Antigen Removal</i>	14
2.11 Histologi dan Jaringan Kulit	15
2.12 Hewan Coba Mencit (<i>Mus musculus</i>)	17
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	20
3.1 Kerangka Konseptual	20
3.2 Hipotesis Penelitian	23
BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN	24
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	24
4.2 Sampel Penelitian	24
4.3 Rancangan Penelitian	25
4.4 Variabel Penelitian	26
4.5 Materi Penelitian	26
4.5.1 Alat	26



4.5.2 Bahan	27
4.6 Tahapan Penelitian	27
4.6.1 Persiapan Hewan Coba	27
4.6.2 Preparasi dan Koleksi Sampel	28
4.6.3 Pembagian Kelompok	28
4.6.4 Deselularisasi Dinding Jantung	28
4.6.5 Teknik <i>Antigen Removal</i>	29
4.6.6 Uji Biokompabilitas <i>in vivo</i> (Implantasi Subkutan Mencit)	29
4.6.7 Pembuatan Preparat Histopatologi Metode Paraffin	29
4.6.8 Imunohistokimia (IHK) TNF- α Jaringan Kulit	30
4.6.9 Analisa Data	31
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN	32
5.1 Ekspresi <i>Tumor Necrosis Factor-Alpha</i> (TNF- α) pada Uji Biokompabilitas Dinding Jantung <i>Acellular</i> Pasca Perlakuan Teknik <i>Antigen Removal</i>	32
5.2 Gambaran Makroskopis Dinding Jantung <i>Acellular</i> dengan Perlakuan Teknik Deselularisasi dan Teknik <i>Antigen Removal pre-Implantasi</i>	36
5.3 Gambaran Mikroskopis Dinding Jantung <i>Acellular</i> dengan Perlakuan Teknik Deselularisasi dan Teknik <i>Antigen Removal pre-Implantasi</i>	38
5.4 Gambaran Makroskopis Dinding Jantung <i>Acellular</i> pada Kulit Mencit Pasca Implantasi	39
5.5 Pengaruh Perlakuan <i>Antigen Removal</i> terhadap Histopatologi Kulit Mencit <i>Balb/C</i>	42
BAB 6 PENUTUP	45
6.1 Kesimpulan	45
6.2 Saran	45
DAFTAR PUSTAKA	46
LAMPIRAN	50

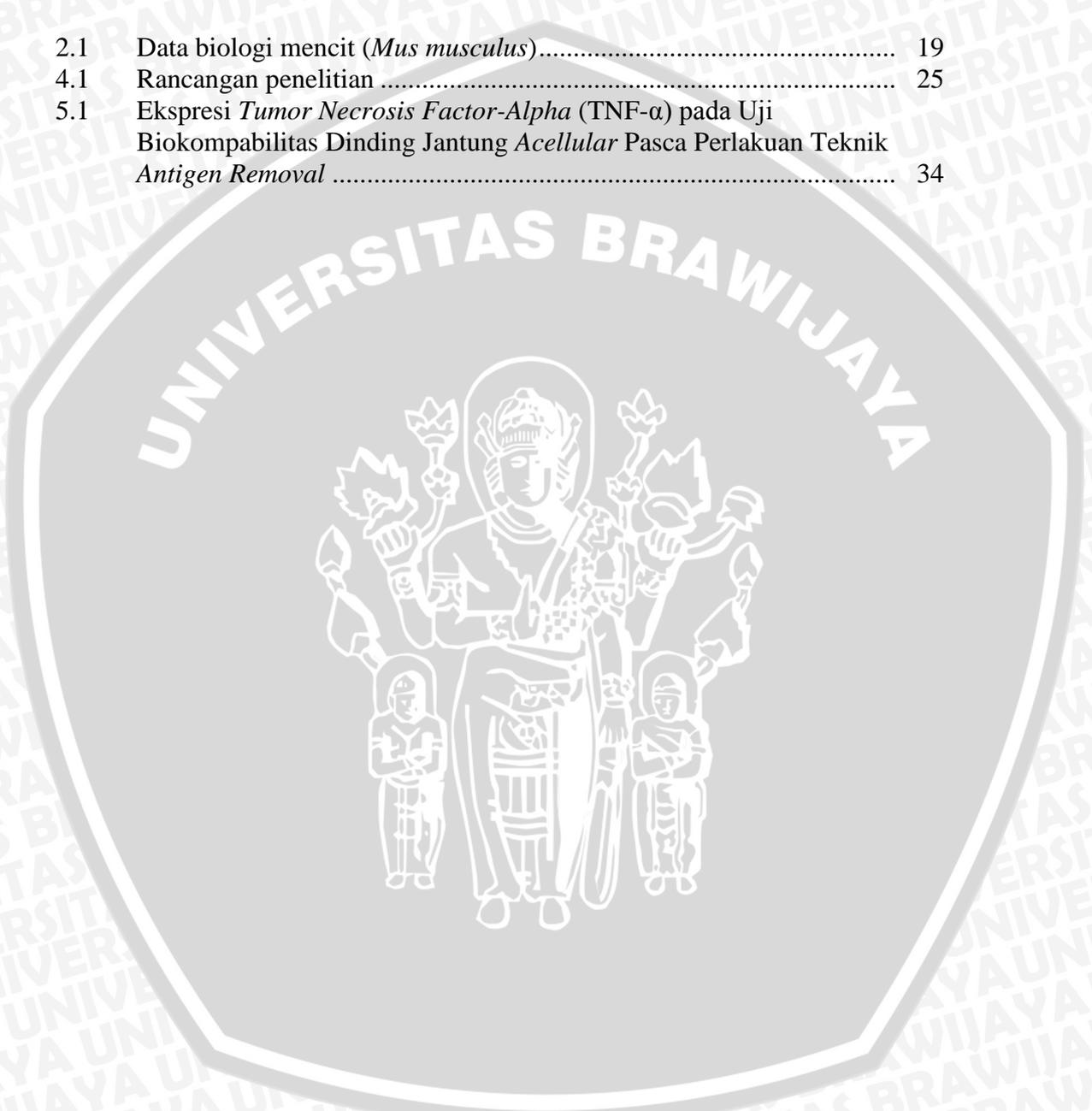
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1	Gambaran penampang jantung 7
2.2	Fotomikrograf sediaan kulit 17
2.3	Mencit putih 18
3.1	Kerangka konseptual 20
5.1	Ekspresi <i>Tumor Necrosis Factor-Alpha</i> (TNF- α) pada gambaran imuno-histokimia kulit mencit (<i>Mus musculus</i>) perbesaran 40x lensa objektif 33
5.2	Gambar makroskopis sampel dinding jantung segar, pasca perlakuan deselularisasi, dan pasca perlakuan <i>antigen removal</i> 37
5.3	Gambaran histopatologi sampel dinding jantung segar, pasca perlakuan deselularisasi, dan pasca perlakuan <i>antigen removal</i> 38
5.4	Jaringan kulit mencit dan sampel dinding jantung pasca implantasi ... 40
5.5	Gambaran histopatologi subkutan kulit mencit <i>Balb/C</i> pasca implantasi 42



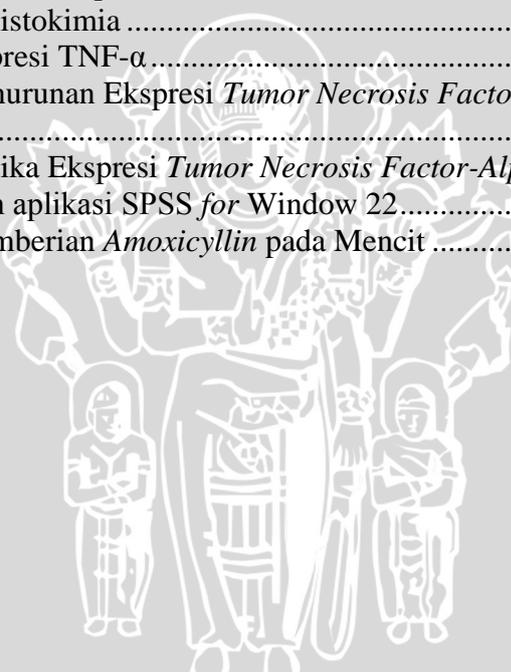
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Data biologi mencit (<i>Mus musculus</i>).....	19
4.1 Rancangan penelitian	25
5.1 Ekspresi <i>Tumor Necrosis Factor-Alpha</i> (TNF- α) pada Uji Biokompabilitas Dinding Jantung <i>Acellular</i> Pasca Perlakuan Teknik <i>Antigen Removal</i>	34



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Sertifikat Laik Etik	51
2. Kerangka Operasional Penelitian	52
3. Rancangan Perlakuan	53
4. Preparasi Jantung Domba Segar	54
5. Pembuatan Larutan Penstrep	55
6. Pembuatan <i>Phospat Buffer Saline</i> (PBS) 1 L	56
7. Pembuatan Larutan Deselularisasi	57
8. Pembuatan Larutan <i>Antigen Removal</i>	58
9. Prosedur Implantasi Mencit	60
10. Metode Pembuatan Preparat HE	62
11. Metode Imunohistokimia	63
12. Data Hasil Ekspresi TNF- α	64
13. Perhitungan Penurunan Ekspresi <i>Tumor Necrosis Factor-Alpha</i> (TNF- α)	65
14. Hasil Uji Statistika Ekspresi <i>Tumor Necrosis Factor-Alpha</i> (TNF- α) dengan aplikasi SPSS for Window 22	66
15. Perhitungan Pemberian <i>Amoxicyllin</i> pada Mencit	69



DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

Simbol/Singkatan	Keterangan
%	Persen
⁰ C	Derajat Celcius
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
AR	<i>Antigen Removal</i>
AV	Atrio Ventricular
BNJ	Beda Nyata Jujur
Cm	Centimeter
DAB	<i>Diaminobenzidine Tetrahydrochloride</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>Deoxyribo Nuclei Acid</i>
DTT	<i>Dithiotreitol</i>
ECM	<i>Extracellular Matrix</i>
EKG	Elektrokardiogram
H ₂ O ₂	Hidrogen Peroksida
HRP	<i>Horse Radish Peroxidase</i>
IFN- γ	<i>Interferon Gamma</i>
IHK	Imunohistokimia
IMA	Infark Miokardial Akut
KCl	Kalium Klorida
KEP	Komisi Etik Penelitian
KH ₂ PO ₄	Kalium Dihidrogen Fosfat
LAF	<i>Laminar Air Flow</i>
Mg	Miligram
MgCl ₂	Magnesium Klorida
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
ml	Mililiter
Mm	Milimeter
mM	Milimolar
Na ₂ HPO ₄	Disodium Fosfat
NaCl	Natrium Klorida
NS	<i>Normal Saline</i>
PBS	<i>Phospat Buffer Saline</i>
Penstrep	<i>Penicillin-Streptomycin</i>
PMN	Polimorfonuklear
RAL	Rancangan Acak Lengkap
Rpm	Rotasi per menit
SC	<i>Subcutan</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Science</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-Alpha</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit jantung merupakan salah satu masalah kesehatan utama di negara maju maupun berkembang. Penyakit ini menjadi penyebab nomor satu kematian di dunia setiap tahunnya. *World Health Organization* (WHO) mencatat pada tahun 2015 sebesar 17,5 juta orang mengalami penyakit jantung dan telah dilaporkan sebesar 31% diantaranya mengalami kematian sebelum usia 60 tahun (WHO, 2015). Penyakit jantung pada hewan kesayangan termasuk anjing dan kucing kini juga semakin banyak dijumpai di ruang praktik dokter hewan. Menurut Mahmud (2010) beberapa ahli jantung melaporkan bahwa 25% dari semua anjing ras kecil sampai sedang berumur di atas 7 tahun kemungkinan menderita penyakit jantung pada tahap tertentu dalam hidupnya.

Salah satu penyebab penyakit gagal jantung adalah karena adanya infark pada jantung. Infark miokardial akut atau IMA adalah manifestasi lanjut dari penyakit jantung yang terjadi secara akut, merupakan keadaan iskemik jantung yang berlangsung lebih dari 30-45 menit yang dapat menyebabkan kerusakan secara *irreversible* serta nekrosis atau kematian otot jantung.

Infark miokardial adalah nekrosis masif otot jantung yang disebabkan oleh ketidakseimbangan antara suplai darah dan kebutuhan oksigen otot jantung (Fenton, 2009). Infark miokardial dapat berlangsung cepat (akut), sebagai akibat dari penyakit jantung iskemik dan akhirnya menyebabkan dekomposisi akut dari ventrikel. Bagian miokardium yang mengalami infark atau nekrosis akan berhenti

berkontraksi secara permanen, sehingga dapat mengganggu fungsi dari kerja jantung (Waly, 2014).

Miokardium yang mengalami nekrosis perlu digantikan dengan jaringan otot jantung baru. Jaringan buatan yang dipilih adalah *bottom up* yaitu jaringan yang digunakan berupa jaringan buatan di luar tubuh (Bell, 2000). Penggunaan jaringan buatan miokardium *bottom up* yaitu berupa *scaffold* yang dikombinasi dengan jaringan sel punca autograft (Ikada, 2006). *Scaffold* yang digunakan adalah komponen jaringan nonseluler berupa *extracellular matrix* (ECM) dari dinding jantung domba (*xenograft*). *Xenograft* memiliki keunggulan berupa ketersediaan bahan melimpah dan ukuran bahan besar. Namun harus dipertimbangkan juga faktor risiko yang mampu menimbulkan penolakan jaringan implan, yaitu berupa adanya reaksi sistem imun.

Reaksi imun terjadi karena adanya *xenoantigen* pada permukaan sel *xenograft*. Molekul *xenoantigen* dapat berupa α -Gal Epitope, DNA dan *Major Histocompatibility Complex 1* (MHC-1) (Easter, 2008). Epitope α -Gal mempunyai struktur karbohidrat yang umumnya berada pada sel hewan terutama mamalia *non primate*. Jaringan donor memiliki MHC kelas 1, ketika ditransplantasikan ke jaringan resipien yang tidak mirip maka akan menimbulkan respon imun dan dapat menyebabkan kegagalan transplantasi (Garcia, 2012).

Menurut Hetherington (2005) jaringan *acellular* domba memiliki sedikit kemungkinan dalam memicu inflamasi pada manusia. Hal ini berdasarkan bahwa jaringan *xenogeneic* tulang rawan asal domba lebih rendah memicu pelepasan

mediator radang dibandingkan tulang rawan asal babi pada uji *in vitro* dengan sel *mononuclear* manusia.

Berdasarkan permasalahan yang telah dikemukakan di atas maka diperlukan adanya suatu metode untuk menghilangkan *xenoantigen* tersebut. Salah satunya yaitu menggunakan kombinasi teknik deselularisasi dan *antigen removal*. Teknik deselularisasi bertujuan untuk melarutkan sel α -Gal dan MHC kelas 1 tanpa menghilangkan struktur dari *extracellular matrix* (ECM) (Cissell, 2014). Teknik *antigen removal* juga akan menghilangkan dan melarutkan *xenoantigen* dengan agen pereduksi berupa *Dithiotreitol* (DTT) dan garam *Potassium Chloride* (KCl) (Wong, 2011). DTT berfungsi untuk menghancurkan protein sedangkan KCl berfungsi untuk mengikat hancuran protein *xenoantigen* sehingga protein *xenoantigen* dapat terlarut dan mudah dihilangkan.

Tingkat kesesuaian jaringan donor (*xenograft*) ke jaringan resipien pasca perlakuan teknik deselularisasi dan *antigen removal* masih perlu diuji cobakan secara *in vivo* pada *subcutan* (SC) mencit *Balb/C* untuk melihat respon imun yang terjadi secara akut. Indikator respon imun akut yang dapat diamati berupa sitokin, yaitu TNF- α (Mihai, 2011). TNF- α berfungsi sebagai sitokin proinflamasi yang akan menyebabkan vasodilatasi pembuluh darah dan terlibat dalam respon imun *innate*. TNF- α dihasilkan oleh sel mast dan makrofag (Olmos, 2014). Metode pemeriksaan respon imun akut dipilih karena dapat mengetahui respon imun dengan cepat yang bisa dilihat berdasarkan ekspresi TNF- α melalui teknik imunohistokimia (IHK).

