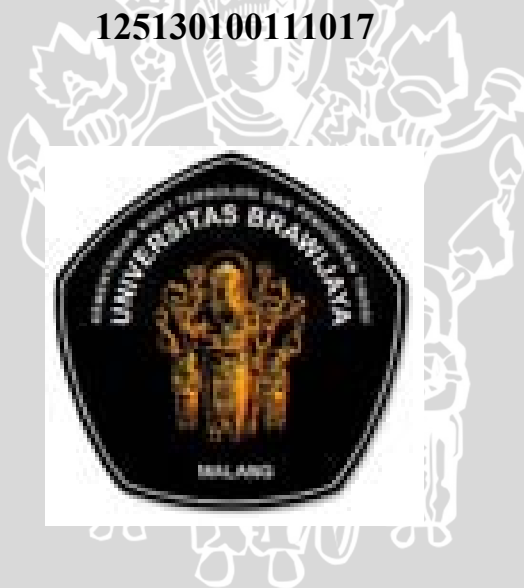


PENGARUH PENGGUNAAN TEKNIK *ANTIGEN REMOVAL*
(AR) PADA DINDING JANTUNG *ACELLULAR* TERHADAP
EKSPRESI *INTERLEUKIN-1 BETA* (IL-1 β) DAN JUMLAH
SEL RADANG DI SUBKUTAN MENCIT PADA UJI
BIOKOMPABILITAS RESPON IMUN AKUT

SKRIPSI

Oleh :
FIKTOR MAHARDIKA
125130100111017



PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2016

PENGARUH PENGGUNAAN TEKNIK *ANTIGEN REMOVAL*
(AR) PADA DINDING JANTUNG *ACELLULAR* TERHADAP
EKSPRESI *INTERLEUKIN-1 BETA* (IL-1 β) DAN JUMLAH
SEL RADANG DI SUBKUTAN MENCIT PADA UJI
BIOKOMPABILITAS RESPON IMUN AKUT

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :
FIKTOR MAHARDIKA
125130100111017



PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2016

LEMBAR PENGESAHAN PROPOSAL SKRIPSI

Pengaruh Penggunaan Teknik *Antigen Removal* (AR) pada Dinding Jantung *Acellular* Terhadap Ekspresi *Interleukin-1 Beta* (IL-1 β) dan Jumlah Sel Radang di Subkutan Mencit Pada Uji Biokompabilitas Respon Imun Akut

Diusulkan Oleh :

Fiktor Mahardika 125130100111017

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji pada tanggal 19 Agustus 2016 dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

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

drh. Fajar Shodiq Permata, M. Biotech
NIP. 19870501 201504 1 001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

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

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Fiktor Mahardika
NIM : 125130100111017
Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan
Penulis Skripsi berjudul : Pengaruh Penggunaan Teknik *Antigen Removal* (AR) Pada Dinding Jantung *Acellular* Terhadap Ekspresi *Interleukin-1 Beta* (IL-1 β) dan Jumlah Sel Radang di Subkutan Mencit Pada Uji Biokompabilitas Akut

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari skripsi yang saya buat benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi 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, 17 Agustus 2016
Yang menyatakan,

(FIKTOR MAHARDIKA)
NIM. 125130100111017

repository.ub.ac.id

Pengaruh Penggunaan Teknik *Antigen Removal* (AR) pada Dinding Jantung *Acellular* Terhadap Ekspresi *Interleukin-1 Beta* (IL-1 β) dan Jumlah Sel Radang di Subkutan Mencit *Balb-C* Pada Uji Biokompabilitas Respon Imun Akut

ABSTRAK

Infark Miokard Akut atau IMA merupakan manifestasi lanjut dari penyakit jantung yang ditandai dengan adanya nekrosis otot jantung sehingga perlu adanya jaringan otot jantung baru berasal dari domba (*Xenograft*) yang digunakan sebagai *Scaffold*. Jaringan domba dipilih sebagai jaringan xenograft karena ditujukan untuk masyarakat muslim di Indonesia. Namun *Xenograft* mampu memicu reaksi imun karena adanya xenoantigen. Metode untuk menghilangkan xenoantigen pada *scaffold* yaitu menggunakan teknik Deselularisasi dengan SDS dan *Antigen Removal* (AR) dengan bahan DTT dan KCL pada dinding jantung domba. Sampel berupa dinding jantung domba yang disegmentasi dengan ukuran 15x15x2 mm, dengan jumlah sampel sebanyak 21 yang dibagi dalam 3 kelompok yaitu kelompok kontrol (Segar), kelompok Deselularisasi, dan kelompok Deselularisasi + AR kemudian di implantasi di subkutan mencit selama 2 minggu. Indikator yang dilihat yaitu berupa penurunan Ekspresi IL-1 β menggunakan pewarnaan imunohistokimia (IHK) dan penurunan Jumlah Sel Radang di jaringan subkutan mencit menggunakan preparat histopatologi dengan pewarnaan *Hematoxylin-Eosin* (HE), kemudian hasil dianalisis menggunakan ANOVA dan tes *Tukey* dengan $p < 0,05$. Penelitian ini memberikan penurunan yang signifikan ($p < 0,05$) yaitu berupa penurunan rerata \pm SD persentase area ekspresi IL-1 β (86,85% \pm 14,83^a; 40,10% \pm 16,31^b; 5,93% \pm 2,86^c) dan penurunan rerata \pm SD jumlah sel radang (203,17 \pm 28,52^a; 84,67 \pm 12,37^b; 37,83 \pm 9,09^c) sel di area implantasi pada setiap kelompok perlakuan. Kesimpulan dari penelitian ini yaitu kombinasi teknik Deselularisasi dan Antigen Removal (AR) mampu menurunkan respon imun ditandai dengan menurunnya Sitokin proinflamasi yaitu IL-1 β sebesar 93,1 % dan 85,2 % dan jumlah sel radang sebesar 81% dan 55,3 % dibandingkan dengan sampel segar dan sampel yang diberi perlakuan deselularisasi pada uji biokompabilitas respon imun akut di jaringan subcutan mencit balb/c. Jaringan domba dapat digunakan sebagai scaffold dan dikombinasikan dengan stem sel.

Kata kunci : *Scaffold*, *Xenograft*, Deselularisasi, *Antigen Removal*, IL-1 β

repository.ub.ac.id

Effect of the Antigen Removal Technique on Myocardial Acellular Tissue based on Interleukin-1 Beta (IL-1 β) Expression and Inflammatory Cell Number in Subcutaneous Tissue of Mice on Acute Immune Response Biocompatibility Test

ABSTRACT

Myocardial Infraction is the further manifestation of heart disease that is marked by necrosis of the myocardial tissue. Therefore, it needs myocardial replacement as myocardial neotissue engineered. Neotissue could be xenograft tissue for scaffold. Sheep (ovine) was chosen as xenograft source due to special needs of graft for muslim society in Indonesia. However, the xenograft could trigger an immune response because there are traces of xenoantigen. The methods used to remove xenoantigens were Decellularization using SDS and Antigen Removal (AR) processing using DTT and KCl to ovine myocardial tissue. Then, the sampel segmented ovine myocard tissues (dimension 15x15x2mm) were implanted to subcutaneous tissue of mice Balb/c for 2 weeks as in vivo biocompatibility test to detect acute immune rejection. There are 3 groups of mice; group I : fresh tissue implant, group 2: decellularized tissue implant, group 3: decellularized+AR tissue implant. The indicator in this study were cytokine proinflammatory (IL-1 β) expression using Immunohistochemistry and the number of cell inflammation in implanted tissue based on histological slide with Hematoxyline-Eosin (HE) staining, the result were analyzed using ANOVA and TUKEY test. The result of this study was the use of Antigen Removal techniques combined Decellularization could significantly reduce ($p < 0.05$) the expresion IL-1 β (86,85% \pm 14,83^a; 40,10% \pm 16,31^b; 5,93% \pm 2,86^c) and number infiltrated cell immune (203,17 \pm 28,52; 84,67 \pm 12,37; 37,83 \pm 9,09) in implant area each group respectively. The conclusion of this study was the application of the combination antigen removal and decellularization methods could reduce IL-1 β expression by to 93,1% and 85,2 and the number of Inflammatory Cells by 81 % and 55,3 % compared with fresh tissue and Decellularized tissue implant of recipient against ovine derived myocardial xenotissue in subcutaneus of mice. The tissue would be prototype as scaffold, and next step would try to recellularize with human stem cell.

Keywords : Scaffold, Xenograft, Decellularized, Antigen Removal, IL-1 β

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT Tuhan Yang Maha Esa karena telah memberikan rahmat dan karunia-Nya sehingga Skripsi yang berjudul : **Pengaruh Penggunaan Teknik *Antigen Removal* (AR) pada Dinding Jantung Acellular Terhadap Ekspresi *Interleukin-1 beta* (IL-1 β) dan Jumlah Sel Radang di Subkutan Mencit Pada Uji Biokompabilitas Respon Imun Akut** telah selesai dilaksanakan. Sholawat serta salam semoga tetap dicurahkan kepada Nabi Muhammad SAW. Naskah skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan. Penelitian ini adalah hibah penelitian mahasiswa yang dibimbing oleh drh. Fajar Shodiq Permata, M. Biotech yang didanai oleh PHK PMA tahun 2015.

Dalam penyusunan skripsi ini penulis ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh, DES Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya selaku dosen pembimbing pertama atas bimbingan, kesabaran, fasilitas, dan waktu yang telah diberikan.
2. drh. Fajar Shodiq Permata, M. Biotech sebagai dosen pembimbing kedua atas segala bantuan, kesempatan, nasihat, dan arahan yang diberikan tiada hentinya kepada penulis.
3. drh. Indah Amalia Amri, M.Si selaku dosen yang membantu dalam proses penelitian penulis hingga selesai.

4. Agri Kaltaria Anisa, S. Farm, Apt. selaku dosen penguji atas kritik dan saran yang diberikan kepada penulis
5. Orangtua tercinta Supeno Hadi dan Sukarmi S.Pd.,M.Pd, serta Kakak tercinta yang sangat istimewa dalam memberikan dukungan, bantuan, semangat, doa dan motivasi yang diberikan kepada penulis.
6. Seluruh teman di VENA12, teman-teman kelompok penelitian Amelda Kurnia Esty Vera, Sonya Budiarto, Bangun Dwi Yulian yang senantiasa memberikan saran, kritik, motivasi semangat, inspirasi, bantuan, kebersamaan, keceriaan dan semua hal yang sangat luar biasa.
7. Program Hibah Kemahasiswaan/Peningkatan Mutu Akademik (PHK/PMA) atas bantuan dana yang telah diberikan kepada kami untuk mendukung proses penelitian tersebut.
8. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan karya tulis ini yang tidak sempat disebutkan.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan proposal skripsi ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis membuka diri untuk segala saran dan kritik yang membangun. Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan dan Skripsi ini dapat memberikan manfaat dan wawasan tidak hanya bagi penulis namun juga bagi pembaca.

Malang, Maret 2016

Fiktor Mahardika

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG	xii
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	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Infark Miokardium	6
2.1.1 Definisi	6
2.2 Mencit (<i>Balb/C</i>)	7
2.3 <i>Xenograft</i>	9
2.4 Respon Imun Jaringan <i>Xenograft</i>	9
2.5 Respon Imun Akut	11
2.6 <i>Interleukin 1 beta</i> (IL-1 β)	13
2.7 Deselularisasi	14
2.8 <i>Antigen Removal</i>	15
2.9 <i>Xenograft</i> dari domba	16
BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN	17
3.1 Kerangka Konseptual	17
3.2 Hipotesis Penelitian	21
BAB 4. METODE PENELITIAN	22
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	22
4.2 Alat dan Bahan Penelitian	22
4.2.1 Alat Penelitian	22
4.2.2 Bahan Penelitian	23
4.2.3 Bahan Kimia	24
4.3 Tahapan Penelitian	24
4.3.1 Penetapan Sampel Penelitian	24
4.3.2 Rancangan Penelitian	25
4.3.3 Variabel Penelitian	26
4.4 Prosedur Penelitian	28
4.4.1 Persiapan Hewan Percobaan	28
4.4.2 Preparasi dan koleksi Sampel	28
4.4.3 Pembagian Kelompok Sampel	28
4.4.4 Perlakuan Deselularisasi	29
4.4.5 Perlakuan Antigen Removal	29

4.4.6 Uji Biokompabilitas in Vivo.....	30
4.4.7 Pengamatan Histopatologi Kulit	30
4.4.8 Metode pembuatan preparat HE	31
4.4.9 Metode pewarnaan HE guna melihat sel radang	32
4.4.10 Pengamatan Sel Radang di Subkutan Mencit	33
4.4.11 Metode pewarnaan IHK guna melihat Ekspresi IL-1 β	34
4.5 Analisa Data	36
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN	37
5.1 Gambaran Makroskopis Perlakuan Deselularisasi dan <i>Antigen Removal</i> Terhadap Dinding Jantung <i>Acellular</i> Sebelum Implantasi	37
5.2 Gambaran Mikroskopis Perlakuan Deselularisasi dan <i>Antigen Removal</i> Terhadap Dinding Jantung <i>Acellular</i> Sebelum Implantasi	39
5.3 Gambaran Makroskopis Perlakuan Deselularisasi dan <i>Antigen Removal</i> Terhadap Dinding Jantung <i>Acellular</i> Pasca Implantasi	41
5.4 Gambaran Mikroskopis Perlakuan Deselularisasi dan <i>Antigen Removal</i> Terhadap Subkutan Mencit <i>Balb/C</i> Pasca Implantasi	45
5.5 Pengaruh Penggunaan Teknik <i>Antigen Removal</i> (AR) Pada Dinding Jantung <i>Acellular</i> Terhadap Ekspresi <i>Interleukin 1 beta</i> Di Subkutan Mencit Pada Uji Biokompabilitas Respon Imun Akut	48
5.6 Pengaruh Penggunaan Teknik <i>Antigen Removal</i> (AR) Pada Dinding Jantung <i>Acellular</i> Terhadap Jumlah Sel Radang Di Subkutan Mencit Pada Uji Biokompabilitas Respon Imun Akut.....	54
5.7 Implikasi Penggunaan Teknik <i>Antigen Removal</i> terhadap <i>Xenograft</i>	56
BAB 6. PENUTUP	59
6.1 Kesimpulan	59
6.2 Saran	59
DAFTAR PUSTAKA	60
LAMPIRAN	64

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.3 Berbagai jenis penolakan respon imun di jaringan <i>Xenotransplantasi</i>	10
4.1 Rancangan Kelompok Penelitian	26
5.1 Ekspresi IL-1 β pada preparat Histopatologi Subkutan mencit	50
5.2 Presentase Homogenitas Protein Kolagen tipe III	52
5.3 Pengaruh penggunaan AR pada dinding jantung Acellular terhadap jumlah sel radang	55



DAFTAR GAMBAR

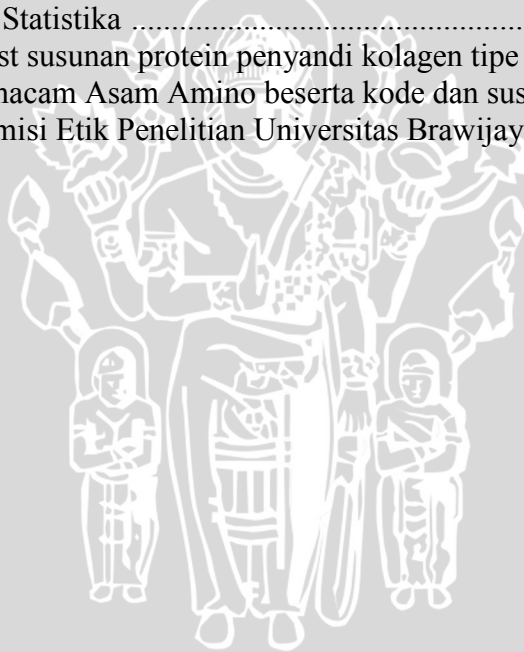
	Halaman
2.1 Makroskopis Infark Myokardium Akut	7
2.2 Mencit Mus musculus Galur <i>Balb/C</i>	8
2.3 Skema Kerja Inflamasi Akut	12
2.5 Sel makrofag penghasil IL-1	13
2.6 Struktur kimia SDS dan EDTA	15
3.1 Kerangka Konseptual	20
4.1 Sel Mononuklear (MN) dan Sel Polimorfonuklear (PMN).....	34
5.1 Gambar Makroskopis Dinding Jantung Domba.....	37
5.2 Gambaran histopatologi sampel dinding jantung domba sebelum di implantasi di subkutan mencit	40
5.3 Jaringan kulit mencit dan sampel dinding jantung pasca nekropsis mencit Balb/C dengan mengambil bagian jaringan implan dan 2 cm kulit disekitar area implan	42
5.4 Gambaran histopatologi subkutan kulit pasca implantasi di jaringan subkutan mencit Balb/C dengan perbesaran 40x lensa objektif.....	46
5.5 Gambaran histopatologi pewarnaan IHC IL-1 β subkutan kulit pasca implantasi di jaringan subkutan mencit Balb/C	49
5.6 Grafik Rata-Rata Jumlah Sel Radang pada tiap Kelompok Perlakuan	56





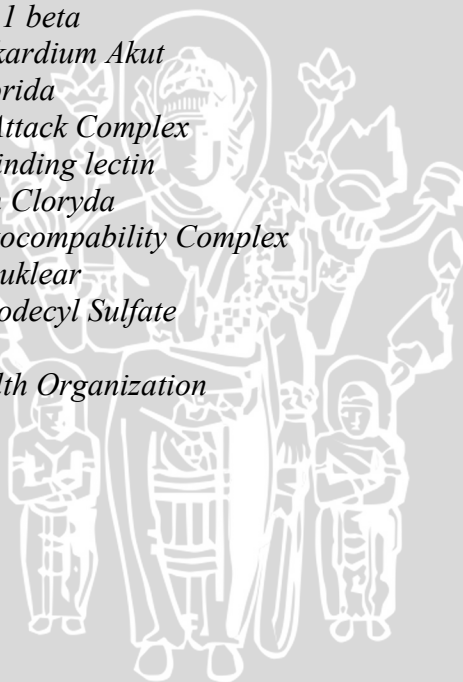
DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Diagram Alir Tahapan Penelitian	65
Lampiran 2 Pembuatan Kandang Mencit	66
Lampiran 3 Preparasi Jantung Domba	66
Lampiran 4 Pembuatan larutan PBS 1 liter	67
Lampiran 5 Pembuatan Larutan Deselularisasi sebanyak 1 liter	68
Lampiran 6 Pembuatan Larutan <i>Antigen Removal</i>	69
Lampiran 7 Cara Implantasi Subkutan Mencit	71
Lampiran 8 Cara pembuatan Preparat Histologi	72
Lampiran 9 Pewarnaan IHK	74
Lampiran 10 Pewarnaan HE	76
Lampiran 11 Data Ekspresi IL-1 β	77
Lampiran 12 Perhitungan penurunan Ekspresi IL-1 β	78
Lampiran 13 Hasil Uji Statistika Ekspresi IL-1 β	79
Lampiran 14 Data Jumlah Sel Radang	84
Lampiran 15 Perhitungan Penurunan Jumlah Sel Radang	84
Lampiran 16 Hasil Uji Statistika	85
Lampiran 17 Hasil Blast susunan protein penyandi kolagen tipe III	88
Lampiran 18 Macam-macam Asam Amino beserta kode dan susunan	89
Lampiran 19 Surat Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya	91



DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

ANOVA	: <i>Analysis of variance</i>
AR	: <i>Antigen Removal</i>
C	: <i>Complement</i>
DAB	: <i>Diaminobenzidine</i>
DMEM	: <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	: <i>Deoxynucleid Acid</i>
DTT	: <i>Dithiotreitol</i>
ECM	: <i>Extracellular Matrix</i>
EKG	: <i>Elektrokardiograf</i>
HRP	: <i>Horse Redish Peroxidase</i>
H ₂ O ₂	: <i>Hydrogen Peroxida</i>
IHC	: <i>Immunohisto Chemistry</i>
IL-1 β	: <i>Interleukin 1 beta</i>
IMA	: <i>Infark Miokardium Akut</i>
KCL	: <i>Kalium Clorida</i>
MAC	: <i>Membran Attack Complex</i>
MBL	: <i>Mannose binding lectin</i>
MgCl	: <i>Magnesium Clorida</i>
MHC	: <i>Mayor Histocompatibility Complex</i>
PMN	: <i>Polimorfonuklear</i>
SDS	: <i>Sodium Duodecyl Sulfate</i>
Sc	: <i>Subcutan</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit jantung merupakan penyakit dengan tingkat kematian tertinggi di dunia. WHO mencatat pada tahun 2015 sebesar 17,5 juta orang mengalami penyakit jantung, dan telah dilaporkan sebesar 31 % diantaranya mengalami kematian yang tersebar di seluruh dunia (WHO, 2015). Data statistik di rumah sakit seluruh Indonesia pada tahun 2002 menunjukkan bahwa kasus penyakit jantung iskemik merupakan kasus terbanyak pasien rawat inap maupun rawat jalan dibandingkan penyakit jantung lainnya dan diperkirakan terjadi 105 kematian akibat penyakit jantung iskemik per 100.000 penduduk pada tahun 2002 (Waly, 2014).

