

**STUDI AKTIVITAS DEKSAMETASON TERHADAP PROFIL
SEL-SEL IMUNOKOMPETEN PADA MENCIT BALB/c MODEL
ATRESIA BILIER**

SKRIPSI

oleh:
Qonitatul Khasanah
105090113111005



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014**

**STUDI AKTIVITAS DEKSAMETASON TERHADAP PROFIL
SEL-SEL IMUNOKOMPETEN PADA MENCIT BALB/c MODEL
ATRESIA BILIER**

SKRIPSI

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains
dalam bidang Biologi**

oleh:
Qonitatul Khasanah
105090113111005



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**STUDI AKTIVITAS DEKSAMETASON TERHADAP PROFIL
SEL-SEL IMUNOKOMPETEN PADA MENCIT BALB/c MODEL
ATRESIA BILIER**

oleh:
Qonitatul Khasanah
105090113111005

Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji pada tanggal 25 Juni 2014 dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam Bidang Biologi

**Menyetujui,
Pembimbing**

Muhaimin Rifa'i, S.Si., PhD., Med.Sc.
NIP. 196806261997021001

**Menyetujui,
Ketua Program Studi S1 Jurusan Biologi**

Rodliyati Azrianingsih, S.Si., M.Agr.Sc., PhD.
NIP. 197001281994122001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Qonitatul Khasanah
NIM : 105090113111005
Jurusan : Biologi
Judul Skripsi : Studi Aktivitas Deksametason Terhadap Profil Sel-Sel Imunokompeten pada Mencit Balb/c Model Atresia Bilier

dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini. Karya-karya yang tercantum dalam daftar pustka skripsi ini, semata-mata digunakan sebagai acuan/referensi.
2. Apabila di kemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko dari keadaan tersebut.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan segala kesadaran.

Malang, 27 Mei 2014
Yang menyatakan

Qonitatul Khasanah
105090113111005

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi yang disusun oleh penulis ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum sebagai sumber referensi dan pembelajaran lebih lanjut, dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis, Daftar pustaka yang ada dalam skripsi ini diperkenankan untuk dicatat, namun pengutipan hanya dapat dilakukan seijin penulis dan harus disertai dengan aturan penulisan ilmiah dan etika penulisan untuk menyebutkannya.



Studi Aktivitas Deksametason Terhadap Profil Sel-Sel Imunokompeten pada Mencit Balb/c Model Atresia Bilier

Qonitatul Khasanah, Muhamin Rifa'i
Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

ABSTRAK

Atresia bilier merupakan suatu penyakit yang menyebabkan penyumbatan sistem bilier (obstruksi) pada beberapa bulan pertama kehidupan bayi. Deksametason adalah glukokortikoid sintetik dengan aktivitas immunosupresan dan anti-inflamasi. Penelitian ini penting dilakukan untuk mengetahui apakah deksametason dapat memodulasi aktivitas imunokompeten pada mencit Balb/c model atresia bilier berdasarkan perubahan kuantitas molekul proinflamasi IFN- γ dan TNF- α serta sel CD4⁺, CD8⁺ dan CD62L⁺. Penelitian ini terdiri dari 2 (dua) tahap. Tahap 1 adalah prakondisi dimana saluran empedu bayi tikus dibuat fibrosis dengan induksi 20 μ l *phosphate buffered saline* yang mengandung $1,5 \times 10^6$ *fluorescence-forming units* Rhesus Rotavirus (RRV) secara subkutan pada 24 jam pertama setelah kelahiran, kemudian tahap2 mencit tersebut diberi deksametason 0,5 mg/kgBB secara subkutan pada hari ke 7-14 dan 14-21 setelah induksi RRV. Efek terapi deksametason selanjutnya diteliti pada hari ke 14 dan 21 setelah induksi. Data dianalisis dengan uji Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) dan uji Mann-Whitney menggunakan SPSS 16 *for Windows*. Injeksi Rotavirus secara subkutan terbukti mampu menstimulasi produksi sel-sel imunokompeten terutama pada terminasi minggu ketiga. Hal ini dapat dibuktikan dengan adanya peningkatan sel CD4, CD8, dan sitokin proinflamasi seperti IFN- γ dan TNF- α serta penurunan aktivitas sel CD62L. Deksametason terbukti mampu meregulasi aktivitas sel-sel imunokompeten. Hal ini dapat dibuktikan dengan adanya penurunan jumlah sel CD4, CD8 dan sitokin proinflamasi seperti IFN- γ dan TNF- α serta peningkatan aktivitas sel CD62L terutama pada terminasi minggu ketiga. Peningkatan sel CD62L setelah pemberian deksametason diyakini mampu meningkatkan kemampuan adhesi L-selectin sehingga terbentuk sel T memori sentral (*T central memory cells*).

Kata kunci : Atresia bilier, Deksametason, Inflamasi, Obstruksi, Rhesus Rotavirus

Activity of Dexamethasone Therapy on Immune System Profile of Balb/c Mice with Biliary Atresia

Qonitatul Khasanah, Muhamin Rifa'i
Biology Department, Faculty of Mathematic and Science,
University of Brawijaya

ABSTRACT

Biliary atresia is a neonatal obstructive cholangiopathy that progresses to end-stage liver disease. Dexamethasone is one of synthetic glucocorticoid which has function as immunosuppressant and anti-inflammatory agent. Here, we investigated whether corticosteroid could modulate the immune activity in mice strain Balb/c with biliary atresia based on the change of quantity of IFN- γ and TNF- α as pro-inflammatory molecule and also CD4⁺, CD8⁺ and CD62L⁺ cell. This study consist of 2 stages. The first stage is prerequisite which is made the mice's biliary duct become fibrosis by injecting 20 μ l of phosphate buffered saline containing 1.5×10^6 fluorescence-forming units Rhesus Rotavirus (RRV) subcutaneously on first day (24 hours) after it was born. The second stage is the inducted mice is injected with dexamethasone 0,5 mg/kgBW subcutaneously on the 7th-14th day and 14th-21st day. The clinical effect of dexamethasone is also investigated on 14th and 21st day by flow cytometry method. Data were analyzed using Kruskal-Wallis test ($p < 0,05$) and Mann-Whitney test using SPSS 16 for Windows. Rotavirus injection subcutaneously proven to stimulate the production of immunocompetent cells, especially in the third week of termination. The result indicated an increasing number of CD4, CD8, and proinflammatory cytokines such as IFN- γ and TNF- α but reduction of CD62L cells. Dexamethasone is capable to regulate the activity of immunocompetent cells. The result indicated a decreasing number of CD4 cells, CD8 and both proinflammatory cytokines as well as the increase in activity is mainly CD62L cells in the termination of the third week. Increased CD62L cells after dexamethasone administration is believed to increase the ability of L-selectin adhesion, forming a central memory T cells.

Keywords : Biliary atresia, Dexamethasone, Inflammation, Obstructive, Rhesus Rotavirus

KATA PENGANTAR

Puja dan puji syukur kepada Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul “**Aktivitas Dekametason Terhadap Profil Sel-Sel Imunokompeten pada Mencit Balb/c Model Atresia Bilier**”. Penulisan skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk mendapatkan gelar sarjana Sains dalam Bidang Biologi di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang dengan baik.

Selama pengerjaan skripsi ini, penulis banyak dibantu oleh berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan banyak-banyak terimakasih kepada :

1. Bapak **Muhaimin Rifa’i, S.Si., PhD.Med.Sc** sebagai dosen pembimbing skripsi yang telah banyak membimbing dan memberikan nasehat selama penelitian hingga penulisan naskah skripsi.
2. Tim penelitian **dr. Bagus Setyoboedi** dari spesialis anak RSUD Dr. Soetomo Surabaya yang telah membiayai seluruh dana penelitian dari awal hingga akhir.
3. Bapak **Widodo, S.Si., M.Si., Ph.D., Med.Sc.** dan Bapak **Drs. Aries Soewondo M.Si** yang telah menguji dengan memberikan saran dan kritik dalam penyempurnaan naskah skripsi ini.
4. Ibunda tercinta **Siti Faridah** dan ayah tersayang (**alm**) **Ichwan** yang selalu memberikan dukungan, semangat, do’a, dan limpahan kasih sayang.
5. Tim peneliti **RotaTeam (Wardah dan Riza)** yang telah sama-sama bekerja keras untuk menyelesaikan penelitian dari awal hingga akhir.
6. Bapak **Harmaji**, Mas **Rizki Jumadil P. S.T.**, **Yuyun Ika Christina S.Si**, Mbak **Dewi Satwika, M.Si**, Mbak **Khoirin Maghfiroh M.Si**, Mas **Bambang Pristiwanto S.Si**, Mas **Ahmad Sony M.Si**, **Indriya S.Si**, **Dinia S.Si**, **Yonna A**, **Aisyah Z. Aden**, **Emi R.**, **Arief A.**, **M. Rizar Z.**, **Pak Ali**, serta seluruh pihak yang telah membantu serta memberikan kelancaran dari awal penelitian dari awal hingga akhir penulisan naskah skripsi.

Naskah skripsi ini masih jauh dari kata sempurna, oleh karena itu kritik dan saran yang bersifat membangun sangat diperlukan guna perbaikan ke depannya. Semoga skripsi ini dapat selalu memberikan manfaat dan keberkahan. Aamiin.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xv
DAFTAR ISTILAH	xvii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan	3
1.4 Manfaat	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Atresia Bilier	4
2.2 Infeksi Virus	5
2.3 Rotavirus	6
2.4 Mekanisme Kekebalan Tubuh terhadap Virus	7
2.5 Inflamasi sebagai Penyebab Kerusakan Kolangiosit	9
2.6 Kortikosteroid	10
2.7 Terapi Kortikosteroid pada Atresia Bilier	12
2.8 Organ Limfoid <i>Spleen</i>	12
2.9 <i>Flow Cytometry</i>	13
BAB III METODE PENELITIAN	15
3.1 Waktu dan Tempat	15
3.2 Prosedur Kerja Penelitian	15
3.2.1 Deskripsi Hewan Coba	15
3.2.1.1 Kriteria Inklusi	15
3.2.1.2 Kriteria Eksklusi	15

3.2.2 Deskripsi Perlakuan dan Rancangan Penelitian	15
3.2.3 Preparasi Injeksi RRV	17
3.2.4 Preparasi Dosis Injeksi Dekسامetason	17
3.2.5 Model Atresia Bilier pada Mencit Balb/c dengan Injeksi RRV	17
3.2.6 Terapi Dekسامetason pada Mencit Balb/C Model Atresia Bilier	17
3.2.7 Isolasi Limfosit dari Organ <i>Spleen</i>	18
3.2.8 Pewarnaan <i>Immunostaining</i>	18
3.2.8.1 <i>Staining</i> Antibodi Ekstraseluler	18
3.2.8.2 <i>Staining</i> Antibodi Intraseluler	18
3.2.9 Perhitungan Sel Menggunakan <i>Haemocytometer</i>	19
3.2.10 Analisis <i>Flow Cytometry</i>	19
3.2.11 Analisis Data	19
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	20
4.1 Analisis Jumlah Total Sel T CD4 ⁺ dan Sel T CD8 ⁺	20
4.2 Analisis Jumlah Total Sel T CD4 ⁺ CD62L ⁺ dan Sel T CD8 ⁺ CD62L ⁺	22
4.3 Analisis Jumlah Total Sel T CD4 ⁺ IFN- γ ⁺ dan Sel T CD8 ⁺ IFN- γ ⁺	26
4.4 Analisis Jumlah Total Sel T CD4 ⁺ TNF- α ⁺ dan Sel T CD8 ⁺ TNF- α ⁺	30
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	35
5.1 Kesimpulan	35
5.2 Saran	35
DAFTAR PUSTAKA	36
LAMPIRAN	40

DAFTAR GAMBAR

Gambar

2.1	Tipe atresia bilier	5
2.2	Struktur luar rotavirus	7
2.3	Proses imunologis yang mendasari terjadinya atresia bilier yang disebabkan serangan virus	9
2.4	Struktur molekul deksametason	11
2.5	Prinsip kerja <i>flow cytometry</i>	14
4.1.1	Jumlah absolut sel T CD4 ⁺	20
4.1.2	Jumlah absolut sel T CD8 ⁺	21
4.2.1	Jumlah absolut sel T CD4 ⁺ CD62L ⁺	23
4.2.2	Jumlah absolut sel T CD8 ⁺ CD62L ⁺	24
4.2.3	Aktivasi <i>L-selectin</i> oleh antigen serta terbentuknya sel memori	26
4.3.1	Jumlah absolut sel T CD4 ⁺ IFN γ ⁺	27
4.3.2	Jumlah absolut sel T CD8 ⁺ IFN γ ⁺	28
4.4.1	Jumlah absolut sel T CD4 ⁺ TNF- α ⁺	30
4.4.2	Jumlah absolut sel T CD8 ⁺ TNF- α ⁺	31
5	Aktivitas glukokortikoid dalam menghambat peradangan .	33
6	Perbedaan rata-rata berat badan mencit pada masing-masing kelompok perlakuan dari hari ke-0 sampai hari ke-21	34
LG5.1	Rhesus rotavirus	45
LG5.2	Tahapan Isolasi Sel Limfosit dari Organ <i>Spleen</i>	46
LG6.1	Ruang Hitung Hemasitometer	48
LG8.1	Jumlah Relatif Sel T CD4 ⁺	51
LG9.1	Jumlah Relatif Sel T CD8 ⁺	53
LG9.2	Persentase Jumlah Relatif Sel CD4 ⁺ dan CD8 ⁺ pada Terminasi Minggu ke-2	54
LG9.3	Persentase Jumlah Relatif Sel CD4 ⁺ dan CD8 ⁺ pada Terminasi Minggu ke-3	55
LG10.1	Jumlah Relatif Sel T CD4 ⁺ CD62L ⁺	57
LG10.2	Persentase Jumlah Relatif Sel T CD4 ⁺ CD62L ⁺ pada Terminasi Minggu ke-2	58
LG10.3	Persentase Jumlah Relatif Sel T CD4 ⁺ CD62L ⁺ pada Terminasi Minggu ke-3	59
LG11.1	Jumlah Relatif Sel T CD8 ⁺ CD62L ⁺	61

LG11.2	Persentase Jumlah Relatif Sel T CD8 ⁺ CD62L ⁺ pada Terminasi Minggu ke-2	62
LG11.3	Persentase Jumlah Relatif Sel T CD4 ⁺ CD62L ⁺ pada Terminasi Minggu ke-3	63
LG12.1	Jumlah Relatif Sel T CD4 ⁺ IFN γ ⁺	65
LG12.2	Persentase Jumlah Relatif Sel T CD4 ⁺ IFN γ ⁺ pada Terminasi Minggu ke-2	66
LG12.3	Persentase Jumlah Relatif Sel T CD4 ⁺ IFN γ ⁺ pada Terminasi Minggu ke-3	67
LG13.1	Jumlah Relatif Sel T CD8 ⁺ IFN γ ⁺	69
LG13.2	Persentase Jumlah Relatif Sel T CD8 ⁺ IFN γ ⁺ pada Terminasi Minggu ke-2	70
LG13.3	Persentase Jumlah Relatif Sel T CD8 ⁺ IFN γ ⁺ pada Terminasi Minggu ke-3	71
LG14.1	Jumlah Relatif Sel T CD4 ⁺ TNF- α ⁺	73
LG14.2	Persentase Jumlah Relatif Sel T CD4 ⁺ TNF- α ⁺ pada Terminasi Minggu ke-2	74
LG14.3	Persentase Jumlah Relatif Sel T CD4 ⁺ TNF- α ⁺ pada Terminasi Minggu ke-3	75
LG15.1	Jumlah Relatif Sel T CD8 ⁺ TNF- α ⁺	77
LG15.2	Persentase Jumlah Relatif Sel T CD8 ⁺ TNF- α ⁺ pada Terminasi Minggu ke-2	78
LG15.3	Persentase Jumlah Relatif Sel T CD8 ⁺ TNF- α ⁺ pada Terminasi Minggu ke-3	79



DAFTAR TABEL

Tabel

1	Kelompok Perlakuan	16
LT4.1	Komposisi Bahan <i>PBS (Phodphat Buffer Saline)</i>	43
LT4.2	Komposisi Bahan <i>Paraformaldehyde 4%</i>	43
LT4.3	Komposisi Bahan <i>Cytofix/Cytoperm</i>	43
LT4.4	Komposisi Bahan <i>Washperm</i>	43
LT8.1	Hasil Uji Kruskal-Wallis Jumlah Absolut Sel T CD4 ⁺	50
LT8.2	Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan K dan T.....	50
LT8.3	Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan K dan TnD.....	51
LT8.4	Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan T dan TnD	51
LT9.1	Hasil Uji Kruskal-Wallis Jumlah Absolut Sel T CD8 ⁺	52
LT9.2	Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan K dan T.....	52
LT9.3	Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan K dan TnD.....	53
LT9.4	Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan T dan TnD	53
LT10.1	Hasil Uji Kruskal-Wallis Jumlah Absolut Sel T CD4 ⁺ CD62L ⁺	56
LT10.2	Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan K dan T.....	56
LT10.3	Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan K dan TnD.....	57
LT10.4	Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan T dan TnD	57
LT11.1	Hasil Uji Kruskal-Wallis Jumlah Absolut Sel T CD8 ⁺ CD62L ⁺	60
LT11.2	Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan K dan T.....	60
LT11.3	Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan K dan TnD.....	61
LT11.4	Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan T dan TnD	61
LT12.1	Hasil Uji Kruskal-Wallis Jumlah Absolut Sel T CD4 ⁺ IFN- γ ⁺ .	64
LT12.2	Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan K dan T.....	64
LT12.3	Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan K dan TnD.....	65
LT12.4	Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan T dan TnD	65
LT13.1	Hasil Uji Kruskal-Wallis Jumlah Absolut Sel T CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ .	68
LT13.2	Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan K dan T.....	68
LT13.3	Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan K dan TnD.....	69
LT13.4	Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan T dan TnD	69
LT14.1	Hasil Uji Kruskal-Wallis Jumlah Absolut Sel T CD4 ⁺ TNF- α ⁺	72
LT14.2	Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan K dan T.....	72
LT14.3	Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan K dan TnD.....	73
LT14.4	Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan T dan TnD	73
LT15.1	Hasil Uji Kruskal-Wallis Jumlah Absolut Sel T CD8 ⁺ TNF- α ⁺	76
LT15.2	Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan K dan T.....	76

LT15.3 Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan K dan TnD..... 77

LT15.4 Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan T dan TnD 77

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran

1	Surat Kelayakan Etik	41
2	Kerangka Konsep Penelitian	42
3	Kerangka Operasional Penelitian	43
4	Komposisi Larutan	44
5	Isolasi Sel Limfosit dari Organ <i>Spleen</i>	45
6	Penghitungan Sel dengan Hemositometer	48
7	Pewarnaan <i>Immunostaining</i>	49
8	Hasil Analisis Kruskal-Wallis Uji Lanjut Mann-Whitney Jumlah Absolut Sel T CD4 ⁺ Pada Organ <i>Spleen</i> Menggunakan <i>Software</i> SPSS 16.0 for Windows	50
9	Hasil Analisis Kruskal-Wallis Uji Lanjut Mann-Whitney Jumlah Absolut Sel T CD8 ⁺ Pada Organ <i>Spleen</i> Menggunakan <i>Software</i> SPSS 16.0 for Windows	52
10	Hasil Analisis Kruskal-Wallis Uji Lanjut Mann-Whitney Jumlah Absolut Sel T CD4 ⁺ CD62L ⁺ Pada Organ <i>Spleen</i> Menggunakan <i>Software</i> SPSS 16.0 for Windows	56
11	Hasil Analisis Kruskal-Wallis Uji Lanjut Mann-Whitney Jumlah Absolut Sel T CD8 ⁺ CD62L ⁺ Pada Organ <i>Spleen</i> Menggunakan <i>Software</i> SPSS 16.0 for Windows	60
12	Hasil Analisis Kruskal-Wallis Uji Lanjut Mann-Whitney Jumlah Absolut Sel T CD4 ⁺ IFN- γ ⁺ Pada Organ <i>Spleen</i> Menggunakan <i>Software</i> SPSS 16.0 for Windows	64
13	Hasil Analisis Kruskal-Wallis Uji Lanjut Mann-Whitney Jumlah Absolut Sel T CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ Pada Organ <i>Spleen</i> Menggunakan <i>Software</i> SPSS 16.0 for Windows	68
14	Hasil Analisis Kruskal-Wallis Uji Lanjut Mann-Whitney Jumlah Absolut Sel T CD4 ⁺ TNF- α ⁺ Pada Organ <i>Spleen</i> Menggunakan <i>Software</i> SPSS 16.0 for Windows	72
15	Hasil Analisis Kruskal-Wallis Uji Lanjut Mann-Whitney Jumlah Absolut Sel T CD8 ⁺ TNF- α ⁺ Pada	

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



DAFTAR ISTILAH

Singkatan/symbol

BDE

Bile Duct Epithel

CFSE

Carboxyl Fluorescein Succinimidyl Ester

IFN

Interferon

IL

Interleukin

MHC

Mayor Histocompatibility Complex

NK

Natural Killer

PALS

Periarteriolar Limfoid Sheath

ROS

Reactive Oxygen Species

RRV

Rhesus Rotavirus

Th

T helper

TNF

Tumor Necrosis Factor



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Atresia bilier adalah suatu keadaan dimana terjadi gangguan sistem bilier intra dan ekstra hepatic pada beberapa bulan pertama usia bayi. Karakteristik dari atresia bilier adalah tidak terdapatnya sebagian sistem bilier antara duodenum dan hati sehingga terjadi hambatan aliran empedu dan menyebabkan gangguan fungsi hati (Miner dan Gaito, 1979). Atresia bilier terjadi karena adanya perkembangan abnormal dari saluran empedu di dalam maupun di luar hati. Jika saluran empedu buntu, maka empedu akan menumpuk di hati. Gejala penyakit ini dapat berupa terjadi ikterus atau kuning di kulit dan mata akibat tingginya kadar bilirubin dalam darah. Hal ini bisa menyebabkan kerusakan hati yang jika tidak diobati bisa berakibat fatal atau sampai terjadi kematian (Sodikin, 2007).

Sampai saat ini penyebab atresia bilier belum diketahui. Kejadian atresia bilier dilaporkan antara 1:8000 sampai 1:18000 kelahiran hidup. Atresia bilier merupakan penyebab penyakit hati terminal yang merupakan indikasi utama transplantasi hati pada anak. Gejala awal atresia bilier seringkali sulit dibedakan dengan ikterus neonatorum fisiologis, sehingga diagnosis dan tata laksana menjadi terlambat. Penyebab lain keterlambatan diagnosis adalah adanya beberapa diagnosis banding sebagai penyebab hiperbilirubinemia direk yang memerlukan waktu untuk penegakan diagnosis (Moyer dkk., 2010).

Operasi portoenterostomi oleh Kasai yang ditemukan pada tahun 1959 merupakan terobosan besar dalam tata laksana atresia bilier. Keberhasilan operasi Kasai lebih tinggi pada pasien yang dioperasi pada usia kurang dari 2 bulan. Tanpa tindakan bedah, penderita umumnya akan meninggal pada usia 2 tahun. Operasi Kasai merupakan pengobatan yang diandalkan hingga saat ini, namun kerusakan hati masih terus berlanjut meskipun telah dilakukan operasi kasai (Sokol dkk., 2007). Setelah diagnosa, dilakukan operasi untuk membuang saluran empedu ekstrahepatik yang fibrosis. Meskipun telah dilakukan intervensi bedah, keradangan dan kerusakan saluran empedu intrahepatik berlangsung pada kecepatan yang bervariasi yang mengarah kepada terjadinya sirosis bilier dalam mayoritas penderita. Akibatnya,

80% penderita dengan atresia bilierakan membutuhkan transplantasi hati. Oleh karena itu, dibutuhkan suatu rancangan dan pengujian terapi baru yang mampu meningkatkan tingkat keberhasilan pengobatan atresia bilier.

