

**EKSPRESI *TUMOR NECROSIS FACTOR* (TNF- α) DAN
INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE (iNOS)
PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*) HASIL
INDUKSI TIROGLOBULIN KAMBING
(CTg) SEBAGAI UPAYA OPTIMASI
HEWAN MODEL *AUTOIMMUNE*
THYROIDITIS (AITD)**

SKRIPSI

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan**

**Oleh
DYAH AGUSTINI
0911310039**



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN
PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Ekspresi *Tumor Necrosis Factor (TNF)-α* dan *Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS)* pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Hasil Induksi Tiroglobulin Kambing (CTg) Sebagai Upaya Optimasi Hewan Model *Autoimmune thyroiditis (AITD)*

Oleh :

DYAH AGUSTINI

0911310039

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji pada tanggal 5 Februari 2014 dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. Agung Pramana Warih Marhendra, MS

drh. Dyah Ayu Oktavianie A.P., M.Biotech

NIP. 19650616 199111 1 001

NIP. 19841026 200812 2 004

Mengetahui,
Ketua Program Studi Pendidikan Dokter Hewan
Program 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 : Dyah Agustini

NIM : 0911310039

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

“Ekspresi *Tumor Necrosis Factor* (TNF)- α dan *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Hasil Induksi Tiroglobulin Kambing (CTg) sebagai Upaya Optimasi Hewan Model *Autoimmune thyroiditis* (AITD)”

Dengan ini menyatakan bahwa :

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

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 26 Februari 2014

Yang menyatakan,

(Dyah Agustini)

NIM. 0911310039

repository.ub.ac

Ekspresi *Tumor Necrosis Factor* (TNF)- α dan *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Hasil Induksi Tiroglobulin Kambing (CTg) Sebagai Upaya Optimasi Hewan Model *Autoimmune thyroiditis* (AITD)

ABSTRAK

Autoimmune thyroiditis (AITD) merupakan penyakit autoimun spesifik pada kelenjar tiroid dan mengakibatkan disfungsi tiroid, yang ditandai oleh adanya infiltrasi sel mononuklear yang menghasilkan sitokin proinflamasi salah satunya adalah TNF- α dan mediator iNOS sebagai marker kerusakan jaringan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui peningkatan ekspresi TNF- α dan iNOS pada tikus hasil induksi tiroglobulin kambing (CTg) sebagai upaya optimasi pembuatan hewan model AITD. Tikus yang digunakan adalah *Rattus norvegicus* strain Wistar betina umur 8-12 minggu dengan berat badan 100-150 gram. Tikus dibagi dalam tiga kelompok yaitu P0 (tanpa induksi CTg), P1 (induksi CTg dosis 100 μ g/ml), dan P2 (induksi CTg dosis 200 μ g/ml). Induksi CTg yang diemulsikan dengan CFA dilakukan pada hari ke-0 dan dibooster dengan CTg yang diemulsikan dengan IFA pada hari ke-14 dan ke-28. Ekspresi TNF- α dan iNOS diamati dengan metode imunohistokimia dan presentase area dihitung menggunakan software *Axio Vision*. Data dianalisis menggunakan uji *One Way ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji *Tukey HSD*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa induksi CTg secara subkutan pada bagian *cervical* dapat meningkatkan ekspresi TNF- α dan iNOS secara signifikan ($p < 0,05$). Intensitas ekspresi TNF- α meningkat lebih tinggi pada P2 (1639%) daripada P1 (487%) jika dibandingkan dengan P0. P2 juga mengekspresikan iNOS dengan intensitas lebih tinggi (4118%) daripada P1 (1729%) jika dibandingkan dengan P0. Jumlah TNF- α dan iNOS pada jaringan tiroid berbanding lurus dengan tingkat kerusakan jaringan dan jumlah dosis CTg yang diinduksikan. Hal tersebut mengindikasikan adanya inflamasi dan reaksi stress oksidatif pada jaringan tiroid serta menjadi penanda AITD.

Kata kunci : *Autoimmune thyroiditis*, *Rattus norvegicus*, Tiroid, CTg, TNF- α , iNOS

Tumor Necrosis Factor (TNF)- α and Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS)
*Expression in Rat (*Rattus norvegicus*) Induced by Caprine Thyroglobulin*
(CTg) as an Optimum Method to Develop Animal Model
of Autoimmune thyroiditis (AITD)

ABSTRACT

Autoimmune thyroiditis (AITD) is a specific autoimmune disease affected thyroid gland that can lead to thyroid dysfunction caused by mononuclear infiltration which produced proinflammatory cytokine like TNF- α and iNOS as the marker of tissue damage. This study was aimed to investigate the increasing of TNF- α and iNOS expression in rat induced by caprine thyroglobulin (CTg) as the optimum method to develop animal model of AITD. Animal model that used were female *Rattus norvegicus* Wistar strain with age 8-12 weeks and 100-150 gram body weight. It divided into three groups which were P0 (no CTg induction), P1 (100 μ g/ml dose CTg induction), and P2 (200 μ g/ml dose CTg induction). Induction of CTg emulsified with CFA conducted on day-0 and boosted using CTg emulsified with IFA on day-14 and day-28. TNF- α and iNOS expression observed by immunohistochemistry method and counted using *Axio Vision*. Data was analyzed using *One Way ANOVA* test and continued with *Tukey HSD* test. The result showed CTg induction subcutaneously in *cervical* area increased TNF- α dan iNOS expression significantly ($p < 0,05$). P2 expressed TNF- α (1639%) higher than P1 (487%) compared with P0. P2 also expressed iNOS with higher intensity (4118%) than P1 (1729%) compared with P0. TNF- α and iNOS in rat thyroid were expressed as high as the tissue severity and CTg dose injected. It was indicated inflammation and oxidative stress reaction in thyroid tissue which marked AITD.

Key words : *Autoimmune thyroiditis, Rattus norvegicus, Thyroid, CTg, TNF- α , iNOS*

KATA PENGANTAR

Puji syukur alhamdulillah penulis haturkan kehadiran Tuhan Yang Maha Esa karena atas ridho, limpahan rahmat, hidayah dan pertolongan-Nya lah sehingga penulis mampu menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul *Ekspresi Tumor Necrosis Factor (TNF)- α dan Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Hasil Induksi Tiroglobulin Kambing (CTg) Sebagai Upaya Optimasi Hewan Model *Autoimmune thyroiditis* (AITD) dengan lancar. Penelitian ini merupakan bagian dari payung penelitian yang diketuai oleh bapak Dr. Agung Pramana Warih Marhendra, MS.*

Selama pelaksanaan penelitian dan penyusunan laporan ini penulis banyak mendapat bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Agung Pramana Warih Marhendra, MS selaku Ketua Program Kedokteran Hewan dan dosen pembimbing serta drh. Dyah Ayu Oktavanie A.P.,M.Biotech selaku dosen pembimbing atas bimbingan, kesabaran, waktu serta seluruh motivasi yang telah diberikan selama ini.
2. Ibu Dyah Kinasih Wuragil S.Si, MP., M.Sc, drh. Handhayu Untari, dan drh. Herlina Pratiwi selaku dosen penguji atas segala saran, kesabaran, bantuan serta motivasi yang telah diberikan selama ini.
3. Prof. Dr. Aulanni'am selaku Ketua Program Studi Pendidikan Dokter Hewan PKH UB sekaligus Dosen Penasehat Akademik atas pengarahan serta dukungan yang selalu diberikan kepada mahasiswa PKH UB.

4. Seluruh jajaran dekanat, dosen dan staf Program Kedokteran Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya atas fasilitas dan kemudahan yang diberikan.
5. Ibunda Nuraisah dan Ayahanda Muh. Arzak serta adik-adik Nurul Rofadiah dan Afan Akbar atas doa, kasih sayang, serta pengorbanan baik moril maupun materi yang telah diberikan.
6. Bundo, Pimpim, Artul, Awang, Hendro, Winda, Kirun, Bang Adib, Bayu, Vivi, dan Mas Noer Muhammad Dliyaul Haq atas perjuangan selama melaksanakan penelitian ini.
7. Seluruh staf serta asisten Laboratorium Biokimia dan Laboratorium Fisiologi Hewan FMIPA UB yang telah banyak membantu dalam pelaksanaan penelitian.
8. Angkatan 2009 PKHUB, Dara Daeng Brawijaya, ST4, Koloni Makassar-Malang, AIESEC LC UB, *travelmates*, serta Amri Rachman Aly atas persahabatan, semangat, inspirasi, dan motivasinya yang luar biasa.

Saran dan kritik yang membangun dari semua pihak sangat diharapkan demi penyempurnaan selanjutnya. Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan kepada semua pihak dan semoga laporan ini dapat memberikan manfaat serta menambah pengetahuan tidak hanya bagi penulis tetapi juga bagi pembaca. Amin.

Malang, 26 Februari 2014

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG	xiii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang Penelitian.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Batasan Masalah.....	4
1.4 Tujuan Penelitian.....	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Hewan Coba Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Model <i>Autoimmune thyroiditis</i>	6
2.2 Patomekanisme <i>Autoimmune thyroiditis</i>	8
2.3 Tiroglobulin.....	9
2.4 Sitokin <i>Tumor Necrosis Factor</i> (TNF)- α	10
2.5 Hubungan TNF- α dengan <i>Autoimmune thyroiditis</i>	11
2.6 <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i> (iNOS).....	12
2.7 Hubungan iNOS dengan <i>Autoimmune thyroiditis</i>	13
2.8 Gambaran Histopatologi <i>Autoimmune thyroiditis</i>	15
BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
3.1 Kerangka Konsep.....	19
3.2 Hipotesis Penelitian.....	21
BAB IV METODE PENELITIAN	22
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	22
4.2 Alat dan Bahan Penelitian.....	22
4.3 Tahapan Penelitian.....	23
4.4 Prosedur Kerja.....	23
4.4.1 Rancangan Penelitian.....	23
4.4.2 Persiapan Hewan Coba.....	25
4.4.3 Isolasi Tiroglobulin Kambing (CTg).....	26
4.4.4 Preparasi dan Penghitungan Dosis CTg.....	26

4.4.5 Persiapan Hewan Model AITD.....	26
4.4.6 Pembuatan Preparat Histopatologi.....	27
4.4.7 Pembuatan Preparat Imunohistokimia TNF- α	28
4.4.8 Pembuatan Preparat Imunohistokimia iNOS.....	29
4.4.9 Pemeriksaan Ekspresi TNF- α dan iNOS.....	30
4.5 Analisa Data.....	30
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	
5.1 Ekspresi TNF- α pada Tikus Hasil Injeksi CTg sebagai Hewan Model AITD.....	31
5.2 Ekspresi iNOS pada Tikus Hasil Injeksi CTg sebagai Hewan Model AITD.....	38
BAB VI PENUTUP	
6.1 Kesimpulan.....	45
6.2 Saran.....	45
DAFTAR PUSTAKA	46
LAMPIRAN	49



DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
4.1	Komposisi ransum basal untuk tikus percobaan.....	25
5.1	Rata-rata ekspresi TNF- α pada kelompok tikus kontrol, kelompok tikus dosis 100 μ g/ml, dan kelompok tikus dosis 200 μ g/ml.....	34
5.2	Rata-rata ekspresi iNOS pada kelompok tikus kontrol, kelompok tikus dosis 100 μ g/ml, dan kelompok tikus dosis 200 μ g/ml.....	40



DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
2.1	Reaksi sintesis NO dari L-Arginin.....	12
2.2	Jalur aktivasi iNOS melalui NF- κ B dan STAT.....	14
2.3	Gambaran histopatologi sel tiroid penderita HT dengan pewarnaan HE.....	16
2.4	Gambaran jaringan tiroid penderita HT dengan metode pewarnaan imunohistokimia.....	17
3.1	Kerangka konseptual injeksi CTg pada tikus hewan model AITD.....	19
5.1	Ekspresi <i>tumor necrosis factor</i> (TNF)- α dengan pewarnaan imunohistokimia pada jaringan tiroid tikus.....	32
5.2	Ekspresi <i>inducible nitric oxide sythase</i> (iNOS) dengan pewarnaan imunohistokimiapada jaringan tiroid tikus.....	39



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran		Halaman
1	Sertifikat keterangan laik etik penelitian.....	49
2	Skema alur penelitian.....	51
3	Tatalaksana isolasi CTg.....	52
4	Analisis kurva baku protein.....	54
5	Penghitungan dosis CTg.....	55
6	Jadwal induksi tikus.....	57
7	Metode Penggunaan Software <i>Axio Vision</i> 4.8.1.....	58
8	Hasil Penghitungan Ekspresi TNF- α dan iNOS.....	62
9	Analisis Statistika Ekspresi TNF- α dan iNOS.....	63



DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

<u>Simbol/singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
ADCC	<i>antibody dependent cell (mediated) cytotoxicity</i>
AITD	<i>autoimmune thyroiditis</i>
Ag Ab	<i>antibodi tiroglobulin</i>
ANOVA	<i>analisis of variant</i>
AP	<i>activating protein</i>
APC	<i>antigen presenting cells</i>
BTg	<i>bovine thyroglobulin</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CTg	<i>caprine thyroglobulin</i>
Fas	<i>TNF superfamily</i>
FasL	<i>ligan protein fas</i>
HTg	<i>human thyroglobulin</i>
IFN	<i>interferon</i>
IL	<i>interleukin</i>
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i>
kDa	<i>kilo dalton</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MTg	<i>murine thyroglobulin</i>
NADPH	<i>nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa b</i>
NK	<i>natural killer</i>
NO	<i>nitric oxide</i>
PMBC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PTg	<i>porcine thyroglobulin</i>
RIP	<i>receptor interacting protein</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNOI	<i>reactive nitrogen oxydative intermediate</i>
ROI	<i>reactive oxygen intermediate</i>
RTg	<i>rodent thyroglobulin</i>
TEC	<i>thyroid ephitelial cells</i>
Tg	<i>tiroglobulin</i>
Th	<i>T helper</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TNFR	<i>tumor necrosis factor receptor</i>
TPO	<i>tiroksin peroksidase</i>
TSHR	<i>thyroid stimulating hormone receptor</i>

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Autoimmune thyroiditis (AITD) merupakan penyakit autoimun pada organ spesifik kelenjar tiroid yang biasanya berupa *Hashimoto Thyroiditis* (HT) atau hipotiroidisme dan *Grave's disease* atau hipertiroidisme (Weetman, 2001). Menurut Weetman dan McGregor (1996) dalam Burek *et al.* (2003), penyakit autoimun spesifik ini ditandai dengan adanya infiltrasi sel mononuklear pada kelenjar tiroid dan produksi autoantibodi tiroglobulin (Tg) dan tiroid peroksidase (TPO). Penderita penyakit ini pada umumnya mengalami gangguan metabolisme yang diakibatkan oleh destruksi kelenjar tiroid yang berujung pada disfungsi kelenjar tiroid dalam meregulasi hormon tiroid.

Penyakit autoimun termasuk *Hashimoto Thyroiditis* (HT) dan *Grave's disease* mempengaruhi 5-10% populasi dan ditandai oleh respon imunitas yang terlalu aktif dari tubuh yang diarahkan ke jaringan sendiri sehingga menyebabkan inflamasi kronis. *Hashimoto thyroiditis* merupakan penyakit autoimun yang menyebabkan hipotiroidisme primer paling banyak. Rata-rata 1 sampai 1,5 dalam 1000 orang di dunia memiliki penyakit itu. Penyakit ini lebih sering ditemukan pada wanita dibandingkan pria dengan rentang usia antara 45 dan 65 tahun (Sieminska *et al.*, 2010). Di Indonesia, tidak ada data yang menunjukkan secara spesifik mengenai pelaporan kasus tiroiditis yang disebabkan autoimun. Hal ini disebabkan karena minimnya database yang dimiliki oleh Departemen Kesehatan RI. Pada hewan, kasus

autoimmune thyroiditis dilaporkan banyak terjadi pada hewan kesayangan khususnya anjing. Dodds (2000) menganalisa penyakit tersebut pada 1060 kasus yang ditemukan pada anjing di wilayah California antara Januari tahun 1995 sampai Januari tahun 1999. Pada penyakit tersebut, 96% dari total kasus ini didominasi oleh anjing ras murni yaitu *golden retriever*, *shetland sheepdog*, *american cocker spaniel*, *boxer*, *doberman pincher*, *labrador retriever*, *german shepherd*, *akita*, *irish setter*, *english setter*, *old english sheepdog*, dan *collie*.

Autoimmune thyroiditis disebabkan oleh adanya *self antigen* yang memicu sistem imun untuk menyerang tubuh sendiri melalui produksi antibodi anti-tiroid (Weetman, 2004). Patomekanisme dari penyakit ini belum diketahui secara mendalam, namun beberapa penelitian membuktikan adanya korelasi kejadian penyakit ini dengan faktor genetik, pola makan, jenis kelamin, faktor usia serta lingkungan (Tomer dan Huber, 2009; Brooks 2010). Pengembangan hewan model AITD dilakukan untuk mempelajari secara mendalam mengenai patomekanisme dari penyakit autoimun tersebut. Lee dan Chiang (2012) menyebutkan bahwa hewan model autoimun dibagi menjadi tiga jenis yaitu *induced*, *spontaneous*, dan *genetically-engineered models*. Hewan model AITD jenis *induced models* bisa didapatkan dengan menginduksi antigen berupa tiroglobulin (Tg), tiroid peroksidase (TPO), atau *thyroid stimulating hormone receptor* (TSHR). Tiroglobulin lebih banyak dipilih sebagai *inducer* untuk membuat hewan model AITD karena kandungan Tg yang lebih banyak dalam tiroid dibandingkan dengan TPO dan TSHR. Penelitian-penelitian sebelumnya menggunakan tiroglobulin tikus (MTg), tiroglobulin babi (PTg), tiroglobulin sapi

(BTg), dan tiroglobulin manusia (HTg). Pada penelitian ini, tiroglobulin yang digunakan adalah tiroglobulin kambing (CTg). Tiroglobulin kambing dipilih sebagai *inducer* selain karena sumber organ mudah didapatkan, preparasi organ mudah, ukuran organ besar, dan juga karena tiroglobulin setiap spesies memiliki kesamaan fisik, biokimia, dan struktur molekul (Zhou dan Gill, 2005).