Infark miokard akut atau IMA adalah manifestasi lanjut dari penyakit jantung iskemik berupa kegagalan kerja jantung dan dapat menyebabkan kerusakan sel irreversibel serta nekrosis atau kematian otot jantung. IMA terjadi akibat oklusi atau sumbatan pada pembuluh darah koroner yang menyebabkan suplai darah sangat kurang dan ketersediaan oksigen untuk miokard berkurang sehingga terjadi nekrosis miokard. Bagian miokard yang mengalami nekrosis akan berhenti berkontraksi secara permanen, maka dapat mengganggu fungsi dari kerja jantung (Waly, 2014). Untuk mengganti miokard yang mengalami nekrosis perlu adanya jaringan otot jantung baru. Jaringan buatan yang dipilih dengan teknik *bottom up* yaitu jaringan yang digunakan berupa jaringan buatan diluar tubuh (Bell, 2000).

Pembuatan jaringan buatan miokard dilakukan secara *bottom up* yang membutuhkan *scaffold*. *Scaffold* dapat berupa jaringan yang diambil dari hewan (*Xenograft*). *Xenograft* memiliki keunggulan berupa ketersediaan bahan melimpah, dan secara ekonomi lebih terjangkau. Hewan domba dapat digunakan sebagai sumber jaringan *Xenograft* karena jumlah populasi domba di Indonesia yaitu sekitar 16 juta ekor (Dirjennak, 2016), dan penggunaan jaringan *Xenograft* menggunakan domba tidak akan terbentur oleh masalah agama yang mayoritas agama di Indonesia yaitu agama Islam. Namun penggunaan *Xenograft* harus dipertimbangkan faktor resiko yang mampu menimbulkan kegagalan implantasi, yaitu berupa adanya reaksi sistem imun. Reaksi imun terjadi karena adanya Xenoantigen pada permukaan jaringan xenograft. Molekul Xenoantigen dapat berupa α Gal Epitope, DNA dan Major Histocompatibility Complex class I (MHC class I) (Easter, 2008). Epitope α -Gal mempunyai struktur karbohidrat yang umumnya berada pada sel hewan terutama mamalia non primata. Manusia tidak memiliki epitope α -Gal sehingga jika diimplankan ke manusia akan terbentuk antibodi terhadap α -Gal sehingga memicu kegagalan transplantasi (Galili, 2001). Setiap sel yang memiliki inti dilindungi oleh 100.000 molekul MHC kelas 1 (Penn, 2002). Jaringan donor memiliki MHC kelas 1, ketika ditransplantasikan ke jaringan resipien maka akan menimbulkan respon imun dan dapat menyebabkan kegagalan transplantasi (Garcia, 2012).

Maka dari itu untuk menanggulangi permasalahan diatas, perlu adanya metode untuk menghilangkan *Xenoantigen* tersebut. Salah satunya yaitu menggunakan teknik deselularisasi dan *Antigen Removal* (AR). Teknik deselularisasi bertujuan untuk menghilangkan sel tanpa merusak struktur dari ekstraselular matrik (ECM) (Cissell, 2014). Teknik AR menggunakan prinsip protein *solubization* juga akan menghilangkan dan melarutkan *Xenoantigen* dengan agen pereduksi berupa *Dithiotreitol* (DTT) dan Garam *Potassium Chloride* (KCl) (Wong, 2011). DTT berfungsi untuk penghancuran protein sedangkan KCl untuk mengikat hancuran protein *Xenoantigen* sehingga dapat terlarut dan mudah dibersihkan.

Xenograft perlu dilakukan uji biokompabilitas terkait ada tidaknya penolakan respon imun resipien. Salah satu metode uji biokompabilitas adalah implantasi graft pada subkutan (SC) mencit (Mirsandrae,2007). Respon imun yang pertama kali diperhatikan adalah respon imun akut. Indikator respon imun akut yang dapat diamati berupa sitokin, yaitu IL-1 β dan jumlah sel radang (Mihay, 2011). IL-1 β aktif dihasilkan oleh makrofag, dan sel polymorphonuklear (PMN) (Olmos, 2014).

Adanya penggunaan teknik AR pasca deselularisasi diharapkan akan menurunkan jumlah sel radang dan ekspresi IL-1 β akibat hilangnya *Xenoantigen* di dinding jantung. Pengaruh teknik AR pada dinding jantung domba *acellular* guna menurunkan jumlah sel radang dan ekspresi IL-1 β pada uji biokompabilitas akut belum pernah dilaporkan.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh penggunaan teknik *antigen removal* (AR) pada dinding jantung *acellular* asal domba terhadap ekspresi *Interleukin-1 beta* (IL-1 β) di subkutan mencit pada uji biokompabilitas akut ?
2. Bagaimana pengaruh penggunaan teknik *antigen removal* (AR) pada dinding jantung *acellular* asal domba terhadap jumlah sel radang di subkutan mencit pada uji biokompabilitas akut ?

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini adalah :

1. Hewan coba yang digunakan yaitu Mencit Balb/c jantan berusia 6 – 8 minggu dengan berat rata rata 25-35 gram, diperoleh dari Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya. Penggunaan hewan coba dalam penelitian sudah memperoleh persetujuan dari Komisi Etik Penelitian UB dengan Nomor 435-KEP-UB.
2. Jaringan buatan yang digunakan yaitu berupa jaringan jantung domba berumur 1 – 2 tahun pada ventrikel kiri jantung, dengan ukuran 15 x 15 x 2 mm.
3. Mencit pada penelitian ini dilakukan implantasi segmen dinding jantung domba pada daerah subkutan mencit bagian dorsal punggung.
4. Segmen dinding jantung domba tersebut dibagi menjadi 3 kelompok yaitu kontrol (tanpa perlakuan), perlakuan deselularisasi, perlakuan deselularisasi + AR

1.4 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui pengaruh penggunaan teknik *Antigen Removal* (AR) pada dinding jantung *acellular* asal domba terhadap ekspresi *Interleukin-1 beta* (IL-1 β) di subkutan mencit pada uji biokompabilitas akut
2. Untuk mengetahui pengaruh penggunaan teknik *Antigen Removal* (AR) pada dinding jantung *acellular* asal domba terhadap jumlah Sel Radang di subkutan mencit pada uji biokompabilitas akut

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat secara umum yaitu teknik AR yang mampu menurunkan ekspresi IL-1 β dan jumlah sel radang terhadap dinding jantung *acellular Xenograft* akan menghasilkan suatu metode preparasi jaringan xenograft yang dapat diproduksi di tingkat industri guna penanganan infark miokardium

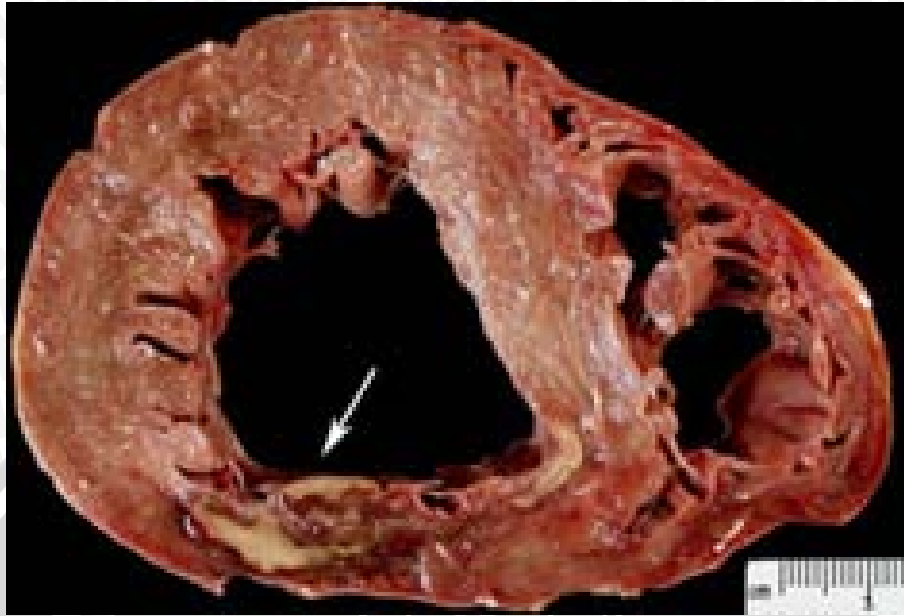
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Infark Miokardium

2.1.1 Definisi

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 cukupnya pasokan darah, yang disebabkan oleh ruptur plak ateroma pada arteri koroner. Keadaan ini biasa disebut dengan Infark Miokardium Akut (IMA) (Muttaqin, 2009).

Infark miokard akut merupakan sindrom klinis dengan ciri-ciri dua dari ketiga kombinasi karakteristik yaitu gejala tipikal infark miokard (nyeri maupun ketidaknyamanan dada), peningkatan kadar enzim jantung, dan perubahan gambaran elektrokardiogram yang mendeskripsikan suatu infark termasuk gambaran patologis. Semua karakteristik itu menggambarkan daerah infark di jantung (miokard) akibat berkurangnya suplai darah ke area tersebut. Akibatnya, akan terjadi kerusakan miokard secara progresif dan irreversible, yang dapat menyebabkan gagal jantung hingga kematian (Roger, 2007)..



Gambar 2.1 Makroskopis Jantung IMA ditandai dengan Otot jantung yang mengalami nekrosis tampak berwarna putih akibat proses infark atau kekurangan suplai oksigen (Zafari, 2015)

2.2 Mencit Balb/C

Hewan laboratorium atau hewan percobaan dapat digunakan sebagai media dalam penelitian atau pengamatan laboratorik untuk mempelajari dan mengembangkan ilmu pengetahuan. Hewan coba yang banyak digunakan dalam penelitian adalah mencit, tikus, kelinci, hamster, unggas, kambing, domba, sapi, kerbau, kuda, dan simpanse. Mencit Balb/C merupakan hewan yang umum digunakan dalam penelitian, karena mudah dipelihara, secara garis besar fungsi dan bentuk organ serta proses biokimianya antara mencit dan manusia memiliki banyak kesamaan (Suckow, 2006).



Gambar 2.2. Mencit *Mus musculus* Galur *Balb/C* (Vinerean, 2012)

Sistem klasifikasi mencit *Balb/C* menurut Vinerean (2012) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Subordo	: Myomorpha
Famili	: Muridae
Genus	: <i>Mus</i>
Spesies	: <i>Mus musculus</i>
Galur	: <i>Balb/C</i>

2.3 *Xenograft*

Jaringan *Xenograft* berasal dari spesies hewan lain dan menyediakan sumber bahan untuk rekayasa cangkok jaringan mekanis fungsional, seperti katup jantung, tendon, ligamen, dan tulang rawan. Jaringan *Xenograft*, mengandung molekul yang dikenal sebagai antigen, yang meminta reaksi kekebalan implantasi ke pasien. Oleh karena itu, perlu *AR* dari *Xenograft* jaringan untuk mencegah penolakan kekebalan graft. Namun, proses yang digunakan untuk sel dan antigen removal dari jaringan sering memiliki efek merusak pada matriks ekstraselular (ECM) dari jaringan. Dengan demikian, tujuan dari proses *antigen removal* harus mengurangi antigen. *Xenograft* mengandung antigen, terutama protein, yang diakui oleh sistem kekebalan tubuh pasien sebagai asing. Komponen antigenik jaringan memulai penerima kekebalan tubuh yang berusaha untuk memecah dan menghapus materi asing (Cissell *et al.*, 2014).

2.4 **Respon Imun terhadap Jaringan *Xenograft***

Respon imunologi dari jaringan atau organ *Xenograft* dibagi menjadi beberapa fase yang berbeda, meskipun pembagian itu sampai batas tertentu, karena manifestasi dapat terjadi lebih dari satu kali. Tahapan pertama dari respon ini yaitu Penolakan Respon Imun Hiperakut. Penolakan ini tidak biasanya terjadi pada teknik Allotransplantasi, meskipun dalam keadaan tertentu terjadi penolakan hiperakut dari allograft, jika resipien memiliki jenis antibodi tertentu terhadap sel donor. Pada prakteknya saat mendeteksi kehadiran antibodi tersebut penolakan respon imun akut selalu dicegah. Penolakan respon imun perakut adalah masalah

yang sangat serius karena obat immunosupresif konvensional tidak mampu untuk mengendalikannya. Penolakan respon imun hiperakut terjadi pada jaringan donor yang tidak sesuai dengan jaringan resipien pada proses transplantasi (Levinsky *et.al.*, 1996).

Tiap fase penolakan dapat di tandai dengan lamanya respon imun tersebut muncul pasca transplantasi dan dengan berbagai tanda lainnya yaitu tipe dan letak kerja respon imun tersebut. Respon imun Hiperakut dimulai pada menit pertama dan menimbulkan penolakan di jaringan dengan rentang waktu satu hingga dua jam dalam sebagian besar kasus. Jika tidak terjadi penolakan respon imun secara hiperakut, maka jaringan graft akan mengalami respon imun setelah beberapa hari pasca implantasi yang disebut juga dengan penolakan respon imun xenograft tertunda (*Delayed Xenograft Rejection*) atau penolakan respon imun akut vaskular, yang dimulai setelah beberapa jam hingga beberapa hari pasca implantasi. Fase berikutnya yaitu penolakan respon imun akan melibatkan sel T yang bertanggung jawab dalam proses penolakan xenograft. Fase ini merupakan respon imun kronis yang terjadi seminggu hingga berbulan-bulan pasca implantasi (Levinsky *et.al.*, 1996).

Tabel. 2.3 Berbagai Jenis Penolakan Respon Imun jaringan Xenotransplantasi

Karakteristik	Hiperakut	Akut (Delayed)	Chronic
Lama Kerja	Menit – jam	Hari – Bulan	Bulan – Tahun
Tipe Reaksi Imun	Humoral	Lebih Sering Selular	Humoran dan Selular
Letak Kerja	Pembuluh Darah	Pembuluh darah dan beberapa sel	Tidak Diketahui
Faktor Pembatas	Seluruh Organ Xenograft	Organ dan Sel Xenograft	Tidak Diketahui

(Sumber : Levinsky *et.al.*, 1996)

2.5 Respon Imun Akut

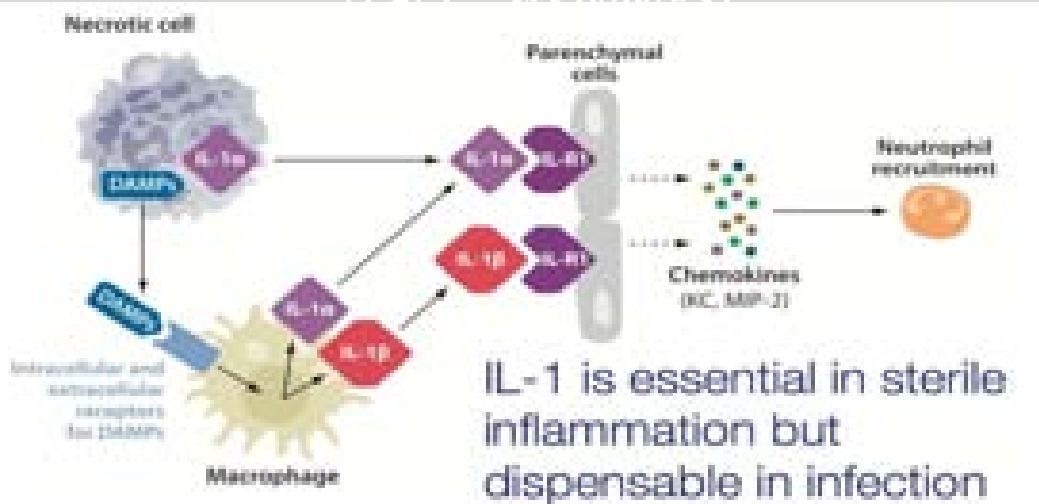
Tubuh hewan memiliki suatu sistem pertahanan terhadap benda asing dan patogen yang disebut sebagai sistem imun. Respon imun timbul karena adanya reaksi yang dikoordinasi sel-sel, molekul-molekul terhadap mikroba dan bahan lainnya. Sistem imun terdiri atas sistem imun alamiah atau non spesifik (natural/innate/native) dan didapat atau spesifik (adaptive/acquired). Baik sistem imun non spesifik maupun spesifik memiliki peran masing-masing, keduanya memiliki kelebihan dan kekurangan namun sebenarnya ke dua sistem tersebut memiliki kerja sama yang erat (Baratawidjaya, 2006).

Pertahanan humoral non spesifik berupa komplemen, interferon, protein fase akut dan kolektin. Komplemen terdiri atas sejumlah besar protein yang bila diaktifkan akan memberikan proteksi terhadap infeksi dan berperan dalam respon inflamasi. Komplemen juga berperan sebagai opsonin yang meningkatkan fagositosis yang dapat menimbulkan lisis bakteri dan parasit. Tidak hanya komplemen, kolektin merupakan protein yang berfungsi sebagai opsonin yang dapat mengikat hidrat arang pada permukaan kuman (Baratawidjaya, 2006).

Sistem imunitas tubuh memiliki fungsi yaitu membantu perbaikan DNA; mencegah infeksi yang disebabkan oleh jamur, bakteri, virus, dan organisme lain; serta menghasilkan antibodi (sejenis protein yang disebut imunoglobulin) untuk memerangi serangan bakteri dan virus asing ke dalam tubuh. Tugas sistem imun adalah mencari dan merusak antigen yang membahayakan tubuh manusia. Respon imun akut, karena adanya antigen masuk kedalam tubuh kemudian makrofag dan

2.6 Interleukin 1 beta (IL-1 β)

Proses inflamasi melibatkan beberapa komponen, salah satunya yaitu *Interleukin 1* (IL-1). IL-1 sebagai proinflamasi sitokin dengan beberapa efek pleiotropic, tampaknya berperan penting dalam proses inflamasi. IL-1 bersama dengan limfosit berperan dalam induksi inflamasi, kenaikan suhu tubuh, stimulasi dari proliferasi sel T dan sel B, regulasi dari hematopoiesis. IL-1 juga berperan dalam regulasi kadar kalsium darah, stimulasi dari proliferasi berbagai sel, pengaturan tekanan darah. Namun, IL-1 merupakan salah satu mediator yang paling penting dalam proses inflamasi. Hal demikian tidak mengherankan bahwa laporan bukti yang terakumulasi bahwa IL-1 terlibat dalam patogenesis penyakit kardiovaskular tertentu, terutama karena potensi proinflamasi nya. Beberapa studi mengungkapkan bahwa efek dari IL-1 pada miosit jantung meliputi perubahan struktural dan fungsional seperti hipertrofi (Vicenova *et al.*, 2009).



Gambar 2.5 Sel Makrofag penghasil IL-1. (Martinon,2009)

Gambar 2.5 menjelaskan bahwa IL-1 terdiri atas IL-1 α (IL-1F1) dan IL-1 β (IL-1F2) yang disekresikan oleh makrofag dan sel-sel endothel ketika terjadi

paparan oleh antigen dan memiliki fungsi sebagai proinflamatori yang kuat dan berfungsi dalam mengaktifasi sel T dan Makrofag (Ozbabacan *et al.*, 2014). Menurut Higgins *et al.*, (1993) IL-1 β matur memiliki berat molekul 17.500 Da dengan sekuens N-terminus berupa alanine 117 dan berupa senyawa biologis aktif lainnya. Sumber utama dari sitokin IL-1 β yaitu monosit, makrofag dan sel dendritik. Limfosit B dan NK sel juga sebagai sumber produksi IL-1 β . Sel keratin juga mampu memproduksi IL-1 β ketika terstimuli. Fibroblast dan sel epitel secara umum tidak memproduksi IL-1 β . IL-1 β berfungsi sebagai sitokin proinflamasi. IL-1 β disebut sebagai *pirogen endogenous* dan *Inducer* pada sistem respon imun akut (*Acute Phase Respon*). Faktanya juga IL-1 β merupakan molekul yang berperan dalam terjadinya demam (Merriman *et al.*, 1977)

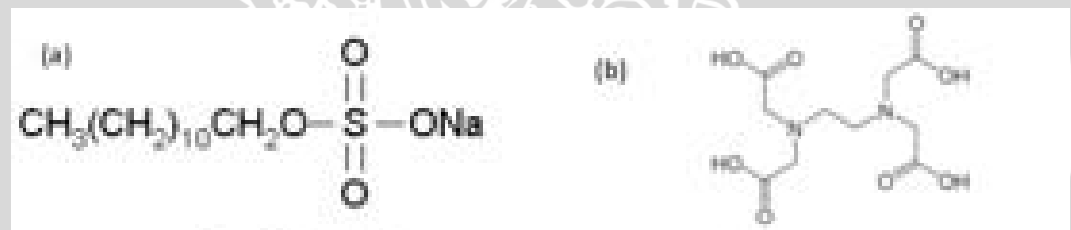
2.7 Deselularisasi

Deselularisasi dianggap penting karena potensi untuk menghilangkan respon imun yang merugikan ditimbulkan oleh epitop membran sel, DNA alogenik atau *Xenograft*. Menghilangkan bahan sel, dengan menjaga sebanyak mungkin *Extracellular Matriks* (ECM), adalah hal penting dalam proses deselularisasi. Meminimalkan efek yang tidak diinginkan pada implantasi jaringan cangkok adalah tujuan deselularisasi (Wu *et al.*, 2015).