Kortikosteroid adalah suatu hormon yang dibuat oleh bagian korteks (luar) dari kelenjar adrenal. Kortikosteroid terbagi menjadi 2 kelompok, yaitu kelompok glukokortikoid dan mineralokortikoid. Glukokortikoid berperan mengendalikan metabolisme karbohidrat, lemak dan protein, juga bertindak sebagai anti-inflamasi dengan cara menghambat pelepasan fosfolipid serta dapat pula menurunkan kinerja eosinofil. Sedangkan mineralokortikoid berfungsi mengatur kadar elektrolit dan air dengan cara penahanan garam di ginjal. Selain itu, steroid juga dilaporkan mengatur ekspresi kemokin (interleukin-8 dan *monocyte chemotactic protein-1*) (Castillo dan Chernwo, 1993).

Deksametason adalah glukokortikoid sintetik dengan aktivitas immunosupresan dan anti-inflamasi. Sebagai immunosupresan, deksametason bekerja dengan menurunkan respon imun tubuh terhadap stimulasi rangsangan. Aktivitas anti-inflamasi deksametason dengan jalan menekan atau mencegah respon jaringan terhadap proses inflamasi dan menghambat akumulasi sel yang mengalami inflamasi, termasuk makrofag dan leukosit pada tempat inflamasi. Deksametason merupakan obat golongan kortikosteroid. Karena fibrosis dari sisa-sisa saluran empedu ekstrahepatik dan intrahepatik di BA berkaitan dengan respon inflamasi yang kuat, diharapkan steroid akan mengurangi fibrosis dan penyumbatan saluran empedu dengan menekan respon kekebalan, sehingga aliran empedu akan tetap terjaga (Sokol dkk., 2007). Oleh karena itu, penelitian ini penting dilakukan untuk mengetahui apakah kortikosteroid ini dapat memodulasi aktivitas imunokompeten pada mencit Balb/c model atresia bilier berdasarkan perubahan kuantitas molekul sitokin proinflamasi IFN- γ dan TNF- α serta sel CD4⁺, CD8⁺ dan CD62L⁺.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, maka rumusan pada penelitian ini antara lain :

1. Apakah pemberian deksametason dapat mempengaruhi modulasi ekspresi sitokin proinflamasi pada mencit Balb/c model atresia

bilier dengan basis kuantitas dari molekul sitokin proinflamasi IFN- γ dan TNF- α ?

2. Apakah pemberian deksametason dapat mempengaruhi kemampuan penetrasi sel limfosit dan makrofag menuju hepar pada mencit Balb/c model atresia bilier dengan basis kuantitas sel CD4⁺, CD8⁺ dan CD62L⁺?

1.3 Tujuan

Tujuan yang ingin dicapai dari penelitian ini antara lain :

1. Mengetahui pengaruh pemberian deksametason terhadap modulasi ekspresi sitokin pro-inflamasi pada mencit Balb/c model atresia bilier dengan basis kuantitas dari molekul proinflamasi IFN- γ dan TNF- α .
2. Mengetahui pengaruh pemberian deksametason terhadap dapat mempengaruhi kemampuan penetrasi sel limfosit dan makrofag menuju hepar pada mencit Balb/c model atresia bilier dengan basis kuantitas sel CD4⁺, CD8⁺ dan CD62L⁺.

1.4 Manfaat

Manfaat aplikatif dari penelitian ini adalah dapat mengetahui proses imunologis yang mendasari terjadinya atresia bilier dan manfaat deksametason dalam menghambat atau menghentikan terjadinya inflamasi pada mencit Balb/c model atresia bilier.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

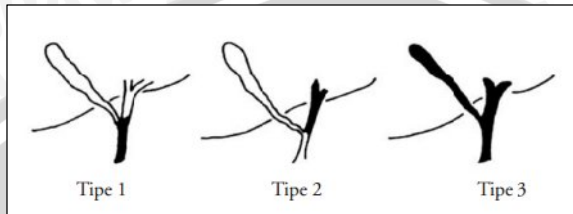
2.1 Atresia Bilier

Atresia bilier merupakan penyakit hati yang ditandai dengan obstruksi dan fibro-obliterasi progresif saluran bilier ekstrahepatik dan intrahepatik yang terjadi pada beberapa bulan pertama kehidupan bayi. Sampai saat ini penyebab atresia bilier belum diketahui (Schreiber dan Kleinman, 2002). Namun, akhir-akhir ini pemahaman tentang patogenesis penyakit ini meningkat pesat meskipun etiologi masih belum diketahui secara pasti. Studi pada penderita maupun kajian *in vitro* yang digabungkan dengan model eksperimen dapat mengidentifikasi mekanisme seluler dan molekuler yang berperan pada kerusakan saluran empedu. Penyebab yang paling mungkin merupakan gabungan dari berbagai hal seperti infeksi virus terutama reovirus dan rotavirus, kelainan genetik, bahan toksik yang mengganggu pertumbuhan saluran empedu serta adanya kerusakan saluran empedu perinatal pada proses persalinan (Sokol dkk., 2003).

Terdapat 3 (tiga) jenis atresia bilier : Tipe I, atresia dari duktus biliaris komunis; tipe II atresia dari duktus hepatikus sedangkan tipe III obstruksi atau sumbatan dari saluran empedu makin ke hulu pada jaringan hati yaitu saluran pada porta hepatis dan di atas porta hepatis. Kebanyakan pasien atresia bilier termasuk dalam tipe III, yaitu sebanyak 90% (Schreiber and Kleinman, 2002). Operasi Kasai berhasil baik terutama pada tipe I atresia bilier dan sedikit pada tipe II. Sedangkan pada tipe III, operasi Kasai sangat tidak memuaskan hasilnya. Akibatnya penyakit akan berlanjut menjadi sirosis hati dimana tekstur organ hati yang sebelumnya lembut dan kenyal menjadi keras bagai batu dan berbonjol-bonjol (Ohi, 2001).

Gejala-gejala yang dapat ditemui pada penderita atresia bilier yaitu ikterus (hiperbilirubinemia terkonjugasi), tinja berwarna pucat (seperti dempul), dan urin berwarna kuning gelap dalam beberapa minggu pertama kehidupan bayi. Gejala klinis hepatomegali, splenomegali, gagal tumbuh, pruritus, dan koagulopati tergantung pada tahap perkembangan penyakit. Meskipun secara umum gambaran klinis tersebut sama pada semua penderita, namun waktu timbulnya gejala, kelainan bawaan koeksistensi nonhepatik, dan varian anatomi sisa-sisa dari saluran-saluran empedu ekstrahepatik memungkinkan

pengelompokan penderita ke dalam beberapa bentuk klinis (Davenport dkk., 1993).



(Schreiber and Kleinman, 2002)

Gambar 2.1 Tipe atresia bilier

(Tipe I obliterasi segmental duktus biliaris komunis; tipe II obliterasi segmental duktus hepatikus; tipe III obliterasi seluruh duktus biliaris sampai ke tingkat porta hepatis)

Bilirubin akan disalurkan ke dalam duodenum atau usus duabelas jari pada saluran empedu normal. Atresia bilier berakibat pada rusaknya dan menutupnya saluran empedu, maka cairan empedu akan memasuki jaringan hati menimbulkan peradangan dan akhirnya sirosis hati. Bilirubin bersifat racun atau toksik bila menyebar ke seluruh tubuh akan menimbulkan warna kuning pada bagian sklera bola mata. Pada kulit menimbulkan gatal-gatal yang luar biasa sehingga penderita akan menggaruk-garuk terus kulitnya sampai berdarah. Feses biasanya berwarna putih-keabuan atau putih kotor seperti dempul karena bilirubin tidak disalurkan lewat usus atau saluran pencernaan (Ohi, 2001).

2.2 Infeksi Virus

Atresia bilier kemungkinan disebabkan oleh faktor lingkungan misalnya serangan virus pada periode perinatal. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Landing pada tahun 1974, hasil fenotipe atresia bilier dari paparan virus yang mungkin menghasilkan sebuah kontinum dari kolestasis intrahepatik neonatal dan kista duktus koledokus. Pada beberapa kejadian atresia bilier di Jepang, virus hepatitis B diduga berperan dalam penyakit ini akan tetapi hal ini tidak dapat dibuktikan pada kejadian di US (Balistreri dkk., 1996). Sejak saat itu, beberapa virus diduga terlibat dalam atresia bilier, baik dari deteksi langsung dari jaringan hati dan sisa-sisa empedu atau penanda serologis. Virus-virus tersebut meliputi *cytomegalovirus*, *human papillomavirus*,

virus herpes 6, virus Epstein-Barr, *respiratory syncytial* virus, reovirus tipe 3, dan rotavirus (Mack, 2007).

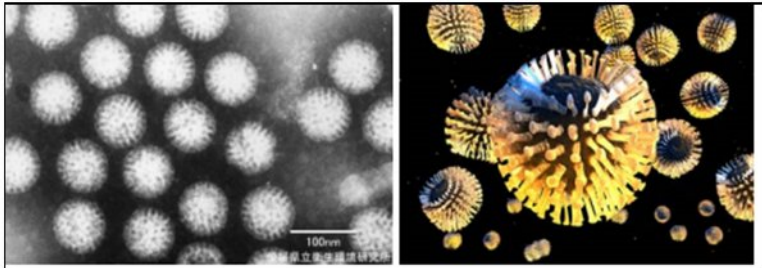
Reovirus dapat menyebabkan atresia bilier terkait kemungkinannya dalam menyebabkan tanda-tanda dan gejala penyakit pada mencit usia perinatal. Keterkaitan reovirus pada perkembangan penyakit ini dapat dideteksi melalui *polymerase chain reaction* (PCR) pada pasien dengan atresia bilier. Hampir sama dengan reovirus, rotavirus juga telah diteliti mengenai keterkaitannya sebagai agen etiologis dari atresia bilier ekstrahepatik setelah inokulasi rotavirus kelompok A ditemukan sebagai agen penginduksi atresia bilier ekstrahepatik pada mencit baru lahir (de Carvalho dkk., 2007).

Studi mendalam untuk membuktikan peran spesifik virus sebagai agen etiologis dari atresia bilier sampai saat ini masih belum ditemukan. Hal ini disebabkan karena sulit untuk konsisten mengisolasi virus dari jaringan yang terkena. Sistem kekebalan tubuh bayi efisien membersihkan virus. Sebagai contoh, dalam percobaan atresia bilier yang diinduksi rotavirus, teknik amplifikasi yang sangat sensitif bahkan gagal untuk mengidentifikasi virus setelah saluran empedu tersumbat (Shivakumar dkk., 2004). Dengan demikian, di masa depan dapat dilakukan studi untuk deteksi virus menggunakan teknologi mutakhir yang menghasilkan bukti tidak langsung adanya infeksi virus, misalnya petanda molekuler suatu respon imun terhadap infeksi virus pada anak-anak dengan atresia bilier (Al-Masri dkk., 2006).

2.1 Rotavirus

Rotavirus merupakan penyebab utama penyakit gastroenteritis akut pada anak-anak. Gastroenteritis adalah masalah radang perut dan usus. Virus ini juga secara etiologis dihubungkan dengan penyebab beberapa penyakit seperti ensefalitis dan meningitis, infeksi saluran pernafasan, *hepatic abscess* (penyakit hati bengkok), diabetes dan *necrotizing enterocolitis*. Serotip rotavirus G3 simian dan SA11 serta strain HCR3-human merupakan penyebab hepatitis dan atresia bilier. Nama virus rota didasarkan pada gambaran mikroskop elektron dari pinggir luar kapsid sebagai pinggirannya suatu roda yang mengelilingi jari-jari yang memancar dari inti yang menyerupai pusat. Partikel-partikel mempunyai kapsid berkulit ganda dan garis tengah berkisar antara 60-75 nm. Virus ini mempunyai partikel virus berkulit tunggal dan tidak mempunyai kapsid luar sehingga menunjukkan pinggir-pinggir luar

yang kasar dan bergaris tengah 50-60 nm. Inti dalam dari partikel bergaris tengah 33-40 nm. Partikel virus mengandung 11 segmen ARN beruntai ganda (Tucker dkk., 2003)



(Tucker dkk., 2003)

Gambar 2.2 Struktur luar rotavirus

World Health Organization (WHO) memperkirakan kejadian penyakit gastroenteritis pada tahun 2004, yang disebabkan karena infeksi rotavirus mencapai kurang lebih 527.000 kematian, kebanyakan terjadi pada negara berkembang. Rotavirus adalah virus yang sulit dibiakkan. Rotavirus menginfeksi sel-sel dalam vili usus halus. Virus-virus itu berkembang biak dalam sitoplasma enterosit dan merusak mekanisme transportnya. Sel yang rusak dapat masuk ke dalam lumen usus dan melepaskan sejumlah besar virus, yang kemudian terdapat dalam tinja. Diare yang disebabkan oleh rotavirus dimungkinkan akibat gangguan penyerapan natrium dan absorpsi glukosa karena sel yang rusak pada vili digantikan oleh sel kriptus yang belum matang (Rodriguez dkk., 2007). Oleh karena itu, saat ini telah dikembangkan vaksin rotavirus. Hal ini telah disetujui oleh *Food and Drug Administration* (FDA) dalam penggunaan 2 strain rotavirus sebagai kandidat vaksin pada manusia, yaitu Rotateq (Merck and Co Inc, *Whitehouse Station*, NJ) pada tahun 2006 dan Rotarix (GlaxoSmith-Kline, Philadelphia, PA, USA) pada tahun 2008 (Vesikari dkk., 2007).

2.4 Mekanisme Kekebalan Tubuh terhadap Virus

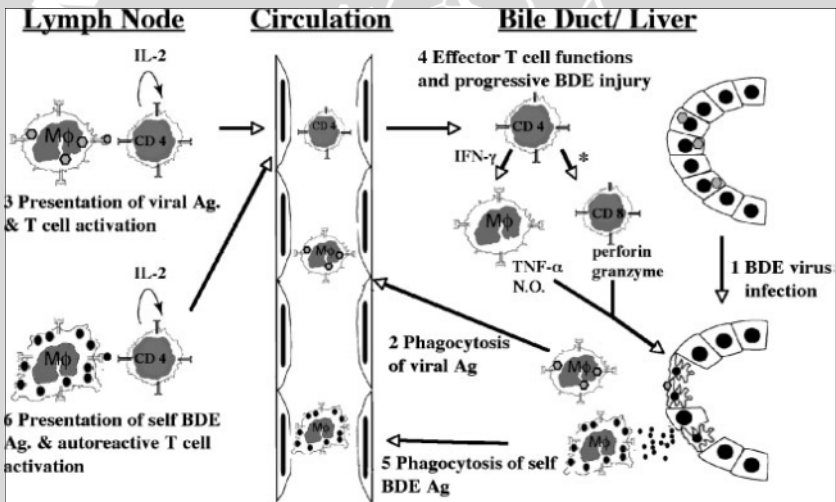
Sistem imun secara evolusi mengalami perkembangan pada mamalia sebagai mekanisme pertahanan tubuh melawan mikroorganisme yang menyerang tubuh. Sistem ini penting dalam pengaturan sistemik dalam tubuh akan tetapi jika mengalami kegagalan

sistem imun justru akan membahayakan tubuh (Rifa'i, 2004). Kegagalan sistem imun diperkirakan terjadi karena epitel pada saluran bilier mengekspresikan antigen pada permukaannya yang dapat dikenali oleh sel limfosit setelah kerusakan yang terjadi akibat virus. Selanjutnya akan terjadi inflamasi yang memicu terjadinya fibrosis pada saluran bilier. Berdasarkan pada penelitian Sokol dkk. (2003) menyatakan bahwa antigen yang berasal dari virus dapat melakukan reaksi silang dengan antigen pada saluran bilier sehingga mampu memicu respon imun melawan antigen virus dan juga antigen saluran bilier.

Mekanisme kerusakan saluran empedu yang diinduksi sel-sel kekebalan tubuh hingga saat ini masih belum jelas. Mekanisme interaksi sistem kekebalan dan patogen yang dipercayai hingga saat ini (Schreiber and Kleinman, 1993) bahwa paparan virus atau racun pada epitel empedu mengarah pada perubahan atau ekspresi antigen baru. Infeksi perinatal oleh virus pada epitel saluran empedu akan menyebabkan apoptosis atau nekrosis dini pada kolangiosit. Meskipun sudah terjadi pembersihan virus, peradangan dan kerusakan epitel pada saluran empedu tetap berlangsung. Sel-sel epitel saluran empedu yang rusak dapat mengekspresikan antigen yang sebelumnya diasingkan "*self*" dan dikenali sebagai benda asing, sehingga menimbulkan peradangan autoreaktif yang dimediasi sel T pada epitel duktus. Mekanisme autoimunitas yang diinduksi virus tersebut dikenal sebagai *bystander activation pathway* (Oldstone, 2005).

Protein virus mungkin secara struktural mirip dengan protein epitel saluran empedu sehingga dapat menyebabkan autoimunitas berdasarkan *molecular mimicry*. Proses ini memerlukan aktivasi sel T sebagai respon terhadap antigen mikroba disertai reaktivitas silang terhadap antigen "*self*". Berkaitan dengan proses imunologis yang dirancang Th, limfosit T CD4 banyak ditemukan dalam hati dan saluran empedu ekstrahepatik penderita atresia bilier. Sel-sel tersebut mungkin terakumulasi dalam hati melalui ekspresi suatu molekul adhesi, yang juga dapat menjelaskan tingginya jumlah sel NK (CD56⁺) dalam infiltrat inflamasi (Davenport dkk., 2001). Respon imun di atas pada akhirnya akan menyebabkan terjadinya kolangitis, obstruksi saluran empedu, dan sirosis bilier. Infeksi virus pada epitel saluran empedu (*bile duct epithel/BDE*) menyebabkan kerusakan awal pada sel epitel. Partikel virus akan difagosit oleh makrofag atau sel dendritik disajikan pada sel T *naive* dalam kelenjar getah bening lokal dimana aktivasi dan

proliferasi yang dirangsang IL-2 dari sel T CD4⁺ spesifik virus selanjutnya terjadi. Sel T CD4⁺ yang diaktifkan kembali ke tempat asal terjadinya paparan dan mengaktifkan fungsi sel T efektor selain itu juga terjadi stimulasi dan aktivasi sel T CD8⁺ sitotoksik oleh IFN- γ yang diinduksi makrofag. Makrofag melepaskan TNF- α , oksida nitrat (NO), dan spesies oksigen reaktif (ROS). Sementara itu, sel T CD8⁺ melepaskan granzime dan perforin, yang bersama-sama mengakibatkan kerusakan lebih lanjut BDE melalui jalur apoptosis atau nekrotik. Antigen BDE yang sebelumnya diasingkan atau diubah, dilepaskan dari tempat kerusakan awal difagosit oleh makrofag atau sel dendritik dan disajikan ke sel T autoreaktif menyebabkan aktivasi lebih lanjut kaskade kekebalan tubuh diperantarai sel T tersebut dan kerusakan BDE secara progresif (Mack, 2007).



(Mack, 2007)

Gambar 2.3 Proses imunologis yang mendasari terjadinya atresia bilier

2.5 Inflamasi sebagai Penyebab Kerusakan Kolangiosit

Hati dan saluran empedu pada penderita BA, respon sel T terutama sel T helper-1 merupakan mekanisme inflamasi dominan, dengan interferon- γ (IFN- γ) dan *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) memainkan peranan penting (Mack and Sokol, 2005). Terdapat bukti yang mendukung bahwa baik CD-4 maupun CD-8 memediasi terjadinya

kerusakan sel saluran empedu. Sel CD4⁺ banyak ditemukan di hati dan berkaitan dengan penanda aktivasi proinflamasi, seperti interferon-gamma (IFN γ), interleukin-2, reseptor CD25 interleukin-2, *tumor necrosis factor-alpha* (TNF α), dan reseptor transferin CD71 (Davenport dkk., 2001; Mack dkk., 2004). Bukti peran efektor limfosit T berasal dari laporan bahwa sisa-sisa hati dan saluran empedu penderita dengan atresia bilier memiliki ekspansi oligoklonal sel T CD4⁺ dan CD8⁺ (Mack dkk., 2007). Pelepasan TNF- α , NO, ROS oleh makrofag dan pelepasan granzim, perforin, IFN- γ oleh sel T CD8⁺ berakibat kerusakan lebih lanjut kolangiosit melalui jalur apoptosis atau nekrotik. Secara bersamaan, kolangiosit dan sel endotel vaskular merangsang ekspresi molekul adhesi dan mensekresi kemokin untuk merekrut neutrofil dan makrofag ke tempat kerusakan saluran empedu. Mekanisme respon sel T helper-1 yang menyerupai kejadian BA pada manusia banyak dijumpai dalam model hewan coba, dengan induksi rotavirus rhesus pada tikus yang baru lahir (Petersen dkk., 1998). Respon imun bawaan juga ikut diaktifkan dalam hati penderita atresia bilier, yang ditunjukkan oleh hadirnya sel-sel makrofag CD68⁺/ keluarga monosit pada saluran porta dan bukti pelepasan kemokin dan sitokin oleh sel tersebut dan sel-sel terkait (Mack dkk., 2005). Selain itu, berbagai sitokin, kemokin, dan faktor-faktor pertumbuhan lain juga dilepaskan yang merangsang amplifikasi jalur inflamasi dan induksi fibrogenesis. Dengan demikian, tampaknya terdapat pembenaran secara ilmiah untuk mendapatkan terapi baru atresia bilier dengan menargetkan jalur inflamasi kritis.

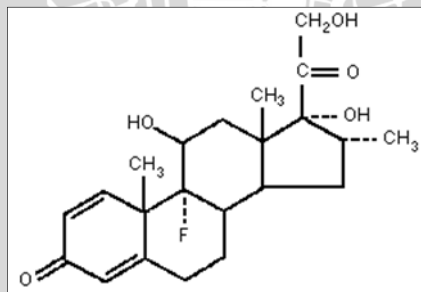
Studi penelitian terakhir ditemukan juga bahwa sel-sel dendritik berinteraksi virus dan menginduksi proliferasi limfosit T, serta aktivasi sel NK setelah paparan RRV. Data ini menunjukkan bahwa kehadiran RRV dalam makrofag dan sel dendritik memicu respon inflamasi dengan limfosit efektor dalam proses pembersihan virus, yang menyebabkan kerusakan duktus empedu melalui rangsangan kolangiosit yang terinfeksi. Selain itu, kemampuan sel NK dan limfosit T CD8⁺ melisis kolangiosit tidak terinfeksi secara molekuler mirip dengan patogenesis autoimun (Saxena dkk., 2009).

2.6 Kortikosteroid

Kortikosteroid adalah suatu hormon yang dibuat oleh bagian korteks (luar) dari kelenjar adrenal. Kortikosteroid terbagi menjadi 2 kelompok, yaitu kelompok glukokortikoid dan mineralokortikoid.

Glukokortikoid berperan mengendalikan metabolisme karbohidrat, lemak dan protein, juga bertindak sebagai anti-inflamasi dengan cara menghambat pelepasan fosfolipid serta dapat pula menurunkan kinerja eosinofil. Sedangkan mineralokortikoid berfungsi mengatur kadar elektrolit dan air dengan cara penahanan garam di ginjal. Berdasarkan mekanisme kerjanya, deksametason digolongkan ke dalam kelompok glukokortikoid (Elenkov, 2004).