Penurunan ekspresi TNF- α akan menurunkan kerusakan jaringan kulit pasca implantasi dinding jantung *acellular* yang diberi perlakuan teknik *antigen removal*. Hal ini mengindikasikan bahwa dinding jantung *acellular* yang telah diberi perlakuan teknik deselularisasi yang dikombinasi dengan teknik *antigen removal* mampu menggantikan jaringan miokardium yang rusak. Penggunaan metode deselularisasi dan *antigen removal* dalam pembuatan jaringan jantung *acellular* secara akut sebagai *xenograft* jantung belum pernah dilaporkan.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan beberapa permasalahan berikut:

1. Bagaimana gambaran histopatologi jaringan kulit mencit pasca implantasi dinding jantung domba *acellular* dengan kombinasi teknik *antigen removal* dalam menghilangkan *xenoantigen*?
2. Bagaimana ekspresi TNF- α pada jaringan kulit mencit pasca implantasi dinding jantung domba *acellular* dengan kombinasi teknik *antigen removal* dalam menghilangkan *xenoantigen*?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan rumusan masalah yang telah disebutkan, maka penelitian ini dibatasi pada:

1. Hewan coba yang digunakan adalah mencit jantan strain *Balb/C* dengan umur 6-8 minggu dan berat badan antara 25-35 g (Mirsadrae *et al.*, 2007) yang diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan

(UPHP) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Penggunaan hewan coba telah mendapat izin laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya dengan nomor 435-KEP-UB.

2. Segmen dinding jantung ventrikel kiri dari domba yang didapat dari Pasar Sukun Malang. Sampel dinding jantung disegmentasi dengan dimensi 15 x 15 x 2 mm (Wang *et al.*, 2010). Sampel dinding jantung pasca teknik *antigen removal* kemudian diimplantasikan pada daerah dorso-lateral mencit.
3. Sampel diberikan perlakuan teknik deselularisasi dan dilanjutkan dengan kombinasi teknik deselularisasi dengan *antigen removal* untuk melarutkan *xenoantigen* (Wang *et al.*, 2010).
4. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah ekspresi TNF- α dengan metode imunohistokimia pada area implan yang dianalisa secara kuantitatif menggunakan aplikasi *immunoratio* dan histopatologi jaringan kulit mencit dengan pewarnaan *Haematoxylin Eosin* yang dianalisa secara kualitatif menggunakan mikroskop Olympus BX51 dan OptiLab Advance.

1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah diuraikan, maka tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui gambaran histopatologi jaringan kulit mencit pasca implantasi dinding jantung domba *acellular* dengan kombinasi teknik *antigen removal* dalam menghilangkan *xenoantigen*.

2. Mengetahui ekspresi TNF- α jaringan kulit mencit pasca implantasi dinding jantung domba *acellular* dengan kombinasi teknik *antigen removal* dalam menghilangkan *xenoantigen*.

1.5 Manfaat Penelitian

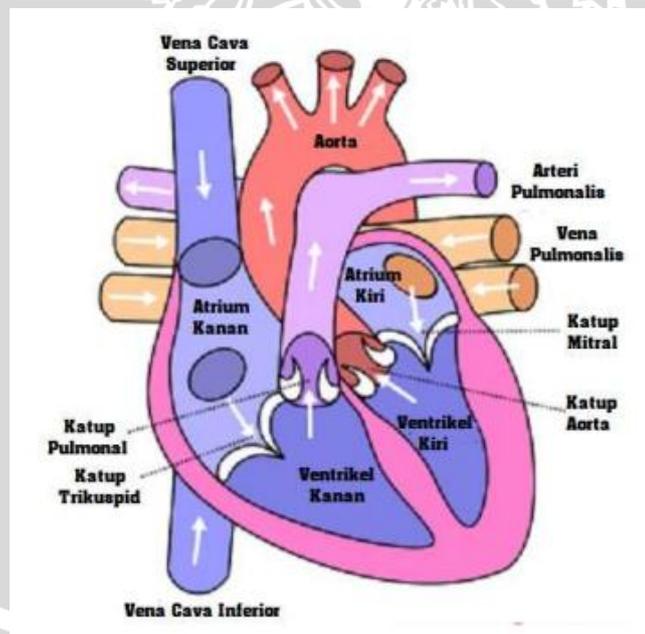
Penelitian ini bermanfaat untuk memberikan informasi mengenai dinding jantung *acellular* domba dengan kombinasi teknik *antigen removal* memiliki biokompabilitas yang tinggi dan dapat menjadi kandidat jaringan dinding jantung buatan yang aman serta sebagai dasar dilakukannya penelitian lanjutan tentang dinding jantung *acellular*.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Anatomi Jantung

Berdasarkan struktur anatomi, jantung hewan mamalia terbagi menjadi 4 ruang yaitu atrium kiri dan kanan, ventrikel kiri dan kanan, serta memiliki empat katup, yaitu dua katup atrio ventricular (AV) yang terdiri dari katup trikuspidalis dan katup bikuspidalis. Dua katup semilunar yang terdiri dari katup aorta dan katup pulmonari. Jantung juga memiliki sistem sirkulasi sistemik yaitu berupa aorta, arteri, arteriole, dan kapiler sedangkan sistem sirkulasi *pulmonic* terdiri dari vena cava, vena, dan venula (Cunningham, 2002).



Gambar 2.1 Gambaran penampang jantung (O'Grady dan O'Sullivan, 2004)

Jantung dibentuk oleh tiga jenis sel eksitasi yaitu sel pacu jantung (*pacemaker*), sel penghantar listrik (konduksi), dan sel miokardium. Sel

pacemaker sebagai sel dominan berada di nodu sinoatrial (SA) mencetuskan impuls bergantung pada aktivitas syaraf otonom. Sel konduksi seperti halnya kabel sirkuit, sel ini menghantarkan arus listrik dengan cepat dan efisien ke seluruh jantung, sedangkan sel miokardium bertanggung jawab terhadap kontraksi dan relaksasi berulang sehingga dapat mengalirkan darah ke seluruh tubuh (Thaler, 2009).

2.2 Infark Miokardial

Sistem kardiovaskuler merupakan suatu sistem transpor tertutup yang terdiri dari beberapa komponen yaitu jantung, komponen darah, dan pembuluh darah. Salah satu komponen dari pembuluh darah yaitu vena, venula, kapiler, arteriol, dan arteri. Pembuluh darah di jantung yang berfungsi menyuplai makanan bagi sel-sel jantung disebut dengan arteri koroner. Arteri koroner dapat mengalami sumbatan akut karena tidak adekuatnya pasokan darah, biasanya disebabkan oleh ruptur plak atheroma pada arteri koroner. Keadaan yang seperti ini biasa disebut dengan Infark Miokardial Akut (IMA) (Muttaqin, 2009). Penatalaksanaan untuk mengurangi angka kematian penyakit Infark Miokardial Akut (IMA) diantaranya adalah mengurangi beban kerja jantung, meningkatkan curah, dan kontraktilitas jantung.

Infark miokardial akut merupakan sindrom klinis dengan dua dari tiga kombinasi karakteristik yaitu gejala tipikal infark miokardial (nyeri maupun ketidaknyamanan dada), peningkatan kadar enzim jantung, dan perubahan gambaran elektrokardiogram. Semua karakteristik itu menggambarkan daerah infark di jantung (miokardial) akibat berkurangnya suplai darah ke area tersebut.

Akibatnya, akan terjadi kerusakan miokardial secara progresif dan *irreversible*, yang dapat menyebabkan gagal jantung hingga kematian (Roger, 2007).

2.3 Patofisiologi *Acute Myocardial Infarction* (AMI)

Kerusakan yang ada pada miokardial pada dasarnya adalah hasil dari respon jaringan yang mencakup apoptosis (kematian sel) dan perubahan inflamasi. Infark miokardial khas awalnya bermanifestasi sebagai nekrosis koagulasi yang akhirnya diikuti oleh fibrosis miokardial. Kejadian ini diikuti dengan reperfusi atau disertai dengan stimulasi adrenergik besar.

Sistem arteri koroner kiri mempunyai wilayah cakupan yang lebih daripada sistem arteri koroner kanan. Oleh karena itu, infark miokardial dalam sistem ini adalah yang paling mungkin untuk menghasilkan cedera yang luas, dengan gangguan fungsi, kongesti paru, dan *output* yang rendah. Efek ini dapat dibuktikan dengan perubahan sumbu frontal pada elektrokardiogram (EKG) (Zafari, 2015).

2.4 Respon Imun

Sistem imunitas tubuh memiliki fungsi yaitu membantu perbaikan DNA manusia; mencegah infeksi yang disebabkan oleh jamur, bakteri, virus, dan organisme lain serta menghasilkan antibodi untuk memerangi serangan bakteri dan virus asing ke dalam tubuh. Tugas sistem imun adalah mencari dan merusak *invader* (penyerbu) yang membahayakan tubuh (Fatmah, 2006).

Imunitas membahas mengenai pengenalan dan pembuangan benda asing atau *non-self* yang masuk ke dalam tubuh, biasanya dalam bentuk mikroorganisme

infeksius yang mengancam nyawa. Resistensi terhadap infeksi dapat berupa bawaan (yaitu bawaan sejak lahir dan tidak berubah) atau didapat sebagai akibat dari respon imun adaptif (Playfair dan Chain, 2009).

2.4.1 Respon Imun Bawaan

Imunitas bawaan diaktivasi saat sel menggunakan serangkaian reseptor terspesialisai untuk mengenali berbagai jenis mikroorganisme yang dapat masuk ke pejamu. Ikatan dengan reseptor tersebut mengaktivasi sejumlah kecil mekanisme dasar pembuangan mikroba seperti fagositosis bakteri oleh makrofag dan neutrofil atau pelepasan interferon antivirus. Sejumlah besar mekanisme yang terlibat dalam imunitas bawaan memiliki banyak kesamaan dengan mekanisme yang memunculkan reaksi nonspesifik terhadap kerusakan jaringan dengan menimbulkan inflamasi (Playfair dan Chain, 2009).

2.4.2 Respon Imun Adaptif

Imunitas adaptif berdasarkan sifat khusus limfosit T dan B, yang dapat merespon secara selektif terhadap ribuan benda asing atau antigen yang berbeda, menyebabkan terbentuknya memori spesifik. Mekanisme adaptif dapat berfungsi dengan sendirinya melawan antigen tertentu, tetapi sebagian besar efeknya muncul dengan cara interaksi antibodi dengan komplemen dan sel fagosit dari imunitas bawaan, dan sel T dengan makrofag. Melalui aktivasi mekanisme bawaan ini, respon adaptif

seringkali menimbulkan inflamasi, baik akut maupun kronis (Playfair dan Chain, 2009).

2.5 Penolakan Jaringan Transplan

Penolakan jaringan transplan merupakan proses yang kompleks. Banyak faktor yang dapat mempengaruhi termasuk sifat jaringan yang ditransplantasikan, ketidakcocokan antara donor dan resipien, maupun status kekebalan penerima. Penolakan terhadap jaringan transplan dibedakan menjadi tiga macam yaitu penolakan yang terjadi secara hiperakut, akut, dan kronis. Menurut Afzali (2010) penolakan hiperakut terjadi ketika sistem kekebalan tubuh penerima telah peka terhadap jaringan organ donor sebelum transplantasi. Sensitisasi sering disertai dengan adanya antibodi dan sel T yang reaktif dengan molekul donor. Bila penerima telah peka terhadap antigen donor (seperti kehamilan, transfusi darah, atau transplantasi organ sebelumnya) maka jaringan transplan akan cepat ditolak dalam beberapa menit setelah transplantasi.

Penolakan akut merupakan istilah yang digunakan untuk menggambarkan respon imun yang terjadi selama periode waktu awal, biasanya dalam kurun waktu 3-6 bulan (untuk ginjal). Penolakan kronis menggambarkan kerusakan fungsional progresif dari jaringan transplan yang terjadi beberapa bulan atau tahun setelah transplantasi (Afzali *et al.*, 2010).

Respon imun akut dimodulasi oleh adanya antigen yang akan mengaktifkan makrofag dan sel mast. Makrofag dan sel mast akan menghasilkan sitokin proinflamasi berupa TNF- α yang akan menyebabkan vasodilatasi

pembuluh darah. Adanya vasodilatasi membuat sel radang PMN migrasi ke jaringan.

2.6 Sitokin dan TNF- α

Sitokin adalah suatu glikoprotein yang berasal dari sel T *helper*, sel *natural killer* (NK) dan makrofag. Sel T *helper* terdiri dari dua subset yang masing-masing menghasilkan sitokin pengatur perbedaan fungsi imun efektor dan bereaksi satu sama lain. Sel T *helper* tipe 1 (Th-1) menghasilkan Interferon Gamma (IFN- γ), Interleukin-2 (IL-2) dan *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α). Sitokin ini mengaktifkan makrofag, untuk membentuk sitokin proinflamasi seperti TNF- α dan menginduksi mekanisme imun efektor sitotoksik dari makrofag. Sebaliknya, sel T *helper* tipe 2 (Th-2) menghasilkan IL-4, IL-5, IL-6 dan IL-13. Sitokin ini menginduksi pembentukan antibodi tetapi juga menghambat fungsi makrofag dan disebut sitokin anti inflamasi (Irawati *et al.*, 2008).

TNF- α merupakan sitokin proinflamasi yang memiliki sifat pleiotropik pada berbagai jenis sel dan berperan penting dalam patogenitas penyakit inflamasi. TNF- α menginduksi terjadinya inflamasi, proliferasi sel otot polos, dan meningkatkan perlekatan leukosit pada sel endotel dengan menginduksi molekul adhesi.

2.7 Allograft

Allograft adalah pemindahan suatu jaringan atau organ dari tubuh seseorang ke tubuh orang lain. Misalnya pemindahan jantung dari seseorang yang telah dinyatakan meninggal pada orang lain yang masih hidup (Flaherty *et al.*,

2009). *Allograft* dapat berasal dari donor orang lain yang memiliki kesesuaian molekul protein. Biasanya yang masih memiliki hubungan kekerabatan, akan tetapi saat ini bisa juga didapatkan dari donor orang lain (Lam *et al.*, 2011).

2.8 Jaringan *Xenogeneic*

Jaringan biologis telah dieksplorasi untuk digunakan sebagai biomaterial pada pasien manusia untuk berbagai aplikasi, terutama yang melibatkan penggantian atau perbaikan jaringan dengan peran mekanik, dari penggantian katup jantung untuk ligamen dan perbaikan tulang rawan. Jaringan biologis lebih menguntungkan dibandingkan dengan bahan sintesis karena jaringan biologis memiliki struktur yang kompleks, komposisi, dan sifat mekanik yang sesuai dengan jaringan yang akan digantikan. Sumber jaringan yang digunakan sebagai biomaterial dapat berupa *autolog* (diperoleh dari pasien yang sama menerima perbaikan), *alogenik* (diperoleh dari donor jaringan manusia), atau *xenograft* (berasal dari spesies hewan lain) (Cissell *et al.*, 2014).

Ketiga sumber jaringan tersebut masing-masing memiliki kelebihan dan kekurangan. Jaringan *autolog* meskipun berhasil digunakan untuk beberapa aplikasi namun mempunyai keterbatasan untuk merekapitulasi struktur dan fungsi dari jaringan asli. Jaringan alogenik dapat digunakan untuk beberapa penggantian katup jantung namun jaringan alogenik ini dibatasi oleh kelangkaan relatif, seperti berpotensi menyebabkan reaksi imun dan transmisi penyakit. Jaringan *xenograft* berlimpah jumlahnya biasanya memiliki komposisi dan sifat yang sebanding dengan manusia. Jaringan *xenograft* juga telah digunakan untuk teknik jaringan dari beberapa jenis jaringan, termasuk katup jantung. Kendala utama dalam

penggunaan jaringan *xenograft* sebagai biomaterial adalah adanya antigen yang memicu respon imun sehingga pada akhirnya akan terjadi penolakan cangkok sehingga untuk aplikasi klinis penggunaan jaringan *xenograft* diperlukan teknik untuk menghapus komponen antigen dari jaringan.

2.9 Teknik Deselularisasi

Deselularisasi dianggap penting karena berpotensi untuk menghilangkan respon imun yang merugikan ditimbulkan oleh epitop membran sel, DNA alogenic atau *xenogeneic*, dan berhubungan dengan kerusakan molekuler pada pola molekul. Hal penting dalam proses deselularisasi adalah menghapus bahan sel, dengan menjaga sebanyak mungkin *extracellular matrix* (ECM). Tujuan deselularisasi adalah menghilangkan sel dan menyisakan matriks ekstraseluler (Qiong *et al.*, 2015).

2.10 Teknik Antigen Removal

Berbagai perlakuan kimia dan fisik bertujuan untuk deselularisasi jaringan *xenogeneic* dalam mengurangi antigen. Perlakuan kimia termasuk menerapkan substansi eksogen untuk jaringan bertujuan menurunkan atau melarutkan komponen sel dan antigen lainnya. Perlakuan kimia, seperti larutan asam, larutan hipotonik / hipertonik, deterjen, pelarut organik, dan solusi enzim, bertujuan untuk mengganggu sel dengan tekanan osmotik (misalnya, solusi hipotonik) atau dengan pelarut membran sel (deterjen dan pelarut organik) dan memfasilitasi penghapusan sitosol dan protein membran terkait. Perlakuan fisik seperti pembekuan dan pencairan, sonikasi, dan radiasi sinar gamma atau foto-oksidasi digunakan untuk merusak sel-sel dalam jaringan dan biasanya digunakan dalam

hubungannya dengan pengobatan kimia yang memfasilitasi penghapusan komponen sel (Cissell *et al.*, 2014). Tujuan dari penghapusan antigen adalah menargetkan penghapusan antigen yang memicu respon imun tanpa merusak molekul struktural penting yang melibatkan jaringan yang bersifat mekanik.