Deselularisasi merupakan proses menghilangkan sel dalam jaringan dan menyisakan ECM. Metode deselularisasi ada 2 yaitu secara fisik maupun secara kimia. Secara fisik dalam menghilangkan sel yaitu menggunakan metode *freezing-thawing* (pembekuan-pencairan). Metode ini mampu melisiskan sel dengan

merusak bagian membran sel menggunakan kristal es. Metode ini tidak efektif digunakan untuk menghilangkan sel secara menyeluruh. Maka diperlukan proses deselularisasi secara kimiawi (Gilbert *et al.*, 2006)

Proses deselularisasi menggunakan secara kimiawi menggunakan bahan kimia untuk menghilangkan sel dalam jaringan. Bahan yang digunakan yaitu *sodium dodecyl sulphate* (SDS) dan *ethylenediaminetetraacetic* (EDTA). SDS terdiri atas bahan detergen ionic yang mampu melisiskan sel dengan merusak struktur membran sel maupun membran nukleus nukleus dan berfungsi juga untuk mendenaturasi protein. Sedangkan EDTA berfungsi untuk mengikat ion sehingga ikatan sel dengan ECM akan rusak (Crapo *et al.*, 2011)



Gambar 2.6 Struktur kimia dari *Sodium Duodecyl Sulphate* (SDS) (a) dan *Ethylene Diamine Tetra Acetic* (EDTA) (b)

2.8 *Antigen Removal* (AR)

Menurut Wong *et al.*, (2011) AR merupakan metode yang digunakan untuk menghilangkan struktur *xenoantigen* dari jaringan xenograft dengan cara protein solubilization. Metode AR dilakukan pada jaringan xenograft pasca deselularisasi. Metode AR menggunakan zat pelarut berupa garam (KCL), DTT dan MgCl_2 untuk menghilangkan protein xenoantigen. DTT berfungsi untuk mengganggu ikatan disulfida intramolekul maupun intermolekul dan digunakan untuk memecah protein. Sehingga struktur dari xenoantigen akan rusak. Namun

xenoantigen masih melekat di jaringan xenograft. Maka perlu senyawa yang digunakan untuk melarutkan protein xenoantigen yang rusak tersebut. KCL berfungsi sebagai pelarut protein xenoantigen. Protein xenoantigen akan terlarut dan terbuang pada saat pembilasan.

2.9 Xenograft dari domba

Kemungkinan jaringan acellular domba memicu inflamasi pada manusia lebih kecil. Hal ini berdasarkan bahwa jaringan xenogenic tulang rawan asal domba lebih rendah memicu pelepasan mediator Radang IL-1 dibandingkan tulang rawan asal babi pada uji *in vitro* dengan sel mononuclear manusia (Hetherington *et al.*, 2005). Karakter jaringan setelah dideselularisasi tidak mungkin sama dengan kondisi segarnya namun karakter jaringan pasca deselularisasi sebaiknya mirip dengan karakter jaringan saat kondisi segar. (Sondell *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2010)

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka Konseptual

Dinding jantung *xenograft* asal domba digunakan sebagai *scaffold*. *Scaffold* merupakan kerangka jaringan yang terdiri atas ekstraselluler matrik (ECM). Struktur dinding jantung domba terdiri atas sel otot jantung dan matriks ekstraselular. Oleh karena itu diperlukan metode untuk menghilangkan sel otot jantung sehingga hanya menyisakan ECM yang digunakan sebagai *scaffold*. Metode untuk menghilangkan sel otot jantung yaitu Deselularisasi. Namun setelah dilakukan proses deselularisasi, masih menyisakan xenoantigen yang mampu memicu reaksi imun dan menimbulkan mekanisme penolakan (*Immune Rejection*). Mekanisme penolakan ini mampu menimbulkan inflamasi di jaringan. Faktor inflamasi yang dapat dilihat yaitu dengan adanya makrofag serta sel radang di sekitar jaringan implantasi. Sedangkan untuk mediator inflamasi yaitu dengan adanya IL-1 β . Maka untuk menghilangkan xenoantigen tersebut dilakukan metode *Antigen Removal* menggunakan metode *Protein Solubilization*.

Xenograft ketika di implantasikan ke bagian subkutan mencit akan menimbulkan reaksi inflamasi antara xenoantigen dengan sel imunitas tubuh mencit (*Antigen Recognition*). *Antigen Recognition* menimbulkan reaksi imun secara langsung (*Direct Recognition*) dan secara tidak langsung (*Indirect Recognition*). *Indirect Recognition* berupa aktifitas selular yang berperan yaitu sel radang makrofag dan sel mast. Makrofag kemudian akan menghasilkan sitokin berupa IL-1 β . IL-1 β berperan sebagai aktivasi makrofag. Kemudian Sel Mast

yang aktif akan menghasilkan senyawa histamin. Histamin berperan dalam vasodilatasi pembuluh darah dan peningkatan permeabilitas vaskular. Permeabilitas vaskular meningkat sehingga terjadi peningkatan diapedesis sel radang yang berada di dalam vaskular. Sel radang yang berperan dalam faktor inflamasi di subkutan mencit yaitu neutrofil dan monosit. Neutrofil akan berperan dalam proses penghancuran Xenoantigen sehingga neutrofil akan aktif. Neutrofil aktif akan mengeluarkan sitokin IL-1 β . Hal ini memicu penolakan jaringan xenograft (*Immune Rejection*).

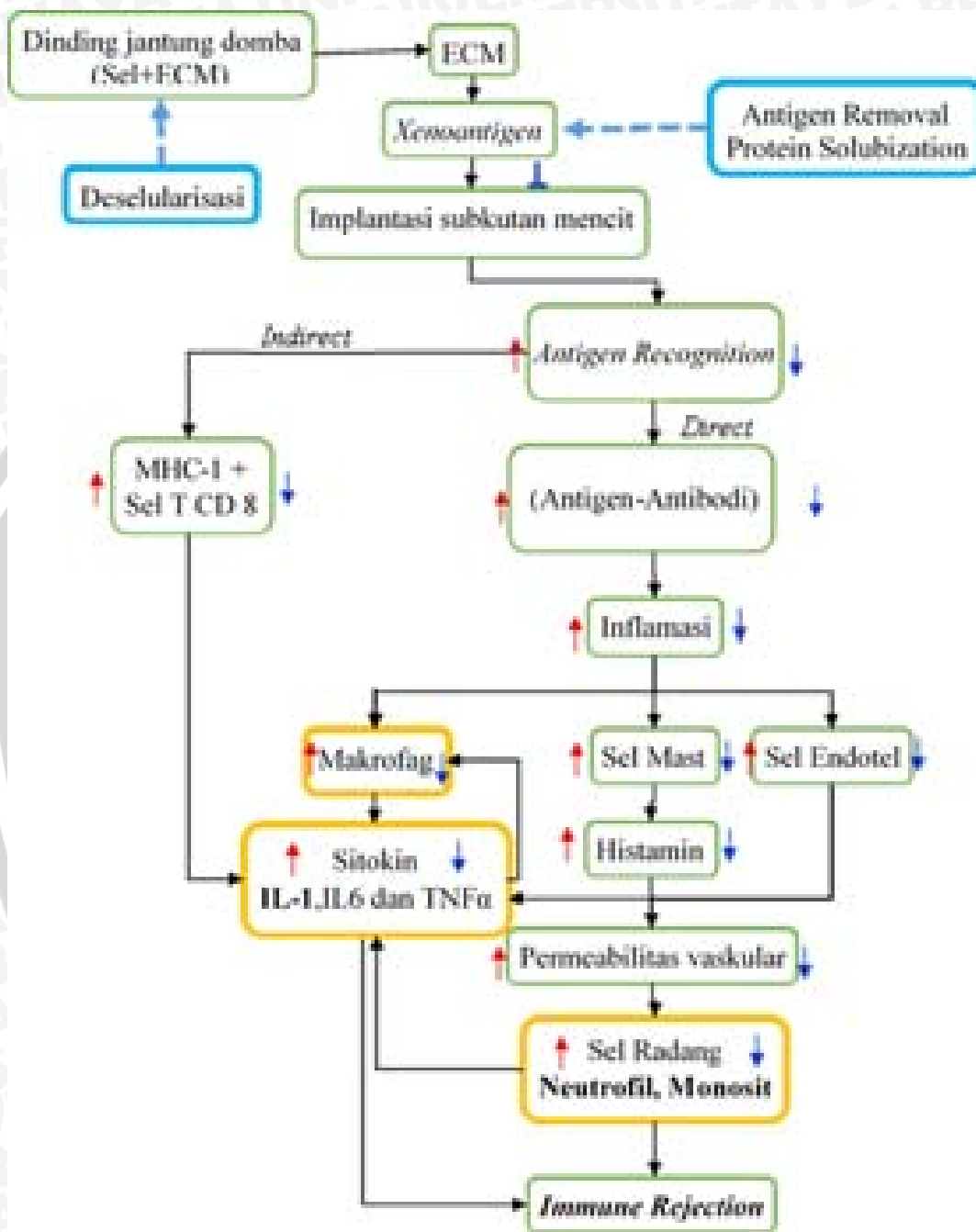
Respon imun secara indirect yaitu setiap sel xenograft mempunyai molekul permukaan berupa MHC kelas I sedangkan sel jantung juga mempunyai molekul permukaan yaitu α -gal. MHC kelas I dan α -gal merupakan xenoantigen ketika di implantasikan ke subkutan mencit. Hal ini memicu reaksi imun secara langsung. MHC kelas I secara langsung berikatan dengan sel T CD8. Ikatan antara MHC-1 dengan sel T CD8 mengakibatkan sel T CD8 aktif dan menghasilkan sitokin IL-1 β . Hal ini juga mampu memicu reaksi imun dan mengakibatkan penolakan jaringan xenograft (*Immune Rejection*).

Teknik Deselularisasi mampu merusak sel sel jantung dan merusak membran nukleus sehingga menyisakan ECM. Struktur sel jantung yang mengalami kerusakan menyebabkan *Xenoantigen* pada permukaan sel ikut meluruh. Sehingga sel T CD8 tidak berikatan dengan sel jantung. Sel T CD8 menjadi tidak aktif dan mampu menurunkan pelepasan mediator radang sehingga sel sel radang lainnya berupa makrofag dan neutrofil ikut menurun jumlahnya dalam menfagosit sel-sel jantung asing. Teknik Deselularisasi ini mempunyai

kelemahan yaitu *Xenoantigen* masih tersisa di jaringan jantung. *Xenoantigen* pada jaringan ini tidak mengalami kerusakan sehingga masih dikenali oleh sel radang umum berupa makrofag dan neutrofil. Sehingga perlu teknik untuk menghancurkan *Xenoantigen* yaitu teknik *Antigen Removal*.

Teknik *Antigen Removal* mampu menghancurkan dan melarutkan *Xenoantigen* dengan mekanisme *Protein Solubization*. Sehingga hanya menyisakan bagian ECM dan diharapkan mampu menurunkan *Immune Rejection*. Indikator terjadi penurunan *Immune Rejection* yaitu dengan melihat jumlah sel radang. Aktifitas sel radang yang mengalami penurunan dapat dilihat dengan menurunnya jumlah ekspresi Sitokin IL-1 β . Namun tidak menutup kemungkinan akan terjadinya respon imun, tetapi dalam jumlah yang sedikit. Hal tersebut dikarenakan struktur ECM yang berasal dari dinding jantung domba memiliki perbedaan struktur genetik dengan jaringan subkutan mencit. Tingkat Homogenitas jaringan ECM dinding jantung asal domba dengan jaringan subkutan mencit dapat dilihat menggunakan aplikasi *Blast* dengan mencocokkan bagian genetik dari setiap jaringan. Bagian jaringan yang tidak memiliki kecocokan akan mengalami degradasi yang disebut dengan *Biodegradable*. *Biodegradable* ini memiliki beberapa manfaat antara lain bahan yang sudah terdegradasi digunakan kembali oleh tubuh untuk di metabolisme dan tidak menyebabkan toksik bagi tubuh resipien.

KERANGKA KONSEP



Keterangan :



: Pemberian Perlakuan



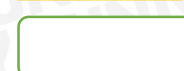
: Peningkatan Aktifitas



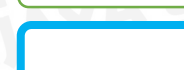
: Penurunan Aktifitas



: Variabel Terikat



: Variabel Bebas



: Perlakuan

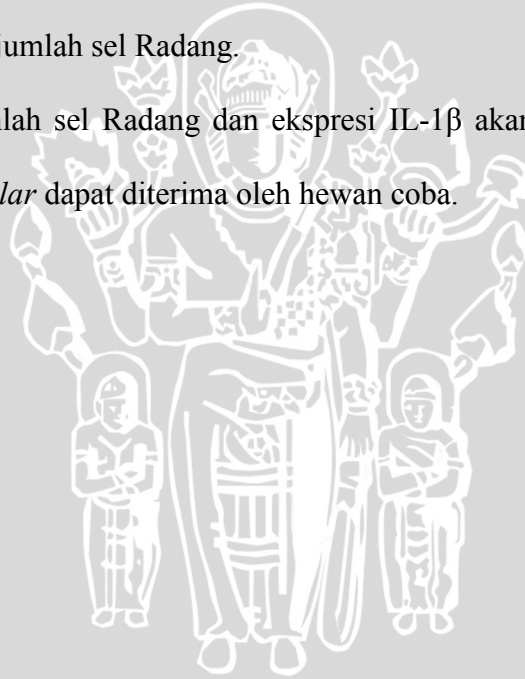


3.2. Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah ada, maka hipotesis yang dapat diajukan adalah sebagai berikut ini:

1. Penggunaan Teknik Deselularisasi dan *Antigen Removal* (AR) pada dinding jantung mampu menurunkan respon imun berdasarkan penurunan ekspresi IL-1 β .
2. Penggunaan Teknik Deselularisasi dan *Antigen Removal* (AR) pada dinding jantung mampu menurunkan respon imun berdasarkan penurunan jumlah sel Radang.

Penurunan jumlah sel Radang dan ekspresi IL-1 β akan mengindikasikan dinding jantung *Acellular* dapat diterima oleh hewan coba.



BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Tempat Dan Waktu Penelitian

Tempat penelitian dilakukan di 3 laboratorium yaitu Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya, dan Laboratorium Mikrobiologi Veteriner Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.

Penelitian ini dilakukan pada bulan September 2015 hingga bulan Januari 2016.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

4.2.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi :

1. kandang tikus berupa kotak berukuran 44x30x12 cm, yang masing-masing berisi 4 ekor mencit yang diberi pakan dan minum berfungsi sebagai kandang percobaan
2. *Shaker* berfungsi untuk mengaduk dan mencampur larutan
3. LAF berfungsi untuk sterilisasi alat dan bahan menggunakan radiasi ultraviolet agar bahan tidak rusak.
4. Gunting berfungsi untuk preparasi jaringan dinding jantung domba sesuai ukuran
5. Pinset berfungsi untuk menjepit atau mengambil jaringan.

6. Vortex (Guo-Huq) berfungsi untuk menghomogenkan bahan bahan deselularisasi dan *Antigen Removal* dengan pelarut berupa PBS.
7. Ependorf (*micro tube*) berfungsi untuk menampung larutan dan bahan.
8. Gelas ukur berfungsi untuk tempat pelarutan bahan
9. *Sentrifuge* (Denley tipe BR 401) berfungsi untuk memisahkan larutan
10. *Stirer* berfungsi sebagai pengaduk
11. Refrigerator berfungsi sebagai tempat penyimpanan jaringan dengan suhu -20°C
12. Lemari es berfungsi sebagai tempat penyimpanan jaringan jantung domba yang berisi larutan dengan suhu $4-8^{\circ}\text{C}$
13. Scalpel berfungsi untuk memotong jaringan dinding jantung domba
14. pH meter berfungsi untuk mengukur tingkat keasamaan larutan PBS

a.

4.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu :

1. Mencit jenis *Mus musculus* strain balb/c jantan umur 6-8 minggu dengan berat badan rata-rata $\pm 25-35$ gr. Kondisi awal tikus dalam keadaan sehat yang ditandai dengan gerakan aktif. Mencit dipelihara dalam kandang berukuran $44 \times 30 \times 12$ cm, dimana setiap kandang berisi 4 ekor mencit.
2. Segmentasi dinding jantung domba dengan ukuran panjang 15 mm, lebar 15 mm dan tebal 2 mm digunakan untuk bahan scaffold

4.2.3 Bahan Kimia

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah penicillin, streptomycin, akuades, NaCl Fisiologis, 0,1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0,01% tripsin, 20 µg/mL RNase, 0,2 mg/mL DNase, DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), 100 mM DTT, 2 mM MgCl₂, 100 mM KCl, PBS (*Phospat Buffer Saline*), PBS-Formaldehyde 4%, larutan etanol, xylol, paraffin, *gelatin coated slide*, H₂O₂ 0,3%, UltraTek IHC kit (terdiri atas blocking solution, Antibody sekunder polyvalent, HRP (*Horse Redish Peroxidase*), Substrat, DAB (*Diaminobenzidine*)), antibodi primer anti mouse IL-1 β, Hematoxylin

4.3 Tahapan Penelitian

4.3.1 Penetapan Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini menggunakan hewan coba berupa mencit *Mus musculus* galur *Balb/c* jantan berumur 6 - 8 minggu. Berat badan mencit antara 25-35 gram. Hewan coba diaklimatisasi selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium. Hewan coba harus memiliki kondisi sehat (berambut cerah, aktivitas baik, tidak ada abnormalitas anatomis, dan nafsu makan baik), mendapatkan persetujuan dari Komisi Etik Penelitian UB nomer : 435-KEP-UB, dan belum pernah digunakan penelitian. Sampel berupa dinding jantung domba yang berumur 1,5 tahun. Dinding jantung yang diambil berupa ventrikel kiri dengan dimensi yaitu panjang 15 mm, lebar 15 mm dan tebal 2 mm.

Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008):

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

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

$$3n-3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 18/3$$

$$n \geq 6$$

Keterangan :

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk 3 macam kelompok perlakuan diperlukan jumlah mencit *Balb/c* minimal sebanyak 6 kali dalam setiap kelompok namun kami melebihkan jumlahnya menjadi 7 kali pengulangan sehingga dibutuhkan total 21 ekor mencit *Balb/c* sebagai hewan coba.

4.3.2 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental (*experiment design*), yaitu kegiatan percobaan (*experiment*) yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh yang timbul sebagai akibat dari adanya perlakuan tertentu. Dalam penelitian ini digunakan mencit putih galur *Balb/c* sebagai hewan coba, yang diimplantasi jaringan buatan berupa dinding jantung domba *acellular* pada subkutan mencit bagian dorsal

Kelompok penelitian ditunjukkan dalam Tabel 4.1 sebagai berikut :

Tabel 4.1 Rancangan Kelompok Penelitian

Kelompok	Keterangan
P1 (Implantasi Jantung segar)	Mencit diimplantasi dengan dinding jantung domba tanpa pemberian perlakuan apapun / segar
P2 (Perlakuan Deselularisasi)	Mencit diimplantasi dengan dinding jantung domba <i>acellular</i> dengan pemberian perlakuan berupa teknik Deselularisasi
P3 (Perlakuan Deselularisasi+ <i>Antigen Removal</i>)	Mencit diimplantasi dengan dinding jantung domba <i>acellular</i> dengan pemberian perlakuan berupa teknik Deselularisasi dan <i>Antigen Removal</i>

4.3.3 Variabel Penelitian

Adapun variabel penelitian terdiri dari :

1. Variabel bebas
 - a. Waktu pengamatan pasca implantasi 2 minggu
 - b. Kelompok 1 mencit diimplantasi dengan dinding jantung domba *acellular* tanpa perlakuan deselularisasi
 - c. Kelompok 2 mencit diimplantasi dengan dinding jantung domba *acellular* diberi perlakuan deselularisasi
 - d. Kelompok 3 mencit diimplantasi dengan dinding jantung domba *acellular* tanpa perlakuan deselularisasi + *Antigen Removal*

2. Variabel terikat

- Jumlah Sel Radang di sekitar jaringan implantasi pada preparat histopatologi kulit
- Ekspresi IL-1 β di jaringan implantasi pada preparat histopatologi kulit

3. Variabel kontrol

- Berat badan mencit rata rata yaitu 25-35 gram, umur mencit sekitar 6 minggu, jenis kelamin mencit jantan, suhu ruangan yaitu 24-32⁰C, kelembapan 20-40% , kandang dengan ukuran panjang 44 cm, lebar 30 cm dan tinggi 12 cm yang didalamnya dibagi menjadi 4 bagian kecil kandang yang disekat dengan kawat, sekam kayu serta pakan yang berupa pelet diberikan tiap dua hari sekali.

Adapun tahapan penelitian yang dilakukan antara lain:

1. Persiapan Hewan Coba
2. Preparasi dan Koleksi Sampel
3. Deselularisasi Dinding Jantung
4. Pembagian Kelompok
5. Teknik *Antigen Removal* (AR)
6. Uji Biokompabilitas secara in vivo (Implantasi Subkutan Mencit)
7. Pengamatan Jaringan Subkutan
8. Immunohistokimia (IHK) IL-1 β dan histopatologi Jaringan Subkutan
9. Analisa data

4.4 **Prosedur Penelitian**

4.4.1 **Persiapan Hewan Coba**

Mencit yang digunakan untuk penelitian diadaptasikan terhadap lingkungan selama 7 hari. Tikus ditempatkan pada bak plastik berukuran 44x30x12 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 ransum basal yang mengandung karbohidrat, protein, lemak, mineral, vitamin, dan air.

4.4.2 **Preparasi dan Koleksi Sampel**

Segmen dinding jantung ventrikel kiri dari domba jantan umur 1-1,5 tahun yang didapat dari Pasar Sukun Malang. Dimensi sampel sebesar 15x15x2 mm yang tanpa dan diberi perlakuan proses deselularisasi guna menjadi dinding jantung *acellular* lalu dilanjutkan perlakuan AR.

4.4.3 **Pembagian Kelompok**

Sebanyak 21 buah sampel segmen jantung dibagi menjadi 3 kelompok yaitu kelompok kontrol (sampel segar tanpa proses deselularisasi dan AR), kelompok deselularisasi, dan kelompok AR. Tiap sampel dari kelompok kemudian akan diuji biokompabilitas secara *in vivo*. Seluruh sampel setiap kelompok dilakukan proses sterilisasi melalui penyinaran UV 30 menit sebelum implantasi.