Obat golongan kortikosteroid utamanya digunakan untuk mengatasi radang. Beberapa penyakit peradangan yang kerap diobati dengan kortikosteroid adalah asma, radang rematik, radang usus, radang ginjal, radang mata dan lain-lain. Obat golongan kortikosteroid termasuk golongan obat yang penting dalam dunia pengobatan, karena memiliki efek farmakologi yang luas, sehingga sering digunakan dalam pengobatan berbagai penyakit, sehingga ada yang menyebutnya sebagai obat dewa atau obat segala penyakit (Hsieh dkk., 2004). Deksametason yang digunakan di pasaran adalah deksametason sintetis sehingga efek terapi yang ditimbulkan cepat, berbeda dengan senyawa alaminya. Kondisi seperti ini mengakibatkan terdapat banyak penyalahgunaan deksametason. Deksametason ditambahkan ke dalam obat tradisional agar efek yang ditimbulkan lebih cepat, padahal penggunaan deksametason memiliki batasan kadar atau sering disebut dengan dosis maksimal. Penggunaan yang melebihi dosis maksimalnya dapat berakibat fatal dan jika digunakan dalam rentang waktu tertentu dapat mengakibatkan kerusakan organ vital yaitu ginjal. Deksametason merupakan obat keras sehingga penggunaannya harus berdasarkan pengawasan dan resep dokter (Karrer dan Lily, 1985).



(Alcon Laboratories, 2008)

Gambar 2.4 Struktur molekul deksametason

2.7 Terapi Kortikosteroid pada Atresia Bilier

Kortikosteroid memiliki berbagai sifat anti-inflamasi dan imunomodulator yang berpotensi menghambat migrasi limfosit dan makrofag ke dalam saluran empedu yang mengalami kerusakan, meningkatkan transkripsi pengkodean gen untuk protein anti-inflamasi, dan meningkatkan respon imun anti-inflamasi Th2 (Elenkov, 2004). Selain itu, steroid juga berperan dalam mengurangi ekspresi kemokin (interleukin-8 dan *monocyte chemotactic protein-1*) pada model tikus dengan kolangitis bakteri. Karena fibrosis dari sisa-sisa saluran empedu dan saluran intrahepatik pada BA dikaitkan dengan respon inflamasi yang kuat, diduga bahwa melalui penekanan respon imun, steroid akan mampu mengurangi fibrosis dan penyumbatan saluran empedu intrahepatik, sehingga dapat mempertahankan aliran empedu. Dengan demikian, terdapat pembenaran secara ilmiah yang memadai tentang manfaat potensial terapi steroid pada atresia bilier (Hsieh dkk., 2004).

Penentuan apakah terapi steroid digunakan dalam BA harus mempertimbangkan tidak hanya keberhasilan potensi, tetapi juga efek samping obat dalam rangka penentuan risiko-manfaat pengobatan. Sayangnya, keamanan pengobatan steroid pada bayi dengan BA belum pernah dikaji secara prospektif. Berdasarkan survei nasional di Jepang, lima komplikasi yang dilaporkan pernah terjadi, diantaranya *dehiscence* luka, perdarahan dan perforasi gastrointestinal, kegagalan anastomotik, dan infeksi kandida. Namun, laporan ini juga tidak memiliki kelompok kontrol yang memadai, sehingga hubungan sebab-akibat tidak bisa dinilai secara akurat (Muraji dkk., 2004).

2.8 Organ Limfoid Spleen

Sel limfosit sebagian besar menempati suatu organ yang disebut organ limfoid. Pada organ ini terjadi interaksi antara sel-sel limfosit dengan sel-sel non-limfosit. Interaksi ini memiliki fungsi yang sangat penting baik bagi perkembangan limfosit itu sendiri maupun sebagai titik awal adaptasi. Organ limfoid secara garis besar dapat dibagi menjadi dua bagian yakni organ limfoid primer dan organ limfoid sekunder. Sel limfosit dihasilkan oleh organ limfoid primer yang pada gilirannya akan menuju ke organ limfoid sekunder. Organ limfoid sekunder merupakan organ limfoid perifer tempat terjadinya penangkapan antigen oleh sel-sel imunokompeten. Pada organ limfoid perifer ini imunitas adaptif dimulai. Pada setiap saat tubuh kita selalu

berhadapan dengan patogen yang masuk. Patogen memasuki tubuh kita dengan berbagai cara, misalnya dari makanan, minuman, udara, dan luka. Antigen dan limfosit akhirnya akan bertemu pada organ limfoid periferil yaitu pada limfa node, spleen, dan jaringan limfoid mukosa (Roitt dkk.,1989).

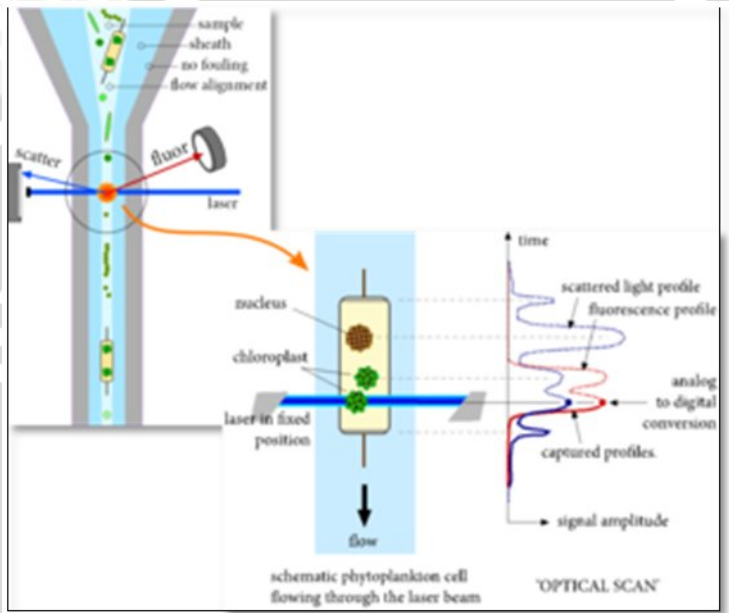
Organ limfa (*spleen*) terletak di belakang lambung dan bertugas mengumpulkan antigen dari darah dan juga mengumpulkan dan menghancurkan darah merah yang telah kehilangan fungsi. Sebagian besar organ spleen terdiri dari daerah yang disebut pulpa merah. Pada pulpa merah, darah merah yang telah tua dihancurkan. Pada spleen terdapat daerah yang disebut pulpa putih. Pulpa putih adalah tempat berkumpulnya sel B yang berasal dari arteri di sekitarnya. Pada pulpa putih terdapat daerah tertentu tempat berkumpulnya sel T yaitu daerah yang disebut *periarteriolar limfaoid sheath* (PALS) (Rifa'i, 2012).

2.9 Flow Cytometry

Flow cytometry mengakibatkan partikel atau sel yang berada di dalam cairan ditembakkan sinar laser dengan kecepatan tinggi. Dengan menghitung sinar yang berpendar pada masing-masing partikel dan mendeteksi kemungkinan sinar fluoresens yang diemisikan oleh pigmen intraseluler sehingga partikel dapat diidentifikasi dan dihitung. Metode ini sangat cepat dan sangat akurat karena jutaan partikel dapat dianalisa dalam hitungan detik dan setiap partikel dapat dilihat struktur internal dan bentuknya. Metode ini juga dapat digunakan untuk menganalisa berbagai komponen seluler (asam nukleat, lemak, protein dll),organel (lisosom, mitokondria dll), bahkan fungsi (viabilitas, aktivitas enzimatik dll) (Nunez, 2001).

Salah satu manfaat dari *flow cytometry* adalah analisa siklus sel. Analisa siklus sel dengan *flow cytometry* merupakan hal yang menarik untuk dikaji baik pada penelitian dasar maupun pada ranah biomedik. Penerapan analisis siklus sel pada berbagai bidang memiliki potensi yang besar untuk terus dikembangkan. Pada bidang farmakologi, *flow cytometry* menyediakan kesempatan untuk menyelidiki efek terapi obat secara *in vitro* seperti efikasi dari faktor-faktor anti tumor untuk mengembangkan terapi baru. Pada onkologi, jumlah DNA sel dan distribusinya pada berbagai fase dalam siklus sel dapat dianalisa untuk mendeteksi sel yang patologis untuk menentukan prognosis maupun untuk monitoring terapi (Jayat dan Marie, 1997). Analisa siklus sel

dengan *flow cytometry* juga tidak terbatas digunakan pada model eksperimen selain hewan dan famili tumbuhan tingkat tinggi saja, namun juga dapat digunakan untuk meningkatkan pengetahuan pada model eksperimen seperti bakteri, jamur, ataupun alga uniseluler.



(Nunez, 2001)

Gambar 2.5 Prinsip kerja *flow cytometry*

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli 2013 sampai dengan bulan Januari 2014 bertempat di Laboratorium Fisiologi Hewan, Laboratorium Biologi Molekuler Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, dan Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang.

3.2 Prosedur Kerja Penelitian

3.2.1 Deskripsi Hewan Coba

Sebagai populasi penelitian adalah bayi mencit Balb/c baru lahir dari induk sehat bebas patogen. Sebelum melahirkan induk tikus dirawat sesuai standar yaitu dikandang dengan ukuran standar, dengan suhu kamar dan siklus gelap dan terang tiap 12 jam. Tikus diberi makan dan minum sesuai kebutuhan, setelah melahirkan bayi tetap dibiarkan bersama induknya agar tetap dapat menyusui. Bayi tikus Balb/c yang lahir hidup dari induk bebas patogen.

3.2.1.1 Kriteria inklusi

Bayi tikus Balb/c baru lahir dari induk yang sehat, berumur <24 jam saat mulai penelitian, dan tidak didapatkan adanya kelainan bawaan.

3.2.1.2 Kriteria eksklusi

Terjadi kerusakan organ atau jaringan pada saat pengambilan sampel untuk pemeriksaan histopatologi anatomi.

3.2.2 Deskripsi Perlakuan dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan coba mencit Balb/c baru lahir karena pada penelitian ini atresia bilier tidak mungkin dilakukan pada manusia. Pemilihan sampel bayi tikus dari populasi dan penempatan pada kelompok coba dan kontrol dilakukan secara alokasi random. Penelitian ini terdiri dari 2 (dua) tahap. Tahap 1 adalah prakondisi dimana saluran empedu bayi tikus dibuat fibrosis dengan induksi 20 μ l *phosphate buffered saline* yang mengandung 1.5×10^6 *fluorescence-forming units* Rotavirus Rhesus (RRV) secara subkutan pada 24 jam pertama setelah kelahiran, kemudian tahap2 bayi tikus tersebut diberi deksametason 0,5 mg/kgBB secara subkutan pada hari ke 7 dan 14

setelah induksi RRV. Efek terapi deksametason selanjutnya diteliti pada hari ke 14 dan 21 setelah induksi. Penelitian ini telah mendapatkan sertifikat kelayakan etik (*Ethical Clearance*) dari Komisi Etik Penelitian (*Animal Care and Use Committee*) Universitas Brawijaya No. 391/EC/KEPK-S3/11/2012 (Lampiran 1).

Tabel 1. Kelompok Perlakuan

Mencit Balb/c	Kontrol	K ₁₄	Tanpa injeksi RRV dan terminasi hari ke-14
		K ₂₁	Tanpa injeksi RRV dan terminasi hari ke-21
	RRV	R ₁₄	Injeksi RRV hari ke-1 dan terminasi hari ke-14
		R ₂₁	Injeksi RRV hari ke-1 dan terminasi hari ke-21
	RRV + Deksameton	D ₁₄	Injeksi RRV hari ke-1, injeksi deksametason hari ke-7 sampai hari ke-14 dan terminasi hari ke-14
		D ₂₁	Injeksi RRV hari ke-1, injeksi deksametason hari ke-14 sampai hari ke-21 dan terminasi hari ke-21

Jumlah replikasi dalam penelitian ini ditentukan berdasarkan rumus Federer (1955).

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

dengan t = jumlah kelompok perlakuan dan r = jumlah replikasi.

Dengan jumlah kelompok perlakuan (t) = 9, maka diperoleh jumlah replikasi minimal 4 ekor mencit putih. Untuk mengantisipasi adanya unit eksperimen yang *drop out*, dilakukan koreksi terhadap jumlah replikasi berdasar rumus Higgins yaitu $1/(1-f)$. Dengan perkiraan unit eksperimen yang *drop out* sebesar 25%, maka jumlah replikasi yang diperlukan adalah $1/(1-0,25) \times 4 \sim 7$ ekor tikus per kelompok perlakuan. Dengan demikian dalam penelitian ini dipergunakan total replikasi 9×7 ekor = 63 ekor mencit.

3.2.3 Preparasi Injeksi RRV

Virus yang digunakan sebagai bahan injeksi adalah *Rhesus Rotavirus* (MMU18006) *American Type Culture Collection* (ATCC®VR 1739™). Virus disimpan dalam suhu -70°C . Dalam waktu <24 jam setelah lahir, bayi mencit disuntik secara subkutan dengan $20\ \mu\text{l}$ *buffered saline phosphate* yang mengandung 1.5×10^6 pfu RRV.

3.2.4 Preparasi Dosis Injeksi Dekسامetason

Injeksi deksametason $0,5\ \text{mg/kgBB}$ secara subkutan atau $0,0005\ \text{mg/gramBB}$, dengan estimasi berat badan bayi mencit usia <24 jam ± 2 gram, maka injeksi deksametason diberikan sebanyak $0,001\ \text{mg}$. Dekسامetason $5\ \text{mg/ml}$ diencerkan hingga $125\ \text{ml}$ (setara dengan $0,04\ \text{mg/ml}$ atau $0,004\ \text{mg}/0,1\ \text{ml}$ atau $0,001\ \text{mg}/0,025\ \text{ml}$). Dosis injeksi akan berubah sesuai dengan perubahan berat badan mencit.

3.2.5 Model Atresia Bilier pada Mencit Balb/c dengan Injeksi RRV

Mencit pada kelompok perlakuan kontrol tidak diberi perlakuan injeksi RRV ataupun deksametason dan diterminasi secara bertahap pada hari ke-7, 14, dan 21. Sedangkan pada kelompok perlakuan RRV dan kelompok perlakuan RRV + deksametason, bayi mencit Balb/c usia <24 jam diinjeksi secara subkutan dengan $20\ \mu\text{l}$ RRV dan $30\ \mu\text{l}$ *phosphate buffer saline*. Pada kelompok perlakuan RRV, mencit kemudian diterminasi secara bertahap pada hari ke-14 dan 21. Spuit yang digunakan berukuran $1\ \text{ml}$ dengan jarum yang berukuran 27G. Mencit diterminasi dengan cara dimasukkan pada botol yang telah berisi kapas dan dietil eter. Selanjutnya organ spleen diisolasi dari tubuh mencit. Hepar diambil dan dimasukkan dalam paraformaldehid 4% selanjutnya dibuat preparat histologi dengan metode parafin dan teknik pewarnaan HE (Hematoksilin-Eosin).

3.2.6 Terapi Dekسامetason pada Mencit Balb/c Model Atresia Bilier

Mencit yang telah terinfeksi RRV selanjutnya diinjeksi deksametason secara bertahap pada hari ke-7 dan 14. Mencit yang diinjeksi deksametason pada hari ke-7 sampai hari ke-14 diterminasi pada hari ke-14 serta mencit yang diinjeksi deksametason pada hari ke-14 sampai hari ke-21 diterminasi pada hari ke-21. Spuit yang digunakan berukuran $1\ \text{ml}$ dengan jarum yang berukuran 27G. Mencit diterminasi

dengan cara dimasukkan pada botol yang telah berisi kapas dan dietil eter. Selanjutnya organ *spleen* diisolasi dari tubuh mencit.

3.2.7 Isolasi Limfosit dari Organ *Spleen*

Organ *spleen* yang telah diisolasi dari tubuh mencit dicuci PBS 2 kali dan dibersihkan dari lemak. Setelah itu, organ dipencet searah jarum jam dengan menggunakan pangkal spuit dan disaring dengan wire. Homogenat yang bercampur PBS dimasukkan dalam tabung propilen 15 ml dan ditambahkan PBS sampai volumenya mencapai 10 ml. Kemudian dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 2500 rpm, 4°C selama 5 menit. Supernatan dibuang sedangkan pellet diambil dan diresuspensi dengan PBS 1 ml lalu dipipeting.

3.3.8 Pewarnaan Immunostaining

3.3.8.1 Staining Antibodi Ekstraseluler

Pelet pada mikrotub ditambahkan dengan 50 µl pewarna antibodi spesifik. Tipe pewarnaan yang digunakan adalah pewarnaan *triple staining* dengan kombinasi dari 3 jenis antibodi spesifik dari marker-marker seluler yang akan dianalisis. Untuk menganalisis status dan sel T yang mampu memproduksi antibodi tertentu digunakan antibodi monoklonal yaitu *fluorescein isothiocyanate* (FITC) anti mouse CD-4 (klon : GK 1.5/Biolegend), *pychoerythrien* (PE) Rat anti mouse CD-8a (klon : 53-6.7) serta PE / Cy5 antimouse CD-62L (klon : MEL-14).

3.3.8.2 Staining Antibodi Intraseluler

Pelet pada mikrotub ditambahkan dengan 50 µl pewarna antibodi spesifik. Tipe pewarnaan yang digunakan adalah pewarnaan *triple staining* dengan kombinasi dari 3 jenis antibodi spesifik dari marker-marker seluler yang akan dianalisis. Untuk menganalisis status dan sel T yang mampu memproduksi antibodi tertentu digunakan antibodi monoklonal yaitu kombinasi antara *fluorescein isothiocyanate* (FITC) anti mouse CD-4 (klon : GK 1.5/Biolegend), *pychoerythrien* (PE) Rat anti mouse CD-8a (klon : 53-6.7) serta PerCP / Cy5.5 antimouse IFN-γ (klon : XMG 1.2) dan juga kombinasi antara *fluorescein isothiocyanate* (FITC) anti mouse CD-4 (klon : GK 1.5/Biolegend), *pychoerythrien* (PE) Rat anti mouse CD-8a (klon : 53-6.7) serta PE antimouse TNF-α (klon : MP6-XT22). Kedua kombinasi *triple staining* tersebut dilakukan secara *intracellular staining* dengan penambahan

Cytofix/Cytosperm kit (*BD-Biosciences Pharmingen*) terlebih dahulu sesuai protokol produk.

3.2.9 Perhitungan Sel Limfosit Menggunakan *Haemocytometer*

Suspensi pellet dari hasil isolasi limfosit pada spleen diambil sebanyak 20 μl untuk perhitungan sel limfosit. Suspensi pellet ditambahkan 80 μl *Evans Blue* kemudian dihomogenkan. Perhitungan sel hidup dilakukan dengan menggunakan kamar hitung dalam *haemocytometer* dan hasil perhitungan digunakan untuk analisa *flowcytometry*.

3.2.10 Analisis *Flow Cytometry*

Hasil pewarnaan *immunostaining* selanjutnya dimasukkan dalam kuvet *flowcytometer* dan ditambahkan 400 μl PBS steril. Kuvet dipasang pada *nozzle BD FACS Calibur™* flowcytometer. Selanjutnya dilakukan setting pada computer dengan software *BD Cell Quest Pro™* dan dilakukan koneksi dengan *flowcytometer (Acquiring mode)*.

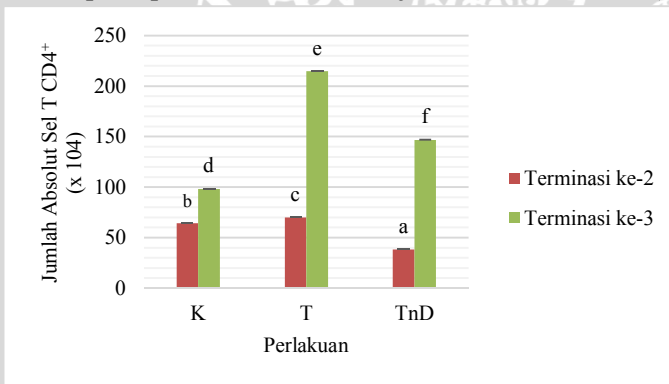
3.2.11 Analisis Data

Penelitian ini diuji dengan uji Kruskal-Wallis dengan menggunakan taraf signifikansi (α) sebesar 0,05. Data yang digunakan berupa perubahan kuantitas jumlah absolut sel T CD4^+ , CD8^+ , CD62L^+ , $\text{TNF-}\alpha$ dan $\text{IFN-}\gamma$. Apabila diperoleh $p > 0,05$ maka hasil tidak menunjukkan adanya signifikansi antar masing-masing perlakuan, sebaliknya jika $p < 0,05$ maka menunjukkan adanya signifikansi antar perlakuan yang dibandingkan. Selanjutnya, dilakukan uji lanjutan Mann-Whitney dengan α sebesar 0,05. Apabila diperoleh $p > 0,05$ maka tidak menunjukkan adanya perbedaan nyata antar 2 perlakuan yang dibandingkan, sebaliknya jika $p < 0,05$ maka menunjukkan adanya perbedaan nyata antar 2 perlakuan yang dibandingkan. Analisis data dilakukan dengan menggunakan program SPSS 16.0 *for Windows*.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Analisis Jumlah Total Sel T CD4⁺ dan Sel T CD8⁺ Menggunakan *Flow Cytometry*

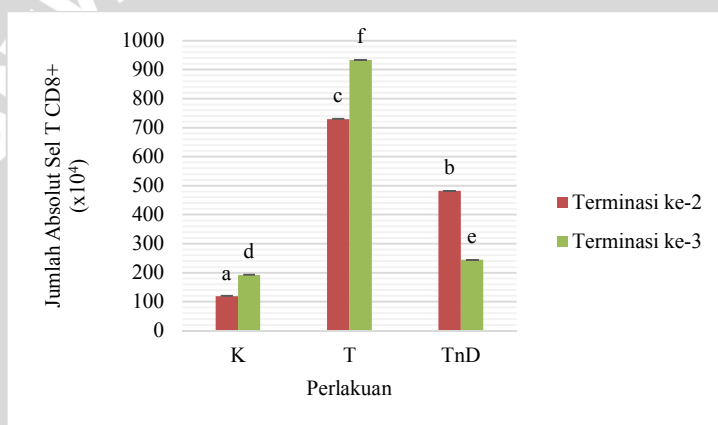
Analisis jumlah relatif dan absolut sel T CD4⁺ dan T CD8⁺ dalam penelitian ini digunakan untuk mengetahui pengaruh aktifitas biologis dari perlakuan pemberian Rotavirus serta perlakuan pemberian Rotavirus dan Dekسامetason terhadap kuantitas sel T CD4⁺ dan T CD8⁺. Hasil analisis *flow cytometry* pada *spleen* (Gambar 4.1.1) menunjukkan bahwa dari seluruh total sel, diketahui jumlah sel T CD4⁺ pada perlakuan T (pemberian Rotavirus) meningkat signifikan ($p < 0.05$) sebesar 2,14 juta sel atau 3,01 % dibandingkan mencit sehat 0,98 juta sel atau 1,97 % dan menurun kembali pada perlakuan TnD (pemberian Rotavirus dan Dekسامetason) sebesar 1,46 juta sel atau 1,46 % pada terminasi ketiga (minggu ketiga) (Lampiran 8). Hasil analisis jumlah sel T CD4⁺ pada minggu kedua menunjukkan bahwa jumlah sel juga menunjukkan peningkatan pada perlakuan T jika dibandingkan dengan K yaitu dari 0,64 juta sel atau 0,65 % menjadi 0,7 juta sel atau 1,04 % dan menurun pada perlakuan TnD 0,38 juta sel atau 1,56 % (Lampiran 8).