Pada keadaan *autoimmune thyroiditis*, terjadi inflamasi kronis di jaringan tiroid sehingga dihasilkan produk-produk dari sel mononuklear, beberapa diantaranya adalah *tumor necrosis factor* (TNF)- α dan *nitric oxide* (NO). *Tumor necrosis factor* (TNF)- α merupakan sitokin yang dapat menjadi suatu penanda kerusakan jaringan. Peran sitokin ini banyak diyakini terlibat dalam patogenesis penyakit autoimun (Uysal *et al.*, 2012). Dalam beberapa penelitian sebelumnya, TNF- α ditemukan sebagai mediator inflamasi yang memacu penyebab terjadinya destruktif sel tiroid melalui proses nekrosis dan apoptosis jaringan.

Sebagai produk dari makrofag dan neutrofil, *nitric oxide* (NO) yang dikatalis oleh *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) berfungsi sebagai sistem pertahanan tubuh dari antigen. *Nitric oxide* merupakan radikal oksigen bebas yang dapat menyebabkan terjadinya stres oksidatif pada jaringan yang mengalami kerusakan. Katalisator iNOS juga terlibat dalam proses autoimun dan inflamasi jaringan (Yoon *et al.* 2009). Pengukuran aktivitas iNOS merupakan salah satu parameter yang penting untuk dapat melihat adanya kerusakan pada jaringan tiroid.

Oleh karena itu, pada penelitian ini akan dipelajari mekanisme dari patogenesis *autoimmune thyroiditis* pada hewan model tikus yang diinduksi dengan CTg dengan

menganalisa ekspresi TNF- α dan aktivitas iNOS sebagai parameter dari adanya kerusakan jaringan tiroid.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimanakah ekspresi *tumor necrosis factor* (TNF- α) pada organ tiroid tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi tiroglobulin kambing (CTg) sebagai penanda *autoimmune thyroiditis*?
2. Bagaimanakah ekspresi *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) pada organ tiroid tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi tiroglobulin kambing (CTg) sebagai penanda *autoimmune thyroiditis*?

1.3 Batasan Masalah

Beberapa batasan masalah dalam penelitian ini adalah :

1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) betina strain Wistar umur 8-12 minggu dengan berat badan berkisar 100-150 gram yang didapat dari Unit Pengembangan Hewan Penelitian (UPHP) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Penggunaan hewan coba telah mendapat sertifikat laik etik No. 140-KEP-UB dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya (Lampiran 1).
2. Pembuatan hewan model tikus AITD menggunakan tiroglobulin kambing (CTg) yang diemulsikan dengan CFA dan IFA yang diinjeksikan secara subkutan pada bagian *cervical* dengan dosis 100 μ g/ml dan 200 μ g/ml (Zhou dan Gill, 2005; Song *et al.*, 2010).

3. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah ekspresi *tumor necrosis factor* (TNF)- α dan *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) melalui metode imunohistokimia.

1.4 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui ekspresi *tumor necrosis factor* (TNF)- α sebagai penanda AITD pada organ tiroid tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi tiroglobulin kambing (CTg).
2. Mengetahui ekspresi *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) sebagai penanda AITD pada organ tiroid tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi tiroglobulin kambing (CTg).

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan akan bermanfaat untuk mengetahui peningkatan ekspresi *tumor necrosis factor* (TNF)- α dan *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) untuk membuktikan tiroglobulin kambing (CTg) dapat menginduksi terjadinya *autoimmune thyroiditis* (AITD) serta dapat menghasilkan hewan model tikus AITD baru dengan dosis induksi yang optimal.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Hewan Coba Tikus (*Rattus norvegicus*) Model *Autoimmune Thyroiditis*

Hewan percobaan adalah hewan yang sengaja dipelihara dan diternakan untuk dipakai sebagai hewan model guna mempelajari dan mengembangkan berbagai macam bidang ilmu dalam skala penelitian atau pengamatan laboratorik. Di bidang ilmu kedokteran selain untuk penelitian, hewan percobaan juga sering digunakan sebagai keperluan diagnostik. Hewan percobaan yang umum digunakan dalam penelitian ilmiah adalah tikus (*Rattus norvegicus*). Ciri-ciri morfologi *Rattus norvegicus* antara lain panjang tubuh total 440 mm, panjang ekor 205 mm, kepala dan badan lebih pendek dari ekornya, serta telinga relatif kecil dan tidak lebih dari 20-23 mm (Myers dan Armitage, 2004).

Penelitian ini menggunakan *Rattus norvegicus* strain Wistar karena strain ini merupakan strain yang paling banyak dikembangkan di Indonesia dan juga didasarkan oleh morfologi tubuh yang lebih besar dibandingkan dengan *Rattus norvegicus* strain lainnya. *Rattus norvegicus* digunakan sebagai hewan coba model karena hewan tersebut memiliki kebutuhan asam amino esensial yang sama seperti manusia, adanya kemiripan fungsi, bentuk organ, proses biokimia serta proses biofisik antara tikus dan manusia, sehingga penelitian yang dilakukan dapat diaplikasikan pada manusia (Hedrich, 2006). Sistem klasifikasi tikus *Rattus norvegicus* menurut Myers dan Armitage (2004) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Animalia

Filum : Chordata

Kelas : Mammalia

Ordo : Rodentia

Subordo : Myomorpha

Famili : Muridae

Genus : *Rattus*

Spesies : *Rattus norvegicus*

Penyakit *autoimmune thyroiditis* merupakan penyakit autoimun dengan angka kejadian yang tinggi di dunia. Hal ini mendasari banyaknya penelitian yang dilakukan untuk menemukan alat deteksi dini sebagai upaya pencegahan dan pengobatan terhadap penyakit ini sehingga diperlukan adanya hewan model *autoimmune thyroiditis*. Tikus *Rattus norvegicus* adalah jenis hewan yang dapat digunakan sebagai hewan coba model AITD. Kong (1996) menyebutkan dalam Zhou dan Gill (2005) bahwa hewan model *autoimmune thyroiditis* atau yang disebut juga sebagai *Experimental Animal AITD* (EAT) dapat diinduksi dengan tiroglobulin (Tg) sebagai autoantigen pada tiroid. Tiroglobulin yang biasanya dipakai sebagai *inducer* adalah tiroglobulin tikus (MTg), tiroglobulin babi (PTg), tiroglobulin sapi (BTg), dan tiroglobulin manusia (HTg). Penelitian ini menggunakan tiroglobulin kambing (CTg) untuk membuktikan bahwa CTg juga dapat menginduksi terjadinya AITD pada tikus karena pada dasarnya semua tiroglobulin memiliki struktur biokimia dan kandungan molekul yang sama.

2.2 Patomekanisme *Autoimmune Thyroiditis*

Autoimmune thyroiditis biasanya berupa *Hashimoto Thyroiditis* (hipotiroidisme) dan *Grave's disease* (hipertiroidisme), menyebabkan kerusakan pada organ tiroid sehingga mengganggu fungsi regulasi hormon tiroid di dalam tubuh. Penyebab dari penyakit ini karena adanya kegagalan dari sistem imunitas tubuh yang dipicu oleh banyak faktor misalnya oleh pola makan, genetik, jenis kelamin, usia dan faktor lingkungan (Brooks, 2010; Tomer dan Huber, 2009). Weetman dan McGregor (1996) menyebutkan dalam Burek *et al.* (2003) bahwa penyakit *Hashimoto Thyroiditis* disertai oleh kerusakan jaringan tiroid karena inflamasi yang diakibatkan oleh sel mononuklear dan produksi tiroglobulin autoantibodi dan tiroid peroksidase autoantibodi. Hal ini didukung oleh hasil penelitian Burek *et al.* (2003) yang mengindikasikan adanya sitokin-sitokin Th-1 dan Th-2 yang terlibat dalam patogenesis penyakit autoimun. Hasil tersebut didapat berdasarkan pengukuran mRNA sitokin-sitokin tersebut. Ekspresi MHC-II memiliki peranan dalam proses infiltrasi sel mononuklear pada sel tiroid. Infiltrasi sel mononuklear adalah salah satu dari penanda terjadinya inflamasi pada suatu jaringan. Inflamasi merupakan keadaan fisiologis (normal) yang merupakan respon imunitas tubuh terhadap kerusakan jaringan (Yoon *et al.*, 2009).

Patogenesis dari penyakit *Grave's disease* masih belum diketahui dengan mendalam, namun ditemukan adanya produksi yang berlebihan terhadap hormon tiroid. Terjadinya infiltrasi sel inflamatori dan adanya produksi sitokin juga diduga sebagai respon autoimunitas pada kasus ini. Hiperplasia dan hipertropi pada sel tiroid

dapat mengarahkan penyakit ini serupa dengan kasus penyakit gondok (Hubbard, 2011).

Produksi sitokin proinflamasi seperti TNF- α dan iNOS dapat dikaitkan dengan mekanisme inflamasi yang terjadi pada kasus *autoimmune thyroiditis*. Sitokin TNF- α dan iNOS juga merupakan mediator dalam proses kerusakan jaringan dan kematian sel baik secara apoptosis maupun nekrosis. Menurut Weetman dan McGregor (1996) dalam Baki *et al.* (2012), sitokin berpartisipasi dalam induksi dan tahapan efektor dalam sistem imun serta terlibat sebagai marker dalam perkembangan *autoimmune thyroiditis*. Sitokin termasuk TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, dan IL-12 muncul pada sel folikuler tiroid dan diproduksi oleh sel inflamatori intratiroidal.

2.3 Tiroglobulin

Tiroglobulin (Tg) adalah protein yang disintesis paling banyak di dalam sel folikel tiroid dengan jumlah hampir 75% dari total protein yang terkandung dalam tiroid. Walaupun berasal dari spesies yang berbeda, semua tiroglobulin adalah sama berdasarkan dari keadaan fisik, biokimia, dan kandungan molekul yang terdapat di dalamnya (Kong, 1996; Verschueren *et al.*, 1991; Zhou dan Gill, 2005). Tiroglobulin merupakan molekul glikoprotein besar yang mengandung 5496 asam amino dengan berat molekul sekitar 660 kDa dan koefisien endapan sebesar 19S. Molekul ini juga mengandung sekitar 140 residu tirosil dan sekitar 10% karbohidrat dalam bentuk manosa, N-asetilglukosamin, galaktosa, fukosa, asam sialat, dan sulfat kondroitin (Anwar, 2005). Hormon tiroid disimpan dalam bentuk tiroglobulin yang terletak dalam folikel-folikel yang berisi koloid. Pada kasus *autoimmune thyroiditis*,

tiroglobulin berperan sebagai *auto-self antigen* yang memicu respon dari sistem imunitas tubuh untuk menyerang diri sendiri sehingga berakibat pada kerusakan tiroid dan gangguan fungsi hormonal (Weetman, 2004).

2.4 Sitokin *Tumor Necrosis Factor Alfa* (TNF- α)

Tumor necrosis factor merupakan mediator utama pada respon terhadap bakteri gram negatif dan berperan dalam respons imun bawaan terhadap berbagai mikroorganisme penyebab infeksi yang lain, serta bertanggungjawab atas banyak komplikasi sistemik yang disebabkan infeksi berat. Sitokin TNF- α diproduksi oleh berbagai jenis sel termasuk makrofag, sel T, B, NK, dan Kupfer. Pembentukannya terjadi sebagai respons terhadap rangsangan bakteri, virus, dan sitokin (IL-1, IL-6, IFN- γ), kompleks imun, dan *reactive oxygen intermediate* (ROI). TNF- α dikenal dengan berbagai nama yaitu cachectin, necrosin, sitotoksin makrofag, atau faktor sitotoksik (Abbas *et al.*, 2000). Bersama-sama dengan IFN- γ , TNF- α bersifat sitotoksik bagi banyak jenis sel tumor. TNF- α juga terbukti merupakan modulator respons imun kuat yang memperantarai induksi molekul adhesi, sitokin lain, dan aktivasi neutrofil. Male *et al.* (1996) menyatakan bahwa lokasi TNF- α dan TNF- β pada region MHC kromosom 6 dan 17 menimbulkan dugaan bahwa molekul ini bertanggung jawab atas beberapa efek yang berhubungan dengan MHC. TNF- α memiliki efek biologis sebagai berikut :

- a. Menginisiasi neutrofil dan monosit ke tempat infeksi serta mengaktifkan sel-sel tersebut untuk menyingkirkan mikroba
- b. Mengaktivasi makrofag untuk mensekresi kemokin dan menginduksi kemotaksis dan pengerahan leukosit
- c. Mengaktivasi fagosit mononuklear untuk mensekresi IL-1
- d. Menginduksi apoptosis sel inflamatori yang sama (Karnen dan Iris, 2010)

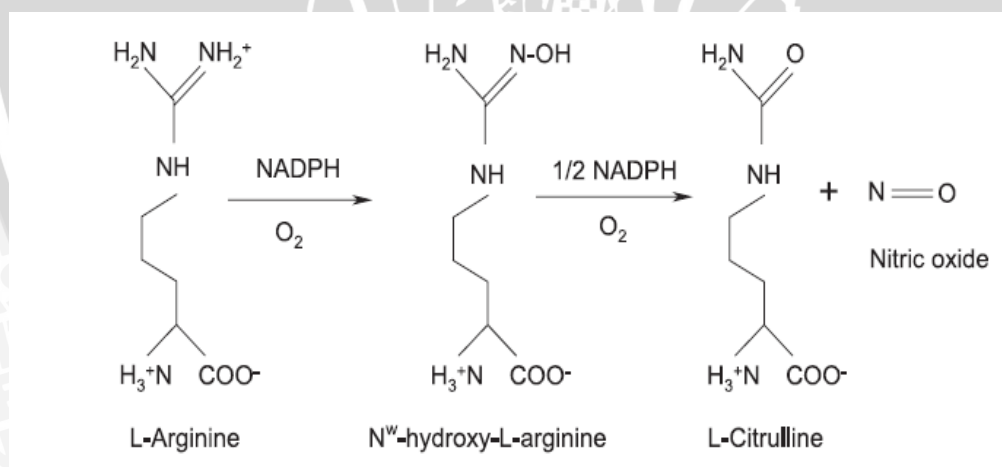
2.5 Hubungan TNF- α dengan *Autoimmune Thyroiditis*

Penyakit *autoimmune thyroiditis* ditandai dengan adanya kerusakan pada jaringan tiroid. Kerusakan tersebut disebabkan oleh infiltrasi sel inflamatori yang menandakan terjadinya inflamasi pada daerah tersebut. Proses inflamasi adalah proses yang melibatkan sel-sel imun yang bersifat protektif terhadap trauma, infeksi, atau kerusakan jaringan (Zedler dan Faist, 2006; Mariathasan dan Monack, 2007; Choy *et al.*, 2008). Sel-sel inflamatori, salah satunya adalah makrofag, akan menghasilkan sitokin-sitokin proinflamasi yang dalam kadar tertentu dapat bersifat patogen dan memperparah kerusakan yang ada.

TNF- α merupakan salah satu sitokin utama yang memiliki peran penting dalam inisiasi dan regulasi sitokin lainnya ketika terjadi inflamasi. TNF- α adalah sitokin proinflamasi yang diproduksi oleh makrofag, monosit, sel epitelial, dan limfosit, yang menginduksi produksi dari IFN- γ dan IL-6. TNF- α terbukti menyebabkan sitotoksitas pada sel-sel tiroid dan meningkatkan regulasi ekspresi MHC-I yang diikuti oleh kerusakan tiroid (Baki *et al.*, 2012).

2.6 Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS)

Nitric oxide adalah molekul intraseluler dan interseluler yang bertugas untuk memberikan sinyal yang terlibat dalam berbagai regulasi dari mekanisme fisiologis dan patofisiologis di kardiovaskular, syaraf, dan sistem imunitas tubuh. *Nitric oxide* bertindak sebagai mediator biologi yang mirip dengan neurotransmitter dalam sistem syaraf, berperan dalam regulasi darah pada pembuluh darah di sistem vaskular, dan merupakan suatu sistem pertahanan tubuh yang penting dalam sistem imun. Hal ini bertentangan dengan fungsi lain NO yaitu sebagai molekul oksigen bebas dan dapat bertindak sebagai agen sitotoksik pada proses patologis, terutama pada proses inflamasi (Aktan, 2004; Alderton *et al.*, 2001; Bogdan, 2001; Dawn dan Bolli, 2002; Moncada dan Higgs, 1991).



Gambar 2.1 Reaksi sintesis NO dari L-Arginin (Alderton *et al.*(2001) dalam Aktan (2004)).