2.11 Histologi Jaringan Kulit

Kulit merupakan organ terbesar tubuh, terdiri dari lapisan sel di permukaan yang disebut dengan epidermis dan lapisan jaringan ikat yang lebih dalam, dikenal sebagai dermis (Moore, 2002). Pembagian kulit secara garis besar tersusun atas tiga lapisan utama yaitu lapisan epidermis atau kutikel, lapisan dermis, dan lapisan subkutis. Tidak ada garis tegas yang memisahkan dermis dan subkutis, subkutis ditandai dengan adanya jaringan ikat longgar serta adanya sel dan jaringan lemak (Tortora dan Derrickson, 2009).

Lapisan epidermis terdiri atas stratum korneum, stratum lusidum, stratum granulosum, stratum spinosum, dan stratum basale. Stratum korneum adalah lapisan kulit yang paling luar dan terdiri atas beberapa lapisan sel-sel gepeng yang mati, tidak berinti, dan protoplasmanya telah berubah menjadi keratin (zat tanduk). Stratum lusidum terdapat langsung di bawah lapisan korneum, merupakan lapisan sel-sel gepeng tanpa inti dengan protoplasma yang berubah menjadi protein yang disebut eleidin. Lapisan tersebut tampak lebih jelas di telapak tangan dan kaki (Djuanda, 2003).

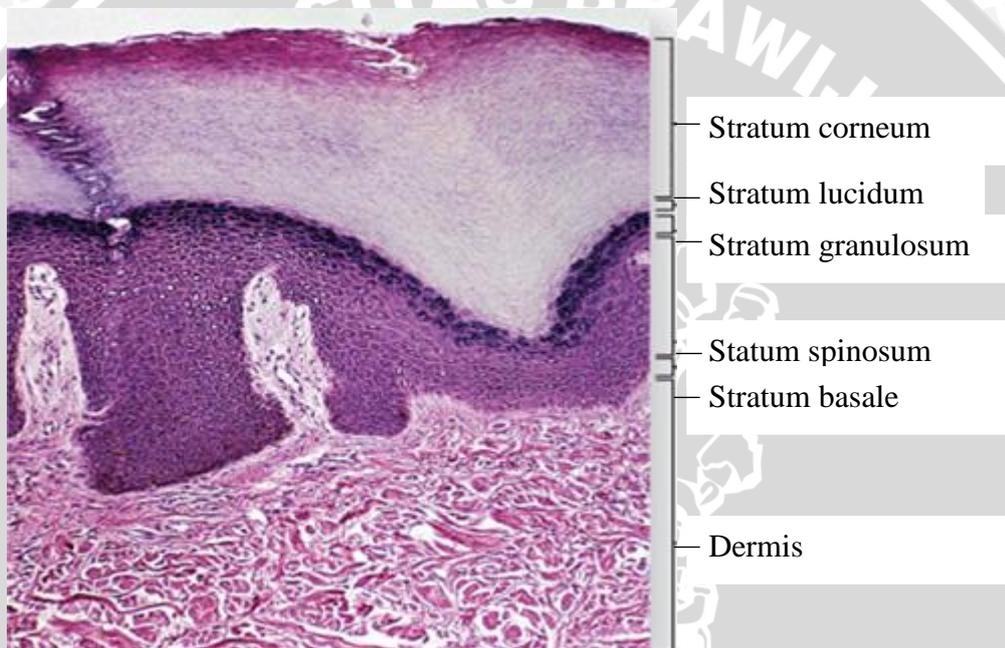
Stratum granulosum merupakan 2 atau 3 lapis sel-sel gepeng dengan sitoplasma berbutir kasar dan terdapat inti di antaranya. Butir-butir kasar ini terdiri atas keratohialin. Stratum spinosum terdiri atas beberapa lapis sel yang

berbentuk poligonal yang besarnya berbeda-beda karena adanya proses mitosis. Protoplasmanya jernih karena banyak mengandung glikogen dan inti terletak di tengah-tengah. Sel-sel ini makin dekat ke permukaan makin gepeng bentuknya. Sel-sel stratum spinosum mengandung banyak glikogen (Djuanda, 2003). Stratum germinativum terdiri atas sel-sel berbentuk kolumnar yang tersusun berbaris vertikal pada perbatasan dermo-epidermal (palisade). Lapisan ini merupakan lapisan epidermis yang paling bawah. Sel-sel basal ini mengalami mitosis dan berfungsi reproduktif. Lapisan ini terdiri atas dua jenis sel yaitu sel-sel yang berbentuk kolumnar dengan protoplasma basofilik inti lonjong dan besar, dihubungkan satu dengan lain oleh jembatan antarsel, dan sel pembentuk melanin atau *clear cell* yang merupakan sel-sel berwarna muda dengan sitoplasma basofilik dan inti gelap, dan mengandung butir pigmen (melanosom) (Djuanda, 2003).

Lapisan yang terletak dibawah lapisan epidermis adalah lapisan dermis yang jauh lebih tebal daripada epidermis. Lapisan ini terdiri atas lapisan elastis dan fibrosa padat dengan elemen-elemen selular dan folikel rambut. Secara garis besar dibagi menjadi dua bagian yakni pars papilare yaitu bagian yang menonjol ke epidermis, berisi ujung serabut saraf dan pembuluh darah, dan pars retikulare yaitu bagian bawahnya yang menonjol ke arah subkutis, bagian ini terdiri atas serabut-serabut penunjang misalnya serabut kolagen, elastin, dan retikulin (Djuanda, 2003).

Lapisan subkutis adalah kelanjutan dermis yang terdiri atas jaringan ikat longgar berisi sel-sel lemak di dalamnya. Sel-sel lemak merupakan sel yang

berbentuk bulat, besar, dengan inti terdesak ke pinggir sitoplasma lemak yang bertambah. Sel-sel ini membentuk kelompok yang dipisahkan satu dengan yang lain oleh trabekula fibrosa. Lapisan sel-sel lemak disebut panikulus adipose, berfungsi sebagai cadangan makanan. Pada lapisan lemak ini terdapat ujung-ujung saraf tepi, pembuluh darah, dan getah bening. Lapisan lemak ini juga merupakan bantalan (Djuanda, 2003).



Gambar 2.2 Fotomikrograf sediaan kulit (Junqueira, 2005)

2.12 Hewan Coba Mencit (*Mus musculus*)

Penggunaan hewan model dalam suatu penelitian sangat perlu diperhitungkan agar pelaksanaan penelitian berjalan dengan baik dan sesuai rencana. Mencit (*Mus musculus*) sering digunakan sebagai sarana penelitian biomedis, penelitian, dan pendidikan. Menurut Kusumawati (2004) diantara spesies hewan lainnya, mencit-lah yang paling banyak digunakan untuk tujuan penelitian medis (60-80%). Hal tersebut karena kelengkapan organ, kebutuhan

nutrisi, metabolisme, dan biokimianya cukup dekat dengan manusia (Hariadi, 2012). Mencit (*Mus musculus*) merupakan binatang asli Asia, India, dan Eropa Barat, termasuk dalam keluarga Rodentia sehingga masih termasuk kerabat hamster, tupai, dan pengerat lainnya (Hariadi, 2012). Klasifikasi ilmiah dari mencit adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Famili	: Muridae
Super family	: Murinae
Genus	: <i>Mus</i>
Sub genus	: <i>Mus</i>
Spesies	: <i>Mus musculus</i>



Gambar 2.3 Mencit putih (Whitedifarimouse, 2010)

Mencit merupakan golongan binatang mamalia yang memiliki kemampuan berkembangbiak yang sangat tinggi, mudah dipelihara, dan menunjukkan reaksi

yang cepat terlihat jika digunakan sebagai objek penelitian. Data biologis mencit menurut Hariadi (2012) adalah:

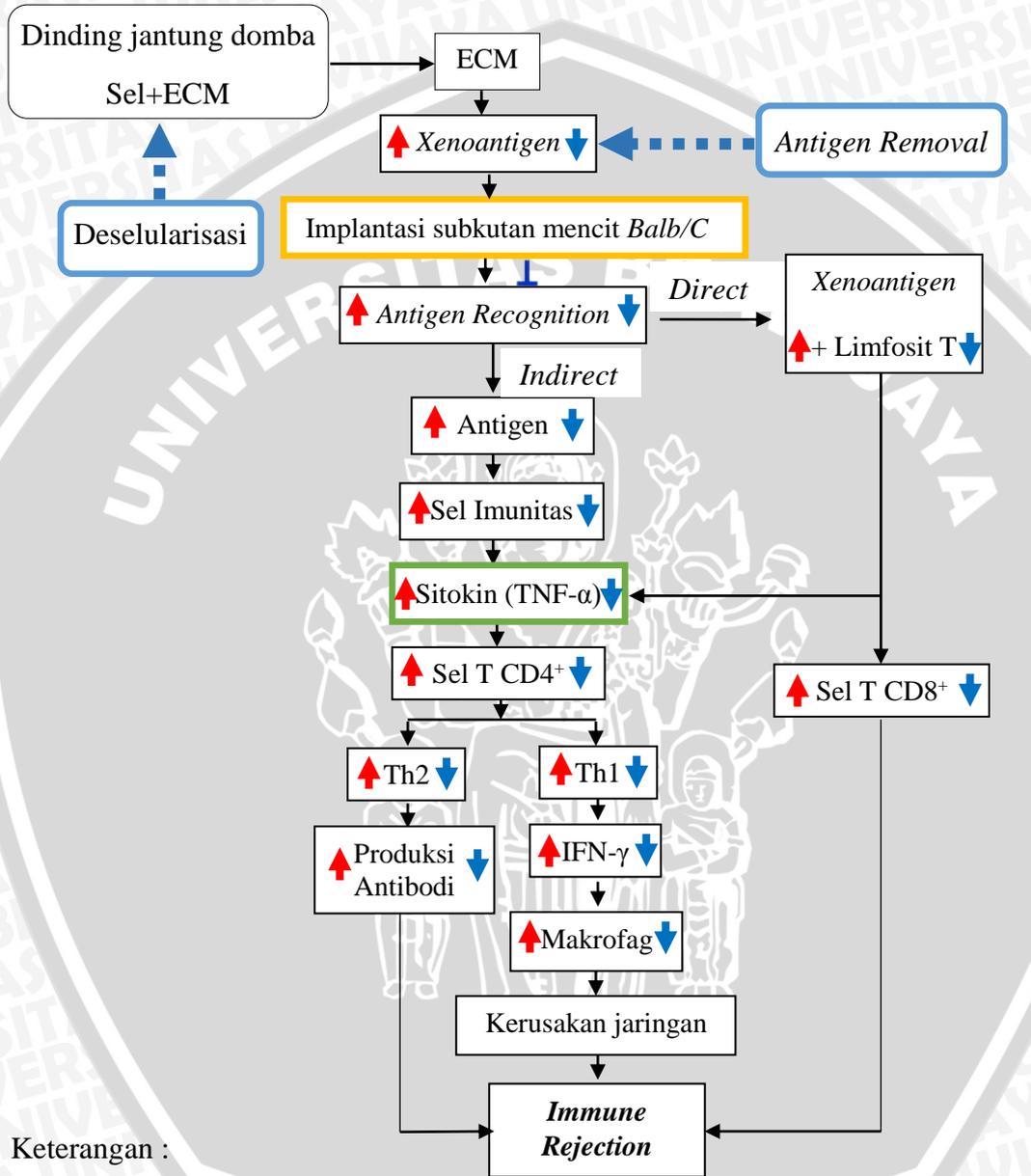
Kriteria	Keterangan
Berat Badan	
- Jantan	20-40 gram
- Betina	18-35 gram
Lama hidup	1-3 tahun
Temperatur tubuh	36,5°C
Kebutuhan air	Ad libitum
Kebutuhan makanan	4-5 gram/hari
Pubertas	28-49 hari
Lama kebuntingan	17-21 hari

Tabel 2.1 Data biologi mencit (*Mus musculus*) (Hariadi, 2012)



BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Keterangan :

⊥ : Menghambat

↑ : Peningkatan Aktivitas

↓ : Penurunan Aktivitas

→ : Proses

▭ (blue) : Variabel Bebas

▭ (green) : Variabel Terikat

▭ (yellow) : Variabel Kontrol

Xenograft adalah bahan cangkok yang diambil dari spesies yang berbeda, biasanya berasal dari lembu, babi atau domba yang digunakan pada manusia. Jaringan *xenograft acellular* cenderung dikembangkan karena ketersediannya sangat melimpah dan harga produk yang lebih terjangkau, namun terkendala adanya *xenoantigen* yang dapat menyebabkan penolakan respon imun atau biokompabilitas rendah. Dinding jantung *xenograft* asal domba digunakan sebagai *scaffold*. *Scaffold* merupakan perancah sel yang terdiri atas *extracellular matrix* (ECM).

Struktur dinding jantung domba terdiri atas sel otot jantung dan matriks ekstraseluler sehingga diperlukan metode untuk menghilangkan sel otot jantung yang hanya menyisakan ECM dan akan digunakan sebagai *scaffold*. Matriks ekstraseluler terdapat *xenoantigen* yang apabila diimplantasikan ke mencit *Balb/C* mampu memicu *antigen recognition*. *Antigen recognition* dibagi menjadi dua jalur yaitu secara *direct* dan *indirect*. Secara *direct*, *xenoantigen* dan limfosit T yang ada di darah akan meningkat dan mengaktifasi sitokin berupa TNF- α . Selain itu, sel imunitas juga mengaktifasi sel T CD8⁺ sehingga materi di dalam sel akan keluar dan menyebabkan sel lisis. Sedangkan secara *indirect*, antigen akan meningkatkan aktivasi sel imunitas yang berupa sitokin (TNF- α). Sitokin (TNF- α) yang dihasilkan sel imunitas sebagai respon terhadap molekul yang terdapat pada antigen akan mengawali proses inflamasi. Disisi lain, sitokin yang meningkat akan meningkatkan sel T CD4⁺ yang dapat meningkatkan produksi Th1 dan Th2. Sel Th2 yang meningkat akan meningkatkan produksi antibodi, sedangkan sel Th1 yang meningkat mengakibatkan peningkatan produksi IFN- γ , sehingga

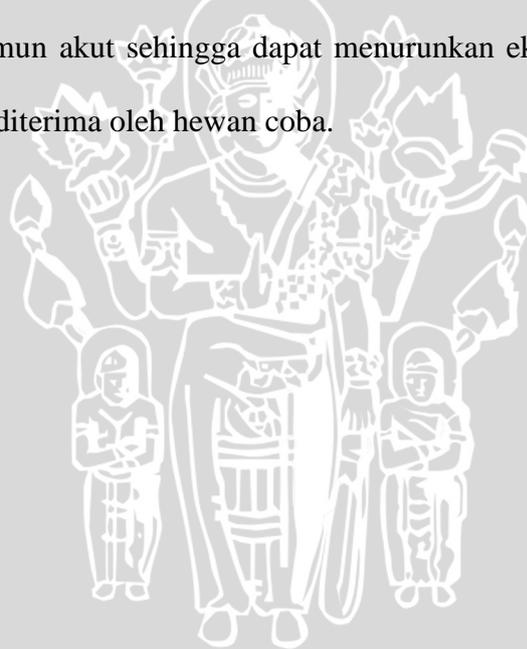
aktivasi sel makrofag akan meningkat. Aktivasi sel makrofag menyebabkan peningkatan fagositosis terhadap antigen sehingga meningkatkan terjadinya *immune rejection*.

Diperlukan suatu metode untuk membuat *scaffold* dinding jantung *acellular* asal domba dengan menghilangkan sel otot jantung menggunakan teknik deselularisasi. Deselularisasi bertujuan untuk menghilangkan sel dan menyisakan matriks ekstraseluler. Namun, setelah dilakukan proses deselularisasi masih menyisakan *xenoantigen* yang mampu memicu reaksi imun dan menimbulkan mekanisme penolakan, sehingga untuk mencegah penolakan diperlukan perlakuan lanjutan dengan menggunakan teknik *antigen removal* (AR). *Antigen removal* (AR) bertujuan untuk menghilangkan protein *xenoantigen* melalui *protein solubilization* yang mampu mengurangi ekspresi protein *xenoantigen* sehingga ketika sampel dinding jantung diimplantasikan ke subkutan mencit *Balb/C* akan menghambat *antigen recognition*. Secara *direct*, *xenoantigen* dan limfosit T akan menurun dan aktivasi sitokin berupa TNF- α akan menurun. Selain itu, sel imunitas yang mengaktivasi sel T CD8⁺ akan menurun. Secara *indirect*, antigen akan menurunkan aktivasi sel imunitas berupa sitokin (TNF- α) maka terjadi penurunan limfosit T yang akan menyebabkan hiporesponsif limfosit T sehingga dapat menurunkan ekspresi sel T CD4⁺ yang dapat menurunkan produksi Th1 dan Th2. Sel Th2 menurunkan produksi antibodi, sedangkan sel Th1 yang menurun mengakibatkan penurunan produksi IFN- γ , sehingga aktivasi sel makrofag pun akan menurun akibatnya tidak terjadi *immune rejection*.