Gambar 4.1.1 Jumlah absolut sel T CD4⁺ (K = kontrol, T = perlakuan pemberian rotavirus, dan TnD = perlakuan pemberian Rotavirus dan deksametason).

Keterangan : Huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata berdasarkan uji Mann-Whitney

Hasil analisis *flow cytometry* pada *spleen* (Gambar 4.1.2) menunjukkan bahwa dari seluruh total sel, diketahui jumlah sel T CD8⁺ pada perlakuan T meningkat signifikan ($p < 0.05$) sebesar 6,22 juta sel atau 1,62% dibandingkan mencit sehat 1,28 juta sel atau 1,87 % dan menurun kembali pada perlakuan TnD (pemberian Rotavirus dan Deksametason) sebesar 1,63 juta sel atau 1,35 % pada terminasi ketiga (minggu ketiga). Hasil analisis jumlah sel T CD8⁺ pada minggu kedua menunjukkan bahwa jumlah sel cenderung meningkat secara signifikan pada perlakuan T jika dibandingkan dengan K yaitu dari 1,19 juta sel atau 1,38 % menjadi 7,29 juta sel atau 5,44 % dan menurun pada perlakuan TnD 4,81 juta sel atau 4,4 % (Lampiran 9).



Gambar 4.1.2 Jumlah absolut sel T CD8⁺ (K = kontrol, T = perlakuan pemberian rotavirus, dan TnD = perlakuan pemberian Rotavirus dan deksametason).

Keterangan : Huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata berdasarkan uji Mann-Whitney.

Peningkatan jumlah sel T CD4⁺ dan T CD8⁺ pada minggu kedua dan ketiga pada perlakuan T disebabkan adanya paparan viral antigen pada Rotavirus sehingga memodulasi aktivitas proliferasi sel T CD4⁺. Infeksi virus pada epitel saluran empedu (*bile duct epithel/BDE*) menyebabkan kerusakan awal pada sel epitel. Partikel virus akan difagosit oleh makrofag atau sel dendritik, disajikan pada sel T *naive* dalam kelenjar getah bening lokal dimana aktivasi dan proliferasi yang dirangsang IL-2 dari sel T CD4⁺ spesifik virus selanjutnya terjadi. Sel T

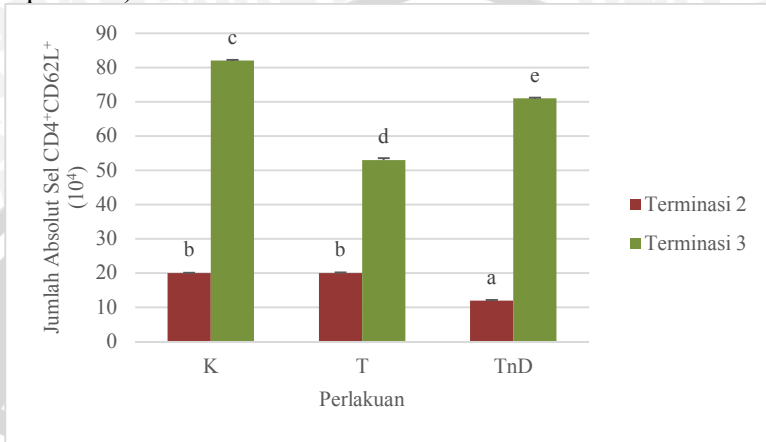
CD4⁺ yang diaktifkan kembali ke tempat asal terjadinya paparan dan mengaktifkan fungsi sel T efektor, selain itu juga terjadi stimulasi dan aktivasi sel T CD8⁺ sitotoksik oleh IFN- γ yang diinduksi makrofag. Makrofag melepaskan TNF- α , oksida nitrat (NO), dan spesies oksigen reaktif (ROS). Sementara sel T CD8⁺ melepaskan granzime dan perforin, yang bersama-sama mengakibatkan kerusakan lebih lanjut BDE melalui jalur apoptosis atau nekrotik. Sementara itu, penurunan jumlah sel T CD4⁺ dan T CD8⁺ pada minggu kedua dan ketiga setelah diberi perlakuan TnD disebabkan karena deksametason yang merupakan obat golongan kortikosteroid memiliki berbagai sifat antiinflamasi dan imunomodulator yang berpotensi menghambat laju migrasi limfosit dan makrofag ke dalam saluran empedu yang mengalami kerusakan dengan jalan melakukan *blocking* aktivitas makrofag serta merangsang apoptosis sel T sehingga menekan produksi sel T CD4⁺ dan T CD8⁺ (Mack, 2007).

Sel T CD8⁺ atau sel Tc (sitotoksik) adalah limfosit yang berasal dari sel dalam sumsum tulang. Sel tersebut matang dalam timus untuk mendapat reseptor spesifik terhadap fragmen antigen. Kebanyakan sel Tc adalah CD8⁺ dan hanya mengenal antigen yang berhubungan dengan MHC kelas I. Fungsi utamanya adalah mengeliminasi sel yang terinfeksi antigen. Sel Tc akan juga menghancurkan sel ganas dan sel histoinkompatibel seperti halnya pada penolakan pada transplantasi. Dalam keadaan tertentu dapat pula menghancurkan sel yang terinfeksi bakteri (Pimentel, 2010).

4.2 Analisa Jumlah Total Sel CD4⁺CD62L⁺ dan CD8⁺CD62L⁺ Menggunakan *Flow Cytometry*

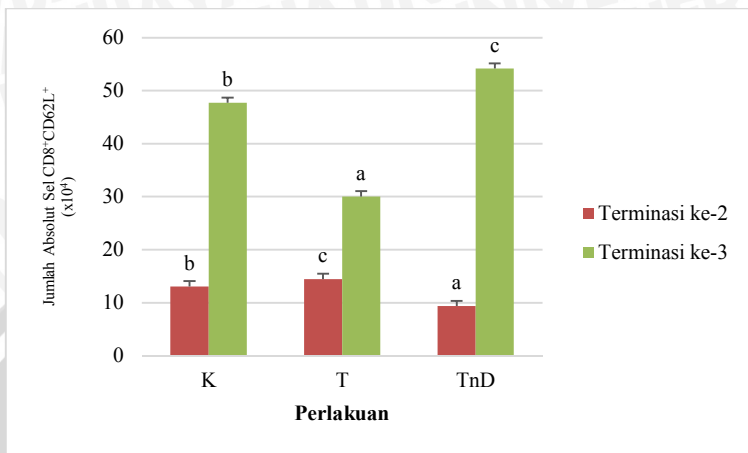
Berdasarkan hasil analisis *flow cytometry* pada *spleen* (Gambar 4.2.1) menunjukkan bahwa dari seluruh total sel, diketahui jumlah sel CD4⁺CD62L⁺ pada perlakuan T mengalami penurunan secara signifikan ($p < 0.05$) sebesar 0,53 juta sel atau 0,33 % dibandingkan mencit sehat 0,82 juta sel atau 0,25 % dan meningkat kembali pada perlakuan TnD (pemberian Rotavirus dan Deksametason) sebesar 0,71 juta sel atau 0,45 % pada terminasi ketiga (minggu ketiga). Hasil analisis jumlah sel CD4⁺CD62L⁺ pada minggu kedua menunjukkan bahwa jumlah sel tetap pada perlakuan T jika dibandingkan dengan K yaitu 0,20 juta sel atau

0,75 % dan menurun pada perlakuan TnD 0,12 juta sel atau 0,85 % (Lampiran 10).



Gambar 4.2.1 Jumlah absolut sel CD4⁺CD62L⁺ (K = kontrol, T = perlakuan pemberian rotavirus, dan TnD = perlakuan pemberian Rotavirus dan deksametason)
Keterangan : Huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata berdasarkan uji Mann-Whitney

Berdasarkan hasil analisis *flow cytometry* pada *spleen* (Gambar 4.2.2) menunjukkan bahwa dari seluruh total sel, diketahui jumlah sel CD8⁺CD62L⁺ pada perlakuan T mengalami penurunan secara signifikan ($p < 0.05$) sebesar 0,3 juta sel atau 0,025 % dibandingkan mencit sehat 0,47 juta sel atau 0,39 % dan meningkat kembali pada perlakuan TnD (pemberian Rotavirus dan Deksametason) sebesar 0,54 juta sel atau 0,43% pada terminasi ketiga (minggu ketiga). Hasil analisis jumlah sel CD4⁺CD62L⁺ pada minggu kedua menunjukkan bahwa jumlah sel cenderung meningkat pada perlakuan T jika dibandingkan dengan K yaitu dari 0,13 juta sel atau 0,54 % menjadi 0,14 juta sel atau 0,7 % dan menurun pada perlakuan TnD 0,09 juta sel atau 0,97 % (Lampiran 11).



Gambar 4.2.2 Jumlah absolut sel CD8⁺CD62L⁺ (K = kontrol, T = perlakuan pemberian Rotavirus, dan TnD = perlakuan pemberian rotavirus dan deksametason)

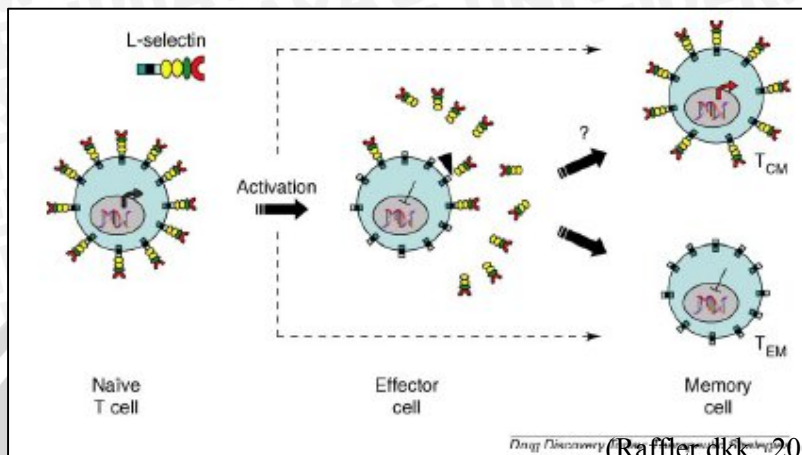
Keterangan : Huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata berdasarkan uji Mann-Whitney

Baik sel T CD4⁺CD62L⁺ maupun sel TCD8⁺CD62L⁺ mengalami penurunan yang signifikan pada perlakuan T jika dibandingkan dengan mencit sehat pada saat terminasi minggu ketiga dan mengalami peningkatan secara signifikan saat pemberian Deksametason. Sel T yang teraktivasi akan kehilangan ekspresi CD62L. Sel T naïve yaitu sel T yang belum pernah terpapar antigen mengekspresikan molekul CD62L, dan pada individu yang sehat umumnya lebih dari 80 % sel T mengekspresikan molekul CD62L. CD62L⁺ atau *L-selectin* merupakan molekul adhesi yang memiliki fungsi perlekatan dan *rolling* pada sel endotel pembuluh darah. Molekul tersebut mampu diekspresikan oleh sel T *naïve* CD4⁺CD62L⁺ maupun CD8⁺CD62L⁺. Sel T *naïve* ini akan mengalami sirkulasi di dalam darah, *spleen*, dan *lymph node peripheral* hingga suatu saat bertemu dengan suatu antigen. Jika sudah bertemu dengan suatu antigen maka sel T *naïve* akan teraktivasi dan kehilangan molekul CD62L⁺. Molekul CD62L⁺ mampu diekspresikan oleh sel T *naïve* dalam individu normal, sedangkan pada individu yang tidak sehat sel T *naïve* akan mengalami penurunan ekspresi CD62L⁺ pada organ *lymph node* perifer dan sel T

akan teraktivasi. Selanjutnya molekul CD62L⁺ melakukan down regulated pada sel T yang akan menghalangi masuk ke *lymph node* dalam sel endotel. Hal ini untuk mencegah *killing* terhadap APC sel dendritik karena adanya aktivasi sel T CD8⁺ dan peningkatan sel Tuntuk melawan antigen yang masuk (Tedder, 1995).

Pemberian Deksmetason terbukti menurunkan ekspresi *L-selectin* pada 8-16 jam setelah pemberian Deksmetason dan meningkat dalam kurun waktu 24 jam. Penurunan ini disebabkan karena Deksmetason mampu menghambat transkripsi gen *L-selectin* mRNA dengan jalan menghambat pengikatan faktor transkripsi Ap-1. Akan tetapi mekanisme peningkatan *L-selectin* setelah waktu tersebut tidak diketahui (Nakagawa, 2014).

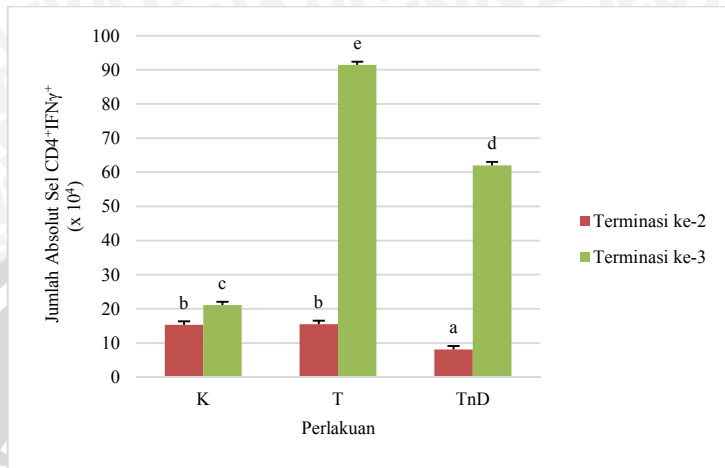
Peningkatan *L-selectin* setelah pemberian Deksmetason ini diduga mampu meningkatkan kemampuan adhesi *L-selectin* sehingga terbentuk sel T memori sentral (*T central memory cells*). Beberapa fraksi dari limfosit T yang diaktivasi oleh antigen akan berdiferensiasi menjadi sel T memori yang akan hidup lama. Sel T memori ini akan berada dalam jaringan limfoid, di mukosa dan dalam sirkulasi darah. Sel T memori tidak terus menerus memproduksi sitokin atau membunuh sel yang terinfeksi tetapi mampu melakukannya secara cepat apabila berjumpa antigen yang dikenali. Subset dari sel T memori yang dikenal sebagai sel T memori sentral berada di jaringan limfoid dan bertanggungjawab terhadap ekspansi klonal apabila mendapat serangan infeksi yang sama untuk kedua kalinya. Selain itu terdapat juga subset yang dikenal sebagai sel T memori efektor (*T effector memory cells*) yang berada pada jaringan mukosa. Untuk memperkuat pendugaan ini maka perlu dianalisis lebih lanjut melalui pengujian beberapa marker sel T memori sentral seperti CD122 dan CD44. Selain itu, peningkatan *L-selectin* ini juga diduga karena deksametason memiliki senyawa yang mampu memicu proliferasi *L-selectin*. Sedangkan untuk pendugaan ini perlu dilakukan analisis *staining* CFSE (*Carboxyfluorescein succinimidyl ester*) guna mengetahui laju proliferasi sel.



Gambar 4.2.3 Aktivasi *L-selectin* oleh antigen serta terbentuknya sel memori

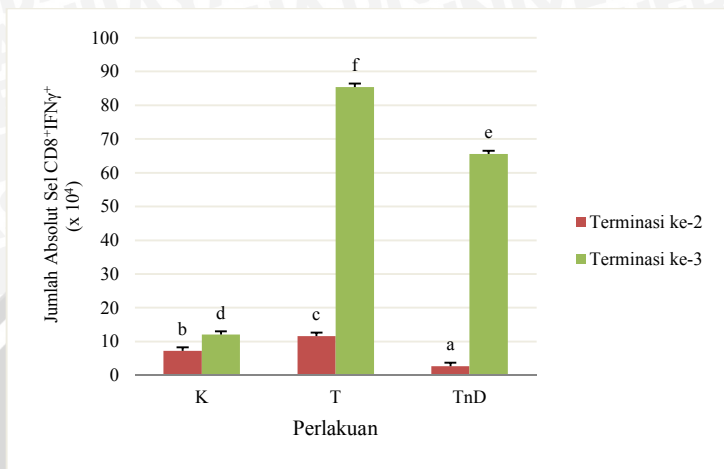
4.3 Analisa Jumlah Total Sel $CD4^+IFN-\gamma^+$ dan $CD8^+IFN-\gamma^+$ Menggunakan *Flow Cytometry*

Hasil analisis *flow cytometry* pada *spleen* (Gambar 4.3.1) menunjukkan bahwa dari seluruh total sel, diketahui jumlah sel $CD4^+IFN-\gamma^+$ pada perlakuan T meningkat signifikan sebesar 0,91 juta sel atau 0,67 % dibandingkan mencit sehat 0,21 juta sel atau 0,06 % dan menurun kembali pada perlakuan TnD (pemberian Rotavirus dan Deksametason) sebesar 0,62 juta sel atau 0,56 % pada terminasi ketiga (minggu ketiga). Hasil analisis jumlah sel $CD4^+IFN-\gamma^+$ pada minggu kedua menunjukkan bahwa jumlah sel tidak mengalami peningkatan atau penurunan pada perlakuan T jika dibandingkan dengan K yaitu 0,15 juta sel atau 0,13 % dan menurun pada perlakuan TnD 0,08 juta sel atau 0,28 % (Lampiran 12).



Gambar 4.3.1 Jumlah absolut sel $CD4^+IFN-\gamma^+$ (K = kontrol, T = perlakuan pemberian rotavirus, dan TnD = perlakuan pemberian Rotavirus dan deksametason).
Keterangan : Huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata berdasarkan uji Mann-Whitney

Hasil analisis *flow cytometry* pada *spleen* (Gambar 4.3.2) menunjukkan bahwa dari seluruh total sel, diketahui jumlah sel $CD8^+IFN-\gamma^+$ pada perlakuan T meningkat signifikan sebesar 0,85 juta sel atau 0,68 % dibandingkan mencit sehat 0,12 juta sel atau 0,1 % dan menurun kembali pada perlakuan TnD (pemberian Rotavirus dan Deksametason) sebesar 0,65 juta sel atau 0,72 % pada terminasi ketiga (minggu ketiga). Hasil analisis jumlah sel $CD8^+IFN-\gamma^+$ pada minggu kedua menunjukkan bahwa jumlah sel cenderung meningkat pada perlakuan T jika dibandingkan dengan K yaitu dari 0,07 juta sel atau 0,14 % menjadi 0,11 juta sel atau 0,77 % dan menurun pada perlakuan TnD 0,02 juta sel atau 0,19 % (Lampiran 13).



Gambar 4.3.2. Jumlah absolut sel CD8⁺IFN- γ ⁺ (K = kontrol, T = perlakuan pemberian rotavirus, dan TnD = perlakuan pemberian Rotavirus dan deksametason). Keterangan : Huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata berdasarkan uji Mann-Whitney

Pengaturan respon inflamasi dicirikan oleh peran antara efek pro-inflamasi (memulai sinyal) dan anti inflamasi (menghentikan sinyal) yang dimediasi oleh sejumlah sitokin. Sitokin merupakan protein *soluble* dengan berat molekul yang rendah yang diproduksi pada respon terhadap antigen dan bertindak sebagai mediator untuk mengatur sistem imunitas baik alamiah maupun adaptif. Sitokin merupakan messenger kimiawi dan termasuk diantaranya adalah *tumor necrosis factors*, interleukin, interferon, kemokin, dan faktor pertumbuhan. Peran sitokin sangatlah kompleks, satu sitokin dapat bertindak pada sejumlah tipe sel yang berbeda (*pleiotropic*), sitokin yang sama mengatur sejumlah fungsi yang berbeda (*multifunctional*) dan sejumlah sitokin yang berbeda dapat memiliki fungsi yang sama (*redundant*). Kesamaan tersebut dalam hal pemanfaatan komponen kunci pada jalur sinyal intraseluler. Interferon gamma (IFN- γ) merupakan salah satu sitokin pro-inflamasi yang mengatur *innate immunity*. Istilah interferon merupakan implikasi dari kemampuannya untuk mengganggu infeksi virus (menghambat replikasi virus). IFN- γ bekerja dengan meningkatkan ekspresi MHC kelas I untuk virus serta menstimulasi

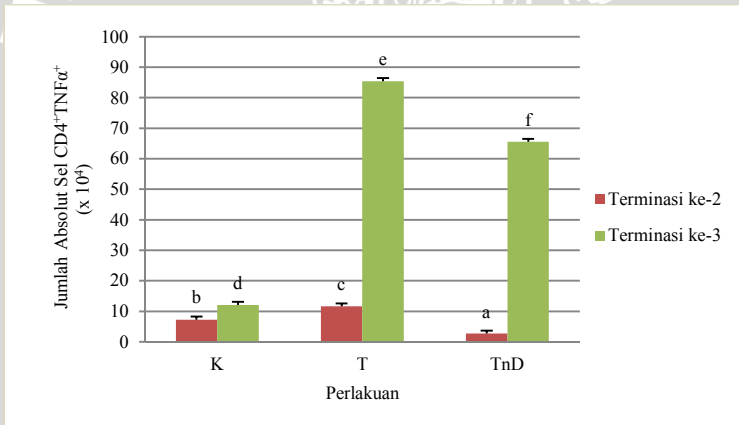
perkembangan T_{H1} yang selanjutnya dapat meningkatkan aktifitas sitolitik dari sel NK (*Natural Killer*) (Pimentel, 2010).

Baik jumlah sel absolut $CD4^+IFN-\gamma^+$ maupun $CD8^+IFN-\gamma^+$ pada mencit yang diberi perlakuan pemberian Rotavirus menunjukkan peningkatan secara signifikan pada minggu ketiga jika dibandingkan dengan perlakuan kontrol. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Jiang, dkk (2003) yang menyatakan bahwa viral protein dari Rotavirus mampu meningkatkan level sitokin IL-2, TNF- α , serta IFN- γ yang diambil dari serum pasien yang terkena infeksi Rotavirus akut jika dibandingkan dengan kontrol. Sebagai antiviral, IFN- γ mempunyai beberapa fungsi pertahanan. Pertama adalah menghambat replikasi virus dengan cara mengaktivasi selular gen yang mengakibatkan rusaknya mRNA dan terhambatnya translasi protein. Kedua yaitu dengan mengaktifkan sel *Natural Killer* (NK) yang akan membunuh virus penginfeksi sel. Ketiga yaitu dengan menginduksi aktivitas MHC (*Major Histocompatibility Complex*) kelas 1.

Baik pada minggu kedua maupun ketiga, Deksametason terbukti mampu menekan jumlah sitokin IFN- γ baik yang diproduksi oleh sel CD4 maupun sel CD8. Deksametason merupakan glukokortikoid sintetik dengan aktivitas immunosupresan dan anti-inflamasi. Sebagai immunosupresan, deksametason bekerja dengan menurunkan respon imun tubuh terhadap stimulasi rangsangan. Aktivitas anti-inflamasi deksametason dengan jalan menekan atau mencegah respon jaringan terhadap proses inflamasi dan menghambat akumulasi sel yang mengalami inflamasi, termasuk makrofag dan leukosit pada tempat inflamasi. Mekanisme kerja deksametason dengan inhibisi pelepasan asam arachidonat, modulasi substansi yang berasal dari metabolisme asam arachidonat, dan pengurangan jumlah 5-HT3 (5-hidroksitriptofan). Deksametason mempunyai efek antiemetik, diduga melalui mekanisme menghambat pelepasan prostaglandin secara sentral sehingga terjadi penurunan kadar 5-HT3 di sistem saraf pusat, menghambat pelepasan serotonin di saluran cerna sehingga tidak terjadi ikatan antara serotonin dengan reseptor 5-HT3, pelepasan endorphin, dan anti inflamasi yang kuat di daerah pembedahan dan diduga glukokortikoid mempunyai efek yang bervariasi pada susunan saraf pusat dan akan mempengaruhi regulasi dari neurotransmitter, densitas reseptor, transduksi sinyal dan konfigurasi neuron (Elenkof, 2004).