4.4.4 Deselularisasi Dinding Jantung

Jantung domba segar sebanyak 5 buah diambil dari Pasar Sukun Malang dan dibawa ke laboratorium dalam 0,1% Penicillin-Streptomisin dalam NaCl Fisiologis 0,9 % agar terhindar dari kontaminasi. Ventrikel jantung dipotong menjadi segment dinding jantung. Total segmen jantung yang dibutuhkan sebanyak 21 Segmen jantung (sampel) dengan rincian 7 sampel jantung segar, 7 sampel proses deselularisasi dan 7 sampel proses deselularisasi + AR. Metode deselularisasi dengan modifikasi metode Wang *et al.* menggunakan perendaman dalam larutan 0,1% sodium dodecyl sulfat (SDS), 0,01% Tripsin, 20 µg/mL RNase dan 0,2 mg/mL DNase selama 2,5 minggu. Larutan SDS tersebut diganti tiap 3 hari sekali. Sampel post deselularisasi dapat disimpan dalam DMEM pada suhu -20°C

4.4.5 Teknik *Antigen Removal* (AR)

Sebanyak 7 sampel dinding jantung pasca deselularisasi dilanjutkan ke proses *Antigen Removal*. Teknik AR menggunakan teknik *protein solubilization* berdasarkan metode Wang *et al.*, (2010) dengan modifikasi. Larutan guna *Antigen Removal* yaitu 100 mM DTT, 2 mM MgCl₂ dan 100 mM KCl dalam PBS. Sampel kemudian dimasukkan dalam 2 mL larutan kemudian *dishaker* dengan kecepatan 125 rpm selama 48 jam. Untuk proses selanjutnya, sampel bisa disimpan dalam suhu -20°C dalam media DMEM

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

Metode uji biokompabilitas sampel dengan implantasi subkutan mencit dilakukan berdasarkan metode Mirsadraee *et al.*, (2007). Sebanyak 21 ekor mencit Jantan umur 6-8 minggu terlebih dahulu dianestesi menggunakan xylazin dengan dosis 20 mg/kg BB secara subkutan. Pada daerah kulit samping tulang belakang disayat hingga terlihat subkutan. Sampel tiap kelompok diimplantasikan ke subkutan mencit. Kemudian sayatan dijahit menggunakan *silk* sederhana tunggal. Mencit dieuthanasia pasca 2 minggu, dan jaringan kulit sekitar implantasi dikoleksi dan dimasukkan dalam larutan PBS-*Formaldehyde* 4 %.

4.4.7 Pengamatan Histopatologi Kulit

Jaringan kulit tiap mencit dari tiap kelompok pada uji biokompabilitas implantasi subkutan kemudian dilakukan proses pembuatan preparat histologi dengan metode paraffin dan dipotong ketebalan 5 μm serta diwarnai dengan pewarnaan *Hematoxylin-Eosin* (HE). Gambaran histologi subkutan diamati dan diambil foto 5 daerah pandang guna menghitung rata-rata jumlah sel radang. Blok paraffin juga dipotong dan dilekatkan pada *gelatin coated slide* guna dilanjutkan pewarnaan IHK guna deteksi *interleukine cytokine* (IL-1)

4.4.8 Pembuatan Preparat Histopatologi jaringan subcutan kulit

Pembuatan preparat histopatologi dengan menggunakan pewarnaan *Hematoxylin-Eosin* (HE) dilakukan menurut Junquiera and Carneiro (2007). Jaringan kulit difiksasi dengan PFA 10% selama 18-24 jam. Fungsi fiksasi yaitu untuk mempertahankan susunan jaringan kulit agar tidak berubah oleh proses biokimia karena pembusukan bakteri. Kemudian dimasukkan dalam aquades selama 1 jam. Proses selanjutnya yaitu dehidrasi dengan etanol bertingkat 70%, 80%, 90%, dan 95%. Proses ini bertujuan untuk mengeluarkan seluruh cairan yang terdapat dalam jaringan yang telah difiksasi sehingga jaringan nantinya dapat diisi dengan parafin atau zat lainnya yang dipakai untuk membuat blok preparat. Tahap selanjutnya yaitu proses *Clearing*. Jaringan dimasukan kedalam larutan alkohol xylol selama 1 jam berfungsi untuk mengeluarkan alkohol dari jaringan dan menggantinya dengan suatu larutan yang dapat berikatan dengan parafin. Tahap selanjutnya adalah proses impregnasi yang dilakukan dalam parafin cair dan embedding kedalam blok. Pembenaan (impregnasi) adalah proses untuk mengeluarkan cairan pembening (clearing agent) dari jaringan dan diganti dengan parafin. Pada tahap ini jaringan harus benar-benar bebas dari cairan pembening karena sisa cairan pembening dapat mengkristal dan sewaktu dipotong dengan mikrotom akan menyebabkan jaringan menjadi mudah robek. Proses selanjutnya yaitu pengecoran (*Blocking*) adalah proses pembuatan blok preparat agar dapat dipotong dengan mikrotom.

Jaringan pada blok parafin dipotong dengan mikrotom setebal 5 mikron. Hasil irisan dipindahkan ke dalam air hangat 38°- 40°C menggunakan kuas dengan tujuan untuk membuka lipatan dan meluruskan kerutan halus pada sampel organ. Irisan yang sudah rata dapat diambil untuk diletakkan pada gelas objek, kemudian dikeringkan diatas hot plate dengan suhu 38°- 40°C. Penyimpanan dilakukan di dalam inkubator dengan suhu 38°- 40°C lalu siap dilakukan pewarnaan dengan *Hematoxilin-Eosin* (HE) dan *Immunohistochemistry* (IHC)

4.4.9 Metode Pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE) guna melihat sel radang di jaringan subkutan kulit

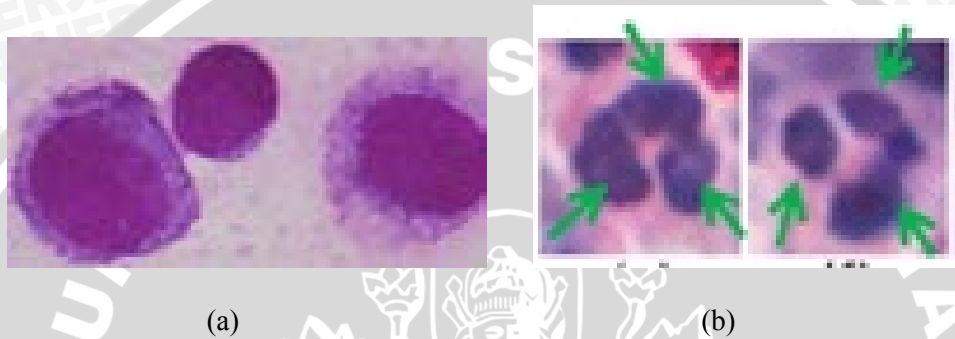
Pewarnaan HE dilakukan dengan menggunakan zat pewarna *Hematoxylin-Eosin* untuk memberi warna pada inti sel, sehingga inti sel akan berwarna biru dan eosin merupakan *Counterstaining Hematoxylin*, digunakan untuk mewarnai sitoplasma dan jaringan penyambung. Eosin akan memberikan warna merah muda. Proses pewarnaan diawali dengan proses Deparafinasi dengan menggunakan Xylol kemudian dilanjutkan dengan proses rehidrasi dengan memasukkan preparat kedalam alkohol bertingkat konsentrasi alkohol yang digunakan 95%, 90%, 80%, 70% secara berurutan masing masing selama tiga menit bertujuan untuk mengisi cairan ke dalam jaringan supaya zat pewarna dapat masuk kedalam jaringan. Selanjutnya dicuci dengan air mengalir dan dilanjutkan dengan merendam kedalam aquades selama 5 menit. Sediaan diwarnai dengan pewarna *Hematoxylin* selama 1 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 10 menit dan kemudian dicuci menggunakan

akuades 5 menit. Kemudian dilakukan pewarnaan menggunakan *Eosin* selama 5 menit dan dicuci kembali dengan air mengalir selama 10 menit dan akuades selama 5 menit. Langkah selanjutnya yaitu Dehidrasi dengan alkohol 70%, 80%, 90% dan 95% masing masing selama beberapa detik dan dilanjutkan dengan alkohol absolut I,II dan III masing masing 2 menit berfungsi untuk menghilangkan air di dalam jaringan. Setelah itu dilanjutkan dengan proses clearing dengan *Xyol* I, II dan III selama 3 menit. Terakhir, dilakukan *mounting* menggunakan *Entellan* serta ditutup menggunakan *Cover Glass*. Preparat jaringan kulit yang telah dibuat diamati menggunakan mikroskop cahaya. Bagian yang diamati adalah jumlah sel radang menggunakan perbesaran 40x lensa objektif guna melihat pengaruh perlakuan teknik *Antigen Removal* menggunakan 5 lapang pandang

4.4.10 Pengamatan Sel Radang di Jaringan Subkutan Kulit mencit Balb/C

Setelah dilakukan pewarnaan HE yang digunakan untuk mewarnai inti dan sitoplasma serta jaringan penyambungannya. Pada pewarnaan HE digunakan 2 macam zat warna yaitu Hematoksilin yang berfungsi untuk mewarnai inti sel dan memberikan warna biru (basofilik) serta eosin yang merupakan counterstaining hematoksilin, digunakan untuk mewarnai sitoplasma sel dan jaringan penyambung dan memberikan warna merah muda dengan nuansa yang berbeda. Sehingga mampu dibedakan antar sel radang dengan sel jaringan jantung. Menurut Baratawidjaya (2006) bahwa sel radang terdiri atas sel Mononuklear (MN) dan sel Poliorfonuklear (PMN). Sel MN terdiri atas sel makrofag, limfosit dan sel dendritik. Sel PMN terdiri

atas Sel Neutrofil, Basofil dan Eusinofil. Gambar 4.4.10 menunjukkan sel Mononuklear dengan inti sel 1 ditengah bewarna biru dan bagian sitoplasma berwarna merah muda.



Gambar 4.1 a. Sel Mononuklear (MN), b. Sel Polimorfonuklear (PMN)
(Wang *et al*, 2014)

Keterangan : Gambar 4.4.10 (a) diatas menunjukkan sel Mononuklear yang berada ditengah yaitu sel limfosit dan sebelah kanan maupun kiri yaitu sel Makrofag (MN), sedangkan gambar (b) merupakan karakteristik dari sel PMN terutama Neutrofil yang memiliki inti 3-5 berwarna biru yang ditunjuk oleh anak panah (Pewarnaan HE)

4.4.11 Deteksi Ekspresi IL-1 β dengan metode Immunohistokimia (IHK) Kulit

Sebanyak 3 potongan jaringan subkutan tiap kelompok kemudian diwarnai ScytTek AMF080-UFU IHC kits., Scytek, USA. Slide diproses deparafinisasi menggunakan Xylol I,II dan III dengan waktu 5 menit tiap proses, rehidrasi menggunakan Ethanol Absolut dengan 2x pencucian kemudian dengan alkohol bertingkat mulai dari alkohol 95%, 90%, 80%, 70% dan terakhir akuades dengan tiap

masing-masing perlakuan 5 menit, dicuci 3x menggunakan PBS lalu diinkubasi dengan H₂O₂ 0,3% 5 menit lalu dicuci dengan PBS.

Selanjutnya dilakukan *blocking background* dengan casein (Sniper/protein blocker) selama 15 menit suhu kamar, lalu diinkubasi dengan antibodi primer. Slide pertama akan diinkubasi dengan antibodi primer anti-mouse IL-1 (No catalog BS-0812R, BIOS USA) 1:1000. Waktu inkubasi antibodi primer (*Antibody Polyclonal Rabbit Anti-IL-1 β mouse*) adalah semalaman pada suhu 4°C. Slide kemudian dicuci dengan PBS, lalu diinkubasi dengan antibodi sekunder (*Antibody Goat anti Rabbit*) dengan ScytTek AMF080-UFU IHC kits selama 20 menit pada suhu kamar. Slide dicuci lalu diinkubasi dengan ScytTek AMF080-UFU IHC kits selama 10 menit, lalu diinkubasi dengan Betazoid DAB chromogen *solution* (SkytTek) selama 3-5 menit hingga menunjukkan warna coklat yang berarti positif. Slide kemudian dicelupkan dalam hematoxylin sebagai *counterstaining*, kemudian dilakukan proses rehidrasi, *clearing*, dan *mounting*.

Hasil pewarnaan kemudian diamati di mikroskop dan dilihat ada tidaknya reaksi positif. Slide kemudian diambil foto sebanyak 5 bidang pandang dengan perbesaran obyektif 40x, dan dihitung jumlah sel yang masing-masing mengekspresikan IL-1.

4.5 Analisa Data

Data kuantitatif berupa jumlah sel radang dan jumlah sel yang mengekspresikan IL-1 akan dianalisa menggunakan One Way ANOVA dan uji BNJ (Tukey Test) dengan nilai signifikan yang digunakan adalah $p < 0,05$ dengan membandingkan antar kelompok menggunakan perangkat lunak SPSS ver.15.

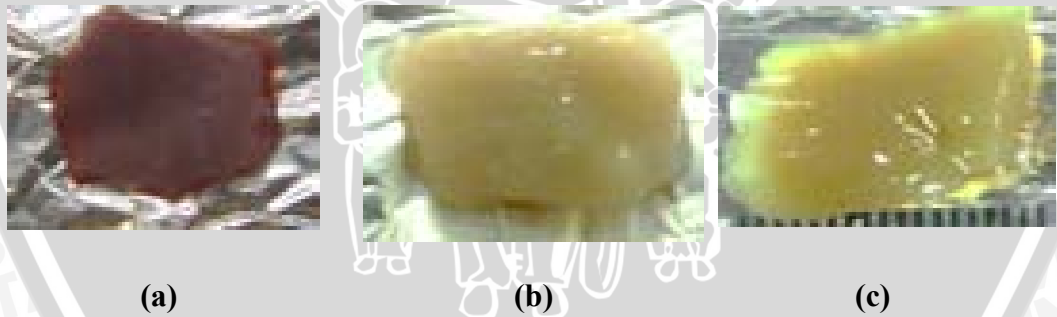
UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Gambaran makroskopis perlakuan Deselularisasi dan Antigen Removal terhadap dinding jantung sebelum implantasi

Segmentasi jaringan jantung baik kelompok segar, kelompok Deselularisasi dan Kelompok Deselularisasi + *Antigen Removal* didokumentasikan secara makroskopis sebelum di implantasikan pada subkutan mencit *Balb/C*. Gambaran makroskopis yang diamati yaitu perubahan warna dari sampel jaringan jantung domba sebelum implantasi pada subkutan mencit *Balb/C*. Perubahan warna diamati dengan membandingkan antara perlakuan segar, perlakuan pasca Deselularisasi dan perlakuan pasca *Antigen Removal* yang disajikan pada Gambar 5.1.



Gambar 5.1 Gambar Makroskopis Dinding Jantung Domba dengan dimensi panjang 15 mm ; lebar 15 mm ; tebal 2 mm

Keterangan : (a) Sampel dinding jantung tanpa perlakuan. (b) Sampel dinding jantung pasca deselularisasi. (c) Sampel dinding jantung pasca *Antigen Removal*.

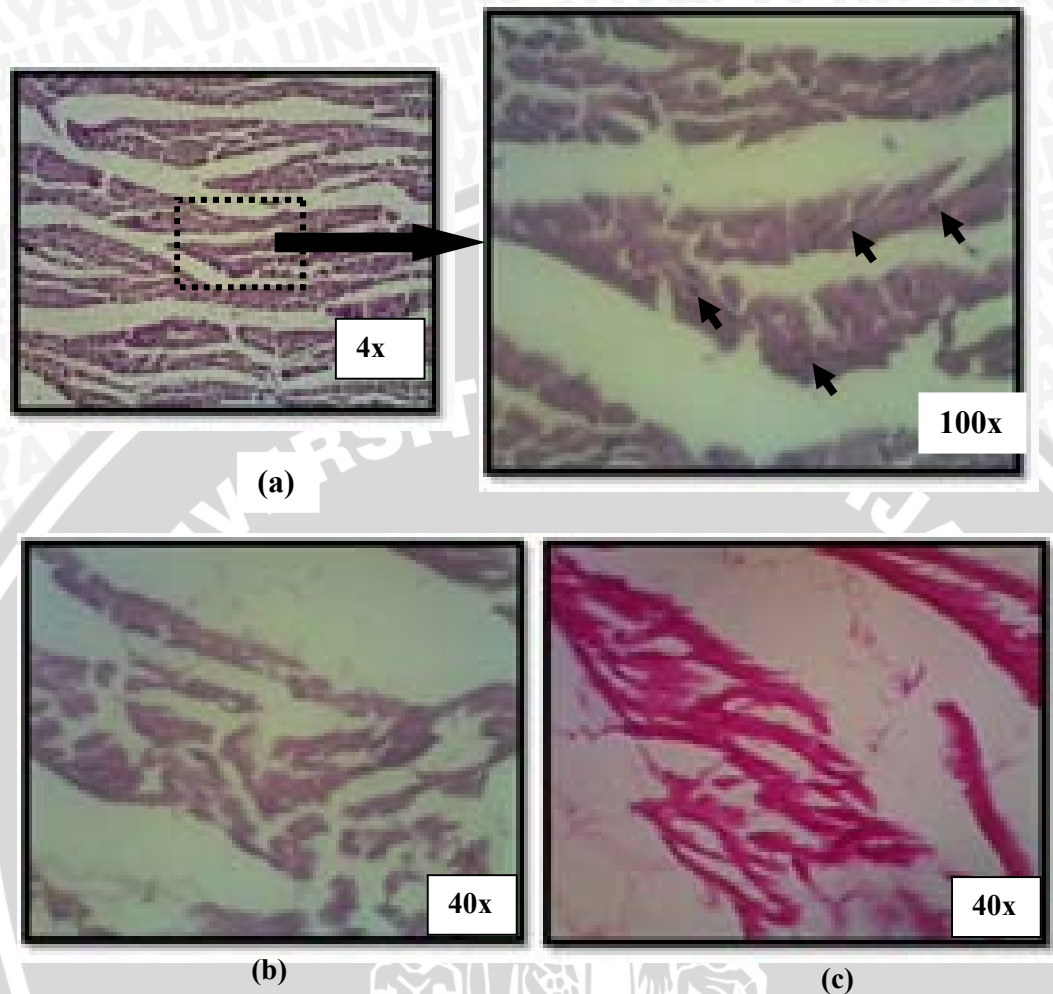
Gambar 5.1 menunjukkan gambaran makroskopis dinding jantung domba sebelum implantasi dengan dimensi sampel yaitu panjang 1,5 mm, lebar 1,5 mm dan tebal 0,2 mm. Nampak pada gambar 5.1

terlihat adanya perubahan warna. Gambar 5.1 (a) menunjukkan dinding jantung domba sebelum implantasi tanpa pemberian perlakuan Deselularisasi (segar) berwarna coklat gelap. Hal ini menunjukkan bahwa masih terdapatnya sel-sel jantung dan masih terdapat ekstraselular matrik. Gambar 5.1 (b) menunjukkan dinding jantung domba sebelum implantasi yang telah diberi perlakuan Deselularisasi berwarna coklat muda dan lebih putih. Menurut Sondell *et al* (1998) dan Yang *et al* (2010) warna jaringan pasca deselularisasi tampak warna lebih putih atau transparan. Hal ini dikarenakan bahwa sel-sel jantung telah terdegradasi akibat perlakuan Deselularisasi. Gambar 5.1 (c) menunjukkan dinding jantung domba sebelum implantasi yang telah diberi perlakuan Antigen Removal (AR) berwarna coklat muda lebih terang dibanding perlakuan Deselularisasi.

Tiap perlakuan memberikan hasil berbeda pada gambaran makroskopis warna dinding jantung domba. Kelompok perlakuan Deselularisasi dan kelompok perlakuan Deselularisasi + *Antigen Removal* terjadi perubahan warna. Perubahan warna ini terjadi karena hilangnya sel-sel miokardium jantung dan menyisakan jaringan matrik ekstraselular, sehingga sel akan rusak dan jaringan menunjukkan warna yang lebih cerah dibandingkan sampel segar (tanpa perlakuan).

5.2 Gambaran mikroskopis, perlakuan Deselularisasi dan *Antigen Removal* terhadap dinding jantung *acellular* sebelum implantasi

Setelah dilakukan pengamatan secara makroskopis jaringan dinding jantung domba sebelum implantasi pada subbab 5.1 di atas, perlu adanya konfirmasi terhadap perubahan yang terjadi pada penampakan makroskopis. Guna mengkonfirmasi perubahan gambaran makroskopis jaringan jantung domba tiap kelompok perlakuan, maka dilakukan pengamatan secara mikroskopik jaringan dinding jantung domba. Gambaran mikroskopis yang dilihat pada jaringan dinding jantung domba tiap kelompok perlakuan sebelum implantasi pada subkutan mencit *Balb/C* yaitu ada atau tidaknya inti sel yang ditandai dengan warna ungu (terwarnai oleh *Hematoxylin*) dan bagian sitoplasma sel berwarna merah muda (terwarnai oleh *Eosin*) pada perbesaran 4x, 40x dan 100x lensa objektif.