Biosintesis NO pada organisme berasal dari L-arginin dan molekul oksigen dengan memanfaatkan NADPH sebagai elektron donor dan menggunakan heme,

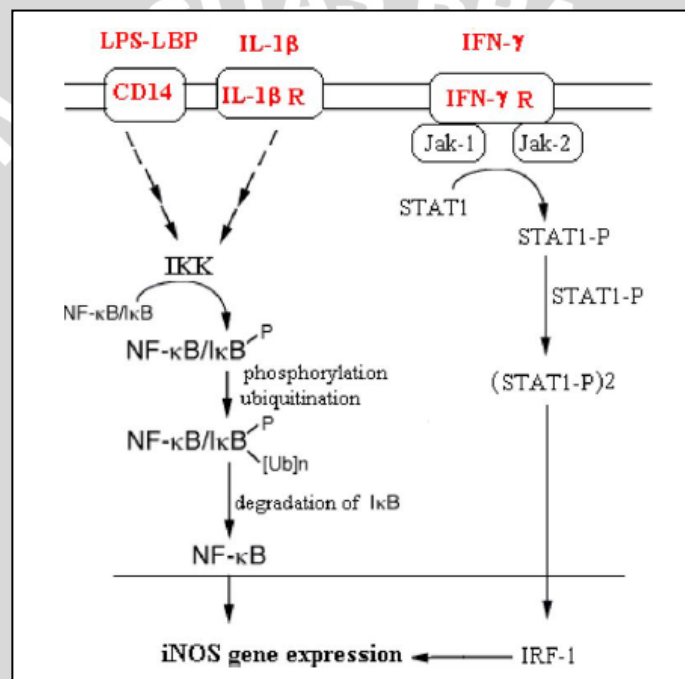
FMN, FAD, dan tetrahidrobiopterin (H_4B) sebagai kofaktor melalui reaksi yang membutuhkan lima elektron. Reaksi keseluruhan terdiri dari dua langkah konversi oksidatif L-arginin terhadap NO dan L-sitrulin melalui N^w -hidroksi-L-arginin (NOharginin) sebagai intermediat, dengan monooksigenase I dan monooksigenase II (Gambar 2.1).

Produksi NO di dalam tubuh dikatalis oleh sebuah kelompok enzim yang disebut *nitric oxide synthase* (NOS) dengan berat molekul 130-160 kDa. Ada tiga jenis isoform NOS yang telah diketahui hingga saat ini. Ketiga isoform tersebut adalah eNOS (*endothelial* NOS, NOS I), iNOS (*inducible* NOS, NOS II) dan nNOS (*neuronal* NOS, NOS III). Isoform iNOS tidak dipresentasikan pada *resting cells* tetapi dapat diinduksi oleh imunostimulator sitokin, produk bakteri, atau infeksi pada sejumlah sel, termasuk endotelium, hepatosit, monosit, sel mast, makrofag, dan sel otot polos (Aktan, 2004). *Nitric oxide* merupakan molekul oksigen bebas sehingga bersifat sangat reaktif apabila berikatan dengan radikal bebas sehingga mengakibatkan stress oksidatif pada jaringan yang dapat berakhir dengan kerusakan dan kematian sel.

2.7 Hubungan iNOS dengan *Autoimmune Thyroiditis*

Kerusakan sel tiroid pada kejadian *autoimmune thyroiditis* tidak hanya disebabkan oleh produksi sitokin proinflamasi yang diproduksi oleh makrofag. Pada keadaan inflamasi, makrofag juga menghasilkan NO yang dikatalis oleh iNOS. Aktivasi iNOS mengarah ke destruksi organ pada proses inflamasi dan proses autoimun. Faktor transkripsi misalnya NF- κ B dan AP-1 memediasi ekspresi iNOS

pada proses tersebut. *Nuclear factor kappaB* (NF- κ B) terdapat di dalam sitosol dalam bentuk kompleks inaktif I κ B-NF κ B. Kompleks I κ B-NF κ B difosforilasi oleh I κ B Kinase (IKK) melalui aktivasi oleh stimulator seperti *inducer* eksogen, *inducer* endogen (sitokin, interferon), dan TNF- α , yang memfasilitasi proses translokasi NF- κ B dari sitosol ke nukleus dan menginduksi ekspresi iNOS (Aktan, 2004).



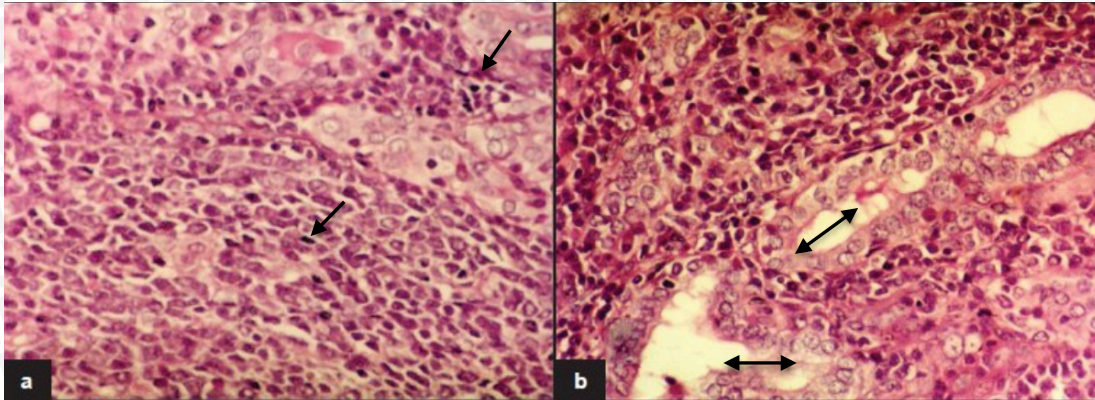
Gambar 2.2 Jalur aktivasi iNOS melalui NF- κ B dan STAT (Aktan, 2004).

Destruksi jaringan tiroid yang disebabkan oleh makrofag dan sitokin-sitokin proinflamasi secara langsung juga dapat menginduksi iNOS untuk meregulasi NO yang memperparah keadaan *autoimmune thyroiditis*. Aktivitas iNOS melalui makrofag diregulasi dan dimodulasi oleh *toll-like receptor* dan CD14 yang diaktivasi melalui jalur NF- κ B. Sedangkan IFN- γ yang dihasilkan oleh Th-1 menginduksi iNOS

melalui jalur Jak-STAT. Jalur tersebut dapat meningkatkan induksi iNOS dan produksi NO (Gambar 2.2).

2.8 Gambaran Histopatologi *Autoimmune Thyroiditis*

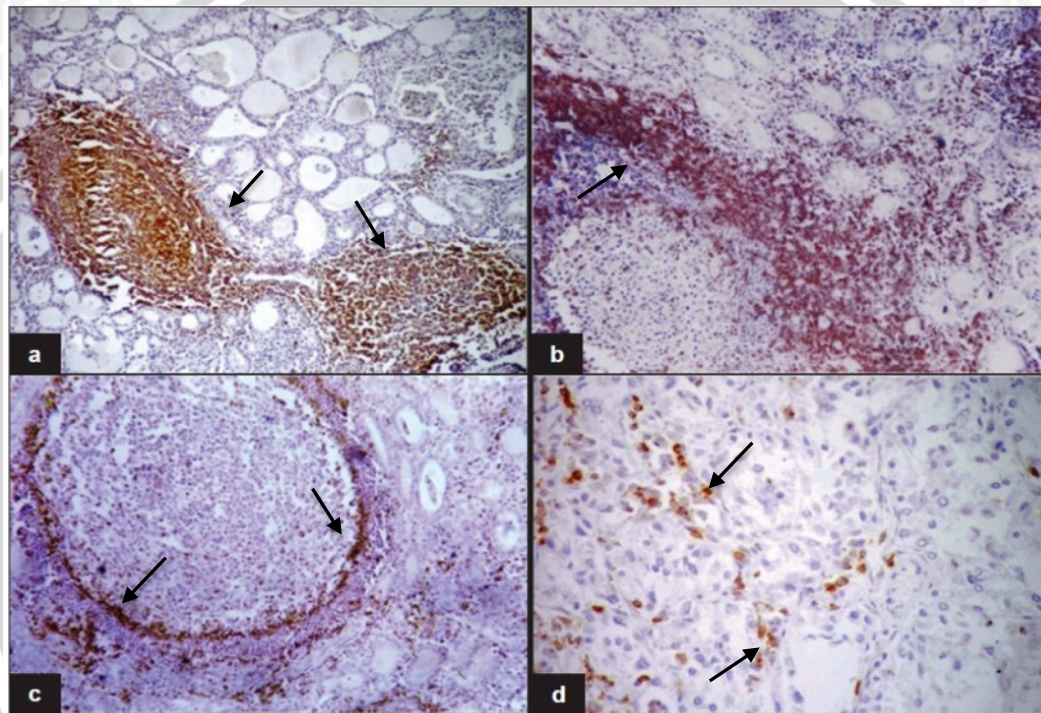
Tiroid memiliki kemampuan untuk menyimpan sekresi yang lebih besar daripada setiap kelenjar endokrin, dan hal ini tercermin di dalam stuktur histologisnya. Kelenjar tiroid tersusun atas timbunan folikel-folikel berbentuk oval dalam ukuran yang berbeda-beda. Area antar folikel diisi oleh jaringan ikat yang dipenuhi oleh pembuluh darah, dan didalamnya dapat ditemukan beberapa limfosit dan histiosit. Pada dinding folikel terdapat dua jenis sel yaitu prinsipal (folikular) dan parafolikular. Jenis folikular ini merupakan jenis sel yang paling banyak dan mempunyai sitoplasma basofil dan merupakan sumber koloid atau tiroglobulin dan dari hormon tiroid triiodotironin (T_3) dan tiroksin (T_4) yang disimpan dalam koloid terikat dengan tirosin. Setiap folikel merupakan unit mikroskopik dan dilapisi oleh epitel sekretori yang tersusun atas lapisan tunggal sel-sel kuboid atau kolumner rendah. Tiroid tikus normal mengandung kira-kira 100.000 folikel dan bervariasi besar ukurannya. Semakin besar folikel biasanya semakin berlokasi dekat perifer dan makin kecil makin ke arah pusat. Apabila tiroid inaktif, terdapat kecenderungan koloid tertimbun dan epitelnya menjadi kuboid rendah atau skuamosa sedangkan apabila terlalu aktif, koloid menjadi kosong, dan epitel menjadi kolumner serta berlipat-lipat (Craigmyle, 1987).



Gambar 2.3 Gambaran histopatologi sel tiroid penderita HT dengan pewarnaan HE (400X). Keterangan: (a) Infiltrasi sel mononuklear pada tiroid. Tanda panah = Infiltrasi sel mononuklear. (b) Lesi pada jaringan tiroid. Tanda panah = *lymphoepithelial lesions* (LELs) (Amani, 2011).

Kondisi patologis pada hewan yang mengalami *autoimmune thyroiditis* dapat diamati pada perubahan gambaran histopatologi jaringan tiroidnya. Perubahan ukuran dan bentuk sel akan tampak jelas pada sel-sel abnormal akibat destruksi kelenjar tiroid oleh autoantibodi dan sel T. Hasil penelitian Amani (2011) terhadap jaringan tiroid yang diisolasi dari penderita *Hashimoto Thyroiditis* (HT) membuktikan adanya infiltrasi sel mononuklear yang disertai dengan perubahan struktur folikel-folikel tiroid. Infiltrasi sel mononuklear pada jaringan tiroid ditemukan tersebar merata sekitar folikel tiroid yang mengalami atropi (Gambar a). Perubahan bentuk juga terjadi pada bagian epitel yang menjadi tidak utuh dan koloid yang tampak kosong. Folikel tiroid yang rusak tersebut mengalami *focal* LELs dengan infiltrasi sel mononuklear di sekitarnya (Gambar b) (Gambar 2.3).

Perubahan jaringan tiroid yang mengalami AITD juga dapat diamati dengan menggunakan metode pewarnaan imunohistokimia. Melalui metode pewarnaan tersebut, akan terlihat perubahan warna yang mengindikasikan adanya ikatan antibodi dan antigen pada jaringan tiroid.



Gambar 2.4 Gambaran jaringan tiroid penderita HT dengan metode pewarnaan imunohistokimia. Keterangan: (a) Ekspresi sel CD20 (200X). (b) Ekspresi sel T CD3⁺ (200X). (c) Ekspresi sel T CD3⁺ (200X). (d) Ekspresi sel B CD20⁺ (400X). Tanda panah = ekspresi antigen (Amani, 2011).

Penelitian Amani (2011) terhadap penderita *Hashimoto Thyroiditis*, menemukan adanya ekspresi sel T (CD20⁻, CD3⁺) dan sel B (CD20⁺, CD3⁻) pada folikel-folikel tiroid. Secara umum, sel CD20 diekspresikan dengan intensitas tinggi dan tersebar tidak merata pada folikel tiroid (Gambar a). Sel T CD3⁺ juga diekspresikan dengan intensitas tinggi dan tersebar merata di sekitar folikel tiroid

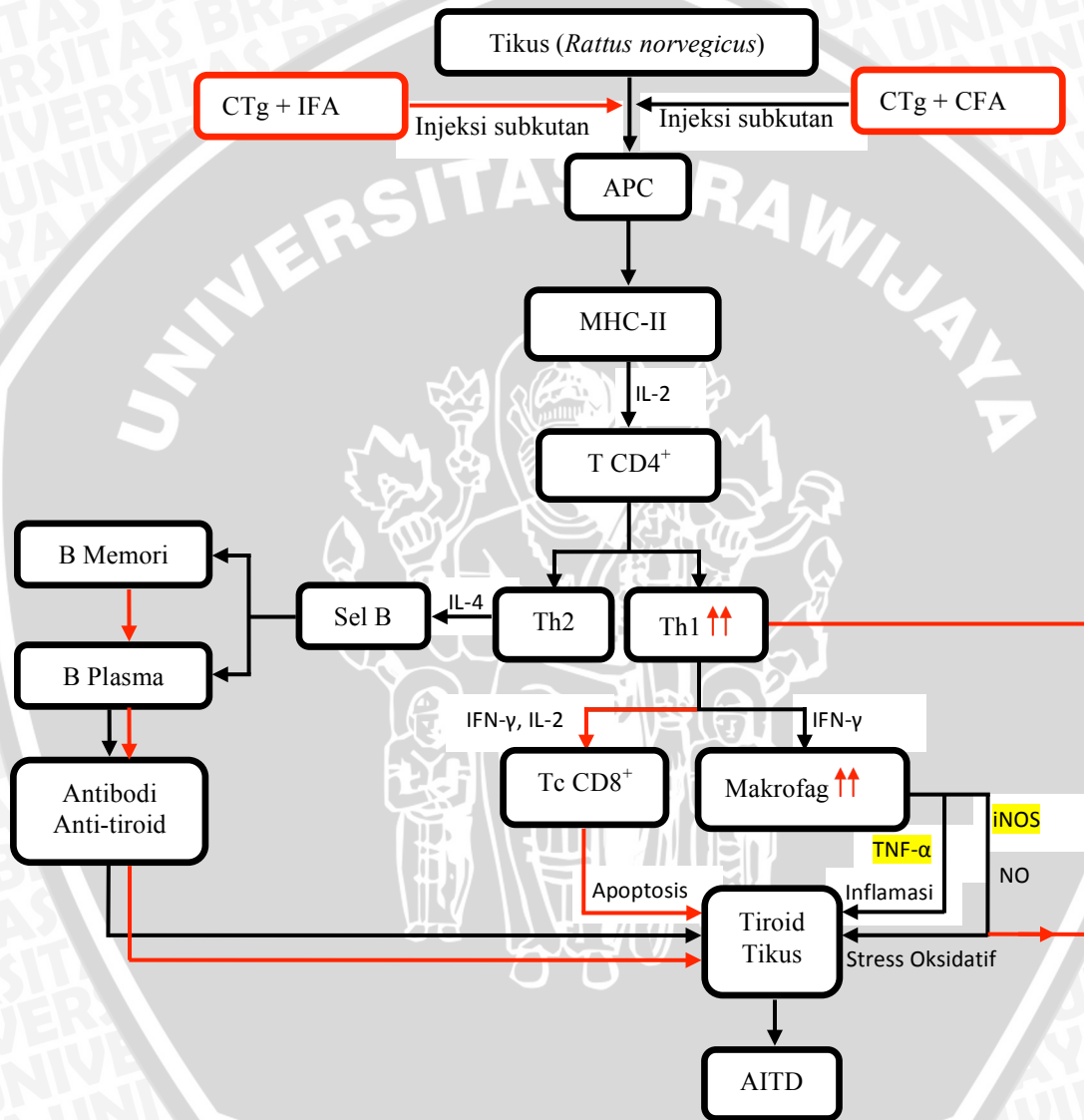
(Gambar b). Selain itu, sel T $CD3^+$ pada jaringan tiroid tersebut juga diekspresikan dengan bentuk persebaran seperti zona mantel yang mengelilingi folikel tiroid (Gambar c). Secara spesifik, sel B $CD20^+$ diekspresikan dengan intensitas yang lebih rendah dibandingkan sel T $CD20^-$ pada jaringan tiroid penderita HT (Gambar d) (Gambar 2.4).