Tujuan dari penelitian ini dengan menggunakan kombinasi teknik *antigen removal* (AR) diharapkan dapat menurunkan ekspresi protein *xenoantigen* sehingga meningkatkan biokompabilitas dinding jantung *acellular* yang digunakan sebagai *scaffold*.

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah diuraikan, maka hipotesis yang dapat diajukan adalah sebagai berikut: kombinasi teknik deselularisasi dan *antigen removal* pada dinding jantung dapat menghilangkan *xenoantigen* yang menghambat respon imun akut sehingga dapat menurunkan ekspresi TNF- α dan dinding jantung dapat diterima oleh hewan coba.



BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat penelitian dilakukan di tiga laboratorium yaitu Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya, Laboratorium Hewan Coba LSIH Universitas Brawijaya, dan Laboratorium Imunologi dan Mikrobiologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.

Waktu yang dibutuhkan untuk penelitian ini adalah lima bulan. Bulan pertama merupakan tahapan persiapan, koleksi sampel, dan proses deselularisasi. Bulan kedua melanjutkan proses deselularisasi ditambah proses *antigen removal*. Bulan ketiga merupakan tahapan proses implantasi pada subkutan mencit. Bulan keempat proses pembuatan preparat histopatologi serta imunohistokimia. Bulan terakhir yaitu bulan kelima merupakan tahap analisis hasil dan data.

4.2 Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan coba mencit (*Mus musculus*) jantan strain *Balb/C* berumur 6 – 8 minggu dengan berat antara 25 – 35 g yang terdiri dari tiga kelompok perlakuan. Perkiraan besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008):

$$t(n - 1) \geq 15$$

$$3(n - 1) \geq 15$$

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Keterangan:

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, untuk tiga macam kelompok perlakuan dibutuhkan jumlah mencit minimal sebanyak enam ekor dalam setiap kelompok, sehingga total mencit yang dibutuhkan adalah 18 ekor.

4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 18 ekor mencit yang dibagi menjadi tiga kelompok perlakuan, yaitu kelompok A adalah kelompok mencit dengan implan sampel dinding jantung segar (tanpa perlakuan), kelompok B adalah kelompok mencit dengan implan sampel dinding jantung pasca perlakuan deselularisasi, dan kelompok C adalah kelompok mencit dengan implan sampel dinding jantung pasca perlakuan kombinasi teknik deselularisasi dan *antigen removal* (**Tabel 4.1**). Masing-masing kelompok perlakuan terdiri dari enam ekor mencit ulangan.

Tabel 4.1 Rancangan penelitian

Kelompok	Keterangan
Kelompok A	Mencit diimplantasi dengan sampel dinding jantung segar (tanpa perlakuan), disegmentasi kemudian direndam dengan larutan penstrep.
Kelompok B	Mencit diimplantasi dengan sampel dinding jantung yang telah direndam dalam larutan penstrep kemudian diganti dengan larutan deselularisasi (DES).

Kelompok C	Mencit diimplantasi dengan sampel dinding jantung yang direndam dalam larutan deselularisasi (DES) kemudian diganti dengan larutan <i>antigen removal</i> (AR).
-------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

4.4 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah:

Variabel bebas	: Perlakuan teknik deselularisasi dan kombinasi teknik deselularisasi dan <i>antigen removal</i>
Variabel tergantung	: Histopatologi jaringan kulit mencit dan ekspresi <i>tumor necrosis factor-alpha</i> (TNF- α) pada jaringan implan
Variabel terkendali	: Mencit (<i>Mus musculus</i>), jenis kelamin, berat badan, umur, pakan, kandang, dan lingkungan

4.5 Materi Penelitian

4.5.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: kandang tikus berupa kotak berukuran 44 x 30 x 12 cm, yang dipisahkan dengan kawat *strimin* masing-masing kandang berisi 4 ekor mencit yang diberi pakan dan minum *ad-libitum*, *automatic shaker*, *Laminar Air Flow* (LAF), kit IHK (Starr Trek Universal Detection, Biocare, Canada), gunting, pinset, vortex (Guo-Huq), ependorf (*micro tube*), gelas ukur, *sentrifuge* (Denley tipe BR 401), *stirer*, inkubator, scalpel, tisu, gloves, jarum jahit, dan pH meter.

4.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit jenis *Mus musculus* strain *Balb/C* jantan umur 6 - 8 minggu dengan berat badan antara 25-35 g. Kondisi awal mencit dalam keadaan sehat yang ditandai dengan gerakan aktif. Mencit dipelihara dalam kandang berukuran 44 x 30 x 12 cm, *penicillin*, *streptomycin* (Naclai tesque, Japan), akuades, benang jahit, NaCl Fisiologis, 0,1% *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS), 0,01% tripsin, 20 µg/ml RNase, 0,2 mg/ml DNase, *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), 100 mM DTT, 2 mM MgCl₂, 100 mM KCl, *Phospat Buffer Saline* (PBS), PBS-Formaldehyde 4%, larutan etanol, xylol, blok paraffin, *gelatin coated slide*, H₂O₂ 0,3%, kasein (Sniper/protein blocker), antibodi primer TNF-α, antibodi sekunder Trek Avidin HRP Link (Biocare), Betazoid DAB kromogen solution Link (Biocare), dan *Haematoxylin*.

4.6 Tahapan Penelitian

4.6.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan untuk penelitian diadaptasikan terhadap lingkungan laboratorium selama tujuh hari (Lamanepa, 2005). Hewan coba harus dalam kondisi sehat dan telah lulus proses sertifikasi laik etik dari komisi etik penelitian dengan nomor: 435-KEP-UB. Mencit ditempatkan pada bak plastik berukuran 44 x 30 x 12 cm yang dilengkapi penutup kawat, lantai kandang yang mudah dibersihkan, berlokasi pada tempat yang bebas dari suara ribut dan terjaga dari polutan dengan pemberian pakan berupa pellet yang telah disediakan oleh Laboratorium Biosains, Universitas Brawijaya.

4.6.2 Preparasi dan Koleksi Sampel

Segmen dinding jantung ventrikel kiri dari domba jantan umur 1-1,5 tahun yang didapat dari Pasar Sukun Malang. Dinding jantung disegmentasi dengan dimensi sampel sebesar 15 x 15 x 2 mm dengan tanpa perlakuan (sampel segar) dan diberi perlakuan proses deselularisasi guna menjadi dinding jantung *acellular* lalu dilanjutkan dengan perlakuan *antigen removal* (AR).

4.6.3 Pembagian Kelompok

Sebanyak 18 buah sampel segmen dinding jantung dibagi menjadi tiga kelompok yaitu kelompok sampel segar (tanpa perlakuan), kelompok sampel deselularisasi, dan kelompok sampel kombinasi teknik deselularisasi dengan teknik *antigen removal* (AR). Tiap sampel dari kelompok kemudian diuji biokompabilitas secara *in vivo*.

4.6.4 Deselularisasi Dinding Jantung

Jantung domba segar sebanyak lima buah diambil dari Pasar Sukun Malang dan dibawa ke laboratorium dalam 0,1% Pens-Strep dalam NS agar terhindar dari kontaminasi. Ventrikel jantung dipotong menjadi segmen dinding jantung. Total segmen jantung yang dibutuhkan sebanyak 18. Segmen jantung (sampel) diberi perlakuan teknik deselularisasi dengan modifikasi metode Wang *et al.*, (2010) menggunakan perendaman dalam larutan 0,1% *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS), 0,01% *Tripsin*, 20 µg/ml *RNase* dan 0,2 mg/ml *DNase* selama 20 hari. Larutan SDS tersebut diganti tiap tiga hari sekali. Sampel post deselularisasi dapat disimpan dalam DMEM pada suhu -20⁰ C.

4.6.5 Teknik Antigen Removal

Teknik *antigen removal* (AR) menggunakan teknik *protein solubization* berdasarkan metode Wang *et al.*, (2010) dengan modifikasi. Larutan yang digunakan untuk *antigen removal* yaitu 100 mM DTT, 2 mM MgCl₂ dan 100 mM KCl dalam PBS. Sampel kemudian dimasukkan dalam 5 ml larutan dan di-*shaker* dengan kecepatan 125 rpm selama 48 jam. Untuk proses selanjutnya, sampel bisa disimpan dalam suhu -20⁰ C dalam media DMEM.

4.6.6 Uji Biokompabilitas *in vivo* (Implantasi Subkutan Mencit)

Metode uji biokompabilitas sampel dengan implantasi subkutan mencit dilakukan berdasarkan metode Mirsadraee *et al.*, (2007). Sebanyak 18 ekor mencit jantan umur 6-8 minggu terlebih dahulu dianestesi menggunakan xylazin dengan dosis 16 mg/kg BB. Pada daerah kulit samping tulang belakang disayat hingga terlihat subkutan. Sampel tiap kelompok diimplantasikan ke subkutan mencit. Kemudian sayatan dijahit menggunakan benang *silk* dengan teknik jahitan sederhana tunggal. Mencit dieuthanasia pasca dua minggu dan jaringan kulit sekitar implantasi dikoleksi lalu dimasukkan dalam larutan PBS-Formalin 4%.

4.6.7 Pembuatan Preparat Histopatologi Metode Paraffin

Jaringan kulit tiap mencit dari tiap kelompok pada uji biokompabilitas implantasi subkutan kemudian dilakukan proses pembuatan preparat histopatologi dengan metode paraffin dan dipotong dengan ketebalan 5 µm serta diwarnai dengan pewarnaan *Haematoxylin-Eosin* (HE). Gambaran

histopatologi kulit diamati guna melihat gambaran peradangan akibat interaksi sampel (dinding jantung *acellular*) dengan jaringan subkutan hewan coba. Blok paraffin juga dipotong dan dilekatkan pada *gelatin coated slide* guna dilanjutkan pewarnaan IHK untuk mendeteksi TNF- α .

4.6.8 Imunohistokimia (IHK) TNF- α Jaringan Kulit

Sebanyak tiga potongan jaringan kulit tiap kelompok kemudian diwarnai IHK (Star Trek Universal Detection, Biocare, Canada). Slide diproses deparafinisasi, rehidrasi, dicuci dengan PBS lalu diinkubasi dengan H₂O₂ 0,3% selama 5 menit lalu dicuci dengan PBS. Selanjutnya dilakukan *blocking background* dengan kasein (Sniper/protein blocker) selama 15 menit pada suhu kamar, lalu diinkubasi dengan antibodi primer. Slide pertama akan diinkubasi dengan antibodi primer *mouse-anti* TNF- α . Waktu inkubasi antibodi primer adalah semalaman pada suhu 4⁰C. Slide kemudian dicuci dengan PBS, lalu diinkubasi dengan antibodi sekunder *rabbit-anti mouse* Ig G selama 20 menit pada suhu kamar. Slide dicuci lalu diinkubasi dengan Trek-Avidin HRP (Biocare) selama 10 menit, lalu diinkubasi dengan Betazoid DAB kromogen *solution* (Biocare) selama 3-5 menit hingga menunjukkan warna cokelat yang berarti positif. Slide kemudian dicelupkan dalam *haematoxylin* sebagai *counterstaining*, kemudian dilakukan proses dehidrasi, *clearing*, dan *mounting*. Hasil pewarnaan kemudian diamati dengan menggunakan mikroskop dan dilihat ada tidaknya reaksi positif. Slide kemudian diambil foto sebanyak lima bidang pandang dengan perbesaran obyektif 40x dan dihitung persentase area yang masing-masing mengekspresikan TNF- α dengan *immunoratio*.

4.6.9 Analisa Data

Hasil penelitian ini akan menyajikan gambaran histopatologi yang menggambarkan kerusakan jaringan kulit mencit serta ekspresi TNF- α di jaringan kulit mencit pasca implantasi jaringan dinding jantung *acellular*. Data kuantitatif akan dianalisa menggunakan One Way ANOVA dan BNJ (*Tukey Test*) dengan nilai signifikan yang digunakan adalah $p < 0,05$ dengan membandingkan antar kelompok menggunakan perangkat lunak IBM SPSS 22.0 for Windows.



BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

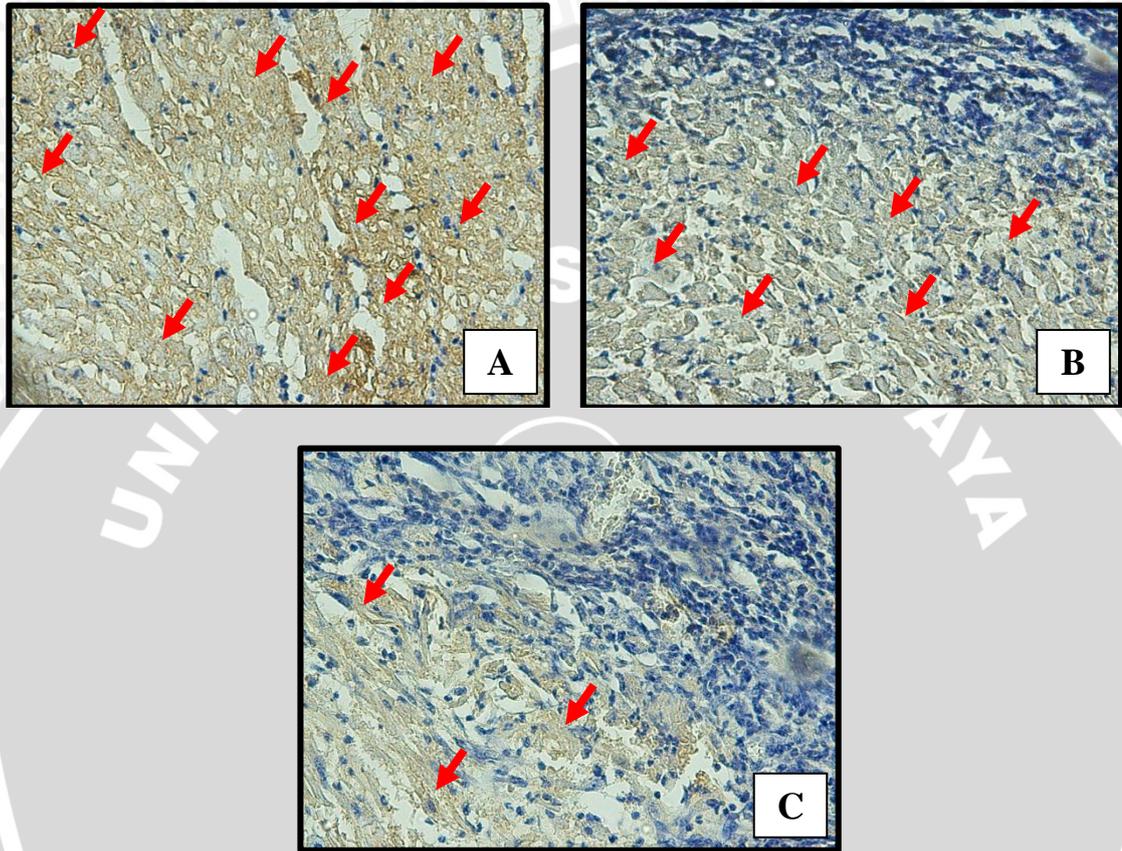
5.1 Ekspresi *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α) pada Uji Biokompabilitas Dinding Jantung *Acellular* Pasca Perlakuan Teknik *Antigen Removal*

Pengaruh penggunaan teknik *antigen removal* (AR) terhadap ekspresi TNF- α diamati dengan menggunakan metode imunohistokimia (IHK) pada preparat histopatologi kulit mencit. Karakteristik pewarnaan IHK menggunakan kromogen berupa DAB (*3,3'-diaminobenzidine*) yang merupakan substansi yang menyerap cahaya dan akan membentuk warna coklat pada preparat. Preparat yang terwarnai coklat akan dihitung persentase (%) warna menggunakan aplikasi *Immunoratio*.

Ekspresi TNF- α ditunjukkan dengan warna coklat pada area implantasi kulit mencit (*Mus musculus*) pasca perlakuan teknik *antigen removal* dengan menggunakan antibodi poliklonal TNF- α pada metode imunohistokimia (IHK) (**Gambar 5.1**). Warna coklat yang dihasilkan merupakan hasil reaksi antara enzim *Horse Radish Peroxidase* (HRP) yang berikatan dengan antibodi sekunder dengan kromogen *Diaminobenzidine* (DAB) (Immunostar, 2010).