Gambar 5.2 Gambaran histopatologi sampel dinding jantung domba sebelum di implantasi di subkutan mencit dengan perbesaran 4 x dan 40 x lensa objektif

Keterangan : (a) Histopatologi dinding jantung tanpa perlakuan deselularisasi (segar) perbesaran 4x, tanda panah menunjukkan sel jantung dengan inti terwarnai ungu pada perbesaran 100x
 (b) Sampel dinding jantung pasca deselularisasi perbesaran 40x
 (c) Sampel dinding jantung acellular pasca Antigen Removal perbesaran 40x

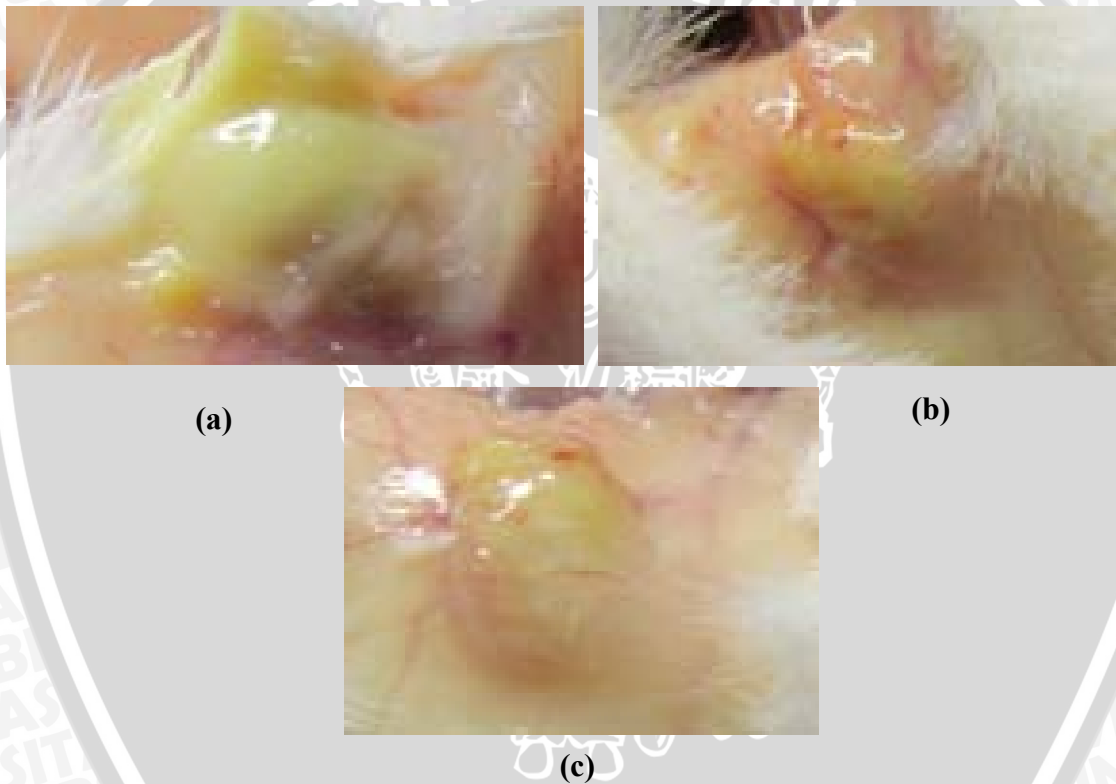
Gambar 5.2 menunjukkan gambaran mikroskopis (histopatologi) dinding jantung domba sebelum implantasi. Gambar (a) menunjukkan dinding jantung domba sebelum implantasi tanpa pemberian perlakuan deselularisasi (segar) nampak adanya sel otot jantung yang ditandai

dengan terlihatnya inti sel jantung yang terletak ditengah sel dengan pewarnaan HE terlihat inti sel berwarna biru. Gambar (b) menunjukkan dinding jantung domba sebelum implantasi yang telah diberi perlakuan desellularisasi tidak adanya inti sel sel otot jantung dan gambar (c) menunjukkan dinding jantung domba sebelum implantasi yang telah diberi perlakuan Antigen Removal (AR) menunjukkan tidak adanya sel, namun tersisa sitoplasma sel. Hal ini dapat diperjelas dengan penelitian Cissel (2014) yaitu teknik Desellularisasi bertujuan melarutkan sel tanpa menghilangkan struktur dari ekstraselular matrik (ECM). Teknik AR 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 cepat mudah dihancurkan.

5.3 Gambaran makroskopis perlakuan Deselularisasi dan Antigen Removal terhadap dinding jantung *acellular* pasca implantasi

Setelah dilakukan pengamatan secara makroskopis dan mikroskopis pada jaringan dinding jantung domba sebelum implantasi terdapat perbedaan di tiap kelompok perlakuan, maka perlu dilakukan uji secara In Vivo. Uji secara In Vivo dilakukan dengan cara segmentasi jaringan dinding jantung domba tiap kelompok perlakuan diimplantasi pada subkutan mencit *Balb/C*. Kemudian setelah 2 minggu pasca implantasi mencit dinekropsi untuk mengamati secara

makroskopis subkutan mencit dan jaringan dinding jantung. Karakteristik makroskopis subkutan mencit *Balb/C* yang diimplantasi dengan segmentasi dinding jantung domba pasca perlakuan Deselularisasi dan *Antigen Removal* yaitu karakteristik jaringan yang mengalami nekrosis dan degradasi serta terbentuknya vaskularisasi baru pada area sekitar implan.



Gambar 5.3 Jaringan kulit mencit dan sampel dinding jantung pasca nekropsis mencit *Balb/C* dengan mengambil bagian jaringan implan dan 2 cm kulit disekitar area implan

- Keterangan :
- (a) Sampel dinding jantung tanpa perlakuan pasca implantasi banyak nanah (pus) disekitar jaringan implan.
 - (b) Sampel dinding jantung pasca deselularisasi pasca implantasi. Masih terdapat jaringan implan pada subkutan tanpa adanya nanah (pus)
 - (c) Sampel dinding jantung pasca Antigen Removal pasca implantasi. Masih terdapat jaringan implan dan vaskularisasi baru pada daerah implantasi

Gambar 5.3 menunjukkan gambaran makroskopis dinding jantung domba *acellular* pasca implantasi di subkutan mencit *Balb/C*. Pada gambar 5.3 terlihat adanya perubahan patologis. Gambar 5.3 (a) menunjukkan dinding jantung domba pasca implantasi tanpa pemberian perlakuan (segar) pada subkutan mencit menimbulkan reaksi imunologis hal ini ditandai dengan adanya nekrosis kaseosa. Nekrosis kaseosa terjadi karena adanya reaksi imunologis antara *Xenoantigen* dengan sel radang. *Xenoantigen* yang berperan dalam nekrosis ini berupa MHC kelas I yang terdapat pada permukaan sel jantung. Sel jantung kemudian dirusak oleh sel radang MN dan PMN. Sehingga sel radang MN dan PMN yang terakumulasi pada jaringan menimbulkan nekrosis kaseosa (pengkejuan)

Hal tersebut sesuai dengan pendapat Levinson (2004) bahwa nekrosis kaseosa adalah suatu cairan yang terbentuk dari akumulasi *makrofag*, sel leukosit (neutrofil, limfosit), debris seluler dan gelembung minyak. Sel leukosit lainnya yang memicu reaksi imunitas yaitu sel T. Sel T CD+8 (*Cytotoxic T-Lymphocyte*) mampu berikatan dengan sel dinding jantung karena sel dinding jantung memiliki molekul permukaan sel berupa MHC kelas 1. Ikatan antara sel T CD+8 dengan MHC kelas 1 pada permukaan sel akan menimbulkan reaksi imunologis yaitu memicu sel T sitolitik berperan untuk melisis sel jantung pada proses imunologis di dalam tubuh.

Sel jantung dan sel leukosit yang mati akan terjadi akumulasi disekitar jaringan sehingga terbentuk nanah. Sel leukosit PMN sudah

terlihat di jaringan *Xenograft* 1 hari pasca implantasi pada mencit. Sel T limfosit, *multinucleated giant cell* dan populasi *Neutrofil* meningkat pasca 10 hari implantasi pada subkutan mencit (Badylack, 2008). Sampel dinding jantung tanpa dilakukan proses deselularisasi masih tersisa sel-sel jantung dan molekul permukaan sel berupa MHC kelas 1 sehingga mampu menimbulkan reaksi imunologis dan menimbulkan nanah (pus).

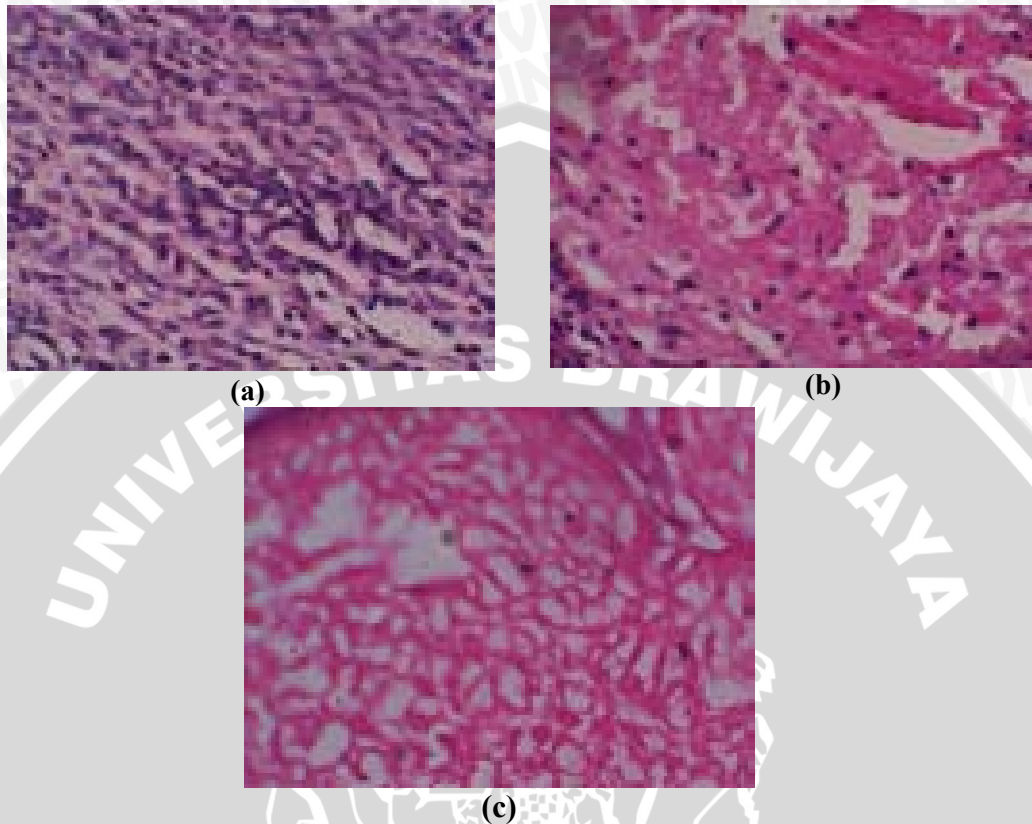
Gambar 5.3 (b) menunjukkan dinding jantung domba pasca implantasi yang telah diberi perlakuan Deselularisasi, tidak terlihat adanya cairan nanah disekitar jaringan implan. Hal ini menunjukkan bahwa proses deselularisasi mampu menurunkan reaksi imunologis. Menurut Badylack (2004), proses deselularisasi sangat berpengaruh terhadap reaksi inflamasi di jaringan *scaffold* yang telah diimplantasikan. Jaringan yang telah melalui 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 resipian karena respon imun dapat diturunkan namun masih menimbulkan *Immune Rejection*.

Gambar 5.3 (c) menunjukkan dinding jantung domba pasca implantasi yang telah diberi perlakuan Antigen Removal (AR) Jaringan kulit mencit yang diimplantasi jantung DES + AR, jaringan implan mengecil dan terlihat adanya vaskularisasi di daerah implan. Teknik AR mampu menurunkan respon imun karena tidak nampak adanya reaksi

imunologis atau terbentuknya nanah jaringan implan. Menurut Cissel (2014), teknik AR mampu menghilangkan struktur *Xenoantigen* di jaringan implan sehingga mampu menurunkan respon imun dibandingkan teknik deselularisasi. Struktur *Xenoantigen* hilang mampu meningkatkan penerimaan jaringan implan di jaringan resipien.

5.4 Gambaran mikroskopis perlakuan Deselularisasi dan Antigen Removal terhadap subkutan mencit *Balb/C* pasca implantasi

Gambaran mikroskopis dinding jantung domba yang diimplantasi pada subkutan mencit *Balb/C* pasca perlakuan Deselularisasi dan *Antigen Removal* (AR) dengan pewarnaan HE bertujuan untuk melihat *Immune Rejection* yang ditandai dengan adanya sel radang mononuklear (MN) *makrofag* dengan kriteria memiliki 1 inti besar dan marginasi tidak merata pada *makrofag* yang mature serta sel radang Polimorfonuklear (PMN) yang memiliki inti lebih dari 3 berwarna ungu (*Neutrofil*) sedangkan sitoplasma berwarna merah muda pada area sekitar jaringan implan (Vykoukal *et al.*, 2009).



Gambar 5.4 Gambaran histopatologi subkutan kulit pasca implantasi di jaringan subkutan mencit *Balb/C* dengan perbesaran 40x lensa objektif

Keterangan : (a) Histopatologi subkutan kulit mencit *Balb/C* tanpa perlakuan
 (b) Histopatologi subkutan kulit mencit *Balb/C* perlakuan Deselularisasi pasca implantasi
 (c) Histopatologi subkutan kulit mencit *Balb/C* perlakuan Antigen Removal pasca implantasi

Gambar 5.4 menunjukkan gambaran mikroskopis (*histopatologi*) subkutan mencit *Balb/C* dan dinding jantung domba *acellular* pasca implantasi. Gambar 5.4 (a) menunjukkan peradangan yang berat ditandai banyaknya jumlah sel radang disekitar area implantasi dengan pewarnaan HE terlihat sel radang berwarna biru. Infiltrasi sel radang di daerah implan terjadi karena adanya mekanisme *Immune Rejection*. *Immune*

Rejection adalah penolakan jaringan implantasi oleh sel imun respien. Penolakan jaringan implantasi karena adanya benda asing yaitu sel dinding jantung dan *Xenoantigen* pada jaringan implan. Sehingga memacu sel-sel radang atau sel imunitas non spesifik untuk menghilangkan sel asing dan *Xenoantigen* di jaringan implantasi. Sel radang non spesifik yaitu *makrofag* di jaringan, sel mast dan sel neutrofil. Menurut Badylack (2008), jaringan *Xenograft* mampu memacu reaksi imun akut. Reaksi imun akut ditandai dengan adanya sel mononuklear di jaringan. Respon akut juga ditandai dengan adanya infiltrasi sel radang di vaskular menuju jaringan misalnya *monosit* dan *neutrofil*.

Sel radang di jaringan dilihat menggunakan preparat histopatologi dan diwarnai menggunakan pewarnaan HE (*Hemaktosilin-Eosin*). Sel *makrofag* dan *neutrofil* inti selnya akan berwarna ungu dan sitoplasmanya berwarna merah. Menurut Brown (2015), pewarnaan HE digunakan untuk mewarnai jaringan. Prinsip dari pewarnaan HE yaitu inti yang bersifat asam akan menarik zat/ larutan yang bersifat basa sehingga akan berwarna biru. Sitoplasma bersifat basa akan menarik zat /larutan yang bersifat asam sehingga berwarna merah. Infiltrasi sel radang di jaringan menandakan bahwa terjadinya *Immune Rejection* penolakan jaringan *Xenograft* oleh jaringan resipien.

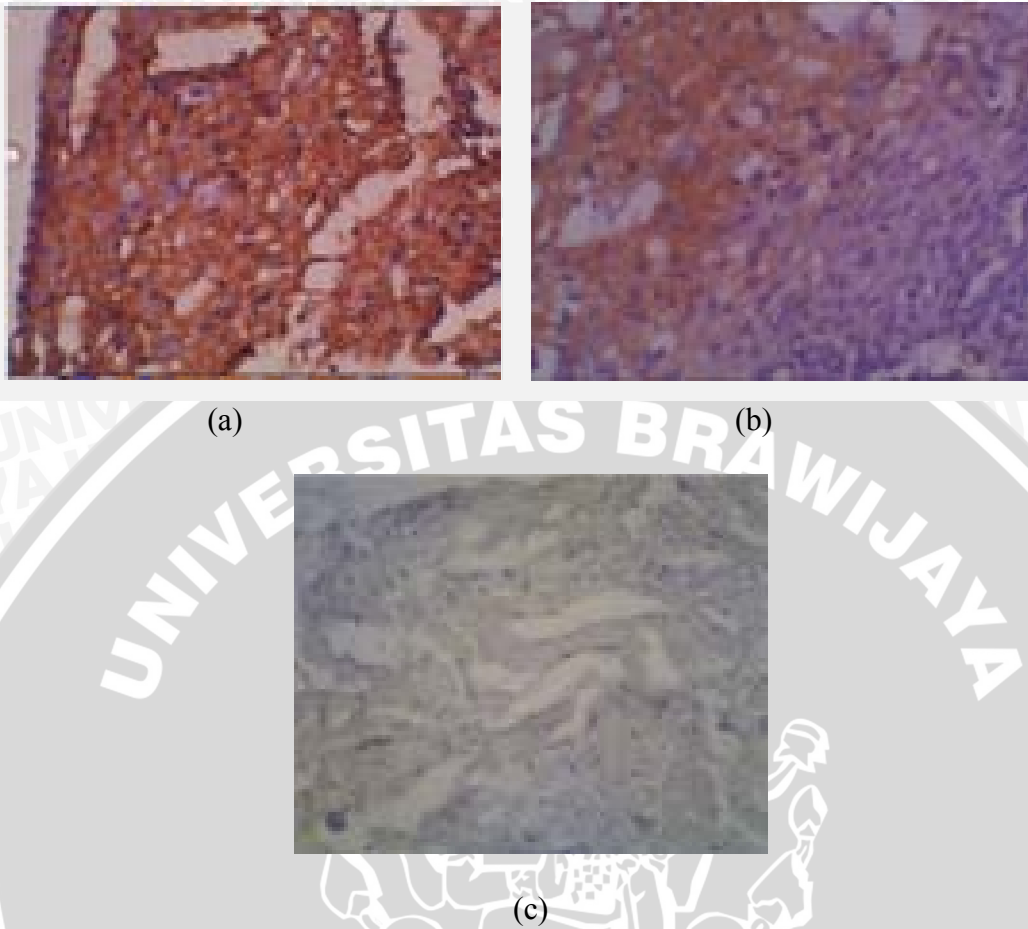
Gambar 5.4 (b) sel radang yang menempel di permukaan jaringan implan dan gambar (c) menunjukkan adanya infiltrasi sel radang di daerah kapsula dan daerah perifer implan dengan jumlah lebih sedikit.

Hal ini sesuai dengan penelitian Cissel (2014) yaitu teknik Deselularisasi bertujuan melarutkan sel tanpa menghilangkan struktur dari ekstraselular matrik (ECM). Teknik 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.

Menurut Badylack (2008), menyatakan bahwa jaringan cangkok menimbulkan reaksi imun akut. Hal ini ditandai dengan munculnya sel radang *Mononuclear* (MN) dan *Polimorfonuclear* (PMN). Sel radang muncul karena adanya *Xenoantigen* pada jaringan implan sehingga memicu sel radang untuk melakukan fagositosis.

5.5 Pengaruh Penggunaan Teknik Antigen Removal (AR) Pada Dinding Jantung Acellular Terhadap Ekspresi Interleukin-1 Beta (IL-1 β) Di Subkutan Mencit Pada Uji Biokompabilitas Respon Imun Akut.

Pengaruh penggunaan teknik AR terhadap ekspresi IL-1 β menggunakan pewarnaan *Immunohistochemistry* (IHC) pada preparat histopatologi subkutan mencit. Karakteristik pewarnaan IHC menggunakan bahan pewarna berupa DAB (*3,3'-diaminobenzidine*) akan terlihat berwarna coklat pada preparat. Preparat yang terwarnai coklat akan dihitung persentase (%) warna menggunakan program *Immunoratio* dengan *software* berupa *fiji.apk*.



Gambar 5.5 Gambaran histopatologi pewarnaan IHC IL-1 β subkutan kulit pasca implantasi di jaringan subkutan mencit *Balb/C* dengan perbesaran 40x lensa objektif

- Keterangan :
- (a) Histopatologi pewarnaan IHC IL-1 β subkutan kulit mencit *Balb/C* tanpa perlakuan
 - (b) Histopatologi pewarnaan IHC IL-1 β subkutan kulit mencit *Balb/C* perlakuan Deselularisasi pasca implantasi
 - (c) Histopatologi pewarnaan IHC IL-1 β subkutan kulit mencit *Balb/C* perlakuan Antigen Removal pasca implantasi

Gambar 5.5 menunjukkan gambaran preparat histopatologi yang diwarnai menggunakan IHC kit untuk mengetahui ekspresi sitokin berupa IL-1 β dari ketiga kelompok perlakuan. Pada Gambar 5.5 (a) menunjukkan warna coklat hampir diseluruh bagian preparat. Presentase

warna coklat pada Gambar 5.5 (a) menunjukkan 96,2 % dari gambaran preparat yang terfoto tersebut. Gambar 5.5 (b) menunjukkan warna coklat terdeteksi sebagian pada gambaran preparat tersebut dengan presentase 34%. Sedangkan Gambar 5.5 (c) menunjukkan warna coklat hanya berada di beberapa titik foto dengan tingkat presentase 5,3 %. Rerata presentase dari hasil ekspresi IL-1 β tiap kelompok perlakuan dapat dilihat pada Tabel 5.1

Data kemudian dianalisis menggunakan statistik. Hasil uji statistik (*One-Way ANOVA*) menggunakan SPSS 2.3 *for Windows* dengan tingkat kesalahan 5 % menunjukkan hasil yang signifikan ($P \leq 0,05$).