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka konseptual induksi CTg pada tikus hewan model AITD

Keterangan :

 : Variabel yang diamati

 : Variabel bebas

↑↑ : Peningkatan

→ : Jalur induksi CTg+CFA

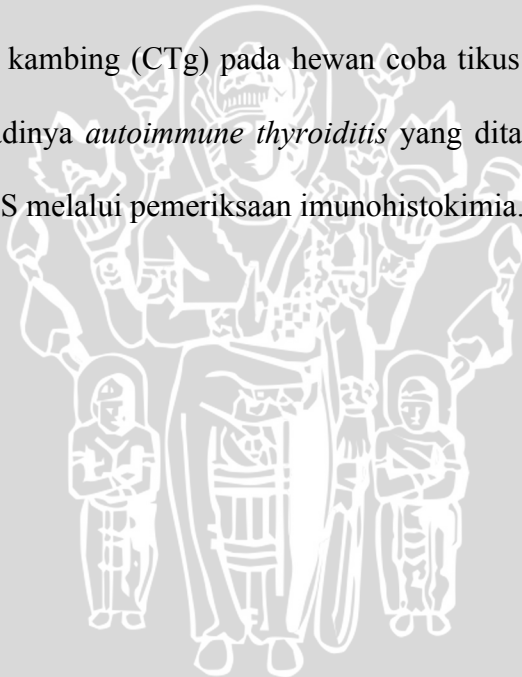
→ : Jalur induksi CTg+IFA

Pada penyakit *autoimmune thyroiditis*, tiroglobulin berperan sebagai *self-antigen* dan target antibodi anti-tiroid. Selain itu, dalam kondisi AITD, sel mononuklear mengekspresikan beberapa molekul yang memodulasi autoimunitas intratiroidal. Protein CTg yang diemulsikan dalam CFA lalu diinduksikan ke tikus akan dikenali oleh *antigen presenting cell* (APC). *Antigen presenting cell* (APC) akan mempresentasikan antigen melalui MHC-II ke sel T CD4⁺. Sel T CD4⁺ yang teraktivasi akan berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi Th1 dan Th2. Sel Th1 akan mengeluarkan IFN- γ untuk mengaktivasi makrofag. Makrofag yang teraktivasi akan menghasilkan sitokin proinflamasi, salah satunya adalah TNF- α yang menjadi penanda kerusakan jaringan pada tiroid. Sel Th2 menghasilkan IL-4 untuk mengaktifkan sel B sehingga sel B berdiferensiasi menghasilkan sel B memori dan sel B plasma. Induksi CTg yang diemulsikan dalam IFA pada tikus membuat antigen akan dikenali oleh sel-sel memori yang menginisiasi sel B plasma kemudian memproduksi antibodi anti-tiroglobulin yang akan berikatan dengan tiroglobulin pada tiroid tikus. Pembacaan CTg sebagai antigen oleh sel T menyebabkan antibodi tiroglobulin tersebut juga mengenali tiroglobulin dari organ tiroid tikus sebagai antigen karena adanya kemiripan struktur kimiawi maupun molekul yang terkandung di dalam kedua protein tiroglobulin tersebut sehingga antibodi anti-tiroglobulin akan menyebabkan terjadinya reaksi inflamasi yang berakibat kerusakan organ tiroid tikus. Kerusakan yang terjadi pada sel tiroid juga akan menginisiasi makrofag untuk menghasilkan *nitric oxide* (NO) yang dikatalis oleh *inducible nitric oxide synthase* (iNOS). Aktivasi iNOS tersebut akan menyebabkan kerusakan jaringan melalui reaksi

stress oksidatif. Kerusakan yang terjadi pada sel tiroid akibat autoantibodi (Tg Ab) akan mengaktivasi sel Tc. Sel Tc yang diaktifkan melalui sitokin IL-2 dan IFN- γ kemudian mengekspresikan koreseptor CD8⁺ dan menghancurkan sel yang terinfeksi antigen spesifik melalui induksi apoptosis. Mekanisme apoptosis tersebut melibatkan TNF- α melalui protein Fas yang berikatan dengan FasL pada sel yang mengekspresikan antigen.

3.2 Hipotesis Penelitian

Induksi tiroglobulin kambing (CTg) pada hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) akan menyebabkan terjadinya *autoimmune thyroiditis* yang ditandai dengan adanya ekspresi TNF- α dan iNOS melalui pemeriksaan imunohistokimia.



BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret-Juni 2013 di Laboratorium Biokimia, Laboratorium Fisiologi Hewan, dan Laboratorium Biomolekuler, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang, dan Laboratorium Patologi Klinik Rumah Sakit Dr. Soetomo Surabaya.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang tikus, scalpel, gunting, pinset bedah, *object glass*, *cover glass*, mortar, sentrifus (Hettich EBA III), timer, sonikator (Branson 200), vortex (GUO HUQ), tabung eppendorf, mikropipet, spuit 1cc, spektrofotometer, dan mikroskop cahaya.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*), pakan, organ tiroid kambing, fosfat buffer saline asida (PBS-asida), larutan fosfat buffer saline tween-phenyl methyl sulfonyl fluoride (PBST-PMSF), pasir kuarsa, etanol 30%, etanol 50%, etanol 70%, etanol 80%, etanol 95%, etanol absolut, larutan biuret 80%, ddH₂O/aquades, tiroglobulin (CTg), Tris HCl, *Complete Freud's Adjuvant* (CFA) (Sigma F-5881, USA) serta *Incomplete Freud's Adjuvant* (CFA) (Sigma F-5881, USA), formaldehida, natrium klorida (NaCl), *prophylene*, xylol, parafin, hidrogen peroksida, *bovine serum albumin*, anti-mouse TNF- α , anti-mouse iNOS, chromogen *diamino benzidine* (DAB), *rabbit anti-rat IgG biotin labelled*, *strep avidin-horseradish peroxidase* (SA-HRP), hematoksilen, dan entellan.

4.3 Tahapan Penelitian

Tahapan yang dilakukan dalam penelitian ini adalah :

1. Rancangan penelitian
2. Persiapan hewan coba
3. Isolasi tiroglobulin kambing (CTg)
4. Preparasi dan penghitungan dosis CTg
5. Persiapan hewan model *autoimmune thyroiditis*
6. Pembuatan preparat histopatologi
7. Pembuatan preparat imunohistokimia TNF- α dan iNOS
8. Pemeriksaan ekspresi TNF- α dan iNOS
9. Analisis data

Tahapan penelitian dapat dilihat secara skematis pada alur penelitian di Lampiran 2.

4.4 Prosedur Kerja

4.4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan coba dibagi menjadi tiga kelompok yaitu :

- a. Kelompok kontrol yang merupakan tikus tanpa injeksi CTg (P0)
- b. Kelompok yang diinjeksi dengan emulsi CTg dan *Complete Freud's Adjuvant* (CFA)/*Incomplete Freud's Adjuvant* (IFA) (P1) sebanyak 0,2ml dengan dosis CTg sebesar 100 μ g/ml.

- c. Kelompok yang diinjeksi dengan emulsi CTg dan *Complete Freud's Adjuvant* (CFA)/*Incomplete Freud's Adjuvant* (IFA) (P2) sebanyak 0,2ml dengan dosis CTg sebesar 200µg/ml.

Sampel penelitian ini menggunakan hewan coba berupa tikus (*Rattus norvegicus*) betina strain Wistar berumur 8-12 minggu. Berat badan tikus antara 100-150 gram. Hewan coba diaklimatisasi selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Montgomery dan Kowalsky, 2011) :

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

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

$$3n-3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Keterangan :

P = jumlah kelompok

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka setiap kelompok diperlukan jumlah sampel atau ulangan paling sedikit enam kali sehingga dibutuhkan 18 ekor hewan coba. Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

Variabel bebas : Variasi dosis CTg

Variabel tergantung : Ekspresi TNF-α dan iNOS

Variabel kendali : Berat badan tikus, umur, dan jenis kelamin.

4.4.2 Persiapan Hewan Coba

Tikus yang digunakan untuk penelitian diaklimatisasi sebagai proses adaptasi terhadap lingkungan selama tujuh hari dengan pemberian makanan berupa ransum basal (Tabel 4.1) pada semua tikus. Tikus dibagi dalam tiga kelompok perlakuan

yang masing-masing terdiri dari enam ekor tikus. Tikus dikandangkan dalam kandang plastik yang berukuran 17.5 x 23.75 x 17.5 cm. Kandang yang digunakan berjumlah enam buah kandang dengan masing-masing kandang diisi oleh tiga ekor tikus. Kandang tikus berlokasi pada tempat yang bebas dari suara ribut dan terjaga dari asap industri serta polutan lainnya. Lantai kandang mudah dibersihkan dan disanitasi. Suhu optimum ruangan untuk tikus adalah 22-24°C dan kelembaban udara 50-60% dengan ventilasi yang cukup (namun tidak ada jendela terbuka). Komposisi ransum basal disusun berdasarkan standar AOAC (2005) yaitu mengandung karbohidrat, protein, lemak, mineral, vitamin, dan air.

Tabel 4.1 Komposisi ransum basal untuk tikus percobaan. Sumber: AOAC (2005)

Bahan-Bahan	Jumlah (%)
Protein kasein	$X = 1,60 \times 100\%N \text{ sampel (10\% port)}$
Minyak jagung	$[(8-X) \times \% \text{ ekstrak eter}] / 100$
Campuran mineral	$[(5-X) \times \% \text{ kadar abu}] / 100$
Campuran vitamin	1
CMC	$[(1-X) \times \% \text{ kadar serat kasar}] / 100$
Air	$[(5-X) \times \% \text{ kadar air}] / 100$
Maizena	Untuk membuat 100%

4.4.3 Isolasi Tiroglobulin Kambing (CTg)

Protein CTg diisolasi dari organ tiroid kambing dengan menghaluskan tiroid menggunakan mortar dingin yang dilanjutkan dengan sonikasi dan sentrifugasi. Supernatan yang terbentuk kemudian ditambah etanol absolut dan disentrifugasi. Hasilnya berupa endapan *crude protein* yang akan diinduksikan pada tikus. Tahapan

isolasi protein tiroglobulin dari organ tiroid kambing secara skematis dapat dilihat pada Lampiran 3.

4.4.4 Preparasi dan Penghitungan Dosis CTg

Penentuan dosis optimasi CTg didasarkan pada penelitian Zhou dan Gill (2005) dan Song *et al.* (2011). Pada kelompok P1 digunakan dosis CTg 100 µg/ml dalam Tris HCl yang diemulsikan menggunakan perbandingan 1 : 1 dengan CFA atau IFA. Pada kelompok P2 digunakan dosis CTg 200 µg/ml dalam Tris HCl yang diemulsikan menggunakan perbandingan 1 : 1 dengan CFA atau IFA. Penghitungan dosis CTg didasarkan pada hasil pengukuran kadar protein CTg melalui uji biuret dan hasil spektrofotometri. Penghitungan dosis CTg yang diisolasi dari organ tiroid kambing dapat dilihat di Lampiran 5.

4.4.5 Persiapan Hewan Model *Autoimmune Thyroiditis*

Pada kelompok pertama (P0), tikus tidak diinduksi CTg dan merupakan kelompok kontrol. Pada kelompok kedua (P1), tikus diinduksi dengan emulsi CTg dan *Complete Freud's Adjuvant* (CFA) secara subkutan pada bagian *cervical* sebanyak 0,2 ml dengan dosis CTg sebesar 100µg/ml pada hari ke-0 kemudian dilakukan *booster* menggunakan emulsi CTg dan *Incomplete Freud's Adjuvant* (IFA) sebanyak 0,2 ml dengan dosis CTg sebesar 100 µg/ml pada hari ke-14 dan ke-28. Pada kelompok ketiga (P2), tikus diinduksi emulsi CTg dan *Complete Freud's Adjuvant* (CFA) secara subkutan pada bagian *cervical* sebanyak 0,2ml dengan dosis CTg sebesar 200 µg/ml pada hari ke-0 lalu dilakukan *booster* menggunakan emulsi

CTg dan *Incomplete Freud's Adjuvant* (IFA) sebanyak 0,2 ml dengan dosis CTg sebesar 200 µg/ml pada hari ke-14 dan ke-28. Jadwal induksi tikus sebagai hewan model AITD secara skematis dapat dilihat pada Lampiran 6.

4.4.6 Pembuatan Preparat Histopatologi

Tikus dikorbankan pada hari ke-34 dengan cara dislokasi leher kemudian dibedah dan diambil organ tiroidnya. Sampel tiroid dicuci dengan menggunakan NaCl fisiologis 0,9% untuk menghilangkan darah. Proses pembuatan preparat histologi terdiri dari fiksasi, dehidrasi, infiltrasi, penjernihan, *embedding*, *sectioning*, penempelan di gelas objek, serta pewarnaan.

Fiksasi dilakukan dengan cara organ tiroid direndam dalam larutan formaldehid 10%. Dehidrasi dilakukan menggunakan larutan etanol secara bertingkat dari konsentrasi 30%, 50%, 70%, 80%, 95%, sampai konsentrasi absolut. Lama jaringan dalam larutan etanol berkisar antara 10 menit hingga 30 menit. Proses dehidrasi berjalan dalam kondisi teragitasi dan pada suhu 4°C. Selanjutnya adalah tahap penjernihan yaitu jaringan dipindahkan dari alkohol absolut III ke larutan penjernih yaitu xylol I (1 jam), xylol II (1 jam), dan xylol III (30 menit pada suhu kamar dan 30 menit pada inkubator).

Proses infiltrasi yang dilakukan dalam parafin cair yang ditempatkan dalam inkubator bersuhu 58-60°C. Jaringan dimasukkan dalam parafin cair I, parafin cair II, dan parafin cair III masing-masing selama 1 jam di dalam oven. Embedding dilakukan dengan cetakan yang didalamnya diisi parafin cair. Setelah membeku, hasil

cetakan tersebut dipotong-potong dan ditempelkan pada blok kayu. Blok tersebut dipasang pada mikrotom dan diatur agar posisinya sejajar dengan posisi pisau. Blok parafin dipotong dengan ketebalan 5 μm . Pada awal pemotongan dilakukan trimming karena jaringan yang terpotong masih belum sempurna. Jaringan diletakkan diatas kaca objek. Sediaan tersebut disimpan pada inkubator dengan suhu 37°C selama semalam (Vara, 2005).

4.4.7 Pembuatan Preparat Imunohistokimia *Tumor Necrosis Factor* (TNF)- α

Jaringan sebelum diwarnai harus melalui proses deparafinasi dan rehidrasi. Proses deparafinasi dengan menggunakan *xylol* bertingkat 1-3 masing-masing selama 5 menit. Lalu dilanjutkan dengan proses rehidrasi dengan menggunakan alkohol absolut I, II dan III masing-masing 3 menit, alkohol 95%, 90%, 80% dan 70% secara berurutan masing-masing selama 3 menit. Selanjutnya jaringan dicuci dengan *aquadest* dan PBS pH 7,4. Selanjutnya, direndam dalam 3% H_2O_2 selama 10 menit. Kemudian preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Blocking dilakukan dengan menggunakan BSA 2% selama 60 menit. Diinkubasi dengan antibodi primer *anti mouse* TNF- α semalam pada suhu 4°C. Setelah diinkubasi dengan antibodi primer dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Selanjutnya ditambah dengan antibodi sekunder *rabbit anti rat IgG biotin labelled* dan diinkubasi selama 1 jam. Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Kemudian ditambahkan reagen *diamino benzidine* (DAB) selama 10-20 menit pada suhu ruang. Preparat dibilas dengan *aquadest* selama 3x5 menit. Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Dilakukan counterstaining dengan *mayer's hematoxylin* selama 10 menit dan dicuci

dengan air. Selanjutnya, preparat dikering anginkan dan dilakukan *mounting* menggunakan entellan kemudian ditutup dengan cover glass (Vara, 2005).

4.4.8 Pembuatan Preparat Imunohistokimia *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS)

Preparat diinkubasi dengan antibodi primer *anti mouse* iNOS semalam pada suhu 4°C. Setelah diinkubasi dengan antibodi primer dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Selanjutnya ditambah dengan antibodi sekunder *rabbit anti rat IgG biotin labelled* dan diinkubasi selama 1 jam. Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Kemudian ditambahkan reagen *diamino benzidine* (DAB) selama 10-20 menit pada suhu ruang. Preparat dibilas dengan *aquadest* selama 3x5 menit. Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Dilakukan counterstaining dengan *mayer's hematoxylin* selama 10 menit dan dicuci dengan air. Selanjutnya, preparat dikering anginkan dan dilakukan *mounting* menggunakan entellan kemudian ditutup dengan cover glass (Vara, 2005).

4.4.9 Pemeriksaan Ekspresi TNF- α dan iNOS

Pemeriksaan preparat imunohistokimia untuk melihat ekspresi TNF- α dan iNOS dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran lemah (100X) hingga perbesaran kuat (400X). Hasil pengamatan ekspresi TNF- α dan iNOS kemudian diuji secara kuantitatif untuk mengukur presentase area menggunakan software *Axio Vision* dengan pengukuran pada lima bidang pandang (Lampiran 7).

4.5 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pemeriksaan ekspresi *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) dan *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) dengan pewarnaan imunohistokimia dianalisis secara statistik menggunakan program SPSS for Windows dengan analisis ragam ANOVA untuk mengetahui perbedaan nyata antar kelompok. Apabila terdapat perbedaan nyata, uji dilanjutkan dengan *Tukey HSD* ($\alpha = 0,05$) untuk mengetahui signifikansi data tersebut (Astuti, 2010).