Ekspresi TNF- α pada masing-masing kelompok perlakuan menunjukkan adanya perbedaan yang ditandai dengan perbedaan persentase warna coklat yang terbentuk. Pada kelompok segar (tanpa perlakuan), TNF- α muncul dalam jumlah yang banyak pada area implantasi (**Gambar 5.1A**). Pada kelompok dengan perlakuan teknik deselularisasi terjadi penurunan ekspresi TNF- α pada area implantasi (**Gambar 5.1B**), sedangkan pada kelompok dengan kombinasi

perlakuan teknik deselularisasi dan *antigen removal* menunjukkan penurunan ekspresi TNF- α paling signifikan (**Gambar 5.1C**).



Gambar 5.1 Ekspresi *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α) pada gambaran imunohistokimia kulit mencit (*Mus musculus*) perbesaran 40x lensa objektif

Keterangan gambar 5.1: (A) sampel segar (tanpa perlakuan), (B) sampel pasca perlakuan teknik deselularisasi, dan (C) sampel pasca perlakuan teknik *antigen removal*. Tanda panah () menunjukkan ekspresi *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α)

Hasil penelitian kombinasi teknik *antigen removal* terhadap ekspresi TNF- α dan gambaran histopatologi kulit mencit pada uji biokompatibilitas dinding jantung *acellular* asal domba menunjukkan adanya penurunan ekspresi TNF- α melalui pengamatan secara kuantitatif berdasarkan intensitas kemunculan warna kecokelatan pada area implantasi. Warna cokelat yang terdapat pada area

implantasi dihitung dengan menggunakan program *Immunoratio* dan dilanjutkan dengan perhitungan statistika. Ekspresi TNF- α pada ketiga kelompok perlakuan (kelompok segar, kelompok deselularisasi, dan kelompok *antigen removal*) menunjukkan hasil yang berbeda signifikan ($p < 0,05$) antarkelompok perlakuan (Tabel 5.1).

Tabel 5.1 Ekspresi *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α) pada Uji Biokompabilitas Dinding Jantung *Acellular* Pasca Perlakuan Teknik *Antigen Removal*

Kelompok	Rata-rata Ekspresi TNF- α	Penurunan Ekspresi TNF- α (%)*
Segar	78,59 \pm 0,80 ^c	-
Deselularisasi	27,44 \pm 0,89 ^b	65,08
Antigen Removal	3,39 \pm 0,28 ^a	95,68

Keterangan: Angka dengan *superscript* (notasi) berbeda menunjukkan adanya perbedaan ($p < 0,05$) signifikan tiap kelompok

*Penurunan ekspresi TNF- α dihitung berdasarkan hasil rata-rata ekspresi TNF- α kelompok perlakuan *Deselularisasi* dan *Antigen removal* dibandingkan dengan kelompok perlakuan segar

Nilai rata-rata persentase TNF- α pada kelompok segar memiliki nilai tertinggi yaitu sebesar 78,59 \pm 0,80 dibandingkan dengan nilai rata-rata persentase TNF- α pada kelompok perlakuan lainnya, sehingga kelompok segar dijadikan sebagai acuan untuk mengetahui adanya penurunan yang terjadi pada kelompok deselularisasi dan kelompok *antigen removal*. Pada kelompok segar menunjukkan adanya ekspresi TNF- α dalam jumlah besar, sedangkan kelompok deselularisasi menunjukkan penurunan nilai rata-rata ekspresi TNF- α sebesar 65,08 % terhadap kelompok segar. Kelompok *antigen removal* dibandingkan dengan kelompok deselularisasi untuk mengetahui kelompok perlakuan yang terbaik dalam menurunkan nilai rata-rata ekspresi TNF- α pada area implantasi. Kelompok

antigen removal memiliki rata-rata persentase ekspresi TNF- α sebesar $3,39 \pm 0,28$ atau mengalami penurunan sebesar 95,68 % dibandingkan dengan kelompok segar. Kelompok yang memiliki penurunan paling signifikan apabila dibandingkan dengan kelompok segar adalah kelompok *antigen removal*. Penurunan yang signifikan ($p < 0,05$) ditandai dengan perbedaan notasi huruf antara kelompok segar dengan kelompok perlakuan deselularisasi dan kelompok *antigen removal* berdasarkan analisis statistika.

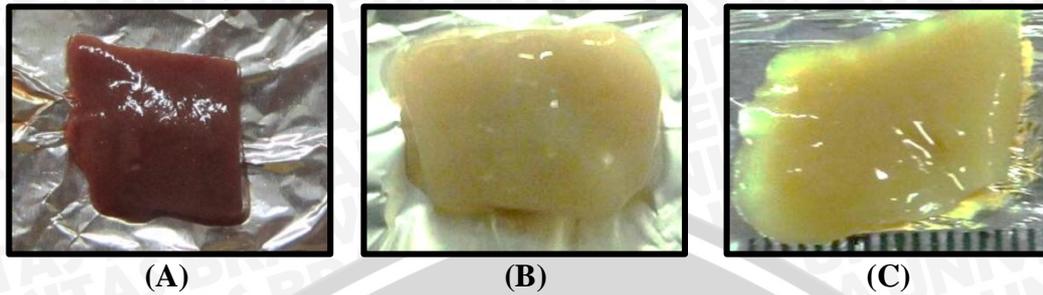
Adanya ekspresi TNF- α di jaringan menandakan terjadinya penolakan jaringan (*immune rejection*) *xenograft* oleh jaringan resipien. Persentase TNF- α yang tinggi pada kelompok tanpa perlakuan (segar) disebabkan karena masih terdapat *xenoantigen* berupa (MHC-1 dan α -Gal) sehingga akan memicu *antigen recognition* yang akan meningkatkan aktivasi sel imunitas berupa sitokin proinflamasi TNF- α , yang kemudian akan mengawali terjadinya proses inflamasi. TNF- α sebagai salah satu sitokin proinflamasi berfungsi untuk merangsang makrofag mensekresi kemokin agar sel imun non spesifik (makrofag) migrasi ke dalam jaringan untuk menyingkirkan patogen atau benda asing. Aktivasi sel makrofag menyebabkan peningkatan fagositosis terhadap antigen sehingga meningkatkan terjadinya *immune rejection*. TNF- α merupakan suatu sitokin yang dihasilkan oleh leukosit yang berfungsi untuk merangsang dan mengaktifkan sistem imun terhadap respon inflamasi, dalam keadaan normal, antigen yang masuk akan memicu reaktivitas sistem imun pada imunitas nonspesifik maupun spesifik (Baratawidjaja, 2009).

Berdasarkan penelitian Qiong (2015) aplikasi teknik deselularisasi berpotensi untuk menghilangkan respon imun yang merugikan ditimbulkan oleh epitop membran sel, sehingga diharapkan memperkecil terjadinya *immune rejection*, sedangkan berdasarkan penelitian Cissell (2014) aplikasi teknik *antigen removal* bertujuan untuk menargetkan penghapusan antigen yang memicu respon imun tanpa merusak molekul struktural *extracellular matrix* (ECM).

Berdasarkan hasil analisis statistika, kelompok perlakuan teknik deselularisasi dan teknik *antigen removal* berbeda signifikan ($p < 0,05$) terhadap kelompok tanpa perlakuan (segar) yang ditunjukkan dengan notasi yang berbeda (**Tabel 5.1**). Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan teknik deselularisasi dan *antigen removal* dapat menurunkan ekspresi TNF- α pada area implantasi. Berdasarkan data yang diperoleh, ekspresi TNF- α pada area implantasi dengan teknik *antigen removal* memiliki hasil penurunan terbaik bila dibandingkan dengan teknik deselularisasi.

5.2 Gambaran Makroskopis Dinding Jantung *Acellular* dengan Perlakuan Teknik Deselularisasi dan Teknik *Antigen Removal* pre-Implantasi

Karakteristik makroskopis dinding jantung *acellular* pre-implantasi yang diamati yaitu berupa perubahan warna sampel masing-masing kelompok sebelum diimplantasikan pada subkutan mencit. Perubahan warna diamati dengan membandingkan antara kelompok segar, kelompok deselularisasi, dan kelompok *antigen removal* (**Gambar 5.2**).



Gambar 5.2 (A) Sampel dinding jantung segar (tanpa perlakuan), (B) sampel dinding jantung pasca perlakuan teknik deselularisasi, dan (C) sampel dinding jantung pasca perlakuan teknik *antigen removal* dengan dimensi panjang 15 mm ; lebar 15 mm ; tebal 2 mm

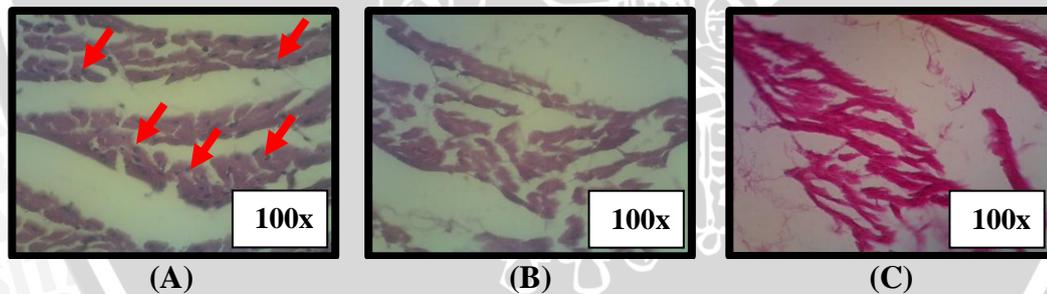
Gambaran makroskopis dinding jantung *acellular* asal domba pada masing-masing segmen sampel dinding jantung sebelum diimplantasikan ke subkutan mencit terlihat adanya perubahan warna (**Gambar 5.2**). Segmen sampel dinding jantung kelompok segar (tanpa adanya perlakuan) terlihat berwarna coklat gelap (**Gambar 5.2A**). Hal ini menunjukkan bahwa masih terdapatnya sel-sel jantung dan juga *extracellular matrix* (ECM). Menurut Masood *et al.*, (2001) jantung yang tanpa diberikan perlakuan ditandai dengan warna merah kecokelatan, selaput jantungnya bersih, konsistensi kenyal, dan tidak ada pendarahan. Segmen sampel dinding jantung kelompok deselularisasi terlihat berwarna lebih putih daripada sampel dinding jantung segar (**Gambar 5.2B**). Hal ini sesuai dengan pendapat Sondell *et al.*, (1998) dan Yang *et al.*, (2010) yang menyatakan bahwa warna jaringan pasca deselularisasi tampak berwarna lebih putih atau transparan. Hal ini dikarenakan bahwa sel-sel jantung telah terdegradasi akibat perlakuan teknik deselularisasi itu sendiri. Segmen sampel dinding jantung kelompok *antigen removal* terlihat berwarna putih atau transparan sama seperti pada kelompok dengan perlakuan teknik deselularisasi (**Gambar 5.2B**). Hal ini

dikarenakan perlakuan *antigen removal* mampu melarutkan *xenoantigen* (Wong *et al.*, 2011).

Masing-masing perlakuan pada sampel dinding jantung memberikan hasil berbeda pada penampakan makroskopis warna dinding jantung domba yang telah disegmentasi. Perubahan warna ini terjadi karena adanya perlakuan deselularisasi yaitu pelarutan sel miokardium jantung, sehingga sel akan rusak dan memberikan warna yang lebih cerah dibandingkan sampel segar (tanpa perlakuan).

5.3 Gambaran Mikroskopis Dinding Jantung *Acellular* dengan Perlakuan Teknik Deselularisasi dan Teknik *Antigen Removal* pre-Implantasi

Gambaran mikroskopis dinding jantung *acellular* pre-implantasi yang diamati yaitu ada atau tidaknya inti sel yang ditandai dengan warna ungu karena terwarnai oleh *Haematoxylin* dan bagian sitoplasma sel berwarna merah muda karena terwarnai oleh *Eosin*.



Gambar 5.3 (A) Gambaran histopatologi sampel dinding jantung segar (tanpa perlakuan) perbesaran 100x, (B) Gambaran histopatologi sampel dinding jantung pasca perlakuan teknik deselularisasi perbesaran 100x, dan (C) Gambaran histopatologi sampel dinding jantung *acellular* pasca perlakuan teknik *antigen removal* perbesaran 100x. Tanda panah () menunjukkan sel otot jantung

Gambaran mikroskopis dinding jantung *acellular* asal domba pada masing-masing segmen sampel dinding jantung sebelum diimplantasikan ke subkutan mencit terlihat adanya perubahan sel otot jantung (**Gambar 5.3**).

Gambaran mikroskopis dinding jantung domba sebelum implantasi tanpa adanya perlakuan (dinding jantung segar), tampak terlihat masih adanya sel otot jantung yang ditandai dengan terlihatnya inti sel otot jantung yang terletak di tengah sel dengan pewarnaan *Haematoxylin* terlihat inti sel berwarna biru (**Gambar 5.3A**).

Gambaran mikroskopis dinding jantung domba sebelum implantasi yang telah diberi perlakuan teknik deselularisasi, tampak terlihat tidak adanya inti sel otot jantung karena tujuan dari deselularisasi adalah menghilangkan sel-sel sehingga hanya menyisakan *extracellular matrix* (ECM) (**Gambar 5.3B**).

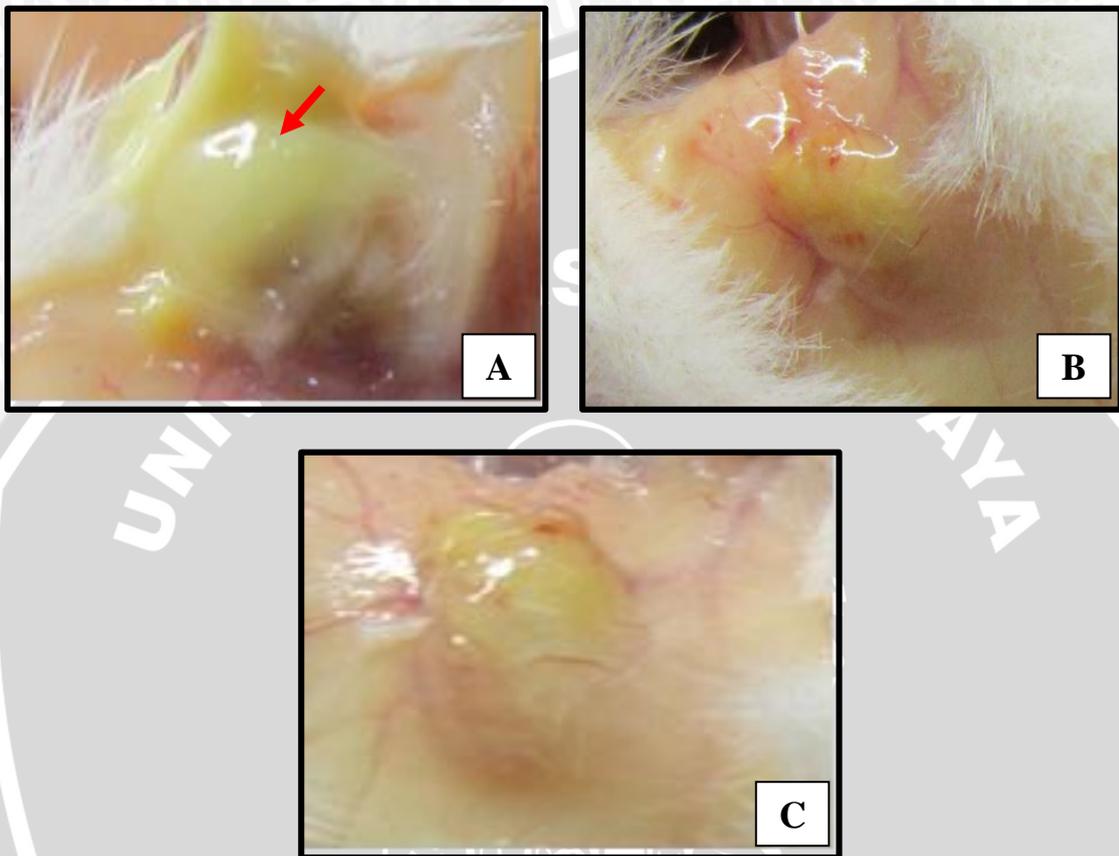
Gambaran mikroskopis dinding jantung domba sebelum implantasi yang telah diberi perlakuan teknik *antigen removal* (AR), tampak terlihat tidak adanya sel namun tersisa sitoplasma sel (*hypoacellular*) (**Gambar 5.3C**). Hal ini diperjelas dengan penelitian dari Cissell (2014) yaitu teknik deselularisasi bertujuan untuk melarutkan sel tanpa menghilangkan struktur dari *extracellular matrix* (ECM).

Perlakuan teknik *antigen removal* juga akan menghilangkan dan melarutkan *xenoantigen* dengan agen pereduksi berupa *Dithiotreitol* (DTT) dan garam *Potassium Chloride* (KCl). DTT berfungsi untuk penghancuran protein sedangkan KCl untuk mengikat hancuran protein *xenoantigen* sehingga dapat terlarut dan dengan cepat mudah dihilangkan.