4.4 Analisa Jumlah Total Sel CD4⁺TNF- α ⁺ dan CD8⁺TNF- α ⁺ Menggunakan *Flow Cytometry*

Hasil analisis *flow cytometry* pada *spleen* (Gambar 4.4.1) menunjukkan bahwa dari seluruh total sel, diketahui jumlah sel CD4⁺TNF α ⁺ pada perlakuan T meningkat signifikan sebesar 0,47 juta sel atau 0,04 % dibandingkan mencit sehat 0,16 juta sel atau 0,04 % dan menurun kembali pada perlakuan TnD (pemberian Rotavirus dan Deksametason) sebesar 0,21 juta sel atau 0,04 % pada terminasi ketiga (minggu ketiga). Hasil analisis jumlah sel CD4⁺TNF α ⁺ pada minggu kedua menunjukkan bahwa jumlah sel cenderung menurun pada perlakuan T jika dibandingkan dengan K yaitu dari 0,17 juta sel atau 0,02 % menjadi 0,10 juta sel atau 0,01 % dan menurun pada perlakuan TnD 0,07 juta sel atau 0,03 % (Lampiran 14).

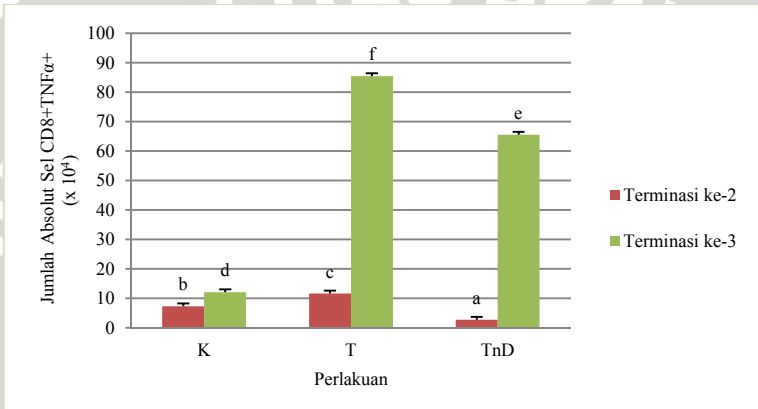


Gambar 4.4.1 Jumlah absolut sel CD4⁺TNF α ⁺ (K = kontrol, T = perlakuan pemberian Rotavirus, dan TnD = perlakuan pemberian Rotavirus dan deksametason)

Keterangan : Huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata berdasarkan uji Mann-Whitney

Hasil analisis *flow cytometry* pada *spleen* (Gambar 4.4.2) menunjukkan bahwa dari seluruh total sel, diketahui jumlah sel CD4⁺TNF α ⁺ pada perlakuan T meningkat signifikan sebesar 0,31 juta sel atau 0,85% dibandingkan mencit sehat 0,13 juta sel atau 0,9 % dan

menurun kembali pada perlakuan TnD (pemberian Rotavirus dan Deksametason) sebesar 0,25 juta sel atau 0,79 % pada terminasi ketiga (minggu ketiga). Hasil analisis jumlah sel CD4⁺TNFα⁺ pada minggu kedua menunjukkan bahwa jumlah sel cenderung menurun pada perlakuan T jika dibandingkan dengan K yaitu dari 0,10 juta sel atau 0,05 % menjadi 0,08 juta sel atau 0,08 % dan cenderung meningkat secara tidak signifikan (p>0,05) pada perlakuan TnD 0,08 juta sel atau 0,2 % (Lampiran 15).

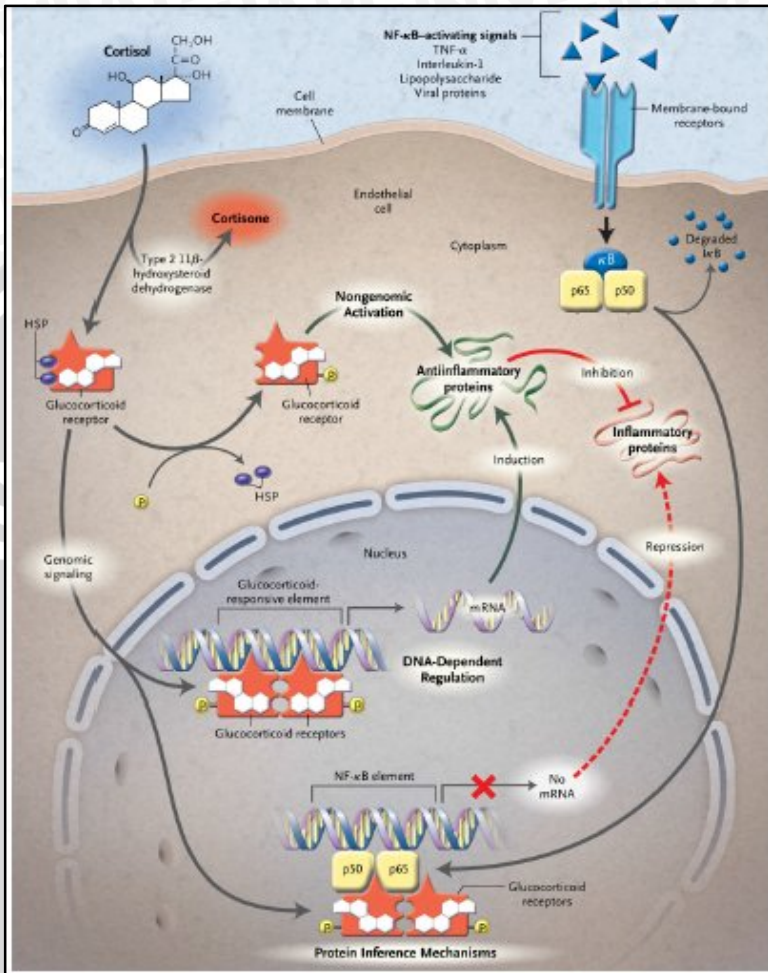


Gambar 4.4.2 Jumlah absolut sel CD8⁺TNF-α⁺ (K = kontrol, T = perlakuan pemberian Rotavirus, dan TnD = perlakuan pemberian Rotavirus dan deksametason)
Keterangan : Huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata berdasarkan uji Mann-Whitney

Sitokin merupakan suatu protein yang disekresikan oleh sel-sel imun yang memediasi beberapa fungsi dari sel tersebut dalam regulasi sistem imun dan respon terhadap inflamasi. Sitokin juga diproduksi sebagai respon terhadap mikroba dan antigen lain. Sitokin ini bertindak baik sebagai faktor pertumbuhan dan diferensiasi stem sel maupun aktivasi sel imun untuk mengeliminasi antigen (Abbas dan Lichtman, 2005). Berbagai jenis sitokin diantaranya adalah kelompok TNF (*Tumor Necrosis Factor*), TGF (*Tumor Growth Factor*), Interferon, Interleukin, dan CSF (*Colony Stimulating Factor*) (Dalhousie University, 2008).

Baik jumlah sel absolut $CD4^+TNF\alpha^+$ maupun $CD8^+TNF\alpha^+$ pada mencit yang diberi perlakuan pemberian Rotavirus menunjukkan peningkatan secara signifikan pada minggu ketiga jika dibandingkan dengan perlakuan kontrol. TNF merupakan sitokin utamapada respons inflamasi akut. Infeksi yang berat dapat memicu produksi TNF dalam jumlah besar yang menimbulkan reaksi sistemik. TNF disebut TNF- α atas dasar historis dan untuk membedakannya dari TNF- β atau limfotoksin (Baratawidjaja, 2006). TNF- α dan - β secara struktur berhubungan, mengikat reseptor seluler yang sama, dan menghasilkan perubahan biologi yang mirip pada berbagai sel. TNF- α diproduksi oleh neutrofil, limfosit yang diaktifkan, makrofag sel NK, dan beberapa sel non limfoid seperti astrosit, sel endotel dan sel otot polos, sementara TNF- β nampaknya hanya diproduksi oleh sel T (Detrick dkk., 2002). LPS merupakan rangsangan poten untuk mensekresi TNF. IFN- γ yang diproduksi oleh sel T dan sel NK juga merangsang makrofag antara lain meningkatkan sintesis TNF. Pada kadar rendah, TNF bekerja terhadap leukosit dan endotel, menginduksi inflamasi akut. Pada kadar sedang, TNF berperan dalam inflamasi sistemik. Pada kadar tinggi, TNF menimbulkan kelainan patologik syok septik.

Berdasarkan gambar 4.4.1 serta gambar 4.4.2, baik pada terminasi minggu kedua maupun minggu ketiga, deksametason terbukti mampu menekan jumlah sitokin TNF- α baik yang diproduksi oleh sel CD4 maupun sel CD8. Deksametason merupakan salah satu kortikosteroid sintetis yang paling efektif. Kemampuannya dalam menanggulangi peradangan dan alergi kurang lebih sepuluh kali lebih hebat dari pada yang dimiliki prednison (Katzung, 2002). Deksametason mampu bekerja melalui jalur genomik dan non-genomik. Melalui jalur genomik, deksametason akan berikatan dengan reseptor glukokortikoid dan membentuk kompleks dengan faktor transkripsi NF κ B untuk melakukan *blocking* aktivitas transkripsi sitokin proinflamasi. Sedangkan pada jalur nongenomik, deksametason bekerja melalui *membrane-associated receptor* dan aktivitas *second messenger* untuk menghasilkan protein antiinflamatori sehingga mampu menghambat produksi sitokin proinflamasi (Gambar 5).

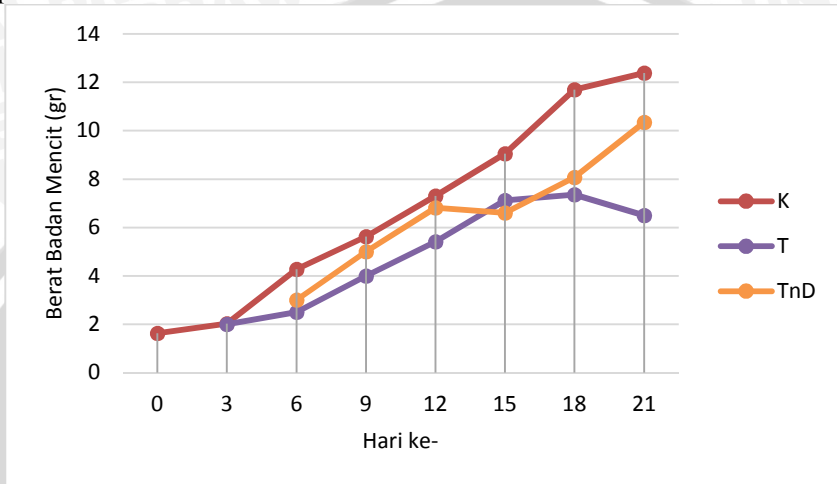


(Rhen, 2005)

Gambar 5. Aktivitas glukokortikoid dalam menghambat peradangan

Kondisi klinis mencit yang mengalami *kolestasis* dapat ditandai dengan adanya ikterus (warna kekuningan) pada kulit yang tidak memiliki rambut, berat badan sulit naik, dan kotoran pucat (akholis). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, tanda yang dapat diamati pada mencit setelah diinjeksi Rotavirus secara subkutan adalah berat badan mencit yang cenderung sulit naik (lebih rendah) bila

dibandingkan mencit sehat (normal). Berikut adalah grafik yang membandingkan perbedaan rata-rata berat badan mencit pada tiap perlakuan.



Gambar 6. Perbedaan rata-rata berat badan mencit pada masing-masing kelompok perlakuan dari hari ke-0 sampai hari ke-21 (K = kontrol, T = perlakuan pemberian Rotavirus, dan TnD = perlakuan pemberian Rotavirus dan deksametason)

Hasil analisa perbedaan berat badan mencit (Gambar 5) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan berat badan mencit antara perlakuan kontrol (K), perlakuan pemberian Rotavirus (T), dan perlakuan pemberian Rotavirus dengan Deksametason (TnD). Berat badan mencit kontrol (K) merupakan berat badan mencit normal karena pada kelompok ini mencit tidak diberi perlakuan apapun. Sedangkan pada perlakuan T, berat badan mencit terbukti lebih rendah daripada mencit pada kelompok K pada hari ke-0 sampai hari ke-21. Rata-rata berat badan mencit pada kelompok perlakuan TnD terbukti lebih tinggi daripada kelompok perlakuan T akan tetapi jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan K maka berat badan mencit pada kelompok ini sedikit lebih rendah. Hal ini dapat membuktikan bahwa dengan adanya pemberian Deksametason dapat menekan adanya efek kolangitis pada mencit yang disebabkan oleh adanya infeksi virus.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Injeksi RRV (Rotavirus Rhesus) secara subkutan pada mencit Balb/c usia <24 jam terbukti mampu menstimulasi produksi sel-sel imunokompeten terutama pada terminasi minggu ketiga. Hal ini dapat dibuktikan dengan adanya peningkatan sel CD4, CD8, dan sitokin proinflamasi seperti IFN- γ dan TNF- α serta penurunan aktivitas sel CD62L.
2. Deksametason terbukti mampu meregulasi aktivitas sel-sel imunokompeten karena memiliki berbagai sifat antiinflamasi dan imunomodulator yang berpotensi menghambat laju migrasi limfosit dan makrofag ke dalam jaringan yang mengalami inflamasi. Hal ini dapat dibuktikan dengan adanya penurunan jumlah sel CD4, CD8 dan sitokin proinflamasi seperti IFN- γ dan TNF- α serta peningkatan aktivitas sel CD62L terutama pada terminasi minggu ketiga. Peningkatan sel CD62L setelah pemberian deksametason diyakini mampu meningkatkan kemampuan adhesi *L-selectin* sehingga terbentuk sel T memori sentral (*T central memory cells*).

5.2 Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya adalah :

1. Sangat disarankan untuk mengamati perkembangan sel T regulator (sel T CD4⁺CD25⁺) pasca injeksi virus serta pasca injeksi deksametason.
2. Untuk memperkuat pendugaan terbentuknya sel T memori sentral dari aktivasi *L-selectin*, maka perlu dianalisis lebih lanjut melalui pengujian beberapa marker sel T memori sentral seperti CD122 dan CD44.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A. K., dan Lichtman, A. H. 2005. **Cellular and Molecular Immunology, Edisi Kelima**. Elsevier. Philadelphia.
- Alcon Laboratories. 2008. Dexamethasone. <http://www.drugs.com/search.php?searchterm=dexamethasone>. Tanggal akses 24 Mei 2014.
- Al-Masri AN, Flemming P, Rodeck B, et al. 2006. Expression of the interferon-induced Mx proteins in biliary atresia. *J. Pediatr. Surg*; 41:1139–1143.
- Balistreri, W.F., et al. 1996. Biliary atresia: current concepts and research directions. *Summary of a symposium*. Hepatology. 23:1682–1692
- Castillo L., Chernwo B. 1993. **Endocrine Disorders, Adrenal Cortex Physiology**. In Holbrook PR Ed. Textbook of Critical Care. WB Saunders, Philadelphia.
- Chantal Jayat dan Marie Ratinaud. 1997. Cell cycle analysis by flow cytometry: Principles and applications. *Biol Cell*. 78, 15-25
- Davenport M, Gonde C, Redkar R, et al. 2001. Immunohistochemistry of the liver and biliary tree in extrahepatic biliary atresia. *J Pediatr Surg*; 36(7):1017–25.
- Davenport M, Savage M, Mowat AP, et al. 1993. Biliary atresia splenic malformation syndrome: an etiologic and prognostic subgroup. *Surgery*; 113:662–68.
- Dalhousie University. 2008. Cytokines. <http://immunology.medicine.dal.ca/education/Immunity.htm>. Tanggal akses 11 November 2008.
- Detrick, B.,Nagineni, C.N., and J.J. Hooks. 2002. Transforming growth factor-beta in human retinal pigment epithelial cell is enhanced by *Toxoplasma gondii* : a possible role in the immunopathogenesis of retinochoroiditis. *Clin. Exp. Immun.* 128 (2): 372-378.
- de Carvalho E., Cláudia A. P I., Jorge A. B. 2007. Extrahepatic biliary atresia: current concepts and future directions. *Jornal de Pediatria*. 83(2):105-120
- Elenkov IJ. 2004. Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance. *Ann N Y Acad Sci*; 1024:138-46.

- Escobar MA, Jay CL, Brooks RM. 2006. Effect of corticosteroid therapy on outcomes in biliary atresia after Kasai portoenterostomy. *J Pediatr Surg*; 41(1):99–103.
- Hsieh CS, Huang CC, Huang LT. 2004. Glucocorticoid treatment down-regulates chemokine expression of bacterial cholangitis in cholestatic rats. *J Pediatr Surg*; 39(1):10–5.
- Jiang B., L. Snipes Magaldi, P. Dennehy, H. Keyserling. 2003. Cytokines as Mediators for or Effectors against Rotavirus Disease in Children. *Clin Diag Lab Immunol*; 10(6): 995-1001.
- Karrer FM, Lilly JR. 1985. Corticosteroid therapy in biliary atresia. *J Pediatr Surg*; 20(6):693–5.
- Katzung, Bertam G. 2002. **Farmakologi Dasar dan Klinik Buku 2 Ed.8.** Salemba Medika Glance. Jakarta.
- Landing BH. 1974. Considerations of the pathogenesis of neonatal hepatitis, biliary atresia and choledochal cyst—the concept of infantile obstructive cholangiopathy. *Prog. Pediatr. Surg*; 6:113–39.
- Lingga, Narke N. 2010. Hemositometer. <http://www.scribd.com/doc/41015759/Hemositometer>. Tanggal akses 05 Desember 2011.
- Lippi C, Chrousos GP. 1992. **Glucocorticoids.** In Yaffe SJ, Aranda JV eds. *Pediatric Pharmacology, Therapeutic Principles in Practice.* WB Saunders, Philadelphia: 466 – 75
- Mack CL, Falta MT, Sullivan AK. 2007. Oligoclonal expansions of CD4+ and CD8+ T-cells in the target organ of patients with biliary atresia. *Gastroenterology*; 133:278–87.
- Mack CL, Sokol RJ. 2005. Unraveling the pathogenesis and etiology of biliary atresia. *Pediatr Res*; 57(pt 2):87R–94R.
- Mack CL, Tucker RM, Sokol RJ. 2005. Armed CD4+ Th1 effector cells and activated macrophages participate in bile duct injury in murine biliary atresia. *Clin Immunol*; 115:200-9.
- Moyer K, Kaimal V, Pacheco C. 2010. Staging of biliary atresia at diagnosis by molecular profiling of the liver. *Genome Med*; 2:33.
- Muraji T, Nio M, Ohhama Y. 2004. Postoperative corticosteroid therapy for bile drainage in biliary atresia—a nationwide survey. *J Pediatr Surg*; 39:1803-5.
- Middleton, E., Kandaswami C., Theoharides TC. 2000. The effect of plant flavonoids on mammalian cells implications for

- inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacological review*. 52 (4):673-751.
- Ohi R. 2001. Surgery for biliary atresia. *Liver*; 21(3):175–82.
- Oldstone MB. 2005. Molecular and cellular mechanisms, pathogenesis, and treatment of insulin-dependent diabetes obtained through study of a transgenic model of molecular mimicry. *Curr Top Microbiol Immunol*;296:65–87.
- Pimentel , J.A.A. 2010. Role of Alergen-Spesific CD8⁺ T Cells in the Murine Asthma Model. Munchen University.
- Petersen C, Kuske M, Bruns E, et al. 1998. Progress in developing animal models for biliary atresia. *Eur J Pediatr Surg*; 8:137-41.
- Raffler, N.A., Jesus, R.N., Klaus, L. 2005. L-Selectin in Inflammation, Infection and Immunity. *Drug Discovery Today*; 2(3):213-220.
- Rafael Nunez. 2001. DNA Measurement and Cell Cycle Analysis by Flow Cytometry. *Curr. Issues Mol. Biol.* 3(3): 67-70.
- Rhen, T., dan Cidlowski, J.A. 2005. Antiinflammatory of Glucocorticoids:New Mechanism for Old Drug. *N Engl J Med*. 353:1711-23
- Rifa'i, M. 2012. *Imunologi dan Bioregulator Edisi Pertama*. Galaxy Sciences. Malang
- Rifa'i, M., Y. Kawamoto, I. Nakashima, H. Suzuki. 2004. Essential roles of CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells in the maintenance of T cell homeostasis. *The Journal of experimental medicine*. 200(9):1123-1124
- Rodriguez ZM, Goveia MG, Stek JE. 2007. Concomitant use of an oral live pentavalent human-bovine reassortant rotavirus vaccine with licensed parenteral pediatric vaccines in the United States. *Pediatr Infect Dis Journal*. 26 : 221-7.
- Roitt I., Jonathan B, David M.1989. **Immunology**. Second ed. New York: Harper&Row Publishers Inc.
- Saxena V, Shivakumar P, Sabla GE. 2009. Dendritic cells regulate injury of bile duct epithelium by activation of NK cells in experimental biliary atresia. *Hepatology*. 50 : 350
- Schreiber RA, Kleinman RE. 1993. Genetics, immunology, and biliary atresia: an opening or a diversion? *J Pediatr Gastroenterol Nutr*; 16(2) : 111–3.
- Schreiber RA, Kleinman RE. 2002. Biliary atresia. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr*; 35(Suppl. 1):S11–6.