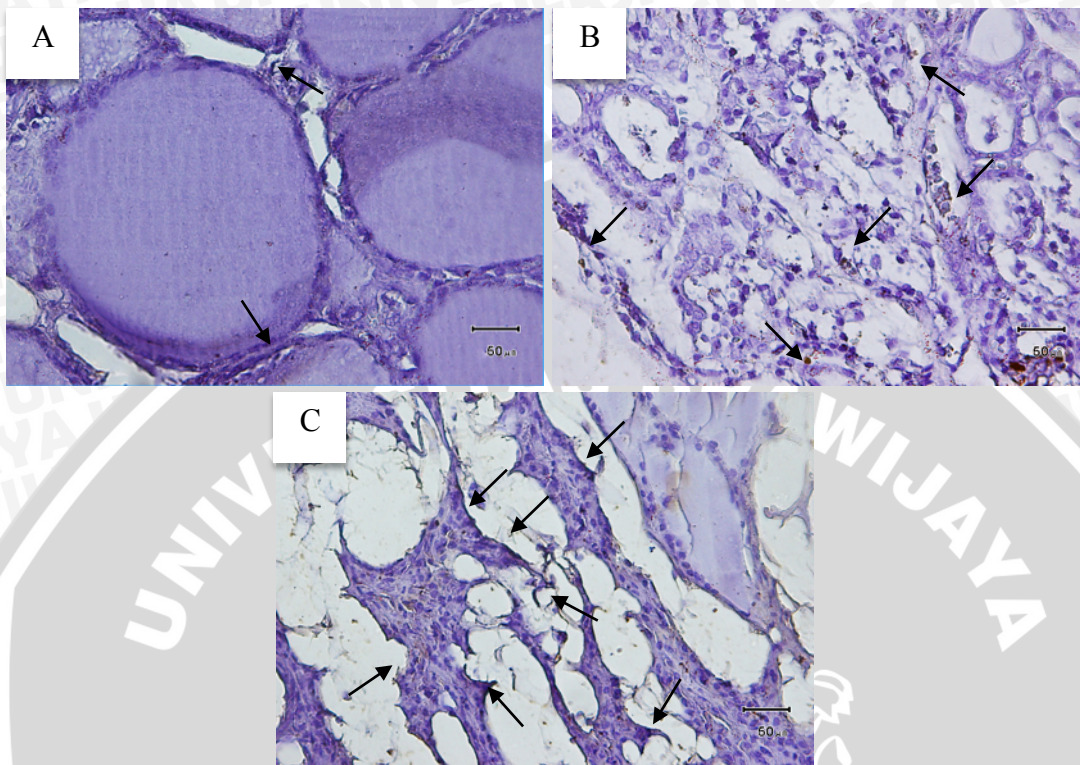


BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Ekspresi *Tumor Necrosis Factor (TNF)- α* pada Tikus Hasil Injeksi CTg Sebagai Hewan Model *Autoimmune Thyroiditis*

Pembuatan tikus model AITD (EAT) dilakukan dengan cara menginjeksikan CTg yang diemulsikan dengan CFA atau IFA secara subkutan pada bagian *cervical*. *Complete Freud Adjuvant* (CFA) mengandung mikobakterium inaktif dan diberikan pada injeksi awal sebagai preimun, sedangkan *Incomplete Freud Adjuvant* (IFA) tidak mengandung mikobakterium dan diberikan pada beberapa injeksi selanjutnya sebagai booster. Injeksi CTg dilakukan dengan dosis pemberian sebesar 100 μ g/ml dan 200 μ g/ml. Pemberian CTg dengan dua jenis dosis bertujuan untuk mengetahui dosis optimum yang dapat menginduksi terjadinya *autoimmune thyroiditis* yang diketahui dari tingkat kerusakan jaringan tiroid.

Berdasarkan pengamatan terhadap preparat histopatologi jaringan tiroid dengan pewarnaan imunohistokimia, jaringan tiroid pada tikus yang tidak diinjeksi CTg dengan tikus yang diinjeksi CTg memberikan perbedaan gambaran baik dari segi struktur jaringan maupun TNF- α yang diekspresikan. Ekspresi TNF- α tersebut ditandai dengan warna coklat yang muncul pada jaringan tiroid.



Gambar 5.1 Ekspresi *Tumor Necrosis Factor* (TNF)- α dengan pewarnaan imunohistokimia pada jaringan tiroid tikus.

Keterangan : (A) Jaringan tiroid tikus normal tanpa injeksi CTg; (B) Jaringan tiroid tikus yang diinjeksi CTg dosis 100 $\mu\text{g/ml}$; (C) Jaringan tiroid tikus yang diinjeksi CTg dosis 200 $\mu\text{g/ml}$. Panah=ekspresi TNF- α (coklat). Perbesaran 400X.

Pewarnaan imunohistokimia dilakukan pada preparat jaringan tiroid tikus untuk mengetahui ekspresi TNF- α pada jaringan tersebut. Pada jaringan tiroid tikus, warna coklat merupakan visualisasi dari ekspresi TNF- α yang berada di dalam jaringan tersebut. Tingkat kerusakan yang terjadi pada setiap kelompok juga menunjukkan perbedaan tidak hanya dari intensitas TNF- α yang diekspresikan, tetapi dapat pula dilihat dari struktur jaringan tiroid yang mengalami perubahan (Gambar 5.1).

Pada kelompok tikus kontrol yang tidak diinjeksi CTg, sitokin TNF- α diekspresikan dengan intensitas yang rendah di antara folikel-folikel tiroid. Secara

struktural, folikel-folikel tiroid tersebut berukuran normal dan berisi koloid serta dikelilingi sel epitel pipih selapis (Gambar 5.1 A). Sitokin TNF- α pada jaringan tiroid kelompok tikus yang diinjeksi CTg dosis 100 $\mu\text{g/ml}$ diekspresikan dalam intensitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok tikus normal. Ekspresi TNF- α tersebut tersebar merata hampir di semua bagian folikel tiroid dan diikuti dengan perubahan struktur folikel-folikel tiroid yang kondisinya sudah tidak utuh. Sel-sel parafolikular tidak terlihat jelas dan disertai dengan penyempitan area folikel (Gambar 5.1 B). Jaringan tiroid kelompok tikus yang diinjeksi CTg dosis 200 $\mu\text{g/ml}$ menunjukkan tingkat kerusakan jaringan yang paling parah dibandingkan dengan dua kelompok sebelumnya. Sitokin TNF- α diekspresikan dengan intensitas yang lebih tinggi pada kelompok dosis tersebut dan tersebar tidak merata. Area folikel semakin sempit sehingga batas antar folikel menjadi tidak jelas dan sel-sel parafolikular juga tidak terlihat jelas (Gambar 5.1 C).

Kerusakan jaringan tiroid yang terjadi pada kelompok tikus yang diinjeksi dengan CTg dosis 100 $\mu\text{g/ml}$ dan dosis 200 $\mu\text{g/ml}$ disebabkan oleh meningkatnya aktivasi makrofag dan produksi autoantibodi terhadap tiroglobulin. Makrofag teraktivasi karena adanya pengenalan Tg sebagai autoantigen sehingga memicu respon imunitas tubuh dan menyebabkan terjadinya inflamasi pada jaringan tiroid. Selain itu, pengenalan tersebut juga menginisiasi proliferasi sel T yang berperan dalam respon imun spesifik pada jaringan tiroid. Sel T berproliferasi menjadi sel Th1 dan sel Th2. Makrofag dan sel Th1 akan menghasilkan sitokin pro-inflamasi, salah satunya adalah sitokin TNF- α yang menjadi penanda terjadinya kerusakan jaringan.

Sedangkan sel Th2 akan mengaktivasi sel B untuk pembentukan autoantibodi yang akan menyerang tiroglobulin sehingga terjadi kerusakan pada jaringan tiroid tikus.

Hasil pengamatan terhadap ekspresi TNF- α pada preparat jaringan yang diwarnai dengan metode imunohistokimia selanjutnya diamati dengan menggunakan program *axio vision* untuk mengetahui presentase area dari ekspresi TNF- α yang dimunculkan oleh setiap kelompok perlakuan.

Tabel 5.1 Rata-rata Persentase Area Ekspresi TNF- α pada Kelompok Tikus Normal dan Kelompok Tikus yang Diinduksi CTg

Kelompok	Ekspresi TNF- α (%) (Mean $\pm$ SD)	Peningkatan Persentase Area Ekspresi TNF- α terhadap Kontrol (%)
A (Tanpa Injeksi CTg)	0,20 $\pm$ 0,04 ^a	0
B (Dosis 100 μ g/ml)	1,18 $\pm$ 0,28 ^b	487
C (Dosis 200 μ g/ml)	3,48 $\pm$ 0,53 ^c	1639

Keterangan : Perbedaan notasi (a,b,c) menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok terhadap ekspresi TNF- α ($p < 0,05$).

Ketiga kelompok perlakuan menunjukkan adanya perbedaan hasil ekspresi TNF- α yang berbeda nyata dan signifikan ($p < 0,05$) (Lampiran 9). Kelompok yang diinjeksi dengan CTg dosis 200 μ g/ml mengekspresikan TNF- α dengan intensitas yang lebih tinggi (3,48 $\pm$ 0,53) dibandingkan kelompok dosis 100 μ g/ml (1,18 $\pm$ 0,28) dan kedua kelompok dosis tersebut mengekspresikan TNF- α lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol yang tidak diinjeksi CTg (0,20 $\pm$ 0,04) (Tabel 5.1). Hal tersebut menunjukkan bahwa ekspresi TNF- α pada jaringan tiroid tikus yang diinjeksi dengan CTg meningkat dari keadaan tiroid normal. Jika dibandingkan dengan kelompok tikus tanpa injeksi CTg, kelompok tikus dosis 100 μ g/ml

mengalami peningkatan ekspresi TNF- α sebesar 487% sedangkan kelompok tikus dosis 200 $\mu\text{g/ml}$ mengalami peningkatan ekspresi TNF- α sebesar 1639% (Tabel 5.1). Semakin tinggi dosis CTg yang diberikan pada tikus maka jumlah TNF- α yang diekspresikan akan semakin tinggi. Hal tersebut mengindikasikan adanya pengaruh dari jumlah dosis CTg yang diberikan terhadap TNF- α yang diekspresikan pada jaringan tiroid tikus.

Dalam kondisi fisiologis, sitokin TNF- α diproduksi untuk mekanisme homeostasis, sehingga pada kelompok perlakuan kontrol TNF- α tetap diekspresikan dengan intensitas yang rendah. Sitokin TNF- α diproduksi dalam jumlah sedikit untuk mempertahankan dan menjaga kondisi suatu jaringan. Sel T CD8⁺ yang berfungsi sebagai sel sitotoksik memproduksi sitokin TNF- α yang berfungsi untuk menginduksi proses apoptosis sel (Karnen dan Iris, 2010). Burek *et al.* (2003) juga menyebutkan dalam penelitiannya bahwa sel T CD8⁺ dapat melisis sel-sel tiroid (tirosit) dengan cara menghasilkan perforin/granzim atau melalui produksi sitokin TNF- α .

Kelompok tikus dengan injeksi dosis CTg 200 $\mu\text{g/ml}$ mengekspresikan sitokin TNF- α dengan intensitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok dosis 100 $\mu\text{g/ml}$ karena jumlah antigen yang diinduksikan lebih banyak. Jumlah antigen yang lebih banyak akan semakin meningkatkan respon aktivasi makrofag dan proliferasi sel T. Hal tersebut didukung oleh pernyataan Yoon *et al.* (2009) dalam penelitiannya bahwa sitokin TNF- α merupakan salah satu sitokin yang sebagian besar diproduksi oleh makrofag dan monosit yang teraktivasi.

Penggunaan CFA sebagai adjuvan membantu pengenalan injeksi CTg sebagai antigen oleh APC. Sementara itu, di dalam jaringan tiroid tikus telah terdapat tiroglobulin yang awalnya tidak dikenali sebagai antigen. Injeksi CTg yang diemulsikan dengan CFA akan mengintervensi sistem imun sehingga mengenali tiroglobulin tikus tersebut sebagai antigen. Keadaan tersebut sejalan dengan pernyataan Karnen dan Iris (2010) bahwa penggunaan adjuvan yang tepat dengan protein *self* dapat menginduksi respon autoimun pada hewan model karena adjuvan dapat memacu respons imun dengan afinitas tinggi serta memiliki kapasitas untuk mengintervensi sistem imun yang selektif seperti sel B dan sel T.

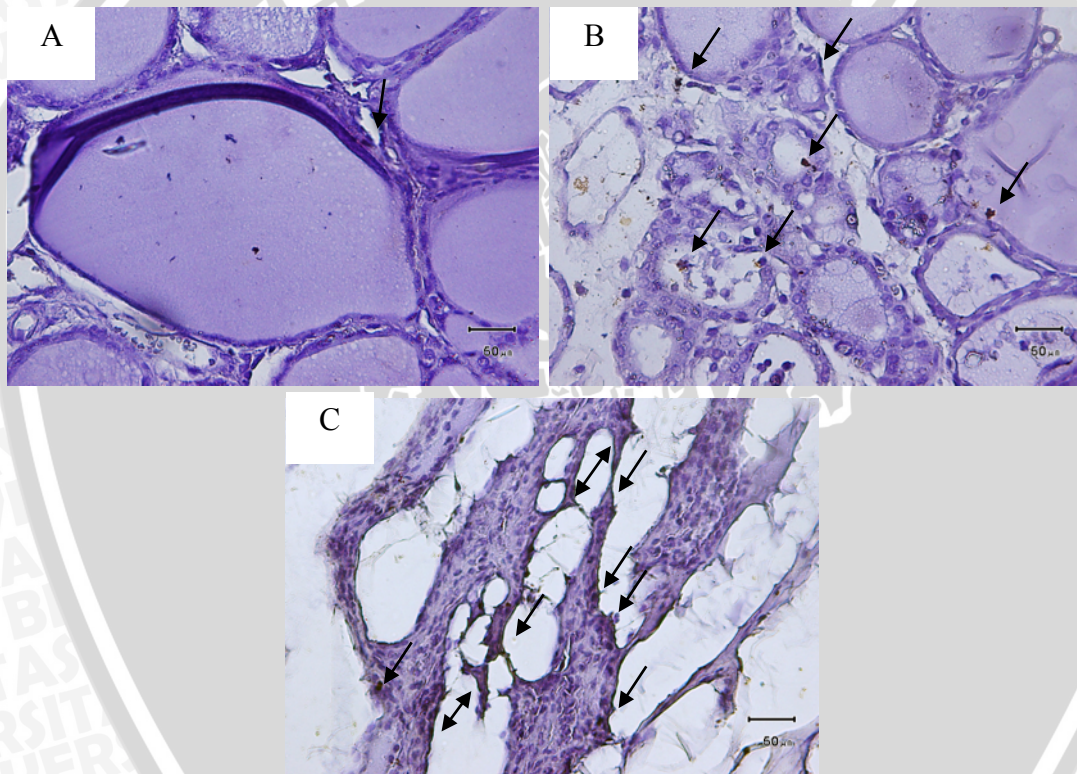
Injeksi CTg mengakibatkan APC melalui MHC-II mempresentasikan tiroglobulin sebagai autoantigen kepada sel $CD4^+$ sehingga tiroglobulin yang berada di dalam tiroid tikus dikenali sebagai *self antigen* karena adanya kemiripan struktur molekul dan biokimia antar tiroglobulin. *Major histocompatibility complex-II* (MHC-II) diketahui memiliki kemampuan yang sangat potensial dalam proses presentasi antigen dan berperan penting dalam terjadinya mekanisme *autoimmune thyroiditis*. Analisis terhadap *thyroid epithelial cells* (TEC) pada beberapa penderita penyakit tiroiditis menunjukkan adanya molekul-molekul adhesi seperti *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) dan *lymphocyte function associated antigen-3* (LFA-3) dalam ekspresi MHC-II. Molekul-molekul adhesi tersebut berfungsi dalam proses regulasi sitokin $TNF-\alpha$ dan $IFN-\gamma$ serta meningkatkan adhesi antara sel T dan APC serta memacu sinyal kostimulator untuk aktivasi sel T (Male *et al.*, 1996).

Injeksi CTg yang diemulsikan dengan IFA akan mengaktivasi sel B memori yang kemudian menginisiasi sel B plasma untuk membentuk antibodi terhadap tiroglobulin. Antibodi terhadap tiroglobulin diproduksi oleh sel B yang teraktivasi melalui sitokin IL-4 yang dihasilkan oleh sel Th2 hasil proliferasi sel T CD4⁺ naif (Burek *et al.*, 2003). Semakin banyak jumlah CTg yang diinjeksikan ke dalam tubuh tikus maka produksi antibodi pun akan semakin tinggi. Ikatan antara antibodi (Tg-Ab) dengan antigen (Tg) akan menghantarkan sel-sel tiroid ke mekanisme pemusnahan efektor. Mekanisme tersebut melibatkan aktivasi sel mononuklear (makrofag dan monosit) melalui regulasi sel T CD4⁺, sel T CD8⁺ (Tc), dan aktivitas sitolitik *antibody dependent cell (mediated) cytotoxicity* (ADCC) (Karnen dan Iris, 2010). Hal tersebut sesuai dengan penelitian Prete *et al.* (1989) yang membuktikan bahwa sitokin TNF- α dihasilkan dalam jumlah yang tinggi oleh sel T CD4⁺ dan sel T CD8⁺ pada penderita penyakit *autoimmune thyroiditis*.

Berdasarkan hasil penelitian ini, pemberian CTg yang diemulsikan dengan CFA akan mengakibatkan presentasi tiroglobulin tikus sebagai antigen dan apabila diemulsikan dengan IFA akan menginisiasi pembentukan antibodi terhadap tiroglobulin sehingga dapat menyebabkan kerusakan pada jaringan tiroid yang ditandai dengan adanya ekspresi sitokin TNF- α . Perbedaan variasi dosis pada kelompok tikus yang diinjeksi CTg dan kelompok tikus tanpa injeksi CTg menunjukkan perbedaan hasil yang signifikan. Jumlah dosis CTg yang diinjeksikan pada tikus juga berbanding lurus dengan tingkat kerusakan yang terjadi pada jaringan tiroid tikus tersebut.

5.2 Ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) pada Tikus Hasil Injeksi CTg sebagai Hewan Model *Autoimmune Thyroiditis*

Berdasarkan pengamatan terhadap preparat tiroid hasil pewarnaan imunohistokimia, jaringan tiroid pada tikus memberikan perbedaan gambaran baik dari segi struktur jaringan maupun ekspresi iNOS yang dihasilkan. Perbedaan tersebut dihasilkan karena jenis perlakuan dan jumlah dosis CTg yang diinjeksikan.