5.4 Gambaran Makroskopis Dinding Jantung Acellular pada Kulit Mencit Pasca Implantasi

Karakteristik makroskopis subkutan mencit *Balb/C* yang diimplantasi dengan segmen dinding jantung domba pasca perlakuan deselularisasi dan *antigen removal* yaitu karakteristik jaringan yang mengalami nekrosis dan degradasi

jaringan implan serta terbentuknya vaskularisasi baru pada area sekitar implan (Gambar 5.4).

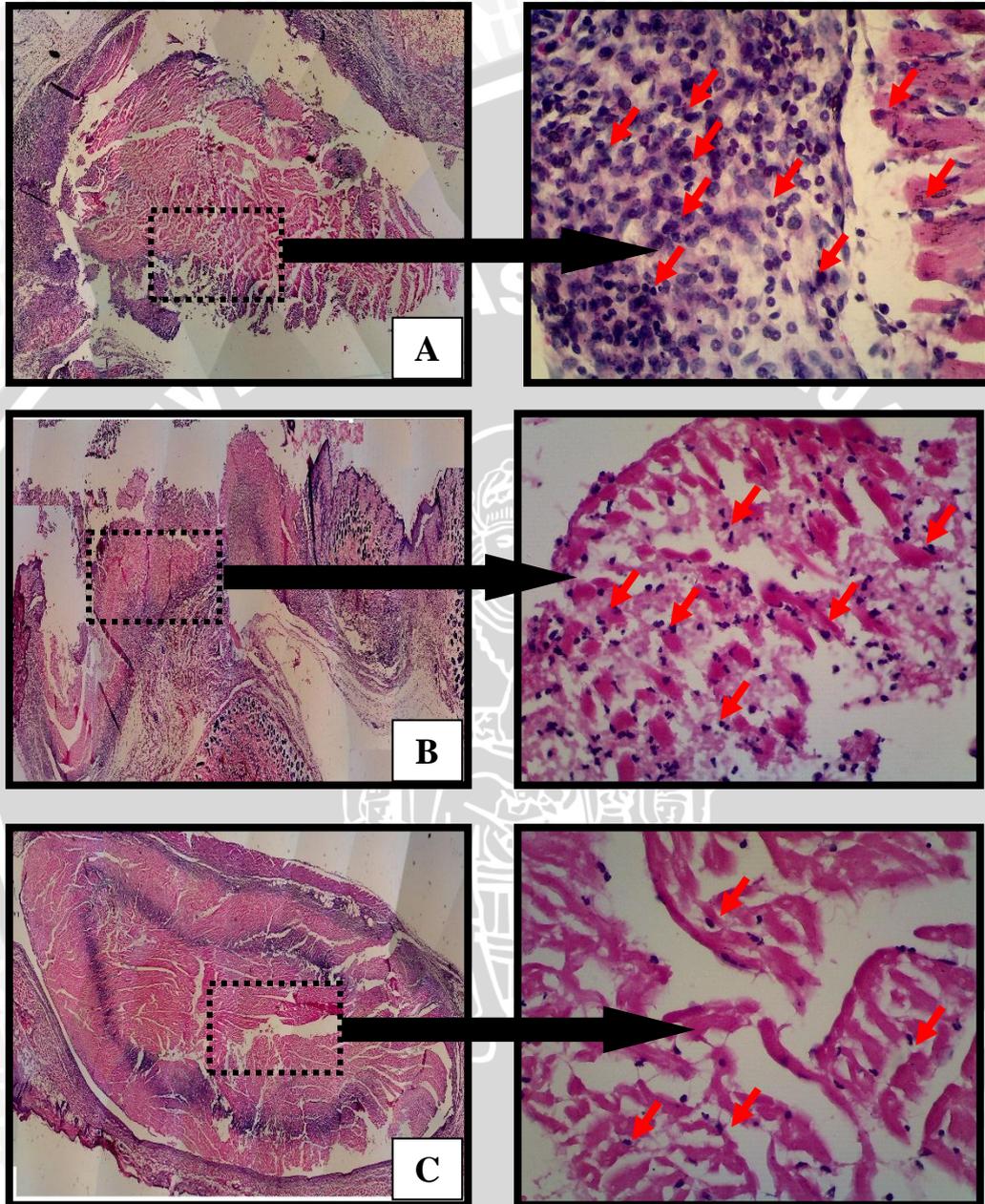


Gambar 5.4 (A) Jaringan kulit mencit dan sampel dinding jantung segar (tanpa perlakuan) pasca implantasi (B) Sampel dinding jantung pasca perlakuan teknik deselularisasi pasca implantasi (C) Sampel dinding jantung pasca perlakuan teknik *antigen removal* pasca implantasi. Tanda panah () menunjukkan nekrosis kaseosa

Gambaran makroskopis dinding jantung *acellular* asal domba setelah diimplantasikan ke subkutan mencit *Balb/C* terlihat adanya perubahan patologis pada masing-masing kelompok perlakuan (Gambar 5.4). Pada kelompok dinding jantung segar (tanpa perlakuan) setelah diimplantasikan ke subkutan mencit menimbulkan reaksi imunologis dengan ditandai adanya nekrosis kaseosa di sekitar jaringan implan dan masih terdapatnya jaringan implan (Gambar 5.4A). Hal ini menandakan bahwa masih terdapatnya sel otot jantung yang mampu

menginduksi adanya makrofag serta sel-sel radang yang dapat menghancurkan sel-sel otot jantung sehingga terdegradasi dan mengalami nekrosis kaseosa. Pada kelompok dinding jantung dengan perlakuan teknik deselularisasi setelah diimplantasikan ke subkutan mencit tidak terdapat nekrosis kaseosa di sekitar jaringan implan (**Gambar 5.4B**). Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan deselularisasi mampu menurunkan reaksi imunologis. Menurut Badylak (2008), proses deselularisasi sangat berpengaruh terhadap reaksi inflamasi di jaringan *scaffold* yang telah diimplantasikan. Jaringan yang telah dilakukan proses deselularisasi mampu mendegradasi struktur sel jantung melalui protein *solubization* dan hanya menyisakan struktur ECM. Sel jantung yang terdegradasi mampu menurunkan sel leukosit untuk melakukan proses fagositosis. Hal ini sangat efektif untuk penerimaan jaringan implan di jaringan resipien karena respon imun dapat diturunkan namun masih menimbulkan *immune rejection*. Pada kelompok dinding jantung dengan perlakuan teknik *antigen removal* setelah diimplantasikan ke subkutan mencit terlihat bahwa jaringan implan mereduksi dan terdapat banyak vaskularisasi di sekitar jaringan implan (**Gambar 5.4C**). Hal ini dikarenakan teknik *antigen removal* pasca perlakuan deselularisasi mampu menurunkan respon imun sehingga tidak nampak adanya reaksi imunologis atau terbentuknya nekrosis kaseosa di jaringan implan. Tidak adanya reaksi imunologis pasca implantasi dengan perlakuan teknik *antigen removal* mampu meningkatkan penerimaan jaringan implan pada jaringan resipien (Cissell, 2014).

5.5 Pengaruh Perlakuan *Antigen Removal* terhadap Histopatologi Kulit Mencit *Balb/C*



Gambar 5.5 (A) Gambaran histopatologi subkutan kulit mencit *Balb/C* segar (tanpa perlakuan) pasca implantasi, (B) Histopatologi subkutan kulit mencit *Balb/C* pasca perlakuan teknik desingularisasi pasca implantasi, dan (C) Histopatologi subkutan kulit mencit *Balb/C* pasca perlakuan teknik *antigen removal* pasca implantasi perbesaran 40x lensa objektif

Keterangan : Tanda kotak putus-putus merupakan penampang sel radang yang menyebar pada subkutan yang diperbesar dengan tanda panah yang ditunjukkan dengan panah merah. Tanda panah (↔) menunjukkan infiltrasi sel radang

Hasil di atas merupakan gambaran mikroskopis (histopatologi) subkutan mencit *Balb/C* dan dinding jantung domba *acellular* pasca diimplantasikan ke subkutan mencit *Balb/C* (A) kelompok 1 segar (tanpa diberikan perlakuan), (B) kelompok 2 perlakuan teknik deselularisasi, (C) kelompok 3 perlakuan teknik *antigen removal*. Kelompok segar (tanpa perlakuan) pada gambaran histopatologi menunjukkan peradangan yang berat ditandai banyaknya sel radang di sekitar area implantasi yang letaknya menyebar dengan pewarnaan *Haematoxylin* terlihat sel radang polimorfonuklear (PMN) berwarna biru. Pada penampang kelompok 1 banyaknya sel radang dikarenakan sampel jantung yang diimplantasikan pada subkutan mencit *Balb/C* merupakan sampel jantung segar (tanpa perlakuan), sehingga memicu makrofag untuk merilis sel radang pada area yang diimplantasikan. Hal tersebut menunjukkan adanya penolakan respon imun (**Gambar 5.5A**).

Kelompok perlakuan deselularisasi pada gambaran histopatologi menunjukkan sel radang yang terdapat di permukaan jaringan implan yang tidak terlalu banyak bila dibandingkan dengan kelompok segar (tanpa perlakuan). Pada gambaran histopatologi ditemukan banyaknya sel radang pada daerah subkutan yang terletak di daerah perifer (**Gambar 5.5B**). Pada penampang kelompok 2 jumlah sel radang semakin berkurang dikarenakan sampel jantung yang diimplantasikan pada subkutan mencit *Balb/C* merupakan sampel jantung dengan perlakuan deselularisasi yang dilakukan selama 17 hari dengan selang waktu tiap 3 hari sekali dilakukan pengulangan pencucian. Tujuan dari proses deselularisasi adalah untuk melarutkan sel-sel dan menyisakan ekstraseluler matriks (Qiong *et*

al., 2015), sehingga makrofag tidak banyak terinduksi pada jaringan donor yang diimplan.

Kelompok perlakuan kombinasi *antigen removal* menunjukkan adanya infiltrasi sel radang yang terdapat di daerah kapsula dan daerah perifer implan yang lebih sedikit (**Gambar 5.5C**). Pada penampang kelompok 3 jumlah sel radang sedikit dikarenakan sampel jantung yang diimplantasikan pada subkutan mencit *Balb/C* merupakan sampel jantung dengan kombinasi perlakuan deselularisasi dengan *antigen removal* yang dilakukan selama 3 hari dan 3x pengulangan pencucian. Tujuan dari proses deselularisasi adalah untuk melarutkan sel-sel dan menyisakan ekstraselular matriks (Qiong *et al.*, 2015), sedangkan tujuan dari *antigen removal* adalah untuk melarutkan *xenoantigen* berupa protein sel (MHC-1 dan α -Gal) (Wong *et al.*, 2014), sehingga makrofag tidak banyak terinduksi pada jaringan donor yang diimplan. Hal tersebut menunjukkan tidak terjadinya penolakan respon imun. Hal ini dapat diperjelas dengan penelitian dari Cissell (2014) yaitu teknik deselularisasi bertujuan melarutkan sel tanpa menghilangkan struktur dari *extracellular matrix* (ECM). Perlakuan teknik *antigen removal* (AR) juga akan menghilangkan dan melarutkan *xenoantigen* dengan agen pereduksi berupa *Dithiotreitol* (DTT) dan garam *Potassium Chloride* (KCl). Hal ini mampu menurunkan infiltrasi sel radang di sekitar area implantasi sehingga tidak terjadi penolakan respon imun.

BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah disampaikan dapat disimpulkan bahwa:

1. Perlakuan teknik *antigen removal* dapat mengurangi degradasi jaringan implan dinding jantung *acellular* domba pada subkutan mencit yang ditandai dengan berkurangnya infiltrasi sel radang di sekitar area implantasi.
2. Perlakuan teknik *antigen removal* dapat menurunkan ekspresi TNF- α sebesar 95,68% pada jaringan kulit mencit pasca implantasi dinding jantung *acellular* domba sehingga dapat mengurangi *immune rejection*.

6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang jaringan cangkok buatan yang berasal dari jaringan non-babi untuk diaplikasikan pada penderita infark jantung.

DAFTAR PUSTAKA

- Afzali, Behdad, Lechler, R., and Lombardi, G. 2010. *Graft Rejection: Immunological Supression*. UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Badylak, S.F., and Gilbert, T.W. 2008. Immune Response to Biologic Materials Scaffold. *Seminars in Immunology 20 (2008): 109-116*.
- Baratawidjaja, K.G. 2009. *Imunologi Dasar Edisi ke-9*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, (8) :197-217.
- Bell, E. 2000. Chapter 16: Organotypic Model of Engineered Tissue, dalam buku *Principle of Tissue Engineering*, 2nd ed., editor: Lanza,R.P., Langer, R., Vacanti, J. Academic Press: San Diego. Hal 181-193.
- Cissell, D., Jerry C. Hu, Leigh G., and Kyriacos A., 2014. Antigen Removal for the Production of Biomechanically Functional, Xenogeneic Tissue Graft. *Journal of Biomechanics 47 (2014) 1987-1996*.
- Cunningham JG. 2002. *Textbook of Veterinary Physiology*. Ed ke-3. Philadelphia: WB. Saunders Company.
- Djuanda, S., dan Sri A. S., 2003. Dermatitis. Dalam: Djuanda, A. *et al.*, ed. 3 *Ilmu Penyakit Kulit dan Kelamin*. Jakarta: Balai Penerbit FKUI. 126-131.
- Easter, D. 2008. Allograft vs. Xenograft. *Practical Considerations for Biologic Scaffolds*. editor: Garth J. University of California. San Diego. Hal 6.
- Fatmah, 2006. Respon Imunitas yang Rendah pada Tubuh Manusia Usia Lanjut. *Makara, Kesehatan, Vol. 10, No. 1, Juni 2006: 47-53*.
- Fenton, Drew. 2009. *Myocardial Infarction*. <<http://emedicine.medscape.com>> [diakses tanggal 20 September 2015]

Flaherty JD, Bax JJ, De Luca L, *et al.* 2009. *Acute Heart Failure Syndromes in Patients with Coronary Artery Disease Early Assessment and Treatment.* J Am Coll Cardiol 2009; 53:254-63.

Galili, U., 2005. *Special Feature: The α -Gal epitope and the anti-Gal antibody in xenotransplantation and in cancer immunotherapy,* Imm Cell Biol 83:674-686.

Garcia, M.A.A.A., Yebra, B.G., Flarez, A.L.L., and Guerra, E.G. 2012. *Review Article : The Major Histocompatibility Complex in Transplantation,* J. Transpl. 2012: 1-8.

Hariadi. 2012. *Peluang Jitu Beternak Tikus Putih.* Yogyakarta: Pustaka Baru Press.

Hetherington, V.J., Kawalec, J.S., Dockery, D.S., Targoni, O.S., Lehmann, P.V., and Nadler, D., 2005. *Immunological testing of xeno-derived osteochondral grafts using peripheral blood mononuclear cells from health human donors,* BMC Muscul. Skel. Disord. 6 (36): 1-11.

Ikada, T., 2006. *Tissue Engineering: Fundamentals and Applications.* Chapter 2, Elsevier: Amsterdam, pp. 162-169.

Irawati, L., Acang, N., Irawati, N, *Ekspresi Tumor Nekrotik Faktor Alfa (TNF- α) dan Interleukin -10 (IL-10) Pada Infeksi Malaria falciparum.* 2008. Madj. Persat. Dokt. Andalas 1 (32): 115-119.

Junqueira, L.C., and J. Carneiro. 2005. *Basic Histology: text and atlas.* 11st Edition. McGraw-Hill's Access Medicine.

Junqueira, L.C. 2007. *Persiapan Jaringan untuk Pemeriksaan Mikroskopik.* Histologi Dasar: teks dan atlas. Edisi 10. Jakarta: EGC. 3-5.

Kusriningrum, R.S. 2008. *Rancangan Percobaan.* Surabaya: Pusat Penerbitan dan Percetakan Unair. 3:15.

Kusumawati, D., 2004. *Bersahabat dengan Hewan Coba*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.

Lamanepa, M. E. L. 2005. Perbandingan Profil Lipid dan Perkembangan Lesi Aterosklerosis pada Tikus Wistar yang Diberi Diet Perasan Pare dengan Diet Perasan Pare dan Statin. [Tesis]. Semarang: Universitas Diponegoro.

Lam CS, Lyass A, Kraigher-Krainer E, *et al.* 2011. Cardiac Dysfunction and Noncardiac Dysfunction as Precursors of Heart Failure With Reduced and Preserved Ejection Fraction in The Community. *Circulation*. Jul 5 2011;124 (1): 24-30.

Lili, I., Nusirwan, A., Nuzulia, I. 2008. Ekspresi Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) dan Interleukin-10 (IL-10) pada Infeksi *Malaria falciparum*. *Majalah Kedokteran Andalas* 32 (1): 15.