- Shivakumar P, Campbell KM, Sabla GE. 2004. Obstruction of extrahepatic bile ducts by lymphocytosis regulated by IFN-gamma in experimental biliary atresia. *J. Clin. Invest*; 114:322–9.
- Sodikin. 2007. **Asuhan Keperawatan Gangguan Sistem Gastrointestinal Dan Hepatobilier**. Salemba Medika.
- Sokol RJ, Mack C, Narkewicz MR. 2003. Pathogenesis and outcome of biliary atresia: current concepts. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr*; 37:4–21.
- Sokol RJ, Mack C. 2001. Etiopathogenesis of biliary atresia. *Semin Liver Dis*; 21(4):517–24.
- Sokol RJ. 2003. New North American research network focuses on biliary atresia and neonatal liver disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*;36:1.
- Tedder, T.F., D.A. Steeber, A. Chen, dan P. Engel. 1995. The Selectins : Vascular Adhesion Molecules. *FASEB J*. 9, 866-873.
- Tucker RM, Hendrickson RJ, Mukaida N. 2007. Progressive biliary destruction is independent of a functional tumor necrosis factor-alpha pathway in a rhesus rotavirus-induced murine model of biliary atresia. *Viral Immunol*; 20:34–43.
- Vesikari T, Matson DO, Dennehy P. 2006. Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *N Engl J Med*;354:23-33.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Kelayakan Etik



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
THE MINISTRY OF EDUCATION AND CULTURE
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MEDICAL FACULTY BRAWIJAYA UNIVERSITY
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN
THE ETHICAL COMMITTEE MEDICAL RESEARCH
Jalan Veteran - Malang - 65145

Telp. (0341) 561611 Pes. 213 214; 569117, 567192 - Fax. (62) (0341) 584755

KETERANGAN KELAIKAN ETIK ("ETHICAL CLEARANCE")

No. 331/EC/KEPK-S3/11/2012

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA, SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIJUSUKAN, DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN

JUDUL : Manfaat dan Pengaruh Perbedaan Waktu Pemberian Kortikosteroid Terhadap Jumlah Sel Pengekspresi CD 56, CD 56 TLR, NFKB, CD 4, CD 8, ANCA, Fibrosis dan Penyumbatan Saluran Empedu Pada Hewan Coba Allosia Bilini (efluksi perubahan respon imun innate, perubahan innate ke adaptif non self, adaptif non self dan adaptif self)

PENELITI UTAMA : dr. Dagus Setyobudi, SpA (K)

UNIT / LEMBAGA : Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

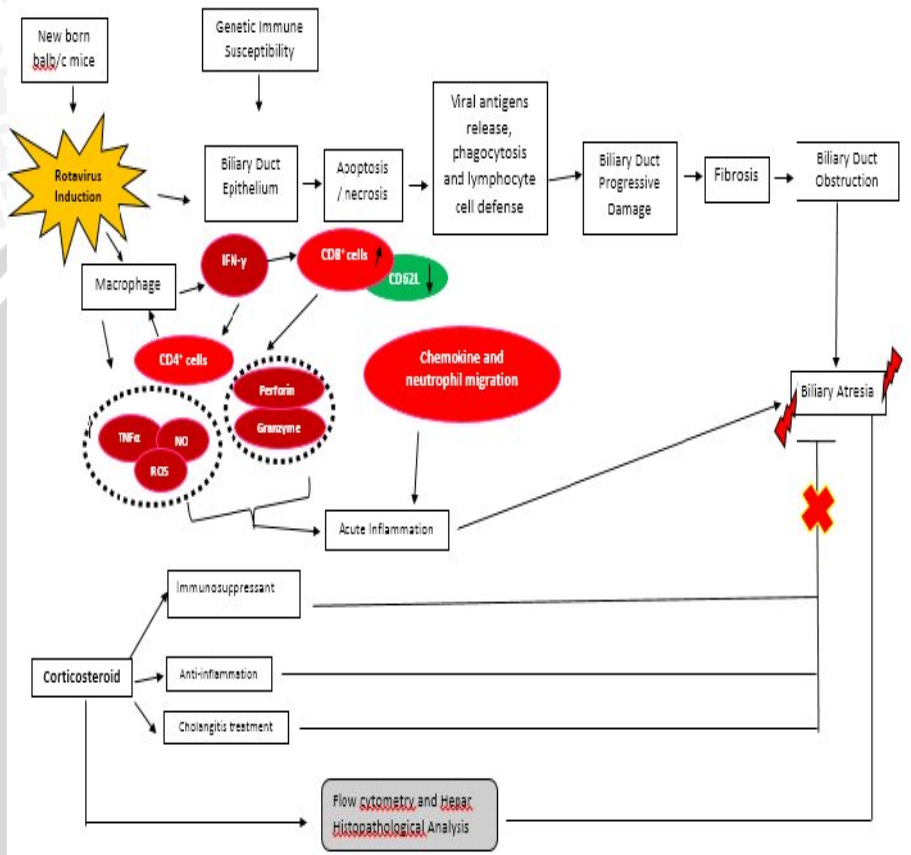
ILMIAH PENELITIAN : Laboratorium Biomolekuler dan Laboratorium Diomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

DINYATAKAN LAIK ETIK

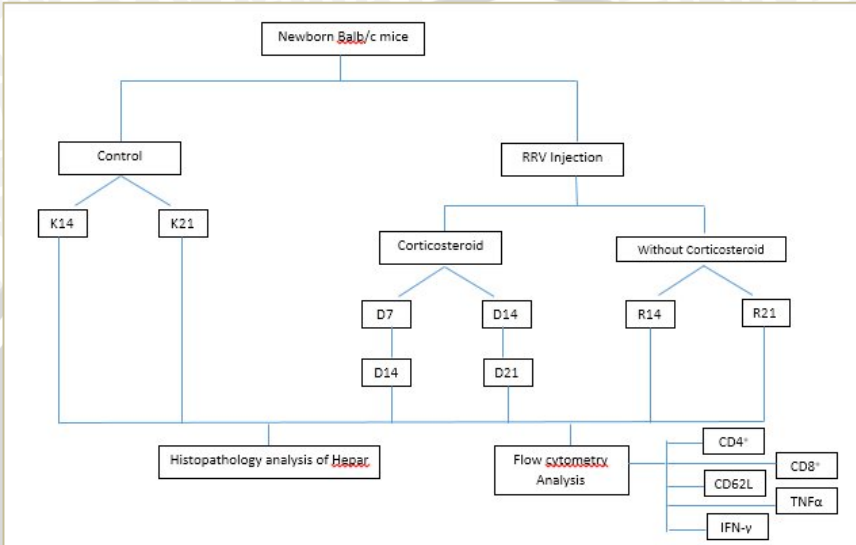


Prof. Dr. dr. Moch. Istiaqid ES, SpS, SpBS, M.Hum

Lampiran 2. Kerangka Konsep Penelitian



Lampiran 3. Kerangka Operasional Penelitian



Keterangan :

Mencit Balb/c	Kontrol	K ₁₄	Tanpa injeksi RRV dan terminasi hari ke-14
		K ₂₁	Tanpa injeksi RRV dan terminasi hari ke-21
	RRV	R ₁₄	Injeksi RRV hari ke-1 dan terminasi hari ke-14
		R ₂₁	Injeksi RRV hari ke-1 dan terminasi hari ke-21
	RRV + Deksametason	D ₁₄	Injeksi RRV hari ke-1, injeksi deksametason hari ke-7 sampai hari ke-14 dan terminasi hari ke-14
		D ₂₁	Injeksi RRV hari ke-1, injeksi deksametason hari ke-14 sampai hari ke-21 dan terminasi hari ke-21

Lampiran 4. Komposisi Larutan

Tabel LT4.1 Komposisi Bahan *Phosphate Buffer Saline* (PBS)

No.	Nama Bahan	Jumlah
1.	NaCl	3,8 gram
2.	Na ₂ HPO ₄	0,55 gram
3.	NaH ₂ PO ₄	0,35 gram
4.	Akuades	Sampai 1 liter

Tabel LT4.2 Komposisi Bahan *Paraformaldehyde* 4%

No.	Nama Bahan	Jumlah
1.	PFA	4 gram
2.	PBS	150 ml
3.	NaOH	

Tabel LT4.3 Komposisi Bahan *Cytofix/Cytoperm*

No.	Nama Bahan	Konsentrasi
1.	<i>Dimethyl sulfoxide</i>	99,9 %
2.	Brefeldin A	0,1 %

Tabel LT4.4 Komposisi Bahan *Washperm*

No.	Nama Bahan	Konsentrasi
1.	<i>Phosphat Buffer Saline</i>	-
2.	<i>Paraformaldehyde</i>	-
2.	<i>Fetal Calf Serum</i>	1 %
3.	<i>Sodium Azide</i>	0,1 %
4.	Saponin	0,1 %

Lampiran 5. Isolasi Sel Limfosit dari Organ *Spleen*

Mencit

- Dimasukkan dalam botol selai yang berisi kapas dan 3-4 tetes dietil eter

Mencit tak sadar

- Disemprot dengan alkohol 70%
- Dibedah pada bagian ventral
- Diisolasi *spleen*

Spleen

- Dicuci PBS 2 kali dan dibersihkan dari lemak
- Dipencet searah jarum jam dengan menggunakan pangkal spuit
- Disaring dengan menggunakan *wire*

Homogenat

- Dimasukkan dalam tabung propilen 15 ml
- Ditambah PBS sampai volume 10 mL
- Disentrifugasi pada kecepatan 2500 rpm, 4°C selama 5 menit.

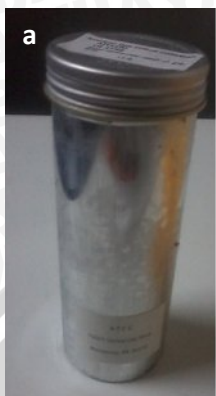
Supernatan

- Dibuang

Pellet

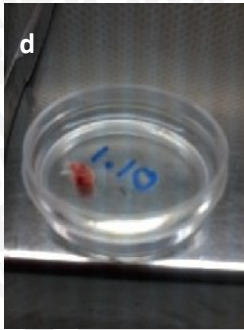
- Diambil dan diresuspensi dengan PBS 1 ml
- Dipipeting

Sel Limfosit



Gambar LG5.1 Rhesus Rotavirus (a) dan (b) di dalam botol besi(c) di dalam ampule volume 1 mL





Gambar LG5.2 Tahapan Isolasi Sel Limfosit dari Organ *Spleen* (a) Pembusuan mencit dengan dietil eter (b) Mencit tak sadar (c) Isolasi *spleen* (d) Organ *spleen* di atas *petridisk* (e) Penggerusan organ *spleen* dengan pangkal spuit(f) Penyaringan hasil gerusan dengan *wire*

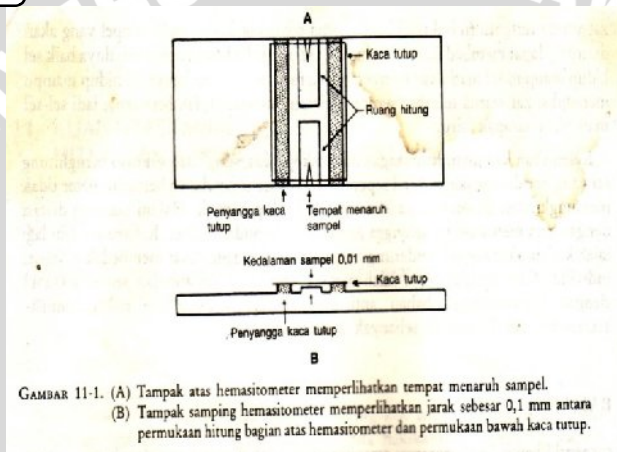


Lampiran 6. Penghitungan Sel dengan Hemositometer

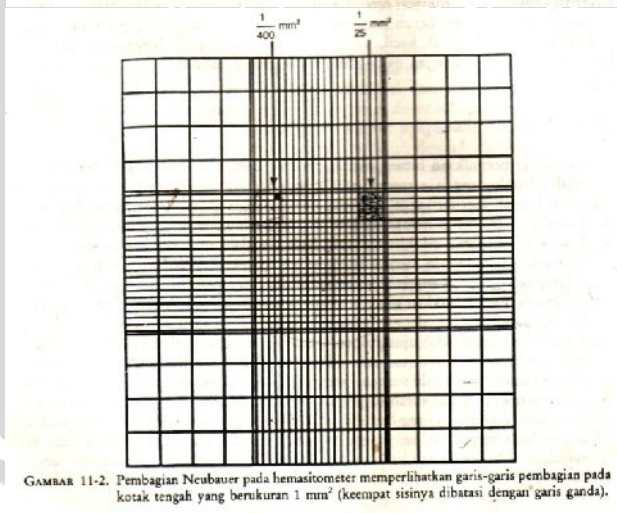
Sel limfosit dalam 1 mL PBS

- Diambil sebanyak 20 μl
- Ditambahkan 80 μl Evans Blue
- Dihitung dengan Hemositometer di 5 bidang pandang menggunakan mikroskop

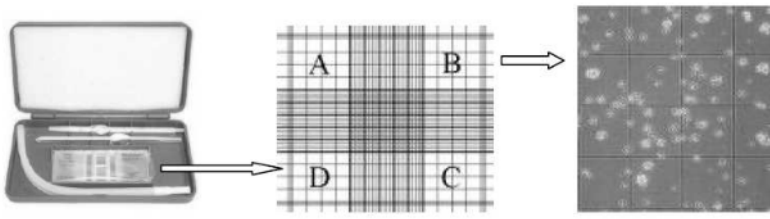
Hasil



GAMBAR 11-1. (A) Tampak atas hemositometer memperlihatkan tempat menaruh sampel. (B) Tampak samping hemositometer memperlihatkan jarak sebesar 0,1 mm antara permukaan hitung bagian atas hemositometer dan permukaan bawah kaca tutup.



GAMBAR 11-2. Pembagian Neubauer pada hemositometer memperlihatkan garis-garis pembagian pada kotak tengah yang berukuran 1 mm^2 (keempat sisinya dibatasi dengan garis ganda).



(Lingga, 2010)

Gambar LG6.1 Ruang Hitung Hemasitometer

Lampiran 7. Pewarnaan Immunostaining

7.1 Intracellular Staining

Sel limfosit dalam 1 mL PBS

- Diambil 350 μL dalam mikrotub
- Ditambah 500 μL PBS
- Disentrifugasi 2500 rpm, 4°C selama 5 menit

Supernatan

- Dibuang

Pellet

- Diambil dan diresuspensi dengan 100 μL *Cytofix*
- Diinkubasi pada suhu 4°C selama 20 menit
- Ditambah 1 mL *Washperm* (*Wash Permeability*) 1x
- Disentrifugasi 2500 rpm, 4°C selama 5 menit

Supernatan

- Dibuang

Pellet

- Ditambah 50 μL antibodi
- Ditambah 200 μL PBS

Running *Flowcytometry*

7.2 Extracellular Staining

Sel limfosit dalam 1 mL PBS

- ▶ Diambil 350 μ L dalam mikrotub
- ▶ Ditambah 500 μ L PBS
- ▶ Disentrifugasi 2500 rpm, 4^oC selama 5 menit

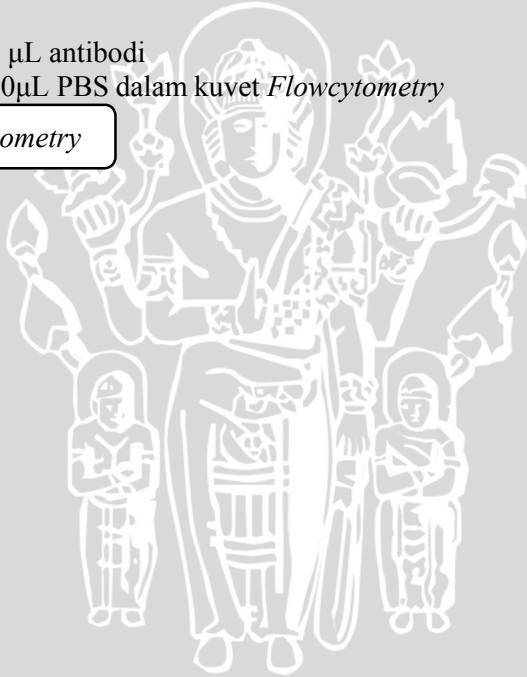
Supernatan

- ▶ Dibuang

Pellet

- ▶ Ditambah 50 μ L antibodi
- ▶ Ditambah 350 μ L PBS dalam kuvet *Flowcytometry*

Running *Flowcytometry*



Lampiran 8. Hasil Analisis Kruskal-Wallis Uji Lanjut Mann-Whitney Jumlah Absolut Sel T CD4⁺ pada Organ *Spleen* Menggunakan *Software* SPSS 16.0 for *Windows*

Tabel LT8.1 Hasil Uji Kruskal-Wallis Jumlah Absolut Sel T CD4⁺

Ranks			
	Perlakuan	N	Mean Rank
CD4.2	K	4	6.50
	T	4	10.50
	TnD	4	2.50
	Total	12	
CD4.3	K	4	2.50
	T	4	10.50
	TnD	4	6.50
	Total	12	

Test Statistics ^{a,b}	
	CD4.2
Chi-Square	9.846
df	2
Asymp. Sig.	.007

a. Kruskal Wallis Test
b. Grouping Variable: Perlakuan

Test Statistics ^{a,b}	
	CD4.3
Chi-Square	9.846
df	2
Asymp. Sig.	.007

a. Kruskal Wallis Test
b. Grouping Variable: Perlakuan

Tabel LT8.2 Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan K dan T

Test Statistics ^b	
	CD4.2
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

Test Statistics ^b	
	CD4.3
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

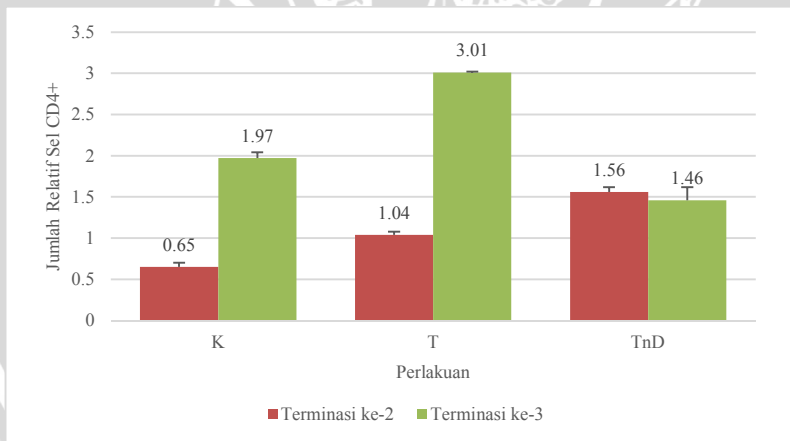
a. Not corrected for ties.
b. Grouping Variable: Perlakuan

Tabel LT8.3 Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan K dan TnD

Test Statistics ^a		Test Statistics ^a	
	CD4.2		CD4.3
Mann-Whitney U	.000	Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000	Wilcoxon W	10.000
Z	-2.308	Z	-2.308
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021	Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [Z*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a	Exact Sig. [Z*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a
a. Not corrected for ties.		a. Not corrected for ties.	
b. Grouping Variable: Perlakuan		b. Grouping Variable: Perlakuan	

Tabel LT8.4 Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan T dan TnD

Test Statistics ^a		Test Statistics ^a	
	CD4.2		CD4.3
Mann-Whitney U	.000	Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000	Wilcoxon W	10.000
Z	-2.308	Z	-2.308
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021	Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [Z*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a	Exact Sig. [Z*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a
a. Not corrected for ties.		a. Not corrected for ties.	
b. Grouping Variable: Perlakuan		b. Grouping Variable: Perlakuan	



Gambar LG 8.1 Jumlah Relatif Sel T CD4⁺ (K = Kontrol, T = Perlakuan Pemberian Rotavirus, dan TnD = Perlakuan Pemberian Rotavirus dan Deksametason)

Lampiran 9. Hasil Analisis Kruskal-Wallis Uji Lanjut Mann-Whitney Jumlah Absolut Sel T CD8⁺ Pada Organ *Spleen* Menggunakan *Software* SPSS 16.0 for *Windows*

Tabel LT9.1 Hasil Uji Kruskal-Wallis Jumlah Absolut Sel T CD8⁺

Ranks			
	Perlakuan	N	Mean Rank
CD8.2	K	4	2.50
	T	4	10.50
	TnD	4	6.50
	Total	12	
CD8.3	K	4	2.50
	T	4	10.50
	TnD	4	6.50
	Total	12	

Test Statistics ^{a,b}	
	CD8.2
Chi-Square	9.846
df	2
Asymp. Sig.	.007

a. Kruskal Wallis Test
b. Grouping Variable: Perlakuan

Test Statistics ^{a,b}	
	CD8.3
Chi-Square	9.846
df	2
Asymp. Sig.	.007

a. Kruskal Wallis Test
b. Grouping Variable: Perlakuan

Tabel LT9.2 Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan K dan T

Test Statistics ^b		
	CD8.2	CD8.3
Mann-Whitney U	.000	.000
Wilcoxon W	10.000	10.000
Z	-2.309	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a	.029 ^a

a. Not corrected for ties.
b. Grouping Variable: Perlakuan

Tabel LT9.3 Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan K dan TnD

	CD8.2	CD8.3
Mann-Whitney U	.000	.000
Wilcoxon W	10.000	10.000
Z	-2.309	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

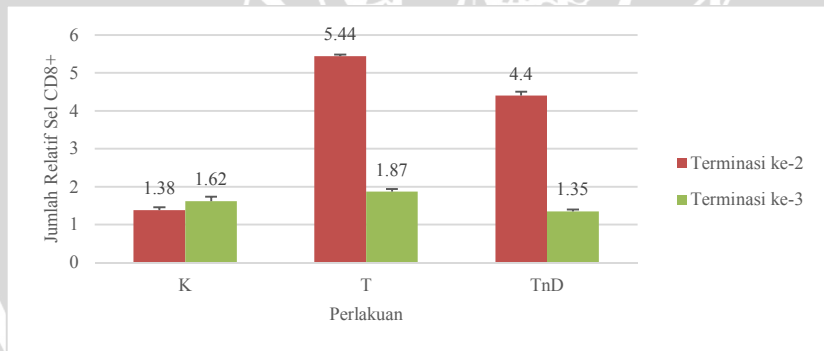
b. Grouping Variable: Perlakuan

Tabel LT9.4 Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan T dan TnD

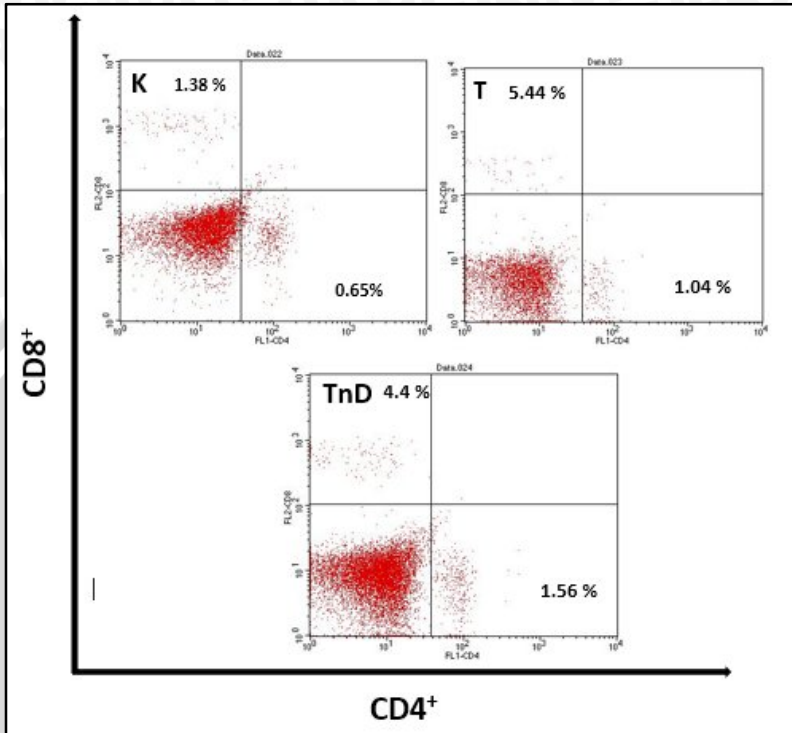
	CD8.2	CD8.3
Mann-Whitney U	.000	.000
Wilcoxon W	10.000	10.000
Z	-2.309	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