Tabel 5.1 Ekspresi IL-1 β pada preparat Histopatologi Subkutan mencit

Kelompok	Ekspresi IL-1 β	
	Rata-rata(%) \pm SD	Perubahan
Kelompok Segar	86,85 \pm 14,83 ^a	-
Kelompok Deselularisasi	40,10 \pm 16,31 ^b	- 53,8%
Kelompok Deselularisasi+Antigen Removal	5,93 \pm 2,86 ^c	- 93,1% (dengan kelompok segar) 85,2% (dengan kelompok Deselularisasi)

Ada Perbedaan signifikan ($p < 0,05$) ekspresi IL-1 β pasca Deselularisasi dengan Perlakuan Deselularisasi dan Antigen Removal

Tabel 5.1 menunjukkan bahwa rata rata persentase (%) sitokin IL-1 β pada implan segar lebih tinggi (rata rata IL-1 β 86,85 %) dibandingkan perlakuan implan deselularisasi (rata-rata IL-1 β 40,10 %) maupun perlakuan kombinasi deselularisasi dan *Antigen Removal* (rata-rata IL-1 β 5,93 %) . Hal ini disebabkan karena pada implan segar

terdapat sel miokardium jantung yang mempunyai struktur MHC kelas 1 yang mampu dikenali oleh *makrofag*. *Makrofag* kemudian aktif dan menghasilkan senyawa *proinflamatori* berupa *sitokin* IL-1 β untuk memanggil sel radang lainnya agar melakukan *fagositosis*. IL-1 β juga dikeluarkan oleh sel sel endotel pembuluh darah untuk memanggil sel radang dalam proses *fagositosis*. Menurut Ozbabacan *et al.*, (2014), IL-1 β (IL-1F2) disekresikan oleh *makrofag* dan sel-sel endothel ketika terjadi paparan oleh antigen dan memiliki fungsi sebagai *proinflamatori* yang kuat dan berfungsi dalam mengaktifasi sel T dan *Makrofag*.

Adanya perlakuan deselularisasi ini menunjukkan ekspresi IL-1 β terjadi penurunan. Hal ini disebabkan karena deselularisasi mampu melarutkan sel-sel jantung dan menyisakan ekstraselular matrik, sehingga saat dinding jantung domba diimplantasikan menurunkan penolakan respon imun akut dan terjadi penurunan proses fagositosis oleh *makrofag* serta sel sel endotel. Hal ini menyebabkan *makrofag* menjadi tidak aktif dan menurunkan ekspresi sitokin IL-1 β . Kombinasi perlakuan deselularisasi dengan *Antigen Removal* menunjukkan penurunan jumlah IL-1 β yang signifikan ($P \leq 0,05$), karena *Antigen Removal* mampu untuk melarutkan protein *Xenoantigen* berupa protein sel (MHC 1, DNA) dan α -Gal. Penurunan presentase IL-1 β sebesar 7,9 % (perbandingan Deselularisasi dengan AR) menunjukkan bahwa masih terdapatnya *Immune Rejection* atau penolakan jaringan *Xenograft* oleh tubuh resipien.

Dinding jantung domba *acellular* pasca perlakuan Antigen Removal menyisakan ECM. ECM terdiri atas banyak kolagen. Kolagen tipe III merupakan komponen penyusun ECM terbanyak di jaringan dinding jantung. Sedangkan pada jaringan subkutan mencit masih terdapat kolagen tipe III. Kolagen tipe III tersusun atas rangkaian polipeptida. Perbedaan susunan polipeptida antara Kolagen tipe III dinding jantung domba dengan jaringan subkutan kulit menyebabkan terjadinya *Immune Rejection*. Namun tidak sepenuhnya susunan polipeptida pada kolagen tipe III tersebut berbeda biasanya disebut dengan tingkat homogenitas protein. Tingkat homogenitas protein kolagen tipe III Domba dengan *Mus Musculus* dapat dilihat menggunakan aplikasi *Basic Local Alignment Search Tool* atau disebut dengan BLAST.

Tabel 5.2 Presentase Homogenitas Protein Kolagen tipe III

Type	Hewan	Accession number	Similarity
Collagen, type III, alpha 1 [Mus musculus]	<i>Mus Musculus (Balb/C)</i>	AAH58724.1	90 %
Collagen type III alpha 1 [Ovis aries]	<i>Ovis aries</i>	ABB45731.1	

Tabel 5.2 menunjukkan tingkat homogenitas sebesar 90 % protein kolagen tipe III mencit dengan jaringan dinding jantung domba. Data tersebut menunjukkan adanya tingkat perbedaan protein kolagen sebesar 10%. Perbedaan protein 10 % antara jaringan implan (dinding jantung domba) dengan jaringan resipien (subkutan mencit *Balb/C*) menyebabkan

timbulnya respon imun adanya aktifitas *makrofag*. *Makrofag* yang aktif akan menghasilkan IL-1 β . *Makrofag* aktif akan menghancurkan protein-protein ECM *Xenograft* yang berbeda susunan proteinnya. Mekanisme degradasi struktur ECM ini disebut dengan *Biodegradable*. *Biodegradable* umumnya berlangsung lama atau kronis. Menurut Badylack (2008), jaringan *Graft* secara natural akan melalui proses degradasi, ketika adanya ketidakcocokkan protein penyandi jaringan implan dengan jaringan resipien. Sekitar 60% jaringan *Graft* akan didegradasi selama 4 minggu pasca implantasi. Degradasi secara keseluruhan biasanya akan berlangsung selama 3 bulan (Kronis). Produk degradasi akan diserap oleh tubuh untuk dirubah menjadi senyawa lainnya. Sisa degradasi yang tidak dipergunakan oleh tubuh akan sekresikan melalui urin.

Menurut O'Brien (2011) kelebihan dari jaringan *Biodegradable Xenograft* yaitu terdiri atas bahan biologi aktif dan sangat baik dalam mendukung perlekatan sel dan pertumbuhan sel pada jaringan resipien. Selain itu bahan ini merupakan bahan *Biodegradable* yang akan terdegradasi secara alami oleh tubuh dan senyawa bahan yang terdegradasi akan dimanfaatkan oleh sel-sel tubuh lainnya untuk proses metabolisme di dalam tubuh. Bahan *Xenograft* alami akan menghasilkan Ekstrasellular Matrik (ECM) sendiri untuk mengganti struktur ECM yang mengalami degradasi.

5.6 Pengaruh penggunaan teknik Antigen Removal (AR) pada dinding Jantung Acellular Terhadap Jumlah Sel Radang Di Subkutan Mencit Pada Uji Biokompabilitas Respon Imun Akut

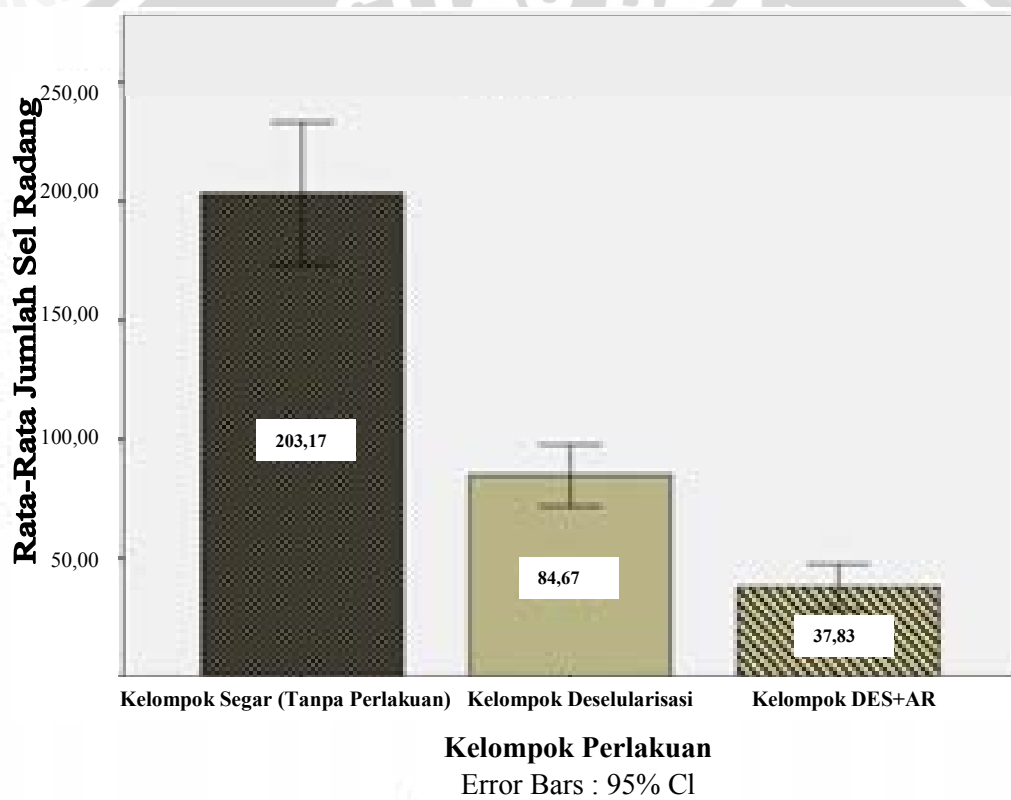
Karakteristik mikroskopis dari histopatologi jaringan dinding jantung domba *Acellular* yang diberi teknik AR memberikan hasil signifikan dibandingkan perlakuan segar ($p \leq 0.05$) terhadap infiltrasi jumlah sel radang dengan pewarnaan HE. Infiltrasi sel radang meliputi *Makrofag* (inti sel satu dan berwarna ungu) dan Neutrofil yang ditandai dengan inti berwarna ungu terdiri atas 3-5 inti. Perlakuan *Antigen Removal* terhadap dinding jantung domba *Acellular* memberikan pengaruh yang signifikan ($p \leq 0.05$) dengan tingkat kesalahan 5% terhadap pemeriksaan respon imun akut. Hasil uji statistik (*One-Way ANOVA*) menggunakan SPSS 23 *for Windows* menunjukkan adanya perbedaan sangat nyata pada ketiga kelompok perlakuan tersebut. Hal ini membuktikan adanya pengaruh perlakuan pada masing-masing kelompok. Secara statistik, teknik yang baik untuk menurunkan jumlah sel radang pada subkutan mencit *Balb/C* yaitu dengan teknik AR. Perhitungan jumlah sel radang pada preparat menggunakan *Image Raster* 3 dengan 5 lapang pandang. Berikut rata-rata jumlah sel radang pada gambaran histopatologi kulit mencit *Balb/C*. Hasil rerata \pm SD jumlah sel radang disajikan pada Tabel 5.3 dan Gambar 5.6.

Tabel 5.3 Pengaruh penggunaan AR pada dinding jantung *Acellular* terhadap jumlah sel radang

Kelompok	Jumlah Sel Radang Rata-rata (sel)±SD	Jumlah Sel Radang (sel)	
		Peningkatan	Penurunan
Kelompok Segar	203,17 ± 28,52 ^a	-	-
Kelompok Deselularisasi	84,67 ± 12,37 ^b	-	58%
Kelompok Deselularisasi+Antigen Removal	37,83 ± 9,09 ^c	-	81,2 % (dengan kelompok segar) 55,3 % (dengan kelompok DES)

Tabel 5.3 menunjukkan bahwa jumlah rata rata sel radang pada implan segar lebih tinggi (rata-rata sel radang 203) dibandingkan perlakuan implan deselularisasi mengalami penurunan jumlah sel radang hingga 58% maupun perlakuan kombinasi deselularisasi dan *Antigen Removal* dengan tingkat penurunan sel radang yang signifikan yaitu 81,2%. Hal ini disebabkan karena pada implan segar tidak diberi perlakuan apapun, sehingga pada waktu proses implantasi pada subkutan mencit, dinding jantung donor akan dikenali oleh sel radang untuk proses penghancuran *Xenoantigen* berupa sel jaringan implan. Adanya perlakuan deselularisasi ini menunjukkan jumlah sel radang semakin menurun. Hal ini diakibatkan karena deselularisasi mampu untuk melarutkan sel-sel jantung dan menyisakan ECM, sehingga saat *Xenograft* dinding jantung domba diimplantasikan mampu menurunkan penolakan respon imun akut yaitu ditandai dengan menurunnya jumlah sel radang. Kombinasi perlakuan deselularisasi dengan *Antigen Removal* menunjukkan penurunan jumlah sel radang yang signifikan, karena *Antigen Removal* mampu untuk melarutkan protein *Xenoantigen* berupa

protein sel (MHC 1, DNA) dan α -Gal, sehingga saat dinding jantung donor diimplankan ke subkutan mencit tidak memacu sel radang. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian dari Wong *et al.*, (2011) bahwa *Antigen Removal* mampu melarutkan sel-sel *Xenoantigen* berupa protein sel (MHC 1, DNA) dan α -Gal sehingga *makrofag* tidak banyak terinduksi pada jaringan donor yang diimplan.



Gambar 5.6 Grafik rata-rata jumlah sel radang pada tiap kelompok perlakuan

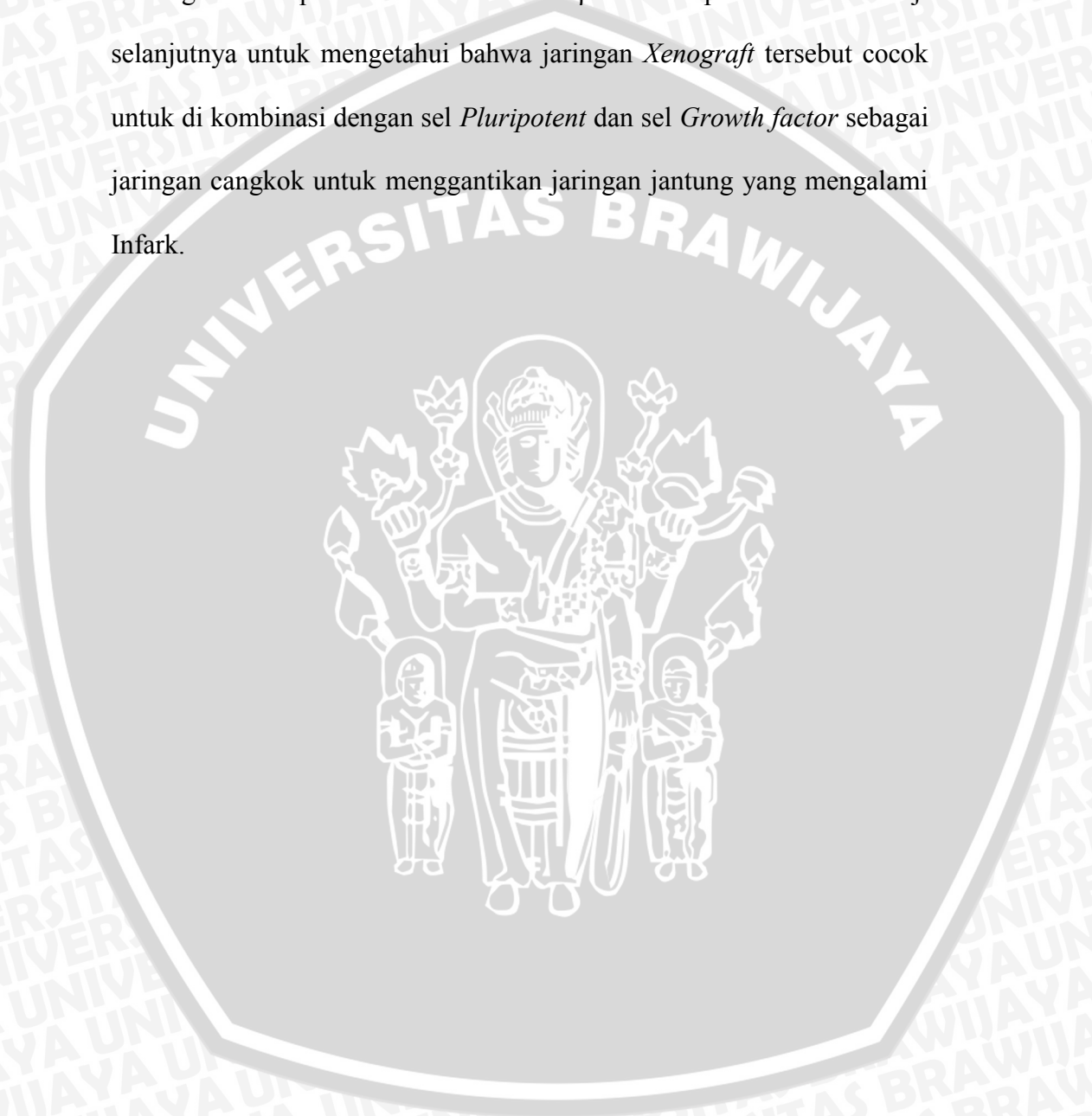
5.7. Implikasi Penggunaan Teknik *Antigen Removal* terhadap *Xenograft*

Penelitian penggunaan jaringan *Xenograft* asal domba masih diujikan secara In Vivo di subkutan mencit *Balb/C* guna untuk melihat respon imun akut. Pembuatan jaringan *Xenograft* asal domba

menggunakan teknik Deselularisasi dan *Antigen Removal*. Teknik ini berfungsi untuk menghancurkan dan melarutkan sel maupun protein *Xenoantigen*. Hal ini sesuai dengan penelitian Cissel (2014) yaitu teknik Deselularisasi bertujuan melarutkan sel tanpa menghilangkan struktur dari ekstraselular matrik (ECM). Teknik AR 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 cepat mudah dihancurkan. Sel-sel jantung mempunyai protein *Xenoantigen* berupa adanya MHC-1 dan α -gal yang mampu menginduksi adanya respon imun sebagai mekanisme penolakan terhadap reaksi imunitas didalam tubuh (*Immune Rejection*) sehingga jaringan akan mengalami degradasi yang cepat dan tidak cocok sebagai jaringan implantasi.

Penelitian ini memberikan hasil bahwa penggunaan teknik *Antigen Removal* terhadap jaringan *Xenograft* asal domba yaitu mampu menurunkan respon imun pada jaringan subkutan mencit. Indikator penurunan respon imun akut yang diamati yaitu penurunan jumlah sel radang Mononuklear dan Polimorfonuklear serta sitokin proinflamasi berupa penurunan IL-1 β . Hal ini sesuai dengan hasil penelitian dari Wong *et al.*, (2011) bahwa *Antigen Removal* mampu melarutkan sel-sel *Xenoantigen* berupa protein sel (MHC 1, DNA) dan α -Gal sehingga *makrofag* tidak banyak terinduksi pada jaringan donor yang diimplan.

Sehingga teknik *Antigen Removal* sangat cocok digunakan sebagai kandidat jaringan cangkok dengan parameter terhadap Jumlah Sel Radang dan Ekspresi Area sitokin IL-1 β . Namun perlu dilakukan Uji selanjutnya untuk mengetahui bahwa jaringan *Xenograft* tersebut cocok untuk di kombinasi dengan sel *Pluripotent* dan sel *Growth factor* sebagai jaringan cangkok untuk menggantikan jaringan jantung yang mengalami Infark.



BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat ditarik kesimpulan bahwa :

1. Kombinasi teknik Deselularisasi dan *Antigen Removal* (AR) pada dinding jantung domba mampu menurunkan ekspresi IL-1 β masing masing sebesar 93,1 % dan 85,2 % dibandingkan dengan kelompok segar dan kelompok Deselularisasi
2. Kombinasi teknik Deselularisasi dan *Antigen Removal* (AR) pada dinding jantung domba mampu menurunkan jumlah sel radang masing masing sebesar 81% dan 55,3 % dibandingkan dengan kelompok segar dan kelompok Deselularisasi
3. Kombinasi teknik Deselularisasi dan *Antigen Removal* (AR) mampu digunakan untuk meningkatkan biokompabilitas *Xenograft* jaringan jantung domba terhadap respon imun akut berdasarkan jumlah sel radang dan area ekspresi IL-1 β

6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui apakah kemampuan jaringan xenograft asal domba mampu digunakan sebagai *scaffold* dalam membawa Sel *Pluripotent* secara *in vitro* guna memperbaiki jaringan jantung yang mengalami infark.