Mahmud, A. 2010. *Congestive Heart Failure in Dogs Clinical Concepts*. Jawa Barat: JB Media.

Masood, S., and Yang, G.Z. 2001. Macroscopic Structure and Physiology of the Normal and Diseased Heart. *Department of Computing, Imperial College of Science, Technology and Medicine, London (2001): 1-32.*

Mihai, R., Florescu, I.P. Corolu, V., Oancea, A., dan Lungu, M., 2011. In vitro biocompatibility testing of some synthetic polymers used for the achievement of nervous conduits, *J. Med Life* 4 (3) : 250-255.

Mirsadraee, S., Wilcox, H., E., Watterson, K.G., Kearney, J.N., Hunt, J., Fisher, J., da Ingham, E., 2007. Biocompatibility of acellular Human Pericardium, *J Surg Res* 143: 407-414

Moore, KL. 2002. *Anatomi Klinis Dasar*. Jakarta: Hipokrates. Hal: 109-111.

Muttaqin, A. 2009. *Buku Ajar Asuhan Keperawatan Klien Dengan Gangguan Sistem Kardiovaskuler Dan Hematologi*. Jakarta: Salemba Medika.

O'Grady, MR. dan O'Sullivan, ML. 2004. *Clinical Cardiology Concepts For The Dog and Cat* <<http://www.vetgo.com/cardio/contact.php>> [diakses 11 Januari 2016].

Olmos, G., Jeronia L. 2014. Tumor Necrosing Factor Alpha: A Link between Neuroinflammation and Excitotoxicity. *Review Article*.

Penn, D., 2002. *Major Histocompatibility Complex (MHC)*. Encyclopedia of Life Sciences. Hal: 1-7.

Playfair, J.H.L. and Chain, B.M. 2009. *Immunology At a Glance 9th Edition*. Blackwel Publishing Ltd.

Qiong, W. 2015. Optimizing Perfusion-Decellularization Methods of Porcine Livers for Clinical-Scale Whole-Organ Bioengineering. *Hindawi Publishing Corporation BioMed. Research International Volume 2015, Article ID 785474, 9*. <<http://dx.doi.org/10.1155/2015/785474>> [Diakses tanggal 15 November 2015]

Ramos, V.J.A. 2005. Technical Aspects of Immunochemistry. *Vet Path.* 42/2 PP. 405-26.

Roger, V.L. 2007. Epidemiology of Myocardial Infarction. *Med. Clin. North Am.* 200 ;91:537.

Sondell, M., Lundborg, G., and Kanje, M. 1998. Regeneration of There Rat Sciatic Nerve Into Allografts Made Acellular Through Chemical Extraction. *Brain Res.* 795: 44-54.

Thaler, M.S., 2009. Basics & Hypertrophy of Heart. *The Only ECG Book You'll Ever Need*, 5th ed. USA: Lippncott Williams & Wilkins, 9-90.

Tortora, G.J. dan Derrickson, B.H. 2009. *Principles of Anatomy and Physiology*. 12th Edition. Asia: Wiley

Waly, T. M. 2014. Prevalensi Pasien Infark Miokard Akut yang Menjadi Cardiac Arrest di Icu/Hcu Rsup Dr. Kariadi Semarang. Program Pendidikan Sarjana Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. *Jurnal Media Medika Muda* : Hal 2.

Wang, B., Borazjani., A., Tahai, M., De Jongh Curry, A.L., Simioescu,D.T., Guan, J., To, F., Elder, S.H., and Liao, J. 2010. Fabrication of Cardiac Patch with Decellularized Porcine Myocardial Scaffold and Bone Marrow Mononuclear Cells. *J. Biomed Res A*. 94 (4) : 1100-1110.

WHO (World Health Organization). 2015. Cardiovascular Diseases (CVDs). <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>> [diakses tanggal 8 Juni 2015]

Wong, M.L., Leach, K.J. Athanasiou, K. A. and Griffiths, L.G., 2011. *The Role of Protein Solubilization in Antigen Removal from Xenogeneic Tissue for Heart Valve Tissue Engineering*, *Biomaterials* 32: 8129-8138h.

Wong, M.L., and Griffiths, L.G. 2014. Immunogenicity In Xenogeneic Scaffold Generation: Antigen Removal Vs. Decellularization. *J Acta Biomaterialia* 10 (2014) 1806–1816.

Zafari A. Maziar. 2015. *Myocardial Infarction*. <<http://emedicine.medscape.com/article/155919-overview>> [diakses 11 Januari 2016]



LAMPIRAN



Lampiran 1. Sertifikat Laik Etik



KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARENCE"

No: 435-KEP-UB

KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:

PENELITIAN BERJUDUL : PEMERIKSAAN RESPON IMUN INNATE TERHADAP
DINDING JANTUNG DOMBA ACELLULAR PASCA
PERLAKUAN TEKNIK ANTIGEN REMOVAL (AR)
MELALUI IMPLANTASI SUBCUTAN MENCIT BALB/C
GUNA UJI BIKOMPABILITAS

PENELITI : FIKTOR MAHARDIKA

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

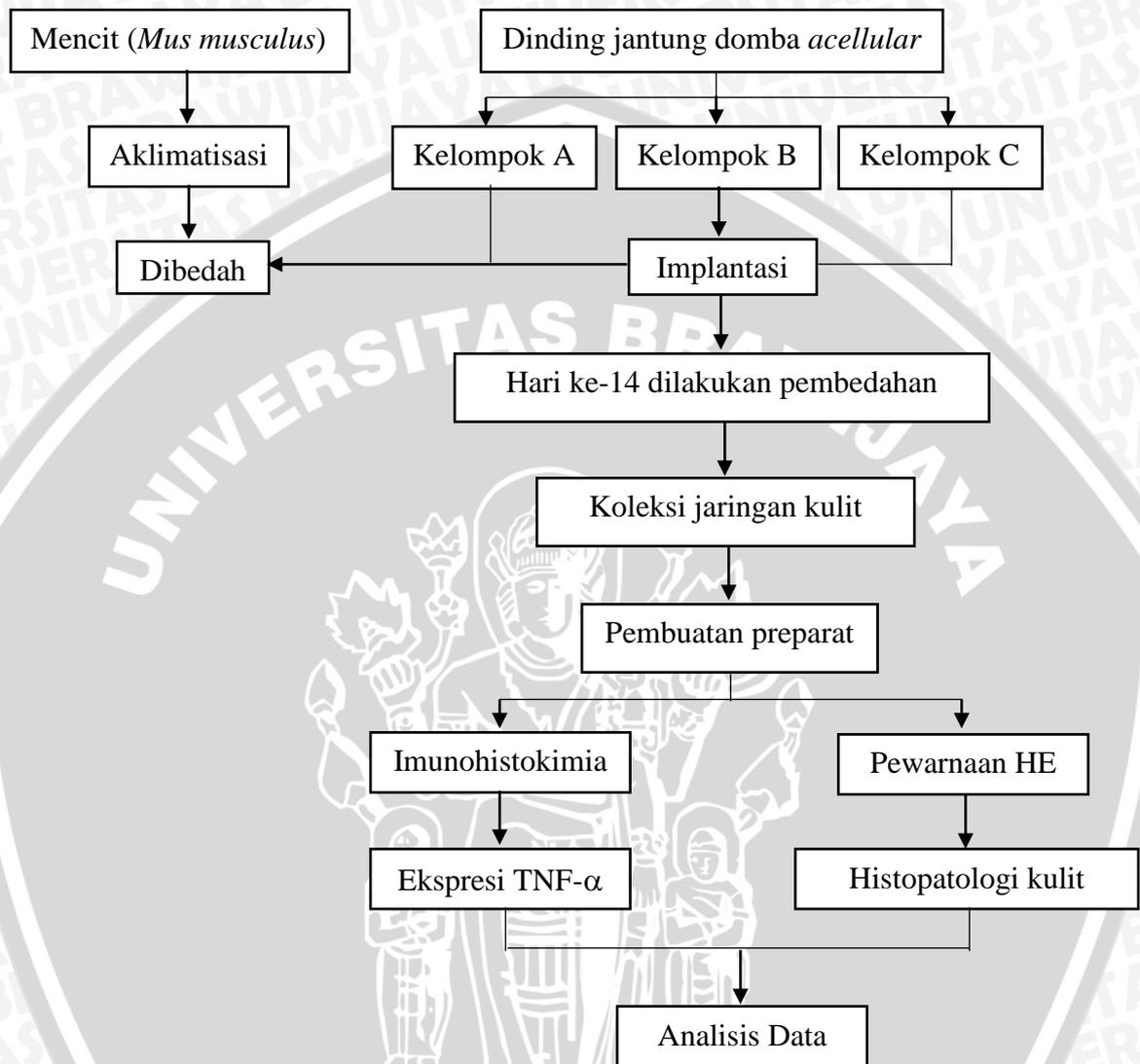
Malang, 20 Oktober 2015
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya



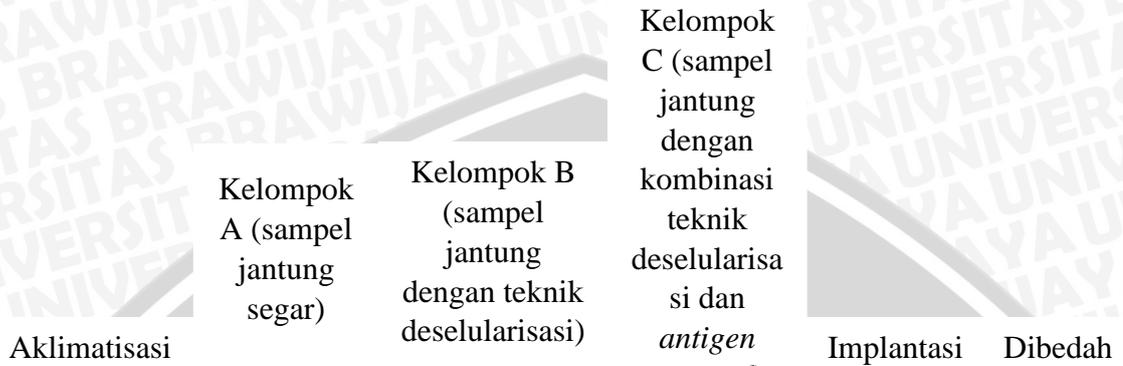
Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES.
NIP. 19600903 198802 2 001



Lampiran 2. Kerangka Operasional Penelitian



Lampiran 3. Rancangan Perlakuan



Keterangan:

- Hari ke-1 hingga ke-7 hewan diadaptasikan dengan lingkungan laboratorium
- Hari ke-8 sampel jantung segar dipreparasi
- Hari ke-12 sampel jantung direndam dalam larutan deselularisasi (DES) dengan komposisi 0,1% *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS), 0,01% Tripsin, 20 µg/ml RNase dan 0,2 mg/ml DNase
- Hari ke-30 sampel dinding jantung yang direndam dalam larutan *antigen removal* (AR) dengan komposisi 100 mM DTT, 2 mM MgCl₂ dan 100 mM KCl dalam PBS
- Hari ke-32 dilakukan implantasi sampel dinding jantung pada subkutan mencit
- Hari ke-46 dilakukan pembedahan untuk semua kelompok yang selanjutnya akan dilakukan analisis data berupa pengamatan histopatologi jaringan subkutan dan ekspresi TNF-α



Lampiran 4. Preparasi Jantung Domba Segar

Jantung Domba

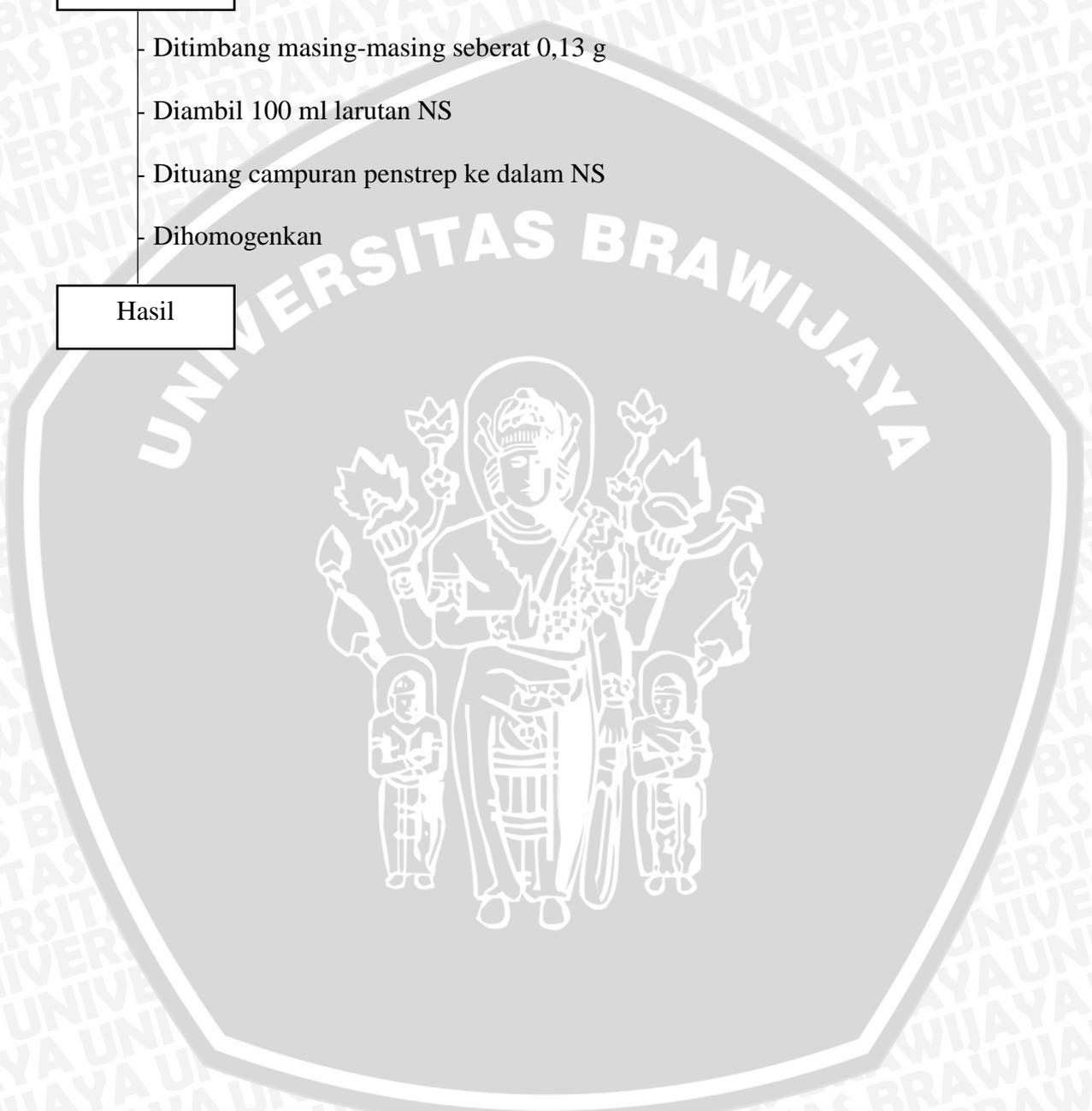
- Diambil bagian ventrikel kiri
- Dipotong dengan ukuran 15 x 2 x 15 mm
- Dimasukkan masing-masing sampel ke dalam pot sampel
- Dituangkan larutan penstrep ke dalam pot sampel
- Disimpan di suhu 4⁰ C

Hasil



Lampiran 5. Pembuatan Larutan Penstrep**Bahan**

- Ditimbang masing-masing seberat 0,13 g
- Diambil 100 ml larutan NS
- Dituang campuran penstrep ke dalam NS
- Dihomogenkan

Hasil

Lampiran 6. Pembuatan *Phospat Buffer Saline* (PBS) 1 L

Bahan

- Ditimbang KCl seberat 0,2 g
- Ditimbang KH_2PO_4 seberat 0,2 g
- Ditimbang NaCl seberat 8 g
- Ditimbang Na_2HPO_4 seberat 2,16 g
- Dicampur masing-masing bahan ke dalam 1000 ml aquadest
- Dihomogenkan dengan *magnetic stirer*
- Diukur hingga mencapai pH 7,4

PBS



Lampairan 7. Pembuatan Larutan Deselularisasi

Bahan

- Ditimbang tripsin seberat 0,1 g
- Ditimbang SDS seberat 1 g
- Ditimbang Rnase seberat 0,02 g
- Ditimbang Dnase seberat 0,2 g
- Dicampur dalam PBS 1 L
- Dihomogenkan

Larutan DES

Rumus perhitungan Trypsin 0,01% :

$$\frac{0,01g}{100ml} = \frac{x}{1000ml}$$

$$x = 0,1 \text{ gram}$$

Rumus perhitungan DNase 0,2mg/ml:

Dibutuhkan 1000 ml,

$$0,2 \text{ mg/ml} \times 1000 \text{ ml} = 200\text{mg} = 0.2 \text{ g}$$

Rumus perhitungan SDS 0,1% :

$$\frac{0,1g}{100ml} = \frac{x}{1000ml}$$

$$x = 1 \text{ gram}$$

Rumus perhitungan Rnase 20 µg/ml

Dibutuhkan 1000 ml

$$20 \mu\text{g} / \text{ml} \times 1000 \text{ ml} =$$

$$20000 \mu\text{g} = 0.02 \text{ g}$$

Lampiran 8. Pembuatan Larutan *Antigen Removal*

Massa Molekul (Mr) KCl = 74,55 g/mol

Massa Molekul (Mr) DTT = 154,253 g/mol

Massa Molekul (Mr) MgCl₂ = 95 g/mol

$$M = \frac{n}{V}$$

$$n = \frac{g}{Mr}$$

$$V = \frac{1}{1000}$$

$$M = \frac{\frac{g}{mr}}{\frac{1}{1000}}$$

$$M = \frac{g}{mr} \times \frac{1000}{1}$$

Rumus Molaritas $\rightarrow M = \frac{\text{gram}}{Mr} \times \frac{1000}{ml}$

1. Rumus perhitungan KCl 100 mM :

$$M = \frac{\text{gram}}{Mr} \times \frac{1000}{ml}$$

$$0,1M = \frac{x \text{ g}}{74,55} \times \frac{1000}{500}$$

$$x = 3,73 \text{ g}$$

2. Rumus perhitungan MgCl₂ 2 mM :

$$M = \frac{\text{gram}}{Mr} \times \frac{1000}{ml}$$

$$0,002 M = \frac{x \text{ g}}{95} \times \frac{1000}{500}$$

$$x = 0,095 \text{ g}$$

3. Rumus perhitungan DTT 100 mM :

$$M = \frac{\text{gram}}{Mr} \times \frac{1000}{ml}$$

$$0,1 M = \frac{x \text{ g}}{154,253} \times \frac{1000}{500}$$

$$x = 7,71 \text{ g}$$

Bahan

- Ditimbang KCl seberat 3,73 g
- Ditimbang $MgCl_2$ seberat 0,095 g
- Ditimbang DTT seberat 7,71` g
- Dicampur masing-masing bahan kedalam 500 ml larutan PBS dalam aquadest
- Dihomogenkan dengan *magnetic stirer*

Larutan AR

Lampiran 9. Prosedur Implantasi Mencit

Alat & Bahan

- Disiapkan alat-alat bedah (*dissecting set*) dan bahan (kapas)
- Dibungkus dengan koran
- Disterilisasi dengan autoclave selama satu jam

Hasil

Mencit

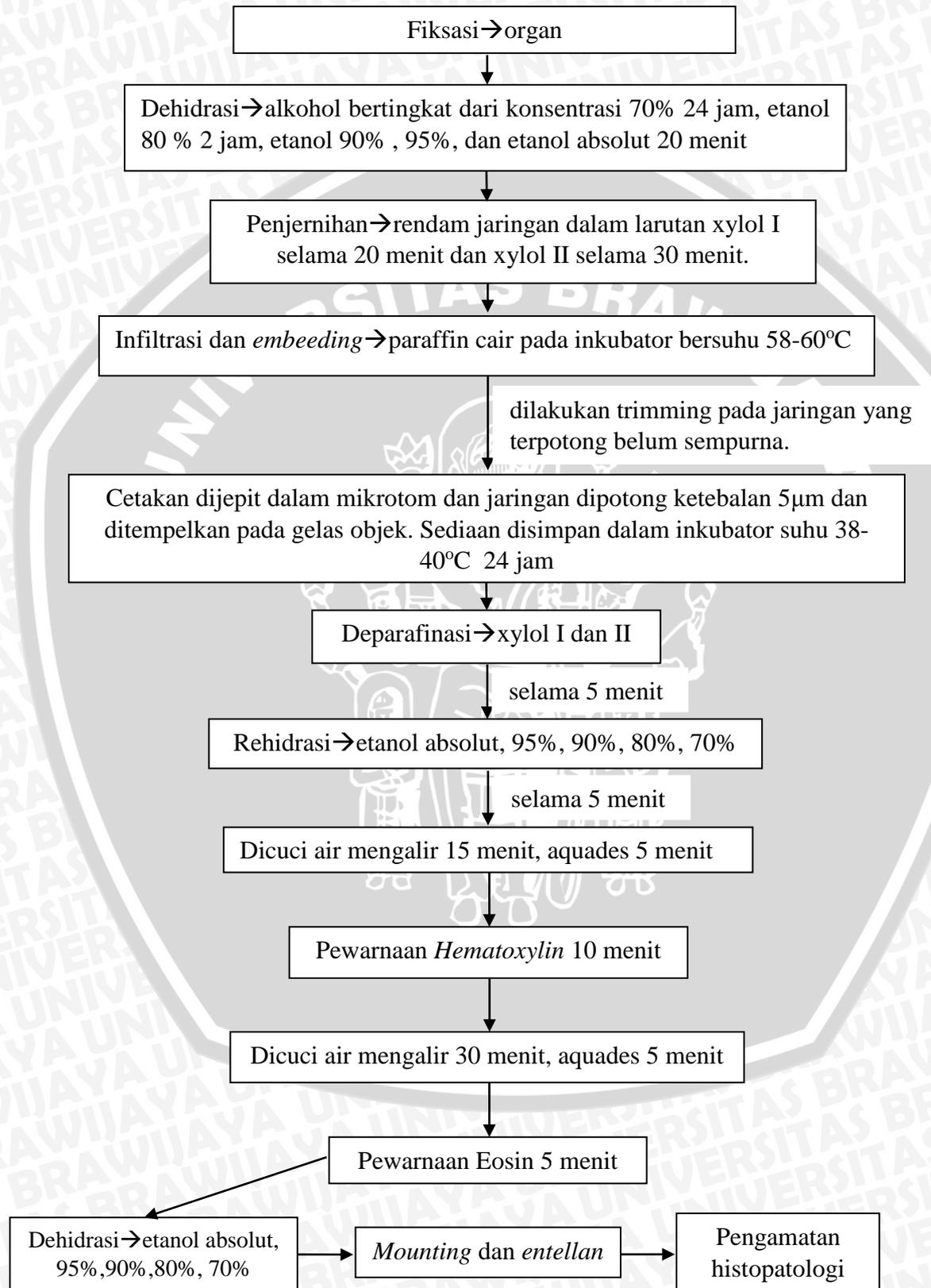
- Ditimbang BB dan dicatat pada kertas label
- Dihitung dosis obat anestesi
- Dilakukan penyuntikan mencit sesuai dengan perhitungan dosis melalui subkutan mencit
- Ditunggu hingga mencit memasuki stadium pembedahan ± 15 menit
- Dilakukan pencukuran rambut pada lapisan punggung (thoraco dorsal) yang telah dibasahi dengan alkohol terlebih dahulu
- Dibersihkan area yang telah bersih dicukur dengan alkohol 70%
- Dilakukan insisi sekitar 1,5 cm pada daerah punggung
- Dipreparir subkutan mencit untuk memperluas area implan
- Disiapkan sampel yang akan diimplan dengan merendamnya pada larutan penstrep terlebih dahulu
- Dimasukkan sampel ke dalam area implan

- Diteteskan sedikit demi sedikit larutan penstrep
- Dilakukan penjahitan dengan pola jahitan *simple interrupted*
- Diberikan tetesan iodine setelah selesai penutupan jahitan

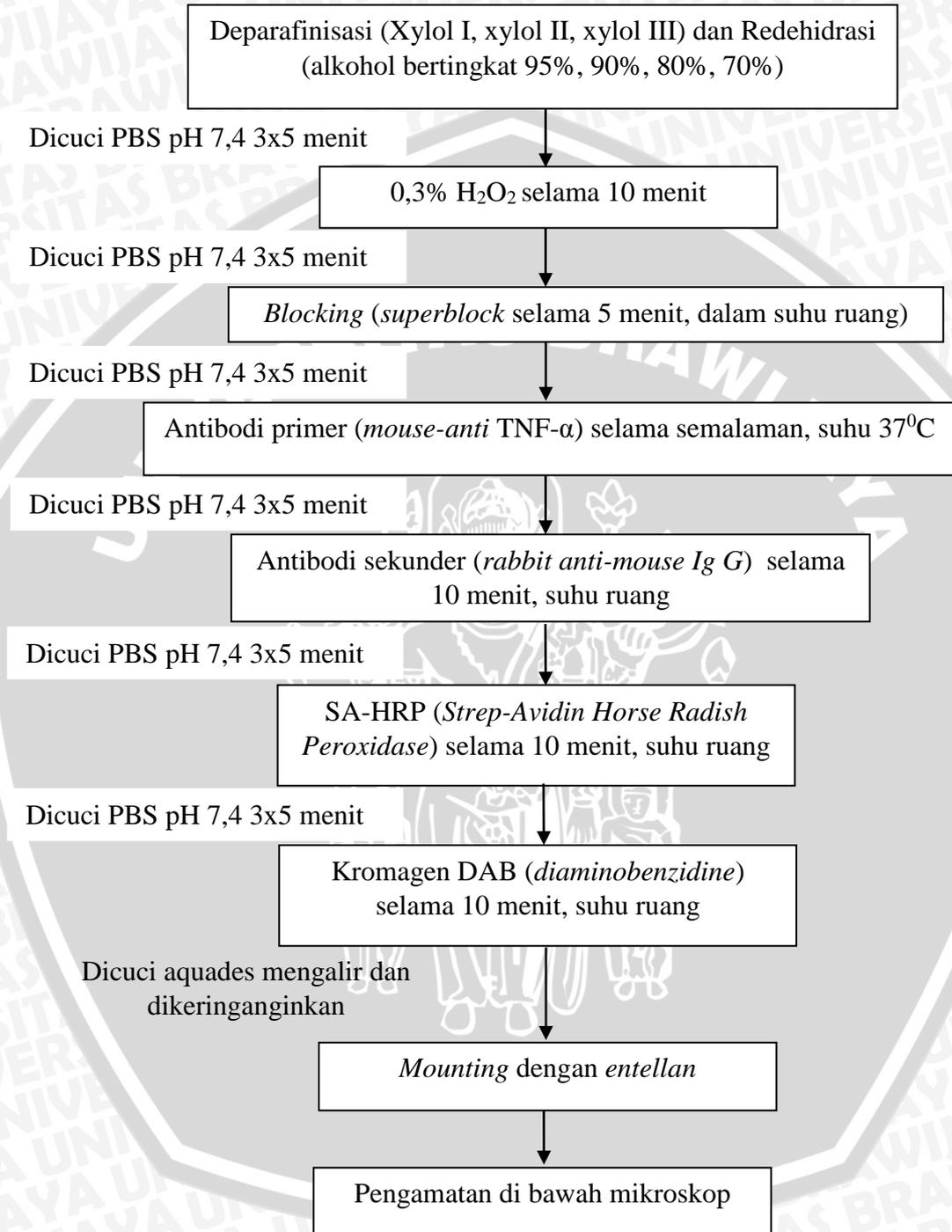
Hasil



Lampiran 10. Metode Pembuatan Preparat HE (Junquiera & Carneiro, 2007)



Lampiran 11. Metode Imunohistokimia (Ramos, 2005)



Lampiran 12. Data Hasil TNF- α

Perlakuan	Ulangan	F1	F2	F3	F4	F5	Total	Rata-rata
P1	U1	71,6	87,5	78,6	77,5	77,3	392,5	78,5
	U1	80	76,6	76,3	80	80	392,9	78,58
	U1	80	77,9	80	80	78,5	396,4	79,28
	U1	78,6	80	79,7	79,7	79,5	397,5	79,5
	U1	73,7	80	78,5	80	73,8	386	77,2
	U1	73,5	73,9	78,9	79,9	86,4	392,6	78,52
P2	U2	26,8	27,6	29	29,2	28,8	141,4	28,28
	U2	24,1	27,8	32,4	27,3	30,8	142,4	28,48
	U2	31,5	27,7	30,2	27,3	21,8	138,5	27,7
	U2	23,7	28,2	27,2	27,9	27	134	26,8
	U2	23,7	26,1	24,9	28,7	27,3	130,7	26,14
	U2	29,3	29,1	31,1	24	22,8	136,3	27,26
P3	U3	3,3	3,2	3,2	3,7	3,3	16,7	3,34
	U3	5,6	5,3	2,9	2,9	2,6	19,3	3,86
	U3	3,2	3,1	3,9	4	3,3	17,5	3,5
	U3	2,5	3	3,1	3,4	5,3	17,3	3,46
	U3	3,7	3,1	3,1	2,9	2,9	15,7	3,14
	U3	2,7	3,3	3,1	3,4	2,8	15,3	3,06



Lampiran 13. Perhitungan Penurunan Ekspresi *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α)

Kelompok 2 (Perlakuan Deselularisasi)

$$\begin{aligned} \text{Ekspresi TNF-}\alpha \text{ (\%)} &= \frac{\text{rataan segar} - \text{rataan DES}}{\text{rataan segar}} \times 100\% \\ &= \frac{78,59 - 27,44}{78,59} \times 100\% \\ &= 65,08 \% \end{aligned}$$

Kelompok 3 (Perlakuan Deselularisasi + *Antigen Removal*)

$$\begin{aligned} \text{Ekspresi TNF-}\alpha \text{ (\%)} &= \frac{\text{rataan segar} - \text{rataan DES+AR}}{\text{rataan segar}} \times 100\% \\ &= \frac{78,59 - 3,39}{78,59} \times 100\% \\ &= 95,68 \% \end{aligned}$$

Lampiran 14. Hasil Uji Statistika Ekspresi *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α) dengan aplikasi SPSS for Window 22

1. Uji Deskriptif

Descriptives

Ekspresi TNF- α

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	6	78,5967	,80612	,32910	77,7507	79,4426	77,20	79,50
2	6	27,4433	,89294	,36454	26,5062	28,3804	26,14	28,48
3	6	3,3933	,28696	,11715	3,0922	3,6945	3,06	3,86
Total	18	36,4778	32,27534	7,60737	20,4276	52,5279	3,06	79,50

2. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Ekspresi TNF- α

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,128	2	15	,154

Hasil pengujian homogenitas menunjukkan nilai signifikansi (p) sebesar 0,154. Oleh karena nilai $p > 0,05$, maka H_0 diterima dan dapat disimpulkan bahwa data yang digunakan mempunyai ragam yang homogen.

Pengujian nilai homogenitas dan nilai normalitas sampel telah memenuhi asumsi sehingga pengujian dengan menggunakan ANOVA dapat dilanjutkan.

3. Uji Statistika ANOVA

ANOVA

Ekspresi TNF- α

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	17701,215	2	8850,607	17359,578	,000
Within Groups	7,648	15	,510		
Total	17708,862	17			

Hasil uji statistika ANOVA didapatkan nilai signifikansi (p) sebesar 0,000. Oleh karena $p < 0,05$ maka H_0 ditolak, yang berarti bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antar perlakuan.

4. Uji Lanjutan Beda Nyata Jujur (BNJ) atau Uji Tukey

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Ekspresi TNF- α

Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	51,15333*	,41225	,000	50,0825	52,2241
	3	75,20333*	,41225	,000	74,1325	76,2741
2	1	-51,15333*	,41225	,000	-52,2241	-50,0825
	3	24,05000*	,41225	,000	22,9792	25,1208
3	1	-75,20333*	,41225	,000	-76,2741	-74,1325
	2	-24,05000*	,41225	,000	-25,1208	-22,9792

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

Ekspresi TNF- α

Tukey HSD^a

Kelompok	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
3	6	3,3933		
2	6		27,4433	
1	6			78,5967
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

5. Uji Normalitas Data

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Ekspresi TNF- α
N		18
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	36,4778
	Std. Deviation	32,27534
Most Extreme Differences	Absolute	,265
	Positive	,265
	Negative	-,230
Test Statistic		,265
Asymp. Sig. (2-tailed)		,062 ^c

a. Test distribution is Normal.

Berdasarkan uji normalitas, maka disimpulkan distribusi data bersifat normal.



Lampiran 15. Perhitungan Pemberian Amoxicillin pada Mencit

Volume : 20 ml

Konsentrasi : $\frac{500 \text{ mg}}{1500 \text{ ml}} = \frac{1 \text{ mg}}{3 \text{ ml}}$

$$V = \frac{\text{Berat Badan (kg)} \times \text{Dosis } \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}}\right)}{\text{konsentrasi } \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right)}$$

$$20 \text{ ml} = \frac{25 \text{ g} \cdot x \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right)}{\frac{1}{3} \text{ mg/ml}}$$

$$25 \text{ g} \cdot x = 20 \text{ ml} \times \frac{1}{3} \text{ mg/ml}$$

$$x = 20 \text{ mg} \times \frac{1000}{75} \text{ kg}$$

$$x = 266,6 \text{ mg/kg}$$

$$x = 0,27 \text{ g/kg}$$