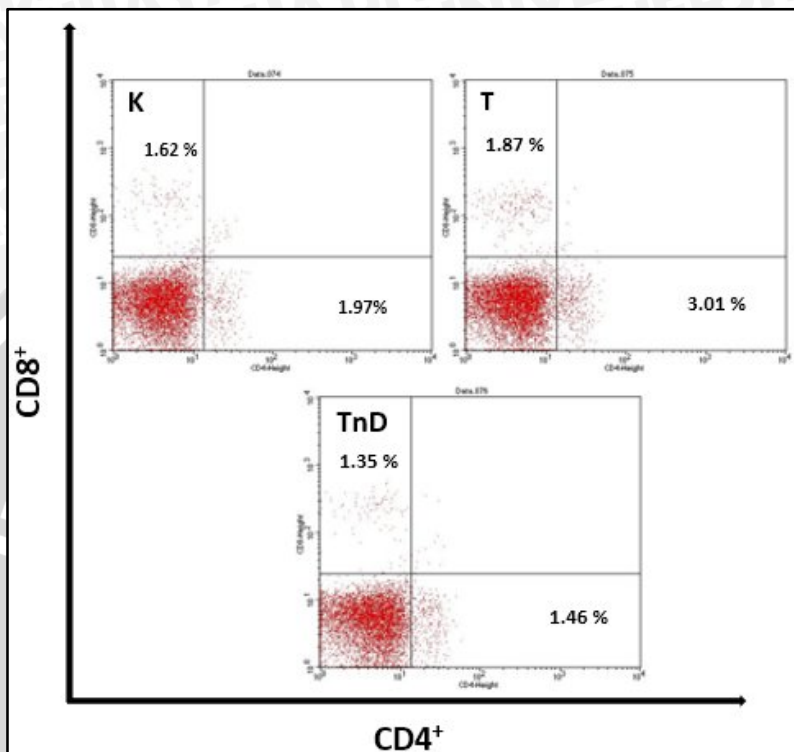
b. Grouping Variable: Perlakuan



Gambar LG9.1 Jumlah Relatif Sel T CD8⁺ (K = Kontrol, T = Perlakuan Pemberian Rotavirus, dan TnD = Perlakuan Pemberian Rotavirus dan Deksametason)



Gambar LG9.2 Persentase Jumlah Relatif Sel CD4⁺ dan CD8⁺ pada Terminasi Minggu ke-2 (K = Kontrol, T = Perlakuan Pemberian Rotavirus, dan TnD = Perlakuan Pemberian Rotavirus dan Deksametason)



Gambar LG9.3 Persentase Jumlah Relatif Sel CD4⁺ dan CD8⁺ pada Terminasi Minggu ke-3 (K = Kontrol, T = Perlakuan Pemberian Rotavirus, dan TnD = Perlakuan Pemberian Rotavirus dan Deksametason)

Lampiran 10. Hasil Analisis Kruskal-Wallis Uji Lanjut Mann-Whitney HSD Jumlah Absolut Sel T CD4⁺CD62L⁺ pada Organ *Spleen* Menggunakan *Software* SPSS 16.0 for Windows

Tabel LT10.1 Hasil Uji Kruskal-Wallis Jumlah Absolut Sel T CD4⁺CD62L⁺

Ranks			
	Perlakuan	N	Mean Rank
CD4CD62L.2	K	4	8.50
	T	4	8.50
	TnD	4	2.50
	Total	12	
CD4CD62L.3	K	4	10.50
	T	4	2.50
	TnD	4	6.50
	Total	12	

Test Statistics ^{a,b}		
	CD4CD62L.2	CD4CD62L.3
Chi-Square	7.489	9.846
df	2	2
Asymp. Sig.	.024	.007

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Perlakuan

Tabel LT10.2 Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan K dan T

Test Statistics ^b		
	CD4CD62L.2	CD4CD62L.3
Mann-Whitney U	8.000	.000
Wilcoxon W	18.000	10.000
Z	.000	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	1.000	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^a	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

Tabel LT10.3 Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan K dan TnD

Test Statistics ^b		
	CD4CD62L.2	CD4CD62L.3
Mann-Whitney U	.000	.000
Wilcoxon W	10.000	10.000
Z	-2.309	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

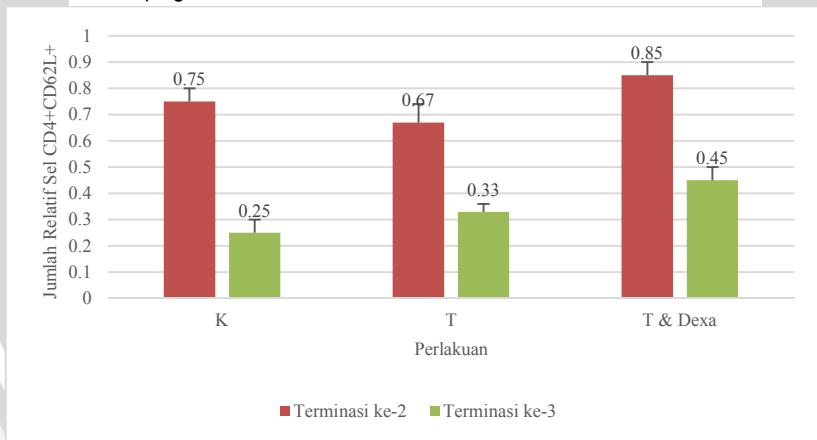
b. Grouping Variable: Perlakuan

Tabel LT10.4 Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan T dan TnD

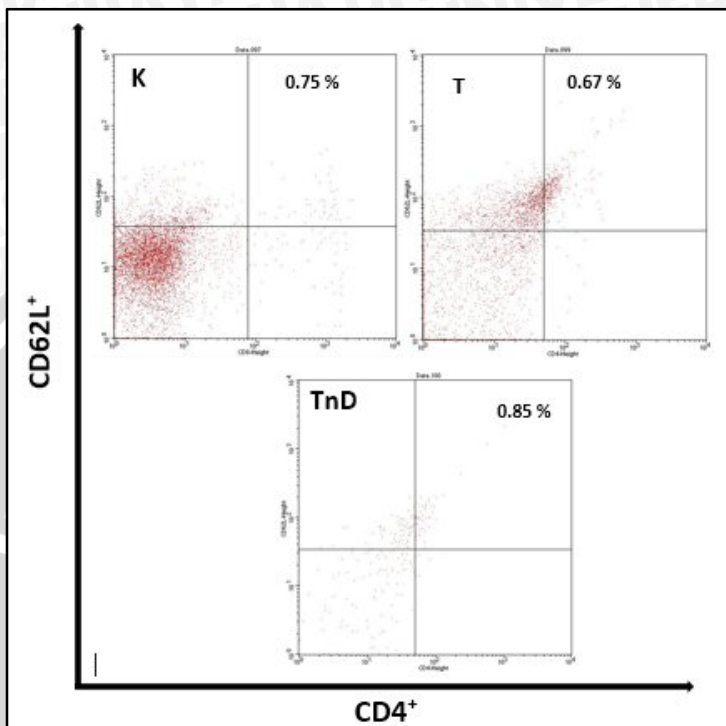
Test Statistics ^b		
	CD4CD62L.2	CD4CD62L.3
Mann-Whitney U	.000	.000
Wilcoxon W	10.000	10.000
Z	-2.309	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

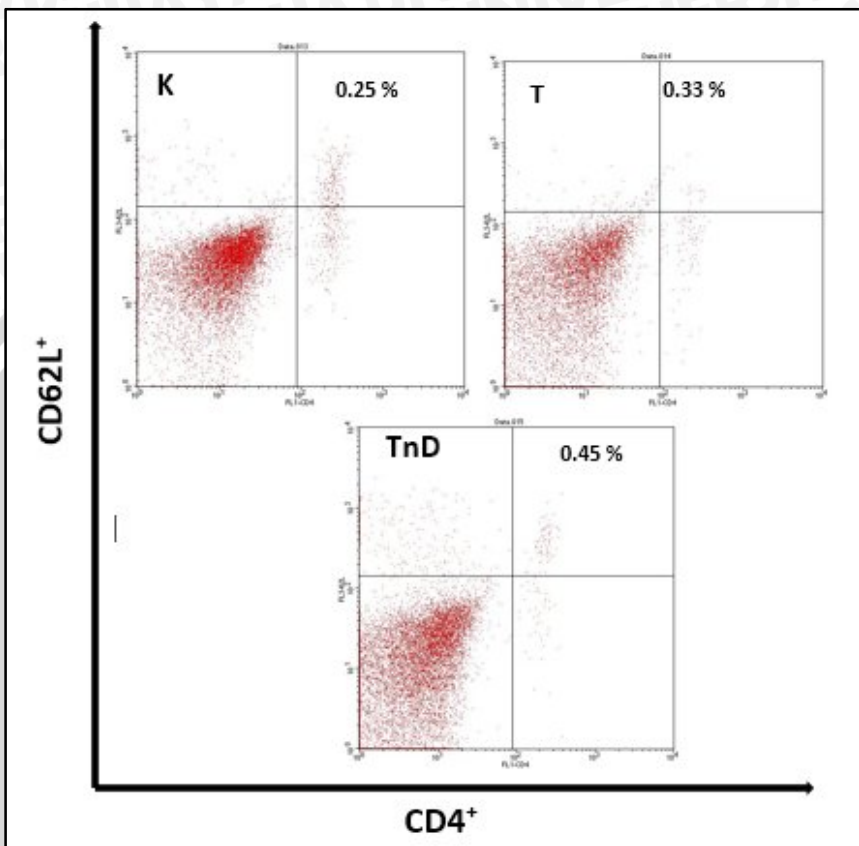
b. Grouping Variable: Perlakuan



Gambar LG10.1 Jumlah Relatif Sel T CD4⁺CD62L⁺ (K = Kontrol, T = Perlakuan Pemberian Rotavirus, dan T & Dexa = Perlakuan Pemberian Rotavirus dan Deksametason)



Gambar LG10.2 Persentase Jumlah Relatif Sel T CD4⁺CD62L⁺ pada Terminasi Minggu ke-2 (K = Kontrol, T = Perlakuan Pemberian Rotavirus, dan TnD = Perlakuan Pemberian Rotavirus dan Deksametason)



Gambar LG10.3 Persentase Jumlah Relatif Sel T CD4⁺CD62L⁺ pada Terminasi Minggu ke-3 (K = Kontrol, T = Perlakuan Pemberian Rotavirus, dan TnD = Perlakuan Pemberian Rotavirus dan Deksametason)

Lampiran 11. Hasil Analisis Kruskal-Wallis Uji Lanjut Mann-Whitney Jumlah Absolut Sel T CD8⁺CD62L⁺ pada Organ *Spleen* Menggunakan *Software* SPSS 16.0 for *Windows*

Tabel LT11.1 Hasil Uji Kruskal Wallis Jumlah Absolut Sel T CD8⁺CD62L⁺

Ranks			
	Perlakuan	N	Mean Rank
CD8CD62L.2	K	4	6.50
	T	4	10.50
	TnD	4	2.50
	Total	12	
CD8CD62L.3	K	4	6.50
	T	4	2.50
	TnD	4	10.50
	Total	12	

Test Statistics ^{a,b}		
	CD8CD62L.2	CD8CD62L.3
Chi-Square	9.846	9.846
df	2	2
Asymp. Sig.	.007	.007

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Perlakuan

Tabel LT11.2 Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan K dan T

Test Statistics ^b		
	CD8CD62L.2	CD8CD62L.3
Mann-Whitney U	.000	.000
Wilcoxon W	10.000	10.000
Z	-2.309	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

Tabel LT11.3 Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan K dan TnD

Test Statistics ^b		
	CD8CD62L.2	CD8CD62L.3
Mann-Whitney U	.000	.000
Wilcoxon W	10.000	10.000
Z	-2.309	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

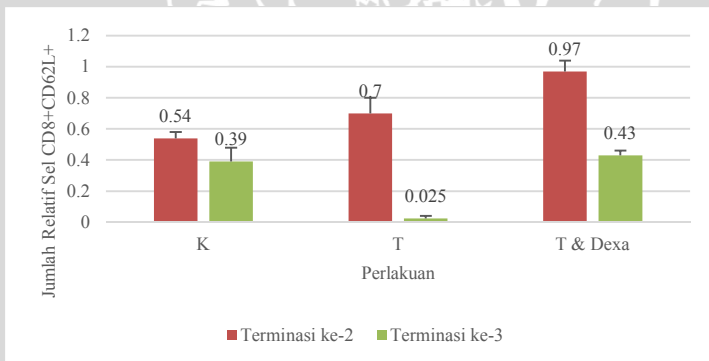
b. Grouping Variable: Perlakuan

Tabel LT11.4 Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan T dan TnD

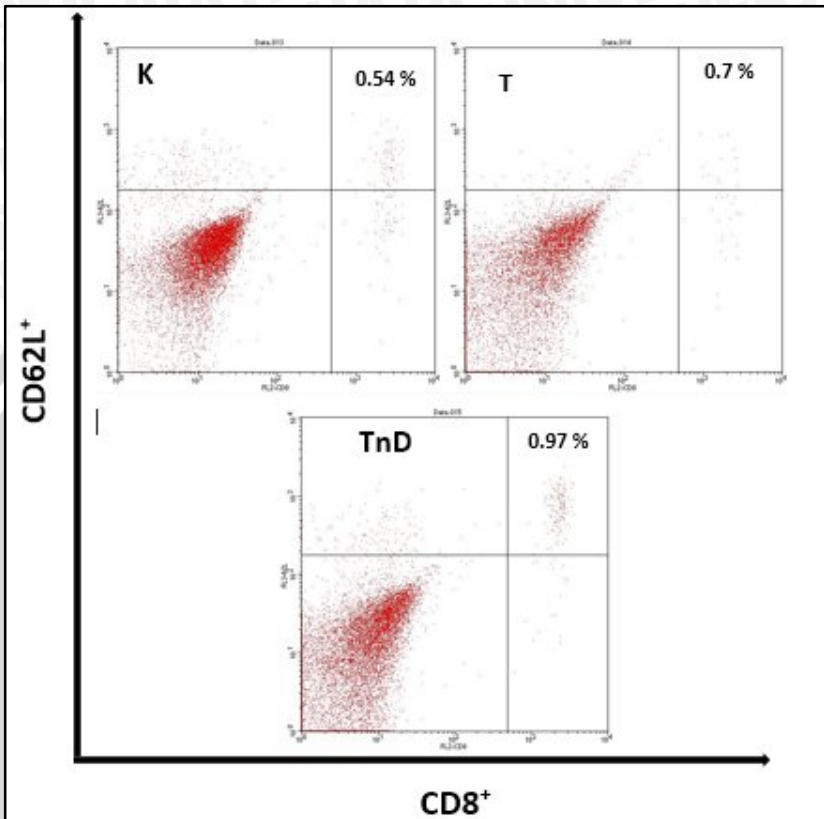
Test Statistics ^b		
	CD8CD62L.2	CD8CD62L.3
Mann-Whitney U	.000	.000
Wilcoxon W	10.000	10.000
Z	-2.309	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

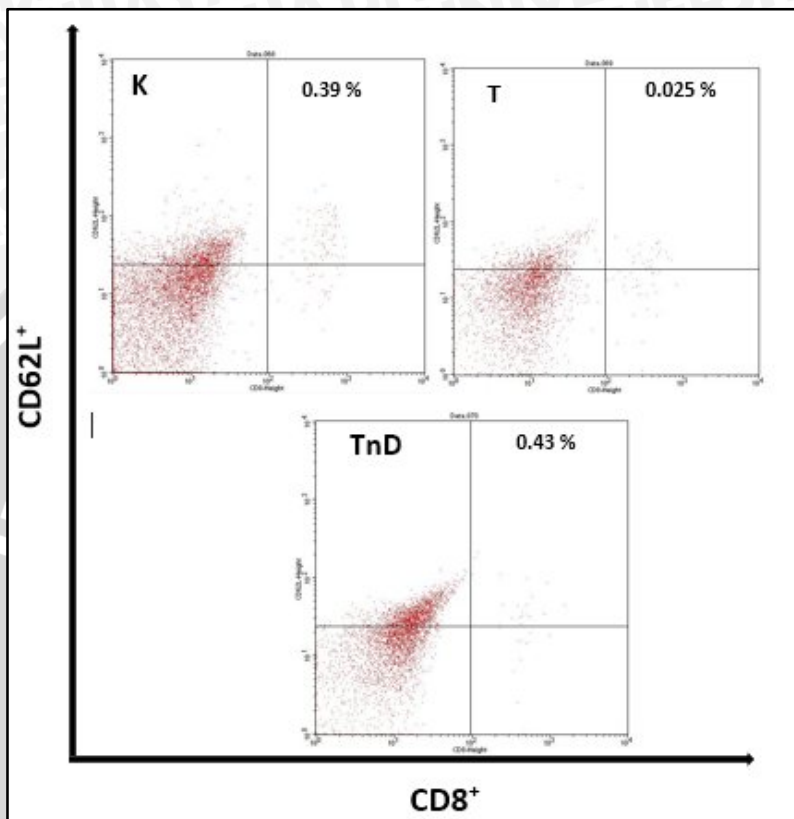
b. Grouping Variable: Perlakuan



Gambar LG11.1 Jumlah Relatif Sel T CD8⁺CD62L⁺ (K = Kontrol, T = Perlakuan Pemberian Rotavirus, dan T & Dexa = Perlakuan Pemberian Rotavirus dan Deksametason)



Gambar LG11.2 Persentase Jumlah Relatif Sel T CD8⁺CD62L⁺ pada Terminasi Minggu ke-2 (K = Kontrol, T = Perlakuan Pemberian Rotavirus, dan TnD = Perlakuan Pemberian Rotavirus dan Deksametason)



Gambar LG11.3 Persentase Jumlah Relatif Sel T $CD8^+CD62L^+$ pada Terminasi Minggu ke-3 (K = Kontrol, T = Perlakuan Pemberian Rotavirus, dan TnD = Perlakuan Pemberian Rotavirus dan Deksametason)

Lampiran 12. Hasil Analisis Kruskal-Wallis Uji Lanjut Mann-Whitney Jumlah Absolut Sel T CD4⁺IFN- γ ⁺ pada Organ *Spleen* Menggunakan *Software* SPSS 16.0 for *Windows*

Tabel LT12.1 Hasil Uji Kruskal-Wallis Jumlah Absolut Sel T CD4⁺IFN- γ ⁺

Ranks			
	Perlakuan	N	Mean Rank
CD4.IFNG.2	K	4	8.50
	T	4	8.50
	TnD	4	2.50
	Total	12	
CD4.IFNG.3	K	4	2.50
	T	4	10.50
	TnD	4	6.50
	Total	12	

Test Statistics ^{a,b}		
	CD4.IFNG.2	CD4.IFNG.3
Chi-Square	7.489	9.846
df	2	2
Asymp. Sig.	.024	.007

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Perlakuan

Tabel LT12.2 Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan K dan T

Test Statistics ^b		
	CD4.IFNG.2	CD4.IFNG.3
Mann-Whitney U	8.000	.000
Wilcoxon W	18.000	10.000
Z	.000	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	1.000	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^a	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

Tabel LT12.3 Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan K dan TnD

	CD4.IFNG.2	CD4.IFNG.3
Mann-Whitney U	.000	.000
Wilcoxon W	10.000	10.000
Z	-2.309	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

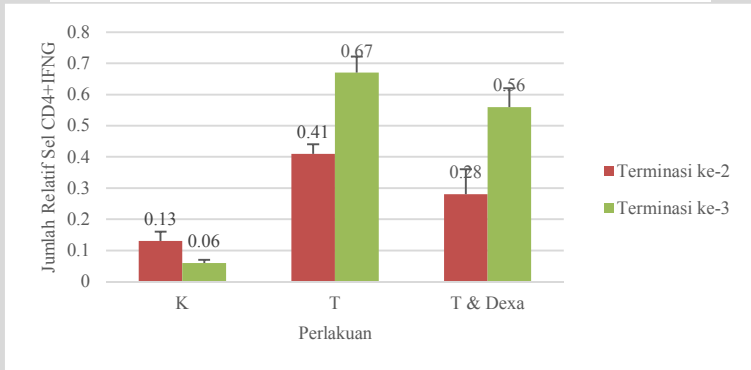
b. Grouping Variable: Perlakuan

Tabel LT12.4 Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan T dan TnD

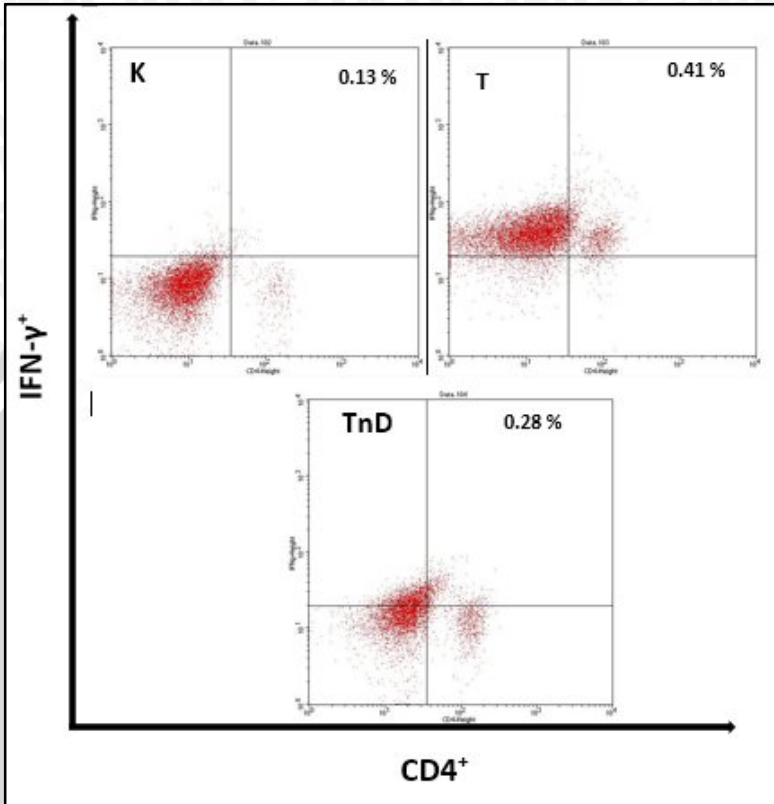
	CD4.IFNG.2	CD4.IFNG.3
Mann-Whitney U	.000	.000
Wilcoxon W	10.000	10.000
Z	-2.309	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

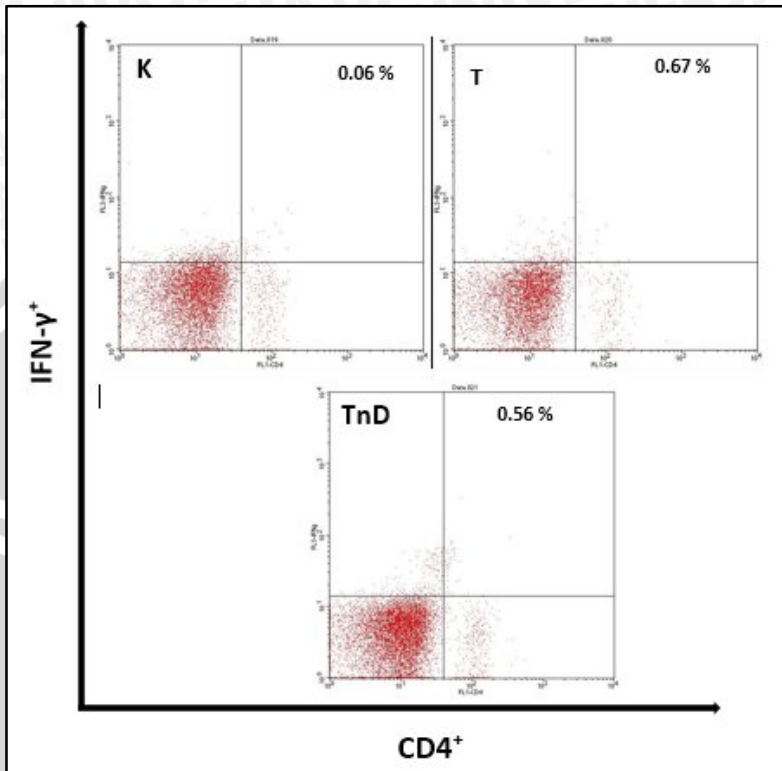
b. Grouping Variable: Perlakuan



Gambar LG12.1 Jumlah Relatif Sel T CD4⁺IFN γ ⁺ (K = Kontrol, T = Perlakuan Pemberian Rotavirus, dan T & Dextra = Perlakuan Pemberian Rotavirus dan Deksmetason)