Gambar 5.2 Ekspresi *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) dengan pewarnaan imunohistokimia pada jaringan tiroid tikus.

Keterangan : (A) Jaringan tiroid tikus normal tanpa injeksi CTg; (B) Jaringan tiroid tikus yang diinjeksi CTg dosis 100 µg/ml; (C) Jaringan tiroid tikus yang diinjeksi CTg dosis 200 µg/ml. Panah=ekspresi iNOS (coklat). Perbesaran 400X.

Ekspresi iNOS pada jaringan tiroid divisualisasi menggunakan metode imunohistokimia yang ditunjukkan oleh endapan berwarna coklat. Warna tersebut

menandakan adanya ikatan antara antibodi dengan antigen pada jaringan tiroid tikus. Struktur jaringan tiroid tikus normal tidak mengalami perubahan. Lumen tiroid berisi koloid dan dikelilingi oleh sel-sel epitel pipih selapis. iNOS diekspresikan dengan intensitas rendah pada folikel tiroid tikus (Gambar 5.2 A). Pada kelompok tikus yang diinjeksi dengan CTg dosis 100 $\mu\text{g/ml}$, iNOS diekspresikan dengan intensitas tinggi dan tersebar merata pada jaringan tiroid. Terjadi perubahan warna menjadi lebih muda pada beberapa folikel. Sel-sel parafolikular juga tidak terlihat jelas dan luas area folikel mengalami penyempitan (Gambar 5.2 B). Ekspresi iNOS dengan intensitas yang lebih tinggi dan tersebar tidak merata terlihat pada kelompok tikus yang diinjeksi dengan CTg dosis 200 $\mu\text{g/ml}$. Folikel tiroid mengalami kerusakan dengan sel-sel parafolikular yang tidak terlihat jelas dan diikuti oleh penyempitan area lumen sehingga batas area antar folikel juga menjadi tidak tampak (Gambar 5.2 C).

Secara histologis, kelenjar tiroid terdiri dari banyak folikel berisi koloid yang mengandung tiroglobulin dan dikelilingi oleh sel-sel epitel kubus selapis (Brown, 1992). Tiroglobulin pada jaringan tiroid tikus dikenali sebagai autoantigen karena penggunaan CFA yang diemulsikan dengan CTg membantu tiroglobulin dipresentasikan sebagai antigen oleh APC melalui MHC-II. Presentasi tersebut kemudian mengaktifasi makrofag yang menghasilkan produk peptide yaitu *nitric oxide* (NO) sebagai mediator dalam mekanisme kerusakan jaringan. Van Den Hove *et al.* (2002) menyebutkan bahwa pada tiroid, NO dihasilkan sebagai respon terhadap interleukin-1 (IL-1) yang merupakan sitokin proinflamasi dan memediasi kerja

sitokin pada tahap awal proses autoimun. Perubahan struktur jaringan tiroid yang menjadi tidak utuh adalah salah satu ciri-ciri terjadinya kerusakan pada tiroid. NO yang dihasilkan oleh *thyroid epithelial cells* (TEC) dapat merusak pelindung (barrier) dari sel tersebut yang menyebabkan ketidakutuhan bentuk sel tiroid. Ketidakutuhan bentuk sel mengakibatkan kegagalan fungsi dari sel epitel tiroid yang berperan dalam mengatur regulasi tiroglobulin yang dibutuhkan untuk produksi hormon tiroid. Kerusakan barrier sel tiroid juga dapat meningkatkan adhesi sel limfosit terhadap tiroglobulin dan menghantarkan tiroglobulin ke mekanisme pemusnahan sel (Rasmussen *et al.*, 1994).

Hasil pengamatan terhadap ekspresi iNOS pada preparat jaringan yang diwarnai dengan metode imunohistokimia selanjutnya diamati dengan menggunakan program *axio vision* untuk mengetahui presentase area dari ekspresi yang dimunculkan oleh setiap kelompok perlakuan. Data yang diperoleh kemudian dianalisis secara statistik untuk mengetahui perbedaan antara ketiga kelompok tersebut.

Tabel 5.2 Rata-rata Persentase Area Ekspresi iNOS pada Kelompok Tikus Kontrol, Kelompok Tikus Dosis 100 µg/ml, dan Kelompok Tikus Dosis 200 µg/ml

Kelompok	Ekspresi iNOS (%) (Mean ± SD)	Peningkatan Persentase Area Ekspresi iNOS terhadap Kontrol (%)
A (Tanpa Injeksi CTg)	0,10 ± 0,02 ^a	0
B (Dosis 100 µg/ml)	1,80 ± 0,26 ^b	1729
C (Dosis 200 µg/ml)	4.13 ± 1,06 ^c	4118

Keterangan : Perbedaan notasi (a,b,c) menunjukkan perbedaan yang signifikan antar kelompok terhadap ekspresi iNOS ($p < 0,05$).

Hasil dari ketiga kelompok perlakuan menunjukkan adanya perbedaan rata-rata jumlah ekspresi iNOS secara nyata dan signifikan ($p < 0,05$) (Lampiran 9). Jumlah iNOS yang diekspresikan pada kelompok tikus normal tanpa injeksi CTg lebih kecil ($0,10 \pm 0,02$) dibandingkan dengan jumlah iNOS yang diekspresikan pada kelompok tikus yang diinjeksi CTg. Jumlah iNOS yang diekspresikan pada kelompok tikus yang diinjeksi CTg dosis $100 \mu\text{g/ml}$ ($1,80 \pm 0,26$) lebih kecil dibandingkan dengan kelompok tikus yang diinjeksi CTg dosis $200 \mu\text{g/ml}$ ($4,13 \pm 1,06$). Jika dibandingkan dengan jumlah iNOS yang diekspresikan pada kelompok tikus normal, kelompok yang diinjeksi CTg dengan dosis sebesar $100 \mu\text{g/ml}$ mengalami peningkatan ekspresi iNOS sebesar 1729% sedangkan kelompok tikus yang diinjeksi dengan dosis $200 \mu\text{g/ml}$ mengalami peningkatan jumlah iNOS sebesar 4118%. Hal tersebut menunjukkan adanya pengaruh antara jumlah dosis CTg yang diberikan dengan intensitas iNOS yang diekspresikan (Tabel 5.2).

Pada jaringan tiroid normal, iNOS diekspresikan dalam jumlah yang kecil karena dalam mekanisme fisiologis iNOS tetap dibutuhkan untuk menghasilkan NO. Grisham *et al.* (1999) menyebutkan dalam Aktan (2004) bahwa pada konsentrasi fisiologis, NO menghambat agregasi platelet proinflamasi, adhesi yang dimediasi integrin, ekspresi gen yang menginduksi sitokin proinflamasi, faktor yang mengontrol inflamasi vaskular, dan kerusakan oksidatif.

Pada kelompok tikus yang mendapat perlakuan injeksi CTg dosis $100 \mu\text{g/ml}$, iNOS diekspresikan lebih banyak dibandingkan pada kelompok tikus normal. Peningkatan ekspresi ini karena injeksi antigen CTg memicu peningkatan aktivasi

makrofag untuk reaksi inflamasi. Ekspresi iNOS pada kelompok yang diinjeksi CTg dengan dosis 200 $\mu\text{g/ml}$ juga lebih banyak dibandingkan dengan kelompok dosis 100 $\mu\text{g/ml}$. Hal tersebut disebabkan jumlah antigen yang diinjeksikan pada tikus lebih banyak sehingga aktivasi makrofag juga meningkat. Peningkatan aktivasi tersebut berbanding lurus dengan peningkatan jumlah sitokin IFN- γ yang dihasilkan sebagai salah satu sitokin proinflamasi. Tingginya jumlah sitokin IFN- γ pada tiroid akan meningkatkan produksi iNOS di jaringan tersebut (Brown, 2007). Keadaan ini sejalan dengan pendapat Rao *et al.* (2000) dalam Aktan (2004) bahwa IFN- γ mengaktivasi jalur signal Jak-STAT untuk meningkatkan induksi iNOS dan produksi NO. Selain itu, penggunaan adjuvant CFA yang mengandung mikobakterium inaktif berperan dalam proses pengenalan antigen pada reseptor makrofag, sesuai dengan pendapat Schroder *et al.* (2000) bahwa aktivitas iNOS pada makrofag diregulasi dan dimodulasi pertama kali oleh molekul reseptor seluler misalnya *Toll-like receptor* dan CD-14 yang merupakan reseptor produk bakterial dan berperan penting dalam respon proinflamasi monosit dan makrofag melalui aktivasi jalur *nuclear factor kappa B* (NF- κB).

Banyaknya jumlah iNOS yang diekspresikan jaringan tiroid kelompok yang diinjeksi dengan CTg berbanding lurus dengan tingkat kerusakan yang terjadi sesuai pendapat Brown (2007), ketika iNOS diekspresikan, NO akan diproduksi terus menerus dalam jumlah yang tinggi. Semakin banyak iNOS yang diekspresikan, maka NO yang dihasilkan juga semakin banyak sehingga kerusakan tiroid juga semakin parah. Jaringan tiroid kelompok dosis 100 $\mu\text{g/ml}$ dan 200 $\mu\text{g/ml}$ mengalami stress

oksidatif karena sebagai radikal bebas, NO dapat dengan mudah berikatan dengan molekul oksigen bebas dan menyebabkan kerusakan jaringan. *Nitric oxide* (NO) yang berikatan dengan oksigen bebas akan membentuk *reactive nitrogen oxide intermediate* (RNOI) dan *peroxynitrite* yang bersifat sitotoksik (Aktan, 2004). Menurut penelitian Han *et al.* (2001) dalam Brown (2007), *peroxynitrite* dapat menghambat respirasi mitokondria secara irreversibel dan merusak komponen-komponen penyusun mitokondria, serta menghambat aktivitas dan level antioksidan di dalam sel. Reaksi tersebut bersifat sangat reaktif dan menyebabkan terjadinya stress oksidatif di jaringan tiroid yang berujung pada kematian sel tiroid tikus.

Peningkatan ekspresi iNOS memiliki korelasi penting dengan peningkatan ekspresi TNF- α pada jaringan tiroid tikus yang diinjeksi dengan CTg. Keduanya merupakan produk yang dihasilkan makrofag teraktivasi sebagai bentuk respon dalam keadaan inflamasi jaringan. Sitokin TNF- α yang dihasilkan makrofag juga dapat menginisiasi pembentukan iNOS melalui pengaktifan jalur NF- κ B. Pengaktifan tersebut akan meningkatkan kemampuan reseptor TLR dan CD14 yang memodulasi pembentukan iNOS dan produksi NO (Song *et al.*, 2007).

Berdasarkan hasil penelitian ini, injeksi CTg terbukti mengakibatkan kerusakan pada jaringan tiroid ditandai dengan peningkatan ekspresi iNOS yang dihasilkan oleh setiap kelompok. Perbedaan variasi dosis pada kelompok tikus yang diinjeksi CTg dan kelompok tikus tanpa injeksi CTg menunjukkan jumlah ekspresi iNOS yang berbeda serta berbanding lurus dengan kerusakan jaringan yang diakibatkan.

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

1. Injeksi tiroglobulin kambing (CTg) menyebabkan peningkatan ekspresi *tumor necrosis factor* (TNF)- α dan *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) pada organ tiroid tikus (*Rattus norvegicus*) yang merupakan penanda terjadinya AITD.
2. Jumlah dosis CTg yang diinjeksikan berbanding lurus dengan tingkat kerusakan jaringan tiroid dimana dosis 200 $\mu\text{g/ml}$ merupakan dosis yang paling optimal dalam menginduksi terjadinya AITD pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*).

6.2 Saran

1. Diperlukan proses purifikasi pada tahap isolasi protein tiroglobulin untuk meningkatkan spesifitas *inducer* hewan model tikus *autoimmune thyroiditis*.
2. Diperlukan penelitian lebih lanjut terhadap spesifitas antibodi-tiroglobulin yang dihasilkan pada hewan model tikus *autoimmune thyroiditis*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., A.H. Lichtman, and J.S. Pober. 2000. *The Major Histocompatibility Complex*. In A. L. Abbas, Cellular and Molecular Immunology; 4th Ed. Philadelphia: WB Saunders Co. 63-78.
- Ajan, R.A., P.F. Watson, and A.P. Weetman. 1996. Cytokines and Thyroid Function. *Advanced Neuroimmunology*, 6 : 359-386.
- Aktan, F. 2004. iNOS-mediated Nitric Oxide Production and Its Regulation. *Life Sciences*, 75 : 639-653.
- Amani, H.K. 2011. Histopathologic and Immunohistochemical Features of Hashimoto Thyroiditis. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, 54 (3) : 464-471
- AOAC (Association of Official Analytical Chemist). 2005. *Official Methods of Analysis*. Washington DC.
- Astuti, Widia. 2010. *Teknik Uji Lanjut Tukey dan Uji Scheffe*. <http://unsri.ac.id/Widyaastuti/matematika/teknik-uji-lanjut-tukey-dan-uji-scheffe/mrdetail/14378/> . [2 April 2013]
- Baki, M., F.E. Akman, P. Vural, S. Doğru-Abbasoğlu, A.Özderya, B. Karadağ, and M. Uysal. 2012. The Combination of Interleukin-10 –1082 and Tumor Necrosis Factor- α 308 or Interleukin-6–174 Genes Polymorphisms Suggests An Association with Susceptibility to Hashimoto's Thyroiditis. *International Immunopharmacology*, 12 : 543–546.
- Brooks, W. 2010. X-chromosome Inactivational Autoimmunity. *Clin Rev Allergic Immunol*, 39 (1) : 20-9.
- Brown, G. C. 2007. Mechanisms of Inflammatory Neurodegeneration: iNOS and NADPH Oxidase. *Journal Compilation of Biochemical Society*, 35 (5) : 1119-1121.
- Burek, C.L., E.B. Raphael, R.R. Noel, R. Linda, and C. Patrizio. 2003. Kinetics of Mononuclear Cell Infiltration and Cytokine Expression in Iodine-Induced Thyroiditis in the NOD-H2^{h4} Mouse. *Experimental and Molecular Pathology*, 74 : 1-12.
- Chen, W., H. Lin, and M. Wang. 2002. Immune Intervention Effects on the Induction of Experimental Autoimmune Thyroiditis. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Med Sci]* , 343-345.

- Choy, C.S., C.M. Hu, W.T. Lam, C.S. Ting, S.H. Tsai, dan T.C. Wang. 2008. Suppression of Lipopolysaccharide-induced of Inducible Nitric Oxide Synthase and Cyclooxygenase-2 by *Sanguis draconis*, A Dragon's Blood Resin, in RAW 264.7 Cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 115 : 455-462.
- Craigmyle, M.B. 1987. *A Colour Atlas of Histology*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Del Prete, G.F., A. Tiri, and M. De Carli. 1989. High Potential to Tumor Necrosis Factor- α Production of Thyroid Infiltrating Lymphocytes in Hashimoto Thyroiditis : A Pelicular Feature of Thyroid Autoimmunity. *Autoimmunity Journal*, 4 : 267-276.
- Dodds, W. J. 2000. *Canine Thyroid and Autoimmune Disease* (Genetics, nutrition, and vaccine-related issue). In: The Saluki Welfare Fund Health Seminar. 2000. Santa Monica: Dodds JW.
- Hedrich, H. 2006. Taxonomy stock and strains. *J The laboratory Rat* , 71-92.
- Van Den Hove, M.F., M.S. Stoenoiu, K. Croizet, M. Couvreur, P. J. Courtoy, O. Devuyst, and M. Colin. 2002. NO is Involved in IL-1 α -induced Cytotoxicity in Polarised Human Thyrocytes. *Journal of Endocrinology*, 173 : 177-185.
- Hubbard, G. and H. Jonathan. 2011. Thyrotoxicosis and Thyroiditis. *Endocrine Surgery* , 440-445.
- Karnen, G. dan B. Iris. 2010. *Imunologi Dasar*. Jakarta: Balai Penerbit FKUI.
- Male, D., A. Cooke, M. Owen, J. Trowsdale, and B.Champion. 1996. *Cytokines and Chemokines*. In D. C. Male, *Advanced Immunology*; 3rd Ed. London: Mosby Co. (10.1-10.14)
- Mayer, B. and B. Hemmens. 1997. Biosynthesis and Action of Nitric Oxide in Mammalian Cells. *Trends in Biochemical Sciences*, 22 (12) : 477-481.
- Montgomery, D. and S. Kowalsky. 2011. *Design and Analysis of Experiment John Willey and Sains Inc*. ISBN 978-0-470-16990-2
- Myers, P. and D. Armitage. 2004. *Rattus norvegicus*. Animal Diversity: http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Rattus_norvegicus.html [15 Maret 2013]

- Rasmussen, A.K., R.D. Marco, M. Diamant, U. Feldt-Rasmussen, and K. Bendtzen. 1994. NO Production is Not Involved in The Effects of Interleukin-1 β on cAMP, Thyroglobulin, and Interleukin-6 in TSH-stimulated Human Thyroid Cells. *Autoimmunity Journal*, 19 : 239-245.
- Raphael, E. and N.R. Bonita. 2003. Kinetics of Mononuclear Cell Infiltration and Cytokine Expression in Iodine-Induced Thyroiditis in the NOD-H2 h4 Mouse. *Experimental and Molecular Pathology*, 74 : 1-12.
- Sagawa, K., K. Nagatani, Y. Komagata, and K. Yamamoto. 2005. Angiotensin Receptor Blockers Suppress Antigen-specific T Cell Responses and Ameliorate Collagen-induced Arthritis in Mice. *Arthritis Rheumatic*, 52 : 1920-1928.
- Schroder, N.W., B. Opitz, N. Lamping, K.S. Michelsen, U. Zahringer, U.B. Gobel, and R.R. Schumann. 2000. Involvement of LPS Binding Protein, CD14, and Toll-like Receptor in the Initiation of Innate Immune Responses by Treponema Glycolipids. *Journal of Immunology*, 165 (5) : 2683-2693.
- Sieminska, L., C. Wojciechowska, B. Kos-kudta, B. Marek, D. Kajdaniuk, and M. Nowak. 2010. Serum Concentrations of Leptin, Adiponectin, and Interleukin-6 In Postmenopausal Women with Hashimoto's Thyroiditis. *Journal of Endocrinology*, 61 (1) : 112-116.
- Song, X.H., R.Z. Zan, C.H. Yu, and F. Wang. 2010. Effects of Modified Haizao Yuhu Decoction in Experimental Autoimmune Thyroiditis Rats. *Journal of Ethnopharmacology*, vol.135:2, pp. 321-324.
- Stafford, E.A. and N.R. Rose. 2000. Newer Insights into The Pathogenesis of Experimental Autoimmune Thyroiditis. *International Rev. Immunology*, 19 : 501-513
- Stuehr, D.J., N.S. Kwon, C.F. Nathan, O.W. Griffith, P.L. Feldman, and J. Wiseman. 1991. N Omega-Hydroxy-L-Arginine Is An Intermediate in The Biosynthesis of Nitric Oxide From L-Arginine. *Journal of Biological Chemistry*, 266 (10) : 6259-6263.
- Lee, T.P. and B.L. Chiang. 2012. Sex Differences in Spontaneous Versus Induced Animal Models of Autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, 11 : 422-429.
- Tomer, Y. and A. Huber. 2009. The Etiology of Autoimmune Thyroid Disease : A Story of Genes and Environment. *Journal of Autoimmunity*, 32 (3-4) : 231-239.
- Vara, J. 2005. Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*, 42 (4) : 405-426.