DAFTAR PUSTAKA

- Baratawidjaya, K. G. 2006. *Imunologi Dasar*. Edisi ke 7. Jakarta : Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- 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
- Brown, S. 2015. *The Science and Application of Hematoxylin and Eosin Staining*. Robert H. Lurie Comprehensive Cancer Center. Northwestern University
- Cissell, D.D., J.C. Hu, L.G.Griffiths and K.A. Athanasiou. 2014. Antigen removal for the production of biomechanically functional, xenogeneic tissue graft. *Journal of Biomechanics* 47 : 1987-1996.
- Crapo, P.M., T.W. Gilbert, S.G. Badylac. 2011, An overview of tissue and whole organ decellularization processes, *Biomaterials* 32: 3233-3243
- Dirjennak, 2016. Populasi Domba menurut Provinsi. http://www.pertanian.go.id/ASEM2015-NAK/Pop_Domba_Prop_2015.pdf (2 Pebruari 2016)
- Easter, D. 2008. Allograft vs. Xeograft. Practical Considerations for Biologic Scaffolds. editor: Garth.J. *University of California*. San Diego. hal: 6
- Fatmah. 2006. Respons Imunitas Yang Rendah Pada Tubuh Manusia Usia Lanjut. *J. Makara, Kesehatan*, Vol. 10, No. 1, Juni 2006: 47-53 47.
- Flaherty JD, J.J. Bax, De Luca L, J.S. Rossi, C.J. Davidson, G. Filippatos and P.P Liu. 2009 Acute heart failure syndromes in patients with coronary artery disease early assessment and treatment. *J Am Coll Cardiol*. Jan ; 53(3):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., B.G Yebra., A.L.L Flarez., and E.G Guerra. 2012. Review Article : The Major Histocompatibility Complex in Transplantation, *J. Transpl* 2012: 1-8
- Gilbert, T.W., T.L Sellaro and S.F.Badylak. 2006, Decellularization of tissues and organs, *Biomaterials* 27: 3675-3683

- Hetherington, V.J., J.S. Kawalec, D.S. Dockery, O.S. Targoni, P.V. Lehmann and D. Nadler. 2005, Immunologica testing of xeno-derived osteochondral grafts using peripheral blood mononuclear cells from health human donors, *BMC. Muscul. Skel. Disord.* 6(36): 1-11
- Higgins, G. C., Foster, J. L., and Postlethwaite, A. E. 1993. Synthesis and biological activity of human interleukin-1 propiece in vitro. *Arthritis Rheum.* 39, S153
- Ikada, T., 2006. Tissue Engineering: Fundamentals and Applications,,Chapter 2, *J. Elsevier* : Amsterdam, pp. 162-169.
- Kusriningrum R. 2008. *Dasar Perancangan Percobaan Rancangan Acak Lengkap*. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Lam, C.S., L. Asya, K. Elisabeth, J.M Massaro, D.S Lee, J.E Ho, D. Levy, M.M Redfield, B.M. Pleske, E.J Benjamin and R.S Vasan. 2011. Cardiac and Non-Cardiac Dysfunction as Precursors of Heart Failure with Reduced and Preserved Ejection Fraction in the Community. *Circulation.* Jul 5;124(1):24-30.
- Levinsky N. G. 1996. *Committee On Xenograft Transplantation : Ethical Issues And Public Policy*. National Academy Press., Washington. ISBN: 0-309-58956-8
- Levinson B., 2004. Management of colorectal emergencies : Pecutaneous Abscess Drainage. *Ann. Ital. Chir* LXXV, 5
- Martinol F., A. Mayor, J. Tschopp. 2009. The Inflammasomes : Guardians of the Body. *Annu. Rev. Immunol.* 27:229–65
- Merriman, C. R., Pulliam, L. A., and Kampschmidt, R. F., 1977. Comparison of leukocytic pyrogen and leukocytic endogenous mediator. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 154, 224±227
- Mihai, R., I.P Florescu, V. Corolu, A, Oancea and M. Lungu. 2011 . In Vitro biocompatibility testing of some sytetic polymers used for the achievement of nervous conduits, *J. Med Life* 4 (3) : 250-255
- Mirsadraee, S., H.E Wilcox, K.G. Watterson, J.N Kearney, J. Hunt, J. Fisher, E. daIngham. 2007. Biocompatibility of acellular Human Pericardium, *J Surg Res* 143:407-414
- Muttaqin, A. 2009. *Buku Ajar Asuhan Keperawatan Klien Dengan Gangguan Sistem Kardiovaskuler Dan Hematologi*. Jakarta: Salemba Medika.

- O'Brien F. J. 2011. Biomaterial and Scaffold for Tissue Engginering. *Review article*. Volume 14:3. ISSN. 13697021
- Olmos, G., L. Jeronia. 2014. Tumor Necrosing Factor Alpha: A Link between Neuroinflammation and Excitotoxicit. *Review article* .Volume 2014 (2014), Article ID 861231, pages1-12
- Ozbabacan,. O. E. A., G. Attila, N. Ruth and K.Ozlem. 2014. The Structural Pathway of Interleukin 1 (IL-1) InitiatedSignaling Reveals Mechanisms of Oncogenic Mutationsand SNPs in Inflammation and Cancer. *Journal :PLOS Computational Biology : vol. 10*. hal. 1
- Penn, D., 2002. Major Histocompatibility Complex (MHC). *Encyclopedia of Life Sciences*. hal: 1-7
- Qiong Wu, J. Bao, Y.j. Zou, Y.j. Wang, Z.g. Du, Y.j Shi, L. Li and H. Bu 2015. Optimizing Perfusion-Decellularization Methods of Porcine Livers for Clinical-Scale Whole-Organ Bioengineering. *BioMed Research International*. Volume 2015, Article ID 785474, 9 pages
- Roger VL. 2007. Epidemiology Of Myocardial Infarction. *Med Clin North Am*. 200 ;91:537.
- Sparshott, A. 2016. The Basic of Acute Inflammation. Ivline. <http://www.ivline.org/2011/01/basics-of-acute-inflammation.html> [24 Januari 2016]
- Sondell, M., G. Lundborgand and M. Kanje. 1998, Regeneration of the rat sciatic nerve into allografts made acellular through chemical extraction, *Brain Res*. 795: 44-54
- Suckow, M. A., S.H. Weisbroth and C.I., Franklin. 2006. *The Laboratory Rat. Elsevier Academic Press. USA*
- Vicenova, B., V., Vapolensky., L Bursek., M. Porpiek. 2009. Emerging Role of Interleukin-I in Cardiovascular Disease. *Physiol. Res*. 58: 481-498, 2009
- Vinerean, H. V. 2012. *Mice Biology and Husbandry*. Florida International University. Laboratory Animal Research
- Vykoukal D.M., R.C Peter, J. Vykoukal. 2009. Dielectric characterization of complete mononuclear and polymorphonuclear blood cell subpopulations for label-free discrimination. *J. Integr. Biol*. 1 : 477-484
- Waly, T. M. 2014. Prevalensi Pasien Infark Miokard Akut Yang Menjadi Cardiac Arrest Di Icu/Hcu Rsup Dr. Kariadi Semarang. Program Pendidikan Sarjana KedokteranFakultas KedokteranUniversitas Diponegoro. *Jurnal Media Medika Muda* :hal 2

- Wang, B., A. Borazjani, M. Tahai, D.J Curry, D.T Simioescu, J. Guan, F. To, S.H.Elder and J. Liao. 2010. Fabrication of Cardiac Patch with Decellularized Porcine Myocardial Scaffold and Bone Marrow Mononuclear Cells. *J. Biomed Res A*. 94(4) : 1100-1110
- Wang, J., J. D. Mackenzie, R. Ramachandran, D.C. Chen. 2014. Identifying Neutrophil in HE Staining Histology Tissue Images. *Miccai, part 1 LNCS* 8673, pp 73-80
- Wong, M., J, Kent Leach, K, A, Atanasiou., L, G, Griffiths. 2011. The role of protein solubilization in antigen removal from xenogeneic tissue for heart valve tissue engineering. *J. Biomaterial*. 32, 8129,8138
- WHO (World Health Organization). 2015. Cardiovascular Diseases (CVDs). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>. Diakses tanggal 8 Juni 2015 pukul 20.00 WIB.
- Zafari, A. M. 2015. Myocardial Infarction : Practice Essentials, Background, Anatomy. American Association for the Advancement of Science. <http://emedicine.medscape.com/article/155919-overview#a4>. Diakses tanggal 24 Januari 2016 pukul 20.36 WIB

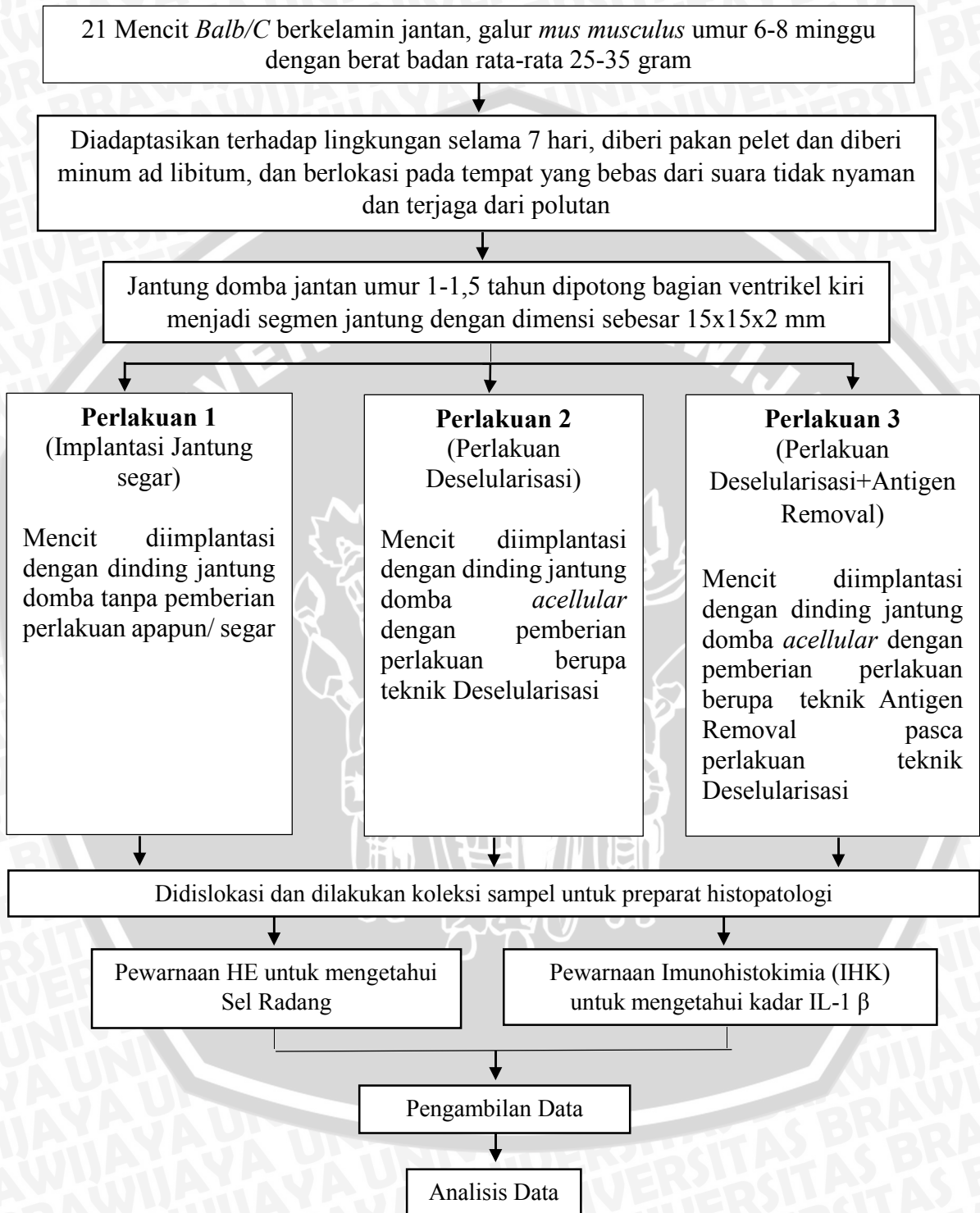


UNIVERSITAS BRAWIJAYA



LAMPIRAN

Lampiran 1. Diagram Alir Tahapan Penelitian



Lampiran 2. Pembuatan Kandang Mencit

Bak Kandang

- Diukur bak kandang yang akan digunakan dengan ukuran kandang panjang 44 cm, lebar 30 cm, dan tinggi 12 cm
- Dipotong kawat penutup kandang mencit sesuai ukuran bak kandang
- Dipotong kawat penutup sebagai sekat antar kandang yang dibagi menjadi 4 bagian dalam 1 bak kandang besar dan bak kecil dibagi menjadi 3 bagian
- Dilubangi bak kandang bagian ujung sebagai pengunci kandang
- Kandang jadi siap pakai

Hasil kandang jadi

Lampiran 3. Preparasi Jantung Domba

Jantung Domba

- Disiapkan alat yang digunakan, yaitu : alumunium foil, silet, penggaris, dan pot sampel
- Dipotong bagian ventrikel kiri jantung domba
- Dipotong dengan dimensi sebesar 15x15x2 mm
- dimasukkan pot sampel

Hasil segmen jantung

Lampiran 4. Pembuatan *Phosphat Buffer Saline* (PBS) 1 liter

Bahan PBS

- Disiapkan bahan yang akan ditimbang, yaitu KCl, KH_2PO_4 , NaCl, Na_2HPO_4 , dan aquadest
- Disiapkan alat yang akan digunakan, yaitu gelas ukur, aluminium foil, magnetic stirer
- Ditimbang KCl 0,2 gram
- Ditimbang KH_2PO_4 0,2 gram
- Ditimbang NaCl 8 gram
- Ditimbang Na_2HPO_4 2,16 gram
- Dicampur semua bahan yang telah ditimbang dengan aquadest 1 liter kedalam tabung erlenmeyer
- Dihomogenkan dengan magnetic stirer
- Diukur pH PBS sebesar 7,4

Hasil

Lampiran 5. Pembuatan Larutan Deselularisasi sebanyak 1 liter

Sampel Jantung Domba

- Disiapkan bahan yang akan ditimbang yaitu : Trypsin 0,01%, SDS 0,1%, RNase 20 µg/ml dan DNase 0,2 mg/ml
- Ditimbang Trypsin 0,1 gram
- Ditimbang SDS 1 gram
- Ditimbang RNase 0,02 gram
- Ditimbang Dnase 1 gram
- Dicampur semua bahan yang telah ditimbang dengan PBS 1 liter kedalam tabung erlenmeyer
- Dihomogenkan dengan magnetic stirer

Hasil

Rumus perhitungan Trypsin 0,01% :

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

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

Rumus perhitungan SDS 0,1% :

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

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

Rumus perhitungan DNase 0,2 mg/ml:

Dibutuhkan 1000 ml,

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

Rumus perhitungan Rnase 20 µg/ml

Dibutuhkan 1000 ml

$$20 \text{ µg /ml} \times 1000 \text{ ml} = 20000 \text{ µg} = 0.02 \text{ g}$$



Lampiran 6. 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 :

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

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

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

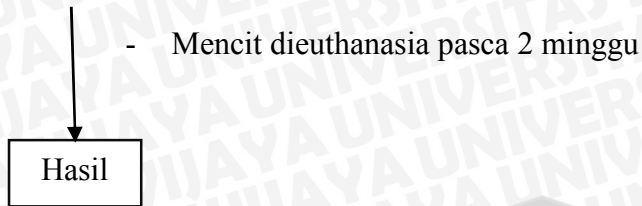
Sampel Jantung Domba

- Disiapkan bahan yang akan ditimbang yaitu : KCl, DTT, dan MgCl₂
- Ditimbang KCl 3,73 gram
- Ditimbang DTT 7,71 gram
- Ditimbang MgCl₂ 0,095 gram
- Dicampur semua bahan yang telah ditimbang dengan PBS 500 ml dalam aquadest kedalam tabung erlenmeyer
- Dihomogenkan dengan magnetic stirer

Hasil

Lampiran 7. Cara Implantasi Subkutan MencitMencit *Balb/C*

- Disiapkan alat bedah yang akan digunakan
- Disiapkan mencit yang akan dilakukan pembedahan
- Disterilisasi alat bedah (dissecting set+kapas) selama 1 jam
- Ditimbang berat badan mencit dan diberi label pada kandang mencit
- Menghitung dosis obat xylazin dengan dosis 16 mg/kgBB
- Dilakukan penyuntikan mencit sesuai dengan perhitungan dosis xylazin melalui subkutan mencit
- Ditunggu ± 15 menit sampai mencit teranesthesi
- Dilakukan pencukuran rambut mencit pada bagian punggung mencit (thoraco dorsal)
- Diusap kapas dengan alkohol setelah dilakukan pencukuran
- Dilakukan insisi pada thoraco dorsal yang sudah dicukur $\pm 1,5$ cm
- Dilakukan reparir subkutan mencit untuk peletakan/ implantasi sampel mencit
- Dimasukkan sampel kedalam mencit
- Dilakukan penjahitan dengan alat bedah stearyl yang sudah direndam dengan iodine dengan tipe jahitan simple interrupted
- Diberikan iodine pada bagian jahitan mencit
- Mencit dikembalikan ke kandang yang sudah dibersihkan +pakan+minum antibiotik (amoxicillin) selama 7 hari secara oral
- Kandang mencit diberi label perlakuan



- Rumus perhitungan xylazin :

$$\frac{\text{Berat Badan kg} \times \text{Dosis}}{\text{Konsentrasi}}$$

Lampiran 8. Cara pembuatan Preparat Histologi

Jaringan pada PBS+Formalin 10%

- Difiksasi jaringan menggunakan formalin 10%
- Didehidrasi menggunakan Alkohol bertingkat dari konsentrasi rendah ke tinggi (70 %, 80%, 90%, 95%, 100%)
- Diclearing menggunakan Xylol I, II
- Dilakukan pembedahan atau *Embedding* menggunakan parafin cair panas
- Dilakukan proses Blocking menggunakan cetakan sesuai ukuran jaringan
- Dilakukan pemotongan menggunakan mikrotom
 - direkatkan blok parafin yang mengandung preparat pada tempat duduknya di mikrotom. Tempat duduk blok parafin beserta blok parafinnya kemudian diletakkan pada pemegangnya (holder) pada mikrotom dan dikunci dengan kuat.
 - diletakkan pisau mikrotom pada tempatnya dan atur sudut kemiringannya. Biasanya sudut kemiringan berkisar 20-30 derajat.
 - ditur ketebalan potongan yang diinginkan, biasanya dipakai ketebalan antara 5-7 mikrometer

- digerakkan blok preparat ke arah pisau sedekat mungkin dan potonglah blok preparat secara teratur dan ritmis. Dibuang pita-pita parafin yang awal tanpa jaringan hingga kita mendapatkan potongan yang mengandung preparat jaringan
 - Pita parafin yang mengandung jaringan lalu dipindahkan secara hati-hati menggunakan sengkeli atau kuas kedalam waterbath yang temperaturnya diatur 37-40°C dan biarkan beberapa saat hingga pita parafin tersebut mengembang.
 - Setelah pita parafin terkembang dengan baik, tempelkan pita parafin tersebut pada kaca objek yang telah dicoated dengan cara memasukkan kaca objek itu kedalam waterbath dan menggerakannya ke arah pita parafin. Dengan menggunakan sengkeli atau kuas pita parafin ditempelkan pada kaca objek. Setelah melekat kaca objek digerakkan keluar dari waterbath dengan hati-hati agar pita parafin tidak melipat.
 - diletakkan kaca objek yang berisi pita parafin di atas hotplate dengan temperatur 40-45°C, biarkan selama beberapa jam. Cara lainnya adalah dengan melewati kaca objek di atas api sehingga pita parafin melekat erat di atas kaca objek.
 - Setelah air kering dan pita parafin telah melekat dengan kuat, simpan kaca objek berisi potongan parafin dan jaringan sampai saatnya untuk diwarnai.
- Dilakukan Pewarnaan HE atau IHK

Hasil

Lampiran 9. Pewarnaan Imunohistokimia (IHK)

Preparat slide

- Disiapkan preparat yang akan dilakukan pewarnaan IHK
- Dilakukan deparafinisasi yaitu menggunakan xylol I, II, dan III @5 menit
- Dilakukan rehidrasi yaitu menggunakan ethanol I, II, alkohol 95%, 90%, 80%, 70%, aquadest @5 menit
- Dilakukan blocking endogenous peroxidase yaitu menggunakan H_2O_2 dalam aquadest selama 10 menit
- Dicuci menggunakan PBS sebanyak 3x @5menit
- Diberikan superbloc @10 menit
- Dibuang larutan superbloc di slide
- Diberikan trypsin @10 menit
- Dicuci menggunakan PBS sebanyak 3x @5menit
- Diinkubasi antibodi primer IL-1 β @1:1000 pada suhu kamar semalaman
- Dicuci menggunakan PBS sebanyak 3x @5menit
- Diinkubasi antibodi sekunder pada suhu kamar @10 menit
- Dicuci menggunakan PBS sebanyak 3x @5menit
- Diinkubasi dengan HRP pada suhu kamar @10 menit
- Dicuci menggunakan PBS sebanyak 3x @5menit

- Diberikan DAB+substrate dengan microtube ditutupi oleh alumunium foil pada suhu kamar @10 menit tidak boleh terpapar cahaya
- Dimasukkan slide kedalam aquadest
- Dilakukan counterstaining hematoxylin @4 celup
- Dilakukan pencucian dengan air mengalir selama 10 menit
- Dilakukan dehidrasi yaitu menggunakan alkohol 70%, 80%, 90%, 95%, ethanol absolut I, II, III @2 menit
- Dilakukan clearing yaitu menggunakan xylol I, II, dan III @5 menit
- Dilakukan mounting

Hasil

- Cara pengenceran blocking endogenous peroxide adalah 30% H₂O₂ 0,1 ml + aquadest 9,9 ml
- Cara pengenceran antibodi primer 1:1000 adalah diambil 1 µl antibodi + 999 µl PBS
- Cara pembuatan DAB+substrate adalah 1 µl DAB tiap 25 µl substrate

Lampiran 10. Pewarnaan Hematoxylen-Eosin**Preparat**

- dideparafinisasi dengan *xylol* sebanyak 2 kali selama 5 menit
- dilakukan dehisrasi dengan ethanol absolut sebanyak 3 kali dan ethanol bertingkat (95%, 90%, 80%, 70%) masing-masing 5 menit
- direndam dalam aquades

Preparat

- diwarnai dengan *Hematoxylen* selama 10 menit
- dicuci dengan air mengalir selama 30 menit
- dibilas dengan aquades selama 5 menit. Langkah selanjutnya
- diwarnai dengan *Eosin* selama 5 menit lalu direndam kedalam aquades.
- dimasukkan kedalam ethanol bertingkat (70%, 80%, 90%, 95%), masing-masing selama 10 menit.
- dimasukkan kedalam ethanol absolut selama 5 menit sebanyak 3 kali.
- dimasukkan kedalam *xylol* selama 5 menit sebanyak 2 kali dan dikeringkan.
- dimounting dengan menggunakan entellan dan ditutup cover glass
- dimounting dengan entellan
- diamati dibawah mikroskop cahaya dengan lensa 10-40 x