Weetman, A.P. 2004. Cellular Immune Responses in Autoimmune Thyroid Disease. *Clinical Endocrinology*, 61 (4) : 405–413.

Weetman, A.P. 2001. Determinants of Autoimmune Thyroid Disease. *National Immunology*, 769-770.

Yoon, W.J., M.H. Young, S.S. Kim, B.S. Yoo, J.Y. Moon, J.S. Baik, N.H. Lee, and C.G. Hyun. 2009. Suppression of Pro-Inflammatory Cytokines, iNOS, and COX-2 Expression by Brown Algae *Sargassum micracanthum* in RAW 264.7 Macrophages. *EurAsian Journal of BioScience*, 3 (17) : 130-143.

Zhou, J.S. and H.S. Gill. 2005. Immunostimulatory Probiotic Lactobacillus Rhamnosus HN001 and Bifidobacterium Lactis HN019 Do Not Induce Pathological Inflammation in Mouse Model of Experimental Autoimmune Thyroiditis. *International Journal of Food Microbiology* 103 : 97-104.



Lampiran 1. Sertifikat Keterangan Laik Etik Penelitian**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA****KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARENCE"**

No: 140-KEP-UB

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

PENELITIAN BERJUDUL : INDUKSI THYROGLOBULIN KAMBING (*Capra hircus*)
PADA HEWAN MODEL TIKUS (*Rattus norvegicus*)
SEBAGAI UPAYA OPTIMASI HEWAN MODEL
AUTOIMMUN THYROIDITIS

PENELITI : PRIMA SANTI

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 12 April 2013
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya



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



**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

Jl. Veteran Malang 65145
Telp/Fax (0341) 559054, 575836
E-mail : bioetikub@ub.ac.id

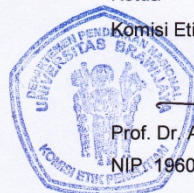


Judul Penelitian : Induksi thyroglobulin kambing (*Capra hircus*) pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) sebagai upaya optimasi hewan model Autoimmun Thyroiditis

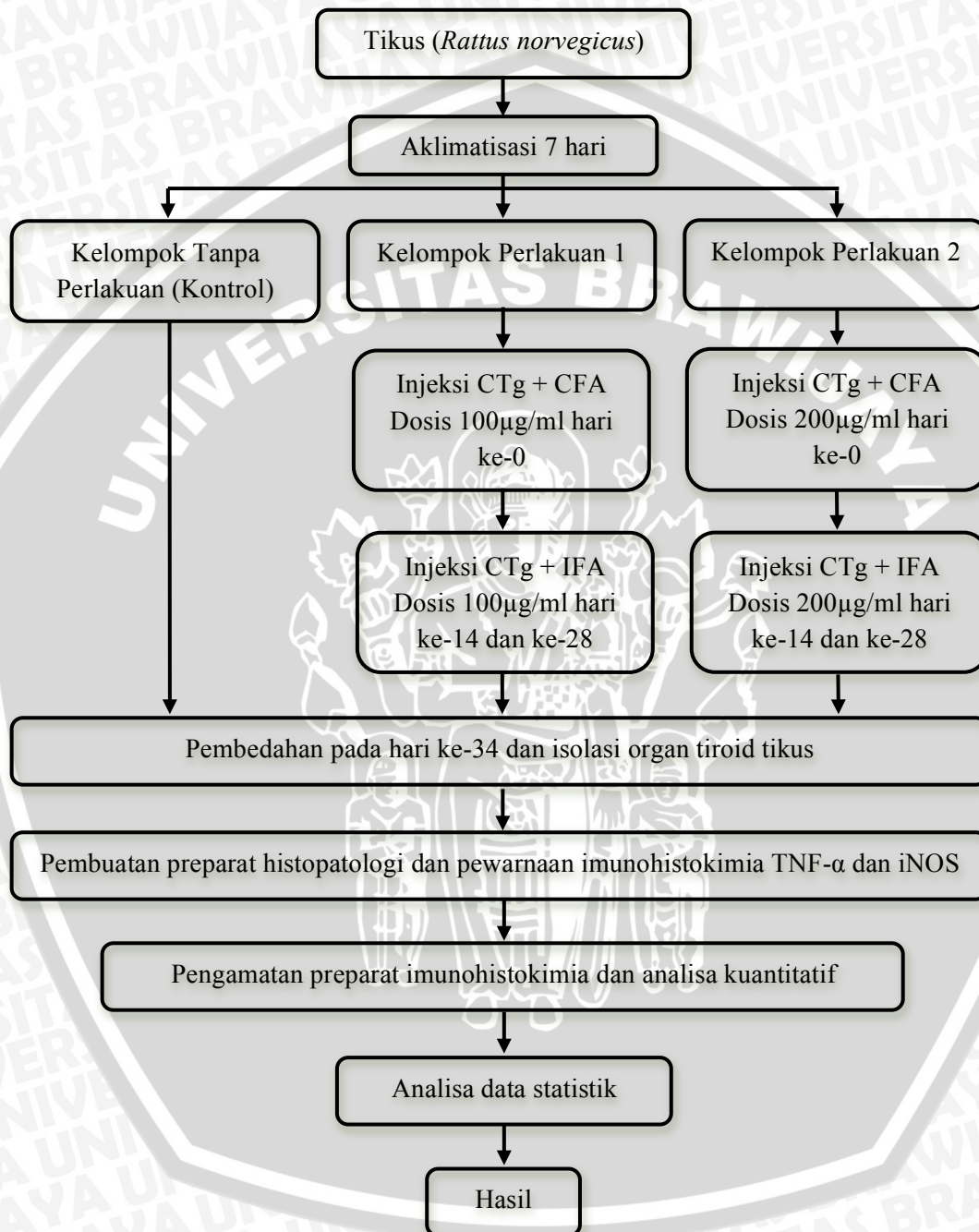
Ketua Peneliti	: Prima Santi	(2009)
Anggota Peneliti	: Fitri Amalia Riska	(2009)
	Dyah Agustini	(2009)
	Ganendra Awang K	(2010)
	Arif Rahmatullah	(2010)

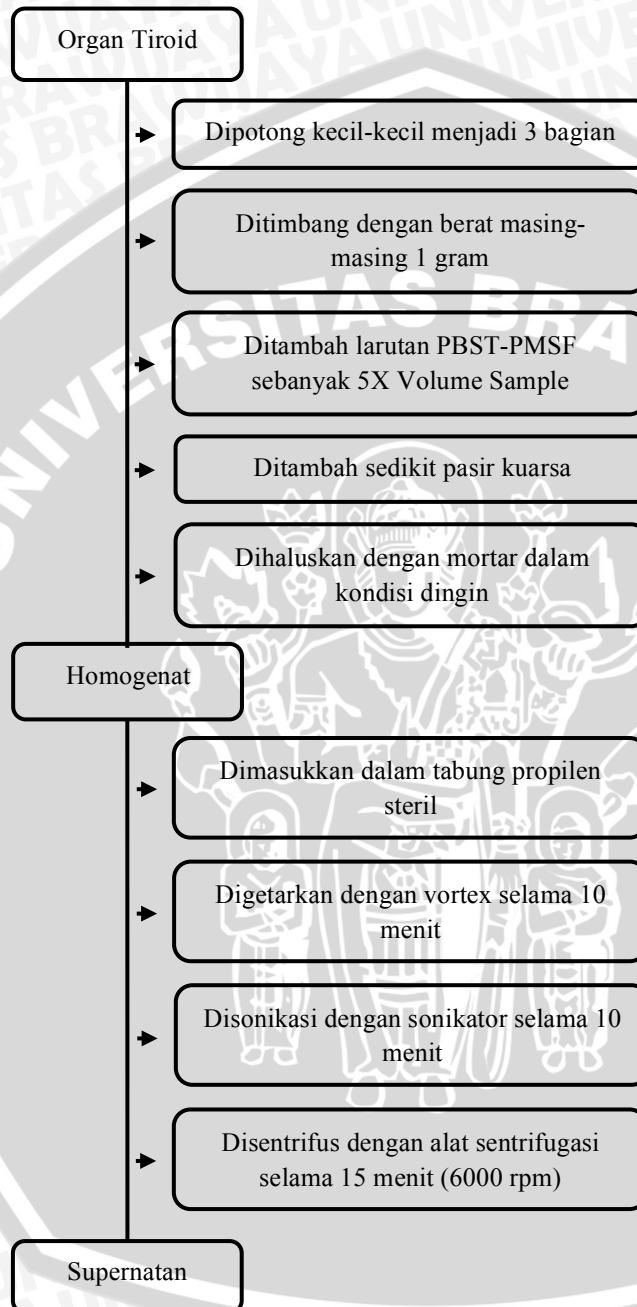
Ketua

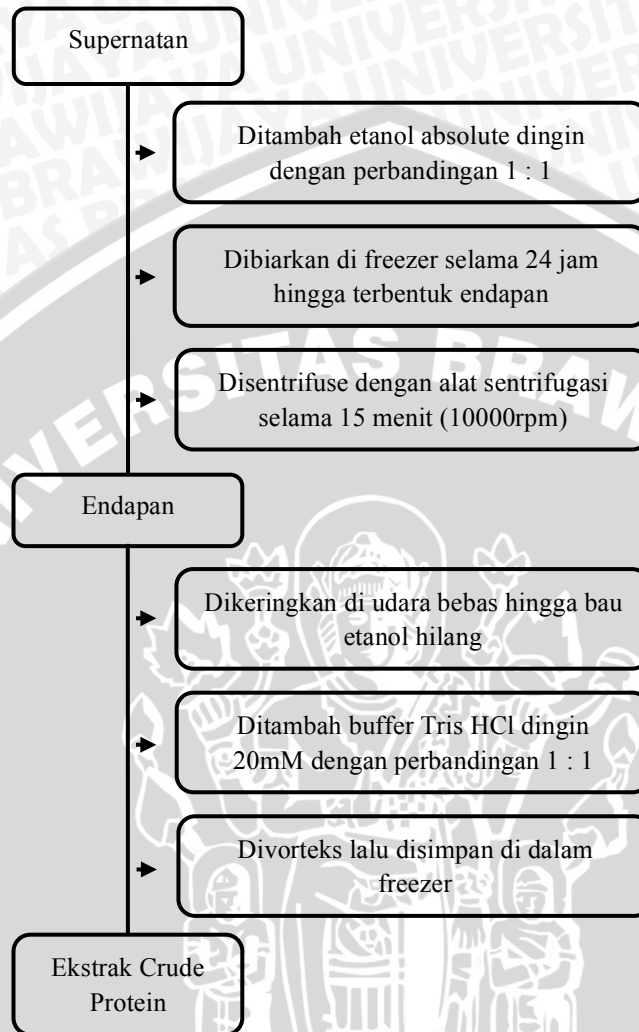
Komisi Etik Penelitian



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

Lampiran 2. Skema alur penelitian.

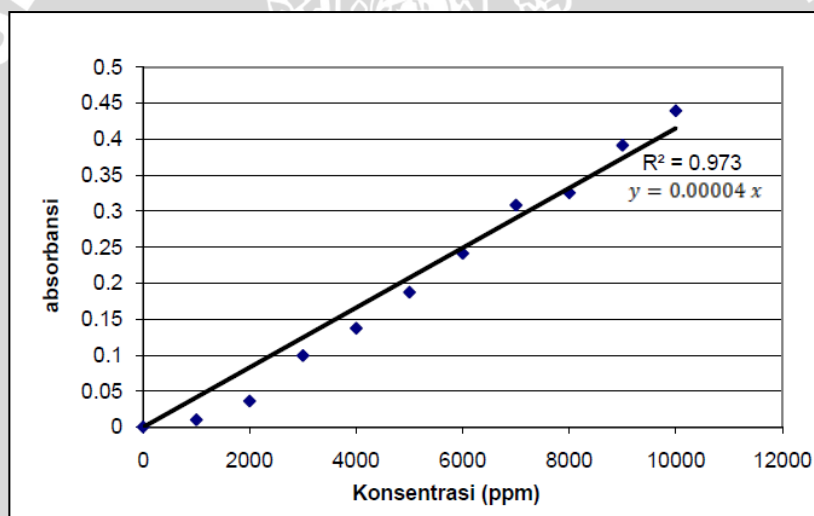
Lampiran 3. Tatalaksana isolasi protein tiroglobulin dari organ tiroid kambing (CTg)



Lampiran 4. Analisis Kurva Baku Protein

Tabel 4.1 Hasil Pengukuran Larutan BSA

No.	Larutan standar (ppm)	Absorbansi
1	0	0
2	1000	0,01
3	2000	0,036
4	3000	0,099
5	4000	0,137
6	5000	0,187
7	6000	0,241
8	7000	0,308
9	8000	0,325
10	9000	0,391
11	10000	0,439



Gambar 4.1 Grafik kurva baku BSA

Tabel 4.2 Hasil Perhitungan Kadar Protein CTg dengan Metode Biuret

Sampel	Absorbansi	Kadar Protein (ppm)
TG1	0,228	5700
TG2	0,228	5700

Dari hasil pengukuran tersebut, didapatkan kadar protein CTg sebesar 5700ppm = 570 μ g/1000 μ l.

Lampiran 5. Penghitungan dosis CTg

A. Dosis Perlakuan I

Pemberian dosis didasarkan pada pengukuran kadar protein hasil analisis kurva baku protein. Hasil analisis kurva baku protein menunjukkan konsentrasi protein CTg sebanyak 570 µg/ml. Jumlah konsentrasi protein yang dibutuhkan untuk mencapai dosis optimasi adalah 100 µg/ml dalam volume 100 µl.

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$570 \text{ µg/ml} \times V_1 = 100 \text{ µg/ml} \times 100 \text{ µl}$$

$$V_1 = \frac{100 \text{ µg/ml} \times 100 \text{ µl}}{570 \text{ µg/ml}} = 17,54 \text{ µl}$$

Berdasarkan penghitungan volume diatas, didapatkan volume protein CTg sebanyak 17,54 µl yang kemudian ditambah dengan 82,46 µl Tris HCl, sehingga volumenya menjadi 100 µl. Protein CTg tersebut lalu diemulsikan dengan CFA atau IFA dengan perbandingan 1 : 1.

$$\text{Emulsi CTg} + \text{CFA} = 100 \text{ µl} + 100 \text{ µl} = 200 \text{ µl} = 0,2 \text{ ml}$$

$$\text{Emulsi CTg} + \text{IFA} = 100 \text{ µl} + 100 \text{ µl} = 200 \text{ µl} = 0,2 \text{ ml}$$

Dari perhitungan tersebut, maka dosis optimasi yang diinduksikan pada perlakuan I untuk setiap ekor tikus adalah 100 µg/ml sebanyak 0,2 ml.

B. Dosis Perlakuan II

Pemberian dosis didasarkan pada pengukuran kadar protein hasil analisis kurva baku standar protein. Hasil analisis kurva baku protein menunjukkan konsentrasi protein CTg sebanyak 570 µg/ml. Jumlah konsentrasi protein yang dibutuhkan untuk mencapai dosis optimasi adalah 200 µg/ml dalam volume 100 µl.

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$570 \text{ µg/ml} \times V_1 = 200 \text{ µg/ml} \times 100 \text{ µl}$$

$$V_1 = \frac{200 \text{ µg/ml} \times 100 \text{ µl}}{570 \text{ µg/ml}} = 35,08 \text{ µl}$$

Berdasarkan penghitungan volume diatas, didapatkan volume protein CTg sebanyak 35,08 μ l yang kemudian ditambah dengan 64,92 μ l Tris HCl, sehingga volumenya menjadi 100 μ l. Protein CTg tersebut lalu diemulsikan dengan CFA atau IFA dengan perbandingan 1 : 1.

$$\text{Emulsi CTg + CFA} = 100 \mu\text{l} + 100 \mu\text{l} = 200 \mu\text{l} = 0,2 \text{ ml}$$

$$\text{Emulsi CTg + IFA} = 100 \mu\text{l} + 100 \mu\text{l} = 200 \mu\text{l} = 0,2 \text{ ml}$$

Dari perhitungan tersebut, maka dosis optimasi yang diinduksikan pada perlakuan II untuk setiap ekor tikus adalah 200 μ g/ml sebanyak 0,2 ml.



Lampiran 6. Jadwal Induksi Tikus

Kelompok Tikus	Hari ke-					
	0	7	14	21	28	34
P0	-	-	-	-	-	Dibedah
P1	CTg + CFA	-	CTg + IFA	-	CTg + IFA	Dibedah
P2	CTg + CFA	-	CTg + IFA	-	CTg + IFA	Dibedah

Keterangan :

P0 = Kelompok tikus tanpa perlakuan (kontrol)

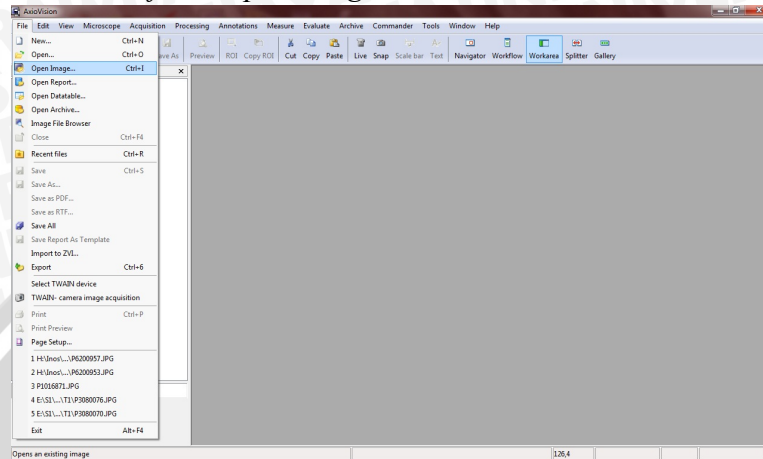
P1 = Kelompok tikus perlakuan dosis 100 μ g/ μ l

P2 = Kelompok tikus perlakuan dosis 200 μ g/ μ l

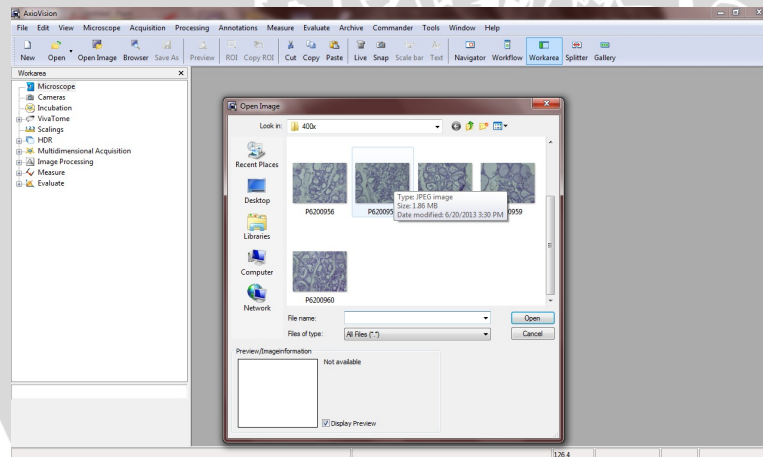


Lampiran 7. Metode Penggunaan Software *Axio Vision* 4.8.1

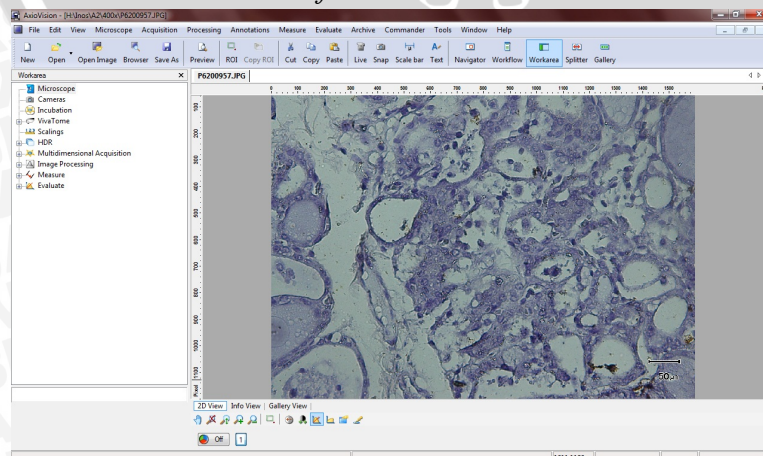
1. Pilih menu *file > open image*



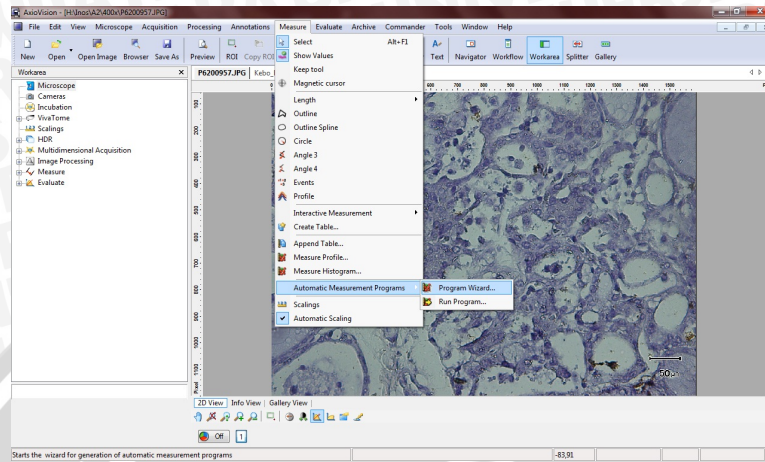
2. Buka folder file, pilih gambar yang akan dihitung presentase areanya, klik *open*



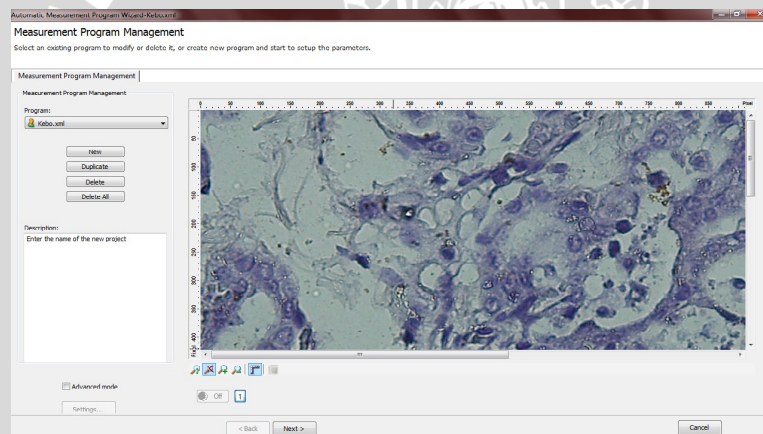
3. Gambar akan muncul di *field area*



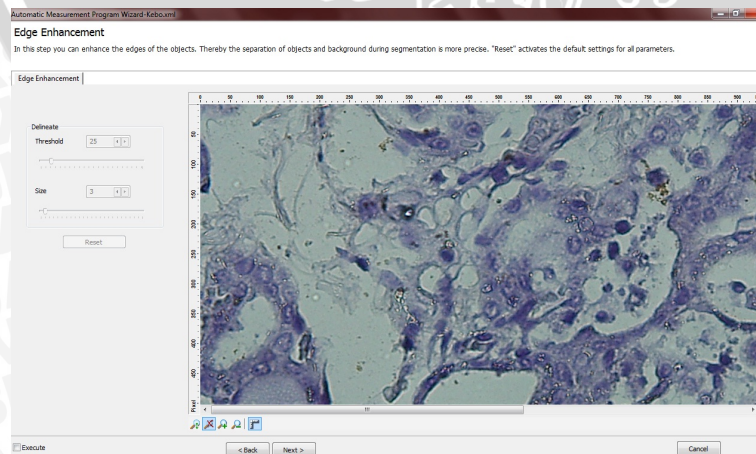
4. Pilih menu *measure* > *automatic measurement program* > *program wizard*



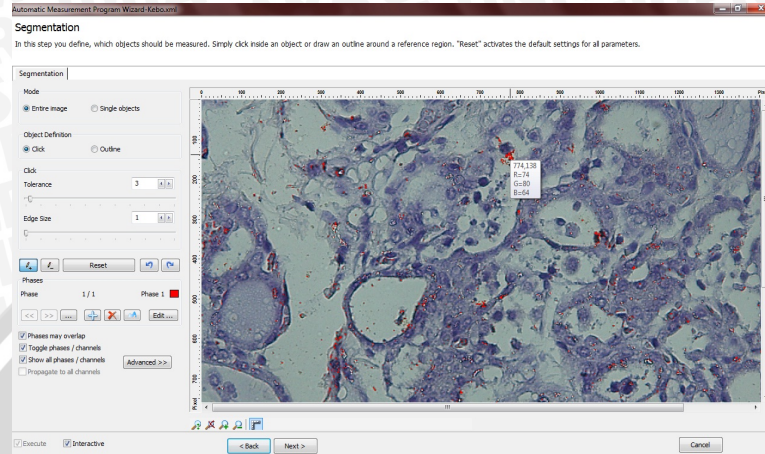
5. *Measurement program management* akan muncul di jendela. Klik *next*.



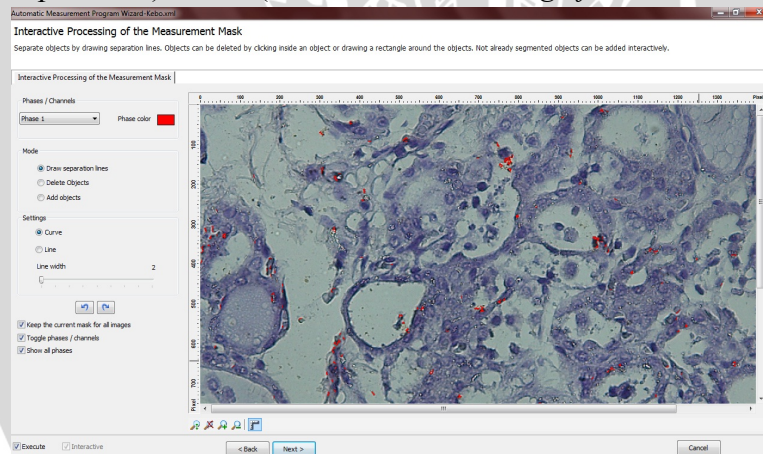
6. Klik *next* (*Brightness, Contrast, and Gamma value*) > *next* (*Sigma Filter*) > *next* (*Shading Correction*) > *next* (*Edge Enhancement*).



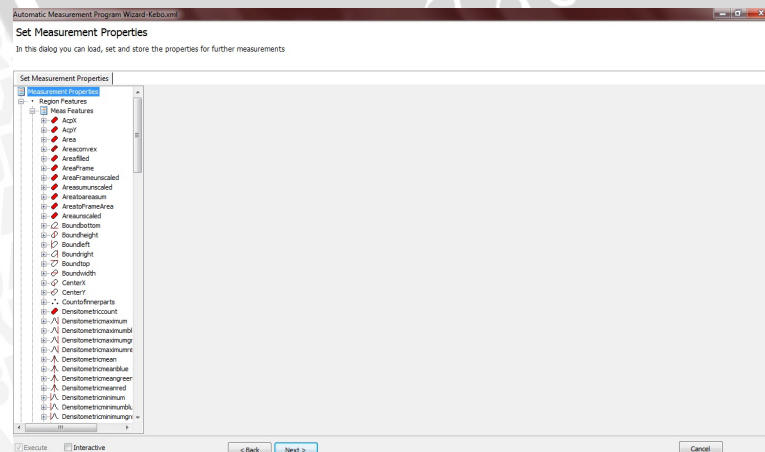
7. Klik *next (segmentation)*, pilih *Object Definition* > *Click* kemudian pilih area pewarnaan berwarna coklat (ikatan antigen-antibodi).



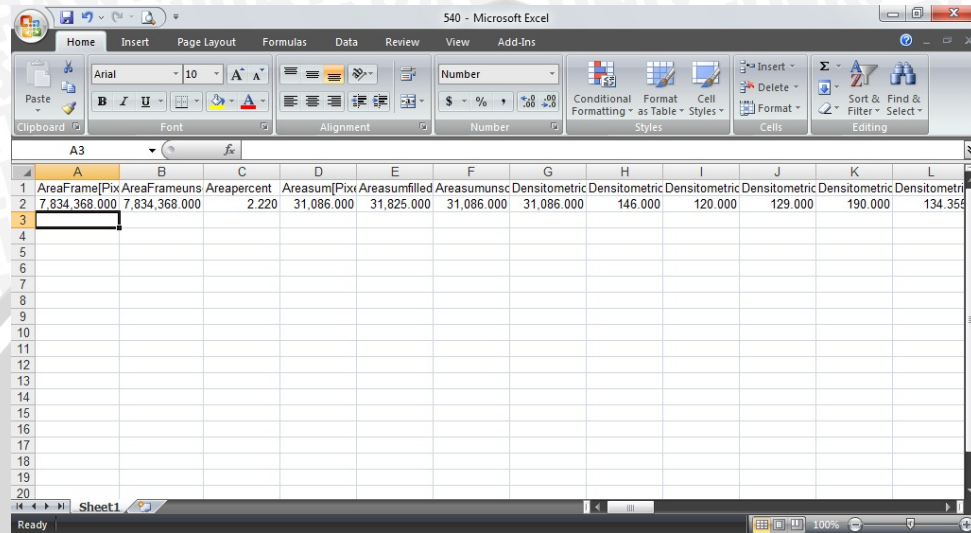
8. Klik *next (Deletion of Artifacts, Filling of Holes)* > *next (Automatic Object Separation)* > *next (Interactive Processing of The Measurement Mask)*.



9. Klik *next*. *Set Measurement Properties* akan muncul di jendela.



10. Klik *next*. Data hasil presentase area ekspresi iNOS dan TNF- α akan secara otomatis ditabulasi di *Microsoft Excel*.



	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	AreaFrame	Pix AreaFrame	uns Areasum	Percent	Areasum	Pix Areasum	filled Areasum	uns Densitometric	Densitometric	Densitometric	Densitometric	Densitometric
2	7.834.368.000	7.834.368.000	2.220	31.086.000	31.825.000	31.086.000	31.086.000	146.000	120.000	129.000	190.000	134.350
3												
4												
5												
6												
7												
8												
9												
10												
11												
12												
13												
14												
15												
16												
17												
18												
19												
20												



Lampiran 8. Hasil Penghitungan Ekspresi TNF- α dan iNOS

Tikus Kelompok Normal		Tikus Kelompok Dosis 100 μ g/ml		Tikus Kelompok Dosis 200 μ g/ml	
TNF- α	iNOS	TNF- α	iNOS	TNF- α	iNOS
0,19	0,10	1,05	1,76	4,01	4,86
0,26	0,10	1,06	1,50	3,62	5,01
0,22	0,07	1,07	2,22	2,94	4,77
0,14	0,10	1,03	1,72	2,90	3,39
0,19	0,12	1,67	1,76	3,93	2,64
0,11	0,09	1,25	1,63	2,87	2,98



Lampiran 9. Analisis Statistika Ekspresi TNF- α dan iNOS

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TNF	Between Groups	28.349	2	14.174	118.079	.000
	Within Groups	1.440	12	.120		
	Total	29.789	14			
INOS	Between Groups	41.073	2	20.537	51.757	.000
	Within Groups	4.761	12	.397		
	Total	45.835	14			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons Tukey HSD

Dependent Variable	(I) TIKUS (J) TIKUS		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
TNF	TANPA INJEKSI	DOSIS 100	-.97560*	.21913	.002	-1.5602	-.3910
		DOSIS 200	-3.27900*	.21913	.000	-3.8636	-2.6944
	DOSIS 100	TANPA INJEKSI	.97560*	.21913	.002	.3910	1.5602
		DOSIS 200	-2.30340*	.21913	.000	-2.8880	-1.7188
	DOSIS 200	TANPA INJEKSI	3.27900*	.21913	.000	2.6944	3.8636
		DOSIS 100	2.30340*	.21913	.000	1.7188	2.8880
INOS	TANPA INJEKSI	DOSIS 100	-1.69400*	.39839	.003	-2.7569	-.6311
		DOSIS 200	-4.03600*	.39839	.000	-5.0989	-2.9731
	DOSIS 100	TANPA INJEKSI	1.69400*	.39839	.003	.6311	2.7569
		DOSIS 200	-2.34200*	.39839	.000	-3.4049	-1.2791
	DOSIS 200	TANPA INJEKSI	4.03600*	.39839	.000	2.9731	5.0989
		DOSIS 100	2.34200*	.39839	.000	1.2791	3.4049

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

Descriptive Statistics

TIKUS		Mean	Std. Deviation	N
TNF	TANPA INJEKSI	.2000	.04416	6
	DOSIS 100	1.1756	.27801	6
	DOSIS 200	3.4790	.52998	6
	Total	1.6182	1.45870	18
INOS	TANPA INJEKSI	.0980	.01789	6
	DOSIS 100	1.7920	.26253	6
	DOSIS 200	4.1340	1.05883	6
	Total	2.0080	1.80939	18