Preparat Hasil HE

Lampiran 11. Ekspresi Interleukin-1 β (IHK)

Perlakuan	Ulangan	S1	S2	S3	S4	S5	Rata-rata
P1 Segar (Tanpa Perlakuan)	U1	69,4%	65,8%	97,3%	48,3%	73,3%	70,8%
	U2	100,0%	100,0%	96,2%	100,0%	100,0%	99,2%
	U3	100,0%	97,6%	91,4%	100,0%	94,0%	96,6%
	U4	86,1%	76,1%	39,6%	70,9%	56,6%	65,9%
	U5	100,0%	100,0%	96,6%	100,0%	98,6%	99,0%
	U6	87,7%	80,3%	96,1%	86,1%	84,3%	86,9%
P2 (Perlakuan Deselularis asi)	U1	27,2%	34,0%	20,6%	22,2%	21,2%	25,0%
	U2	44,5%	54,8%	28,4%	27,8%	1,0%	31,3%
	U3	18,0%	15,2%	46,6%	43,1%	20,6%	28,7%
	U4	40,5%	28,9%	48,9%	59,3%	55,2%	46,6%
	U5	76,6%	86,0%	79,2%	61,9%	43,0%	69,3%
	U6	81,1%	45,9%	16,4%	40,5%	14,6%	39,7%
P3 (Perlakuan DES+AR)	U1	8,9%	7,2%	5,7%	5,8%	7,0%	6,9%
	U2	6,0%	8,0%	6,5%	6,0%	9,4%	7,2%
	U3	5,0%	8,0%	2,0%	1,0%	1,5%	3,5%
	U4	5,3%	1,2%	0,9%	1,7%	0,0%	1,8%
	U5	6,5%	4,5%	14,5%	19,3%	4,1%	9,8%
	U6	8,8%	6,0%	5,6%	5,9%	5,5%	6,4%



Lampiran 12. Perhitungan Penurunan Ekspresi Interleukin-1 β **Kelompok 2 (Perlakuan DES)**

$$\begin{aligned} \text{Ekspresi IL- } 1\beta \text{ (\%)} &= \frac{\text{rataam segar} - \text{rataam DES}}{\text{rataam segar}} \times 100\% \\ &= \frac{86,85 - 40,10}{86,85} \times 100\% \\ &= 53,8 \text{ \%} \end{aligned}$$

Perlakuan Deselularisasi mampu menurunkan ekspresi IL- 1 β sebesar 53,8 % terhadap perlakuan segar

Kelompok 3 (Perlakuan DES+AR)

$$\begin{aligned} \text{Ekspresi IL- } 1\beta \text{ (\%)} &= \frac{\text{rataam segar} - \text{rataam DES+AR}}{\text{rataam segar}} \times 100\% \\ &= \frac{86,85 - 5,93}{86,85} \times 100\% \\ &= 93,1 \text{ \%} \end{aligned}$$

Perlakuan Deselularisasi + Antigen Removal mampu menurunkan ekspresi IL- 1 β sebesar 93,1 % terhadap perlakuan segar

$$\begin{aligned} \text{Ekspresi IL- } 1\beta \text{ (\%)} &= \frac{\text{rataam DES} - \text{rataam DES+AR}}{\text{rataam DES}} \times 100\% \\ &= \frac{40,10 - 5,93}{40,10} \times 100\% \\ &= 85,2 \text{ \%} \end{aligned}$$

Perlakuan Deselularisasi + Antigen Removal mampu menurunkan ekspresi IL- 1 β sebesar 85,2 % terhadap perlakuan Deselularisasi

Lampiran 13. Hasil Uji Statistika Ekspresi IL-1 β

Tabel 13.1 Deskriptif IHK IL-1 beta

		Descriptives			
	Kelompok Perlakuan		Statistic	Std. Error	
Persentase_IL1	Kelompok_Segar(Tanpa_Perlakuan)	Mean	86,8500	6,05330	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	71,2895	
			Upper Bound	102,4105	
		5% Trimmed Mean	87,3278		
		Median	93,1000		
		Variance	219,855		
		Std. Deviation	14,82751		
		Minimum	65,90		
		Maximum	99,20		
		Range	33,30		
		Interquartile Range	29,47		
		Skewness	-,801	,845	
		Kurtosis	-1,715	1,741	
		Kelompok_Deselularisasi	Kelompok_Deselularisasi	Mean	40,1000
95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound			22,9813	
	Upper Bound			57,2187	
5% Trimmed Mean	39,3167				
Median	35,5000				
Variance	266,092				
Std. Deviation	16,31233				
Minimum	25,00				
Maximum	69,30				
Range	44,30				
Interquartile Range	24,50				
Skewness	1,352			,845	
Kurtosis	1,695			1,741	
Kelompok_Deselularisasi+Antigen_Removal	Kelompok_Deselularisasi+Antigen_Removal			Mean	5,9333
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	2,9387	
			Upper Bound	8,9279	
		5% Trimmed Mean	5,9481		
		Median	6,6500		
		Variance	8,143		
		Std. Deviation	2,85354		
		Minimum	1,80		

Maximum	9,80	
Range	8,00	
Interquartile Range	4,78	
Skewness	-,312	,845
Kurtosis	-,401	1,741

Tabel 13.2 Tes Normalitas Data IHK IL-1 beta

Kelompok Perlakuan		Tests of Normality					
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Jumlah Sel	Kelompok_Segar(Tanpa_Perlakuan)	,245	6	,200*	,816	6	,081
Radang	Kelompok_Deselularisasi	,205	6	,200*	,882	6	,277
	Kelompok_Deselularisasi+Antigen_Removal	,232	6	,200*	,952	6	,759

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

- a. Test distribution is Normal.
- b. Calculated from data.
- c. Lilliefors Significance Correction.

Data Normal jika $P > 0,05$. Hasil uji diatas menunjukkan data terdistribusi normal menurut uji Kolmogorof-Smirnov (0,200) dan Shapiro Wilk (0,81 ; 0,277 ; 0,759)

Tabel 13.3 Uji ANOVA

ANOVA					
Persentase_IL1					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	19900,861	2	9900,431	60,113	,000
Within Groups	2470,448	15	164,697		
Total	22371,309	17			

Tabel 13.4 Uji Homogenitas Data

Test of Homogeneity of Variances

Persentase_IL1

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4,338	2	13	,032

Data Homogen jika $P > 0,05$. Uji homogenitas menunjukkan angka 0,032 hal ini menunjukkan bahwa data tidak homogen tiap ulangan di tiap kelompok perlakuan.

13.5 Uji Tukey

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Persentase_IL1

Tukey HSD

(I) Kelompok_Perlakuan	(J) Kelompok_Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kelompok_Segar(Tanpa_Perlakuan)	Kelompok_Deselularisasi	46,75000*	7,40938	,000	27,5044	65,9956
	Kelompok_Deselularisasi+Antigen_Removal	80,91667*	7,40938	,000	61,6710	100,1623
Kelompok_Deselularisasi	Kelompok_Segar(Tanpa_Perlakuan)	-46,75000*	7,40938	,000	-65,9956	-27,5044
	Kelompok_Deselularisasi+Antigen_Removal	34,16667*	7,40938	,001	14,9210	53,4123
Kelompok_Deselularisasi+Antigen_Removal	Kelompok_Segar(Tanpa_Perlakuan)	-80,91667*	7,40938	,000	-100,1623	-61,6710
	Kelompok_Deselularisasi	-34,16667*	7,40938	,001	-53,4123	-14,9210

*. The mean difference is significant at the 0.05 level

Tabel 13.6 Uji Lanjutan Homogenitas Tukey

Persentase_IL1

Tukey HSD^a

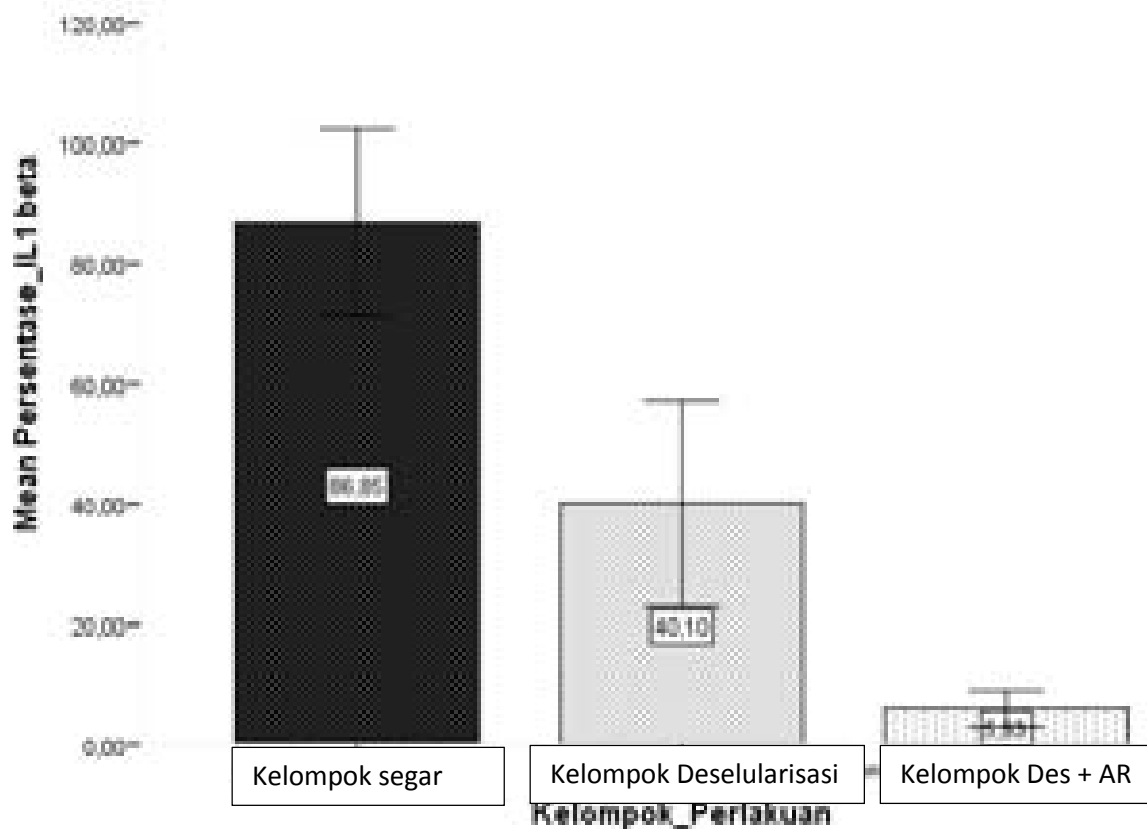
Kelompok_Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Kelompok_Desektularisasi I-Antigen_Removal	6	5,9333		
Kelompok_Desektularisasi I	6		40,1660	
Kelompok_Segar (Tanpa_Perlakuan)	6			86,8500
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.



Grafik 1. Grafik rerata Ekspresi Sitokin IL-1 beta



Error Bar: 95% CI

Lampiran 14. Data Jumlah sel radang

Perlakuan	Ulangan	F1	F2	F3	F4	F5	Total	Rata-rata
P1	U1	30	116	32	21	121	254	64
	U1	35	85	111	68	106	208	81
	U1	49	23	65	47	15	199	39
	U1	65	21	34	69	0	189	37
	U1	90	37	28	30	16	201	40
	U1	48	5	51	28	36	168	33
P2	U2	29	71	35	32	49	99	43
	U2	23	9	32	14	17	95	19
	U2	47	45	36	54	3	76	37
	U2	20	6	31	5	13	75	15
	U2	6	9	16	21	18	70	14
	U2	10	19	24	34	6	92	18
P3	U3	0	24	4	9	1	38	7
	U3	3	7	21	8	9	48	9
	U3	9	0	20	3	0	32	6
	U3	35	5	19	8	7	44	14
	U3	4	2	5	12	19	42	8
	U3	0	7	0	0	16	23	4

Lampiran 15. Perhitungan Penurunan Jumlah Sel Radang**Kelompok Perlakuan Deselularisasi terhadap Segar)**

$$\text{Jumlah Sel Radang (\%)} = \frac{\text{rataam segar} - \text{rataam DES}}{\text{rataam segar}} \times 100\%$$

$$= \frac{203,17 - 84,67}{203,17} \times 100\%$$

$$= 58\%$$

Kelompok Perlakuan Deselularisasi + Antigen Removal terhadap Segar

$$\begin{aligned} \text{Jumlah Sel Radang (\%)} &= \frac{\text{rataam segar} - \text{rataam DES+AR}}{\text{rataam segar}} \times 100\% \\ &= \frac{203,17 - 37,83}{203,17} \times 100\% \\ &= 81,2\% \end{aligned}$$

Lampiran 16. Hasil Uji Statistika

Tabel 16.1 One Way Deskriptif

Descriptives								
Sel Radang								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Perlakuan 1	6	203,17	28,51958	11,643	173,2372	233,0961	168,00	254,00
Perlakuan 2	6	84,67	12,37201	12,372	71,6830	97,6503	70,00	99,00
Perlakuan 3	6	37,83	9,08662	9,086	28,2975	74,3692	23,00	48,00
Total	18	108,56	73,719	17,376	71,8959	145,2152	23,00	254,00

Tabel 16.2 Uji Homogenitas Varian

Test of Homogeneity of Variances				
Sel Radang				
Levene Statistic	df1	df2	Sig.	
1,453	2	15	,265	



Tabel 16.3 Uji ANOVA

ANOVA					
Sel Radang					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	87141,444	2	43570,722	124,606	,000
Within Groups	5245,000	15	349,667		
Total	92386,444	17			

Tabel 16.4 Uji Normalitas Data

Tests of Normality							
Kelompok Perlakuan		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Jumlah Sel Radang	Kelompok_Segar(Tanpa_Perlakuan)	,266	6	,200*	,909	6	,431
	Kelompok_Deselularisasi	,258	6	,200*	,867	6	,215
	Kelompok_Deselularisasi+Antigen_Removal	,177	6	,200*	,949	6	,734

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

- a. Test distribution is Normal.
- b. Calculated from data.
- c. Lilliefors Significance Correction.



Tabel 16.5 Uji Lanjutan Tukey

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Sel Radang

UJI TUKEY

(I) KelompokPerlakuan	(J) KelompokPerlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kelompok_Segar(Ta npa_Perlakuan)	Kelompok_Deselula risasi	118,50000*	10,79609	,000	90,4575	146,5425
	Kelompok_Deselula risasi+Antigen_Rem oval	165,33333*	10,79609	,000	137,2908	193,3759
Kelompok_Deselular isasi	Kelompok_Segar(T anpa_Perlakuan)	- 118,50000*	10,79609	,000	-146,5425	-90,4575
	Kelompok_Deselula risasi+Antigen_Rem oval	46,83333*	10,79609	,002	18,7908	74,8759
Kelompok_Deselular isasi+Antigen_Rem oval	Kelompok_Segar(T anpa_Perlakuan)	- 165,33333*	10,79609	,000	-193,3759	-137,2908
	Kelompok_Deselula risasi	-46,83333*	10,79609	,002	-74,8759	-18,7908



**Tabel 16.6 Uji Lanjutan Homogenitas Tukey
Sel Radang**

JumlahSelRadang

Tukey HSD^a

Kelompok/Pertakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Kelompok_Desekulansas i-Antigen_Removal	6	37,8333		
Kelompok_Desekulansas i	6		64,6667	
Kelompok_Segar (Tanpa_Pertakuan)	6			203,1667
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

**Lampiran 17. Hasil Blast Susunan Protein Penyandi Kolagen tipe III jaringan
jantung domba dengan subkutan mencit**

Lampiran 17.1 Data Kolagen tipe III mencit

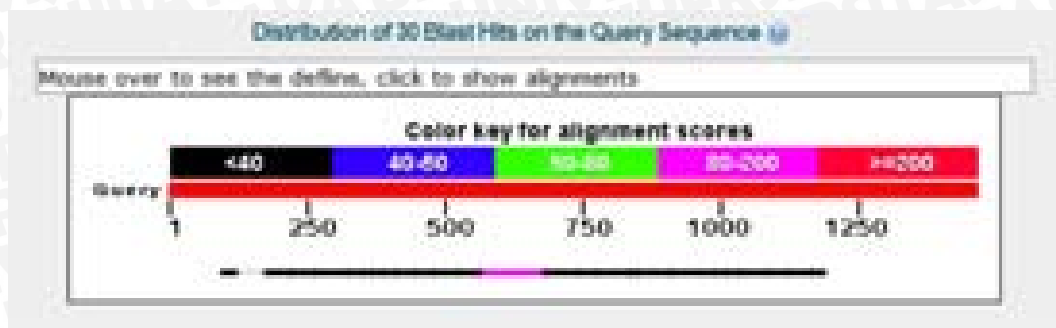
RID: [VJ03328E11N](#) (Expires on 08-16 20:41 pm)
 Query ID: [q1371948821gb144H58724.1](#)
 Description: Collagen, type III, alpha 1 [Mus musculus]
 Molecule type: amino acid
 Query Length: 1464

Lampiran 17.2 Data Kolagen tipe III domba

Subject ID: [q1784993931gb148H43731.1](#)
 Description: collagen type III alpha 1, partial [Ovis aries]
 Molecule type: amino acid
 Subject Length: 175
 Program: BLASTP 2.5.0+ P-Citation



Lampiran 17.3 Distribusi dari 30 blast data



Lampiran 17.4 Tingkat Homogenitas/Ident

Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
124	905	71%	2e-37	90%	ABB45731.1

Lampiran 17.5 Susunan Nukleotida ECM jaringan jantung domba dengan Subkutan mencit

collagen type III alpha 1, partial [Ovis aries]
 Sequence ID: [gblABB45731.1](#) Length: 175 Number of Matches: 30

Range: 1 to 134 Selected Sequences

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
124 bits(312)	2e-37	Compositional matrix adjust.	121/134(90%)	126/134(94%)	0/134(0%)
Query: 545	GGGGKPPFPSSQGEISGRPPFPFSSPFGGQPFYNGTFFPKGIDGALPGRNGERGGPFGPLP			604	
Subject: 1	G+D KPPFPSSQE-SRPPFP GFGQPFYNGTFFPKNDGALPGRNGERGGPFG			60	
Query: 605	GFAGKIGETSPQFFPFTSPAGSDSSFPNGQLQIIPSTGSPFENKNGEPPHSEY			644	
Subject: 61	GFAGKIGETSPQFFPFTSPAGSD-SPPNGQLQ-SPT GPFENKNGEPPHSE			130	
Query: 645	GAPGAPGGKGGGAL 678				
Subject: 131	GAPGAPGGKGGGAL 134				



Lampiran 18. Macam-Macam Asam Amino beserta Kode dan Susunan

Amino Acid	Three-Letter Abbreviation	One-Letter Abbreviation
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Aspartic Acid	Asp	D
Cysteine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Glutamic Acid	Glu	E
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Methionine	Met	M
Phenylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Serine	Ser	S
Threonine	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

1st base

		U	C	A	G			
U	UUU	Phenylalanine	UCU	Serine	UAU	Tyrosine	UGU	Cysteine
	UUC	Phenylalanine	UCC	Serine	UAC	Tyrosine	UGC	Cysteine
	UUA	Leucine	UCA	Serine	UAA	Stop	UGA	Stop
	UUG	Leucine	UCG	Serine	UAG	Stop	UGG	Tryptophan
C	CUU	Leucine	CCU	Proline	CAU	Histidine	CGU	Arginine
	CUC	Leucine	CCC	Proline	CAC	Histidine	CGC	Arginine
	CUA	Leucine	CCA	Proline	CAA	Glutamine	CGA	Arginine
	CUG	Leucine	CCG	Proline	CAG	Glutamine	CGG	Arginine
A	AUU	Isoleucine	AUU	Threonine	AAU	Asparagine	AGU	Serine
	AUC	Isoleucine	AUC	Threonine	AAC	Asparagine	AGC	Serine
	AUA	Isoleucine	ACA	Threonine	AAA	Lysine	AGA	Arginine
	AUG	Methionine (Start)	ACG	Threonine	AAG	Lysine	AGG	Arginine
G	GUU	Valine	GUU	Alanine	GAU	Aspartic Acid	GGU	Glycine
	GUC	Valine	GUC	Alanine	GAC	Aspartic Acid	GGC	Glycine
	GUA	Valine	GCA	Alanine	GAA	Glutamic Acid	GGA	Glycine
	GUG	Valine	GCG	Alanine	GAG	Glutamic Acid	GGG	Glycine

Nonpolar, aliphatic Polar, uncharged Aromatic Positively charged

Negatively charged

Lampiran 19. Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya



**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARANCE"**

No: 438-REP-UB

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

PENELITIAN BERJUDUL	PEMERIKSAAN RESPON IMUN INHATE TERHADAP DINDING JANTUNG Domba Acellular Pasca Perlakuan Teknik Antigen Removal (AR) Melalui Implantasi Subcutan Mencit Balb/c guna uji Biokompatibilitas
PENELITI	FAKTOR MAHARDIKA
UNIT/LEMBAGA/TEMPAT	UNIVERSITAS BRAWIJAYA
DINYATAKAN	LAIK ETIK

Malang, 20 Oktober 2023
 Ketua Komisi Etik Penelitian
 Universitas Brawijaya




Dr. drh. Aslani'Am, GCS
 NIP. 19600811988022002