Gambar LG12.2 Persentase Jumlah Relatif Sel T CD4⁺IFNγ⁺ pada Terminasi Minggu ke-2 (K = Kontrol, T = Perlakuan Pemberian Rotavirus, dan TnD = Perlakuan Pemberian Rotavirus dan Deksametason)



Gambar LG12.3 Persentase Jumlah Relatif Sel T CD4⁺IFN γ ⁺ pada Terminasi Minggu ke-3 (K = Kontrol, T = Perlakuan Pemberian Rotavirus, dan TnD = Perlakuan Pemberian Rotavirus dan Deksametason)

Lampiran 13. Hasil Analisis Kruskal-Wallis Uji Lanjut Mann-Whitney Jumlah Absolut Sel T CD8⁺IFN- γ ⁺ pada Organ *Spleen* Menggunakan *Software* SPSS 16.0 for *Windows*

Tabel LT13.1 Hasil Uji Kruskal-Wallis Jumlah Absolut Sel T CD8⁺IFN- γ ⁺

Ranks			
	Perlakuan	N	Mean Rank
CD8IFNG.2	K	4	6.50
	T	4	10.50
	TnD	4	2.50
	Total	12	
CD8IFNG.3	K	4	2.50
	T	4	10.50
	TnD	4	6.50
	Total	12	

Test Statistics ^{a,b}		
	CD8IFNG.2	CD8IFNG.3
Chi-Square	9.846	9.846
df	2	2
Asymp. Sig.	.007	.007

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Perlakuan

Tabel LT13.2 Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan K dan T

Test Statistics ^b		
	CD8IFNG.2	CD8IFNG.3
Mann-Whitney U	.000	.000
Wilcoxon W	10.000	10.000
Z	-2.309	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

Tabel LT13.3 Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan K dan TnD

Test Statistics^b

	CD8IFNG.2	CD8IFNG.3
Mann-Whitney U	.000	.000
Wilcoxon W	10.000	10.000
Z	-2.309	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

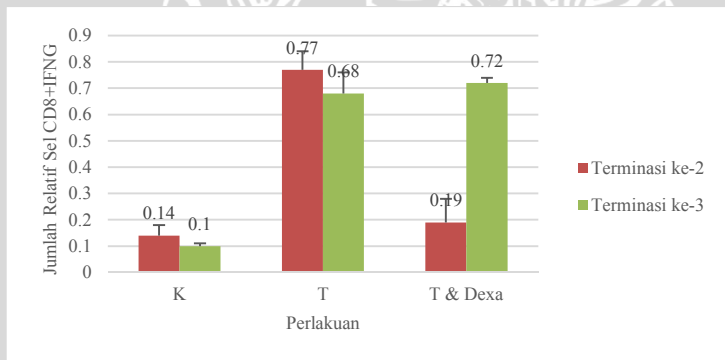
b. Grouping Variable: Perlakuan

Tabel LT13.4 Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan T dan TnD

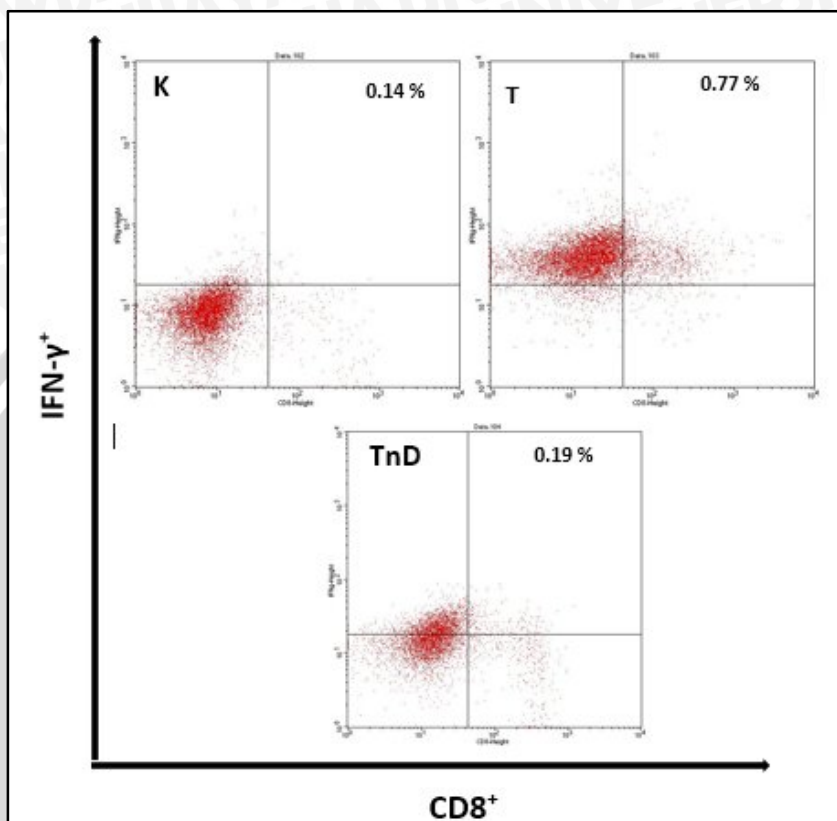
Test Statistics ^b		
	CD8IFNG.2	CD8IFNG.3
Mann-Whitney U	.000	.000
Wilcoxon W	10.000	10.000
Z	-2.309	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

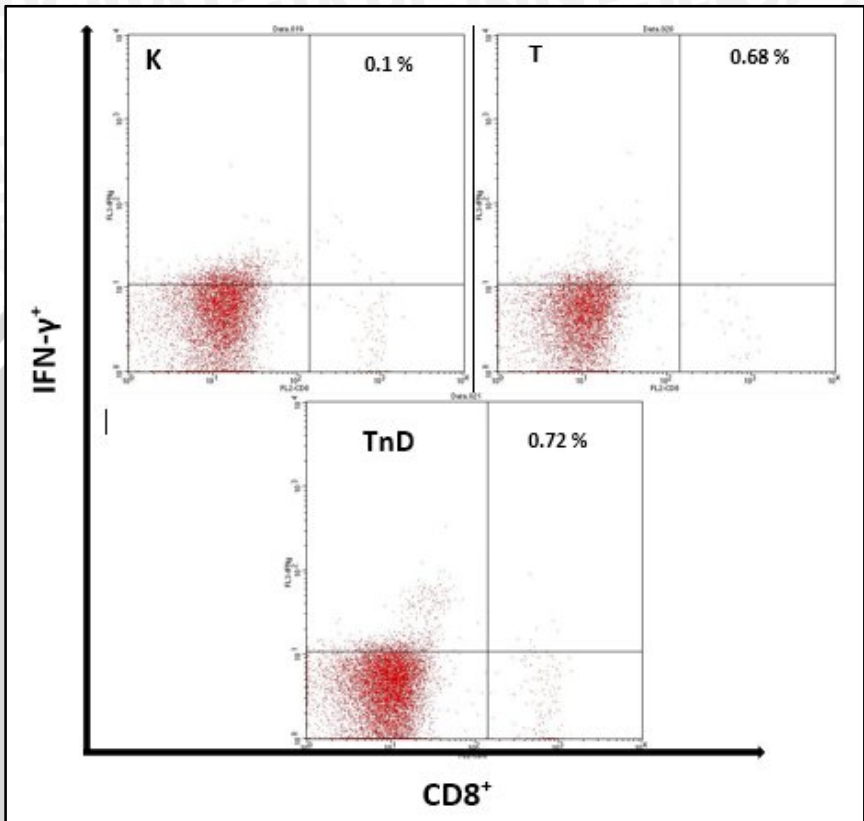
b. Grouping Variable: Perlakuan



Gambar LG13.1 Jumlah Relatif Sel T CD8⁺IFN γ ⁺ (K = Kontrol, T = Perlakuan Pemberian Rotavirus, dan T & Dexa = Perlakuan Pemberian Rotavirus dan Deksametason)



Gambar LG13.2 Persentase Jumlah Relatif Sel T CD8⁺IFN γ ⁺ pada Terminasi Minggu ke-2 (K = Kontrol, T = Perlakuan Pemberian Rotavirus, dan TnD = Perlakuan Pemberian Rotavirus dan Deksametason)



Gambar LG13.3 Persentase Jumlah Relatif Sel T-CD8⁺IFN γ ⁺ pada Terminasi Minggu ke-3 (K = Kontrol, T = Perlakuan Pemberian Rotavirus, dan TnD = Perlakuan Pemberian Rotavirus dan Dekسامetason)

Lampiran 14. Hasil Analisis Kruskal-Wallis Uji Lanjut Mann-Whitney Jumlah Absolut Sel T CD4⁺TNF- α ⁺ pada Organ *Spleen* Menggunakan *Software* SPSS 16.0 for *Windows*

Tabel LT14.1 Hasil Uji Kruskal-Wallis Jumlah Absolut Sel CD4⁺TNF- α ⁺

Ranks			
	Perlakuan	N	Mean Rank
CD4TNF.2	K	4	6.50
	T	4	10.50
	TnD	4	2.50
	Total	12	
CD4TNF.3	K	4	2.50
	T	4	10.50
	TnD	4	6.50
	Total	12	

Test Statistics ^{a,b}		
	CD4TNF.2	CD4TNF.3
Chi-Square	9.846	9.846
df	2	2
Asymp. Sig.	.007	.007

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Perlakuan

Tabel LT14.2 Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan K dan T

Test Statistics ^b		
	CD4TNF.2	CD4TNF.3
Mann-Whitney U	.000	.000
Wilcoxon W	10.000	10.000
Z	-2.309	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

Tabel LT14.3 Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan K dan TnD

Test Statistics^b

	CD4TNF.2	CD4TNF.3
Mann-Whitney U	.000	.000
Wilcoxon W	10.000	10.000
Z	-2.309	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

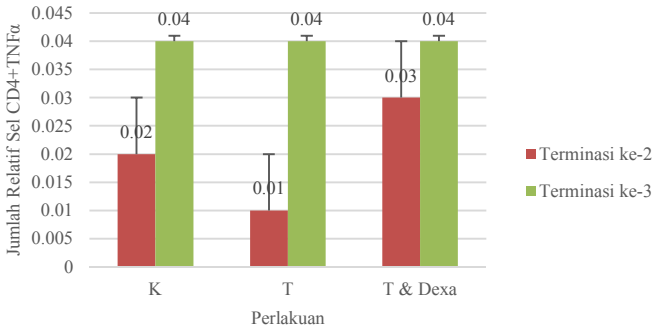
Tabel LT14.4 Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan T dan TnD

Test Statistics^b

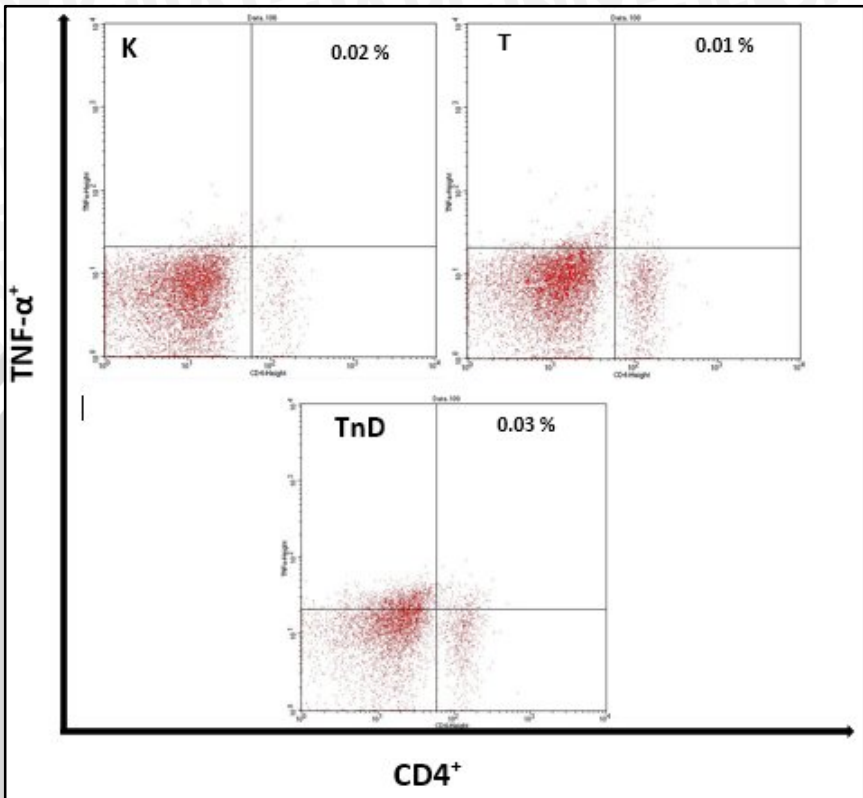
	CD4TNF.2	CD4TNF.3
Mann-Whitney U	.000	.000
Wilcoxon W	10.000	10.000
Z	-2.309	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

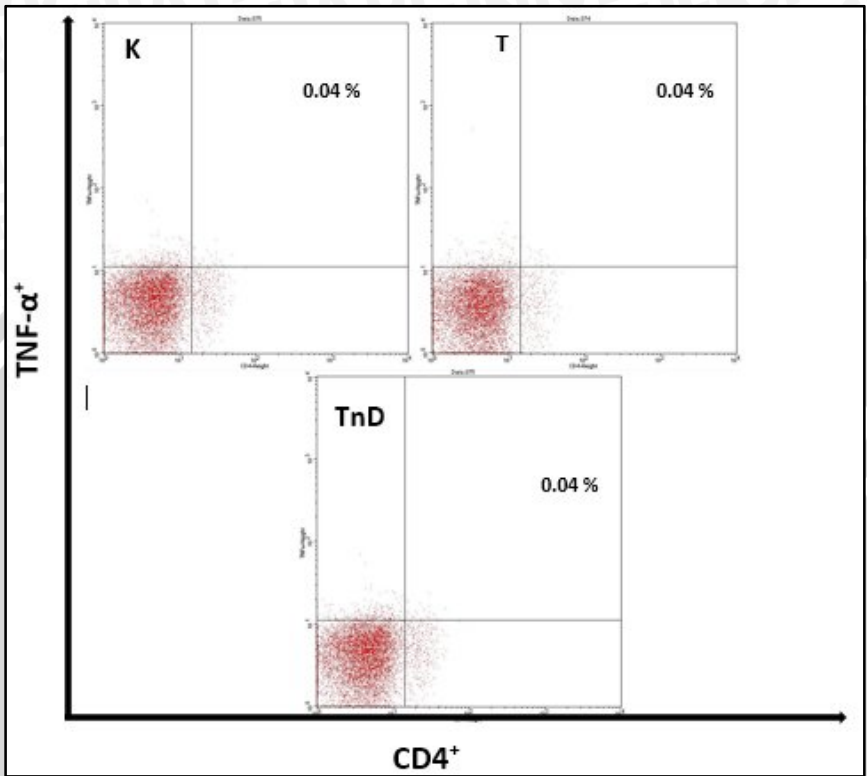
b. Grouping Variable: Perlakuan



Gambar LG14.1 Jumlah Relatif Sel T CD4⁺TNF- α ⁺ (K = Kontrol, T = Perlakuan Pemberian Rotavirus, dan T & Dexa = Perlakuan Pemberian Rotavirus dan Deksametason)



Gambar LG14.2 Persentase Jumlah Relatif Sel T CD4⁺TNF-α⁺ pada Terminasi Minggu ke-2 (K = Kontrol, T = Perlakuan Pemberian Rotavirus, dan TnD = Perlakuan Pemberian Rotavirus dan Deksametason)



Gambar LG14.3 Persentase Jumlah Relatif Sel T $CD4^+TNF-\alpha^+$ pada Terminasi Minggu ke-3 (K = Kontrol, T = Perlakuan Pemberian Rotavirus, dan TnD = Perlakuan Pemberian Rotavirus dan Deksametason)

Lampiran 15. Hasil Analisis Kruskal-Wallis Uji Lanjut Mann-Whitney Jumlah Absolut Sel T CD8⁺TNF- α ⁺ pada Organ *Spleen* Menggunakan *Software* SPSS 16.0 for *Windows*

Tabel LT15.1 Hasil Uji Kruskal-Wallis Jumlah Absolut Sel CD8⁺TNF- α ⁺

Ranks			
	Perlakuan	N	Mean Rank
CD8TNF.2	K	4	10.50
	T	4	4.50
	TnD	4	4.50
	Total	12	
CD8TNF.3	K	4	2.50
	T	4	10.50
	TnD	4	6.50
	Total	12	

Test Statistics ^{a,b}		
	CD8TNF.2	CD8TNF.3
Chi-Square	7.489	9.846
df	2	2
Asymp. Sig.	.024	.007

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Perlakuan

Tabel LT15.2 Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan K dan T

Test Statistics ^b		
	CD8TNF.2	CD4TNF.3
Mann-Whitney U	.000	.000
Wilcoxon W	10.000	10.000
Z	-2.309	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

Tabel LT15.3 Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan K dan TnD

Test Statistics^b

	CD8TNF.2	CD4TNF.3
Mann-Whitney U	.000	.000
Wilcoxon W	10.000	10.000
Z	-2.309	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

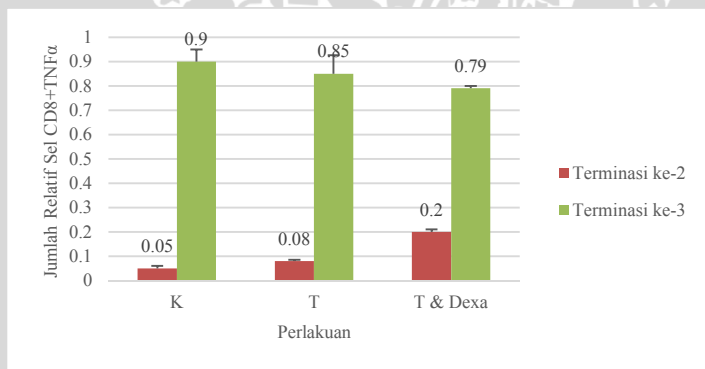
b. Grouping Variable: Perlakuan

Tabel LT15.4 Hasil Uji Mann-Whitney pada Perlakuan T dan TnD

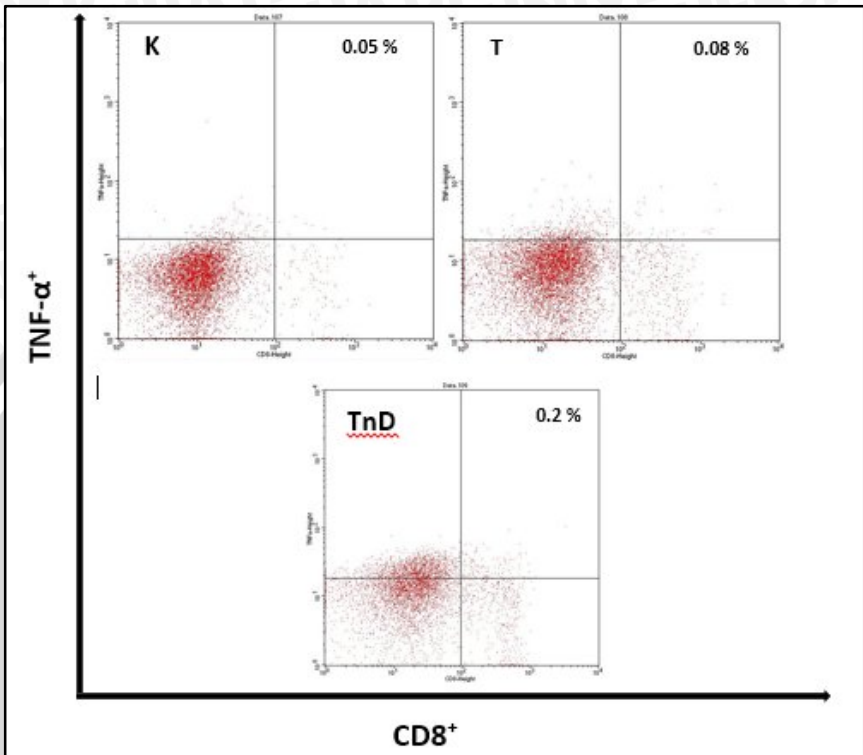
Test Statistics ^b		
	CD8TNF.2	CD8TNF.3
Mann-Whitney U	8.000	.000
Wilcoxon W	18.000	10.000
Z	.000	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	1.000	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^a	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

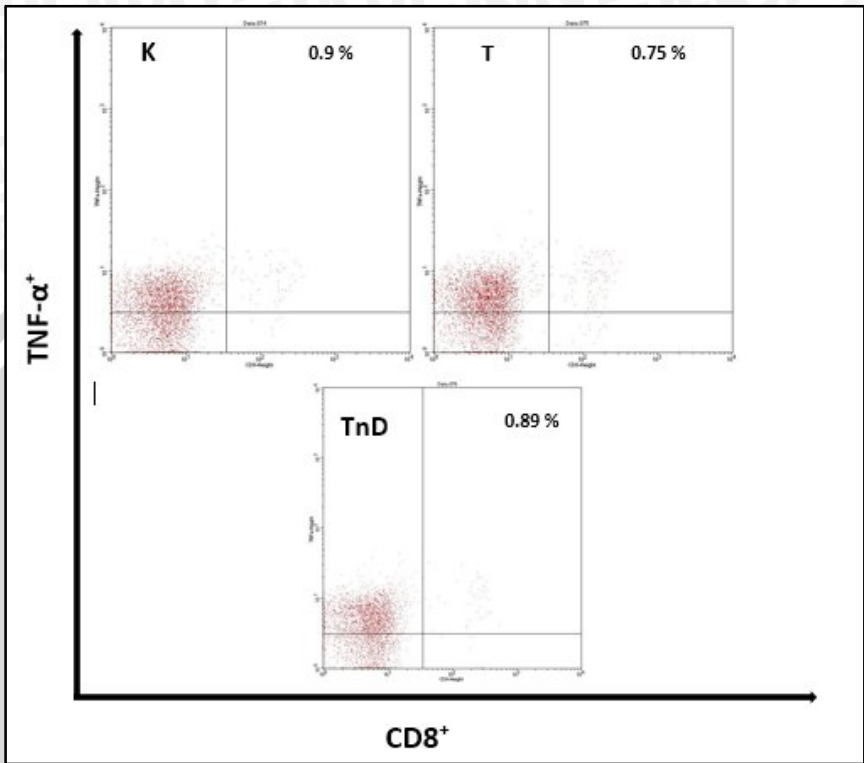
b. Grouping Variable: Perlakuan



Gambar LG15.1 Jumlah Relatif Sel T CD8⁺TNF- α ⁺ (K = Kontrol, T = Perlakuan Pemberian Rotavirus, dan T & Dexa = Perlakuan Pemberian Rotavirus dan Deksametason)



Gambar LG15.2 Persentase Jumlah Relatif Sel T CD8⁺TNF-α⁺ pada Terminasi Minggu ke-2 (K = Kontrol, T = Perlakuan Pemberian Rotavirus, dan TnD = Perlakuan Pemberian Rotavirus dan Deksametason)



Gambar LG15.3 Persentase Jumlah Relatif Sel T CD8⁺TNF-α⁺ pada Terminasi Minggu ke-3 (K = Kontrol, T = Perlakuan Pemberian Rotavirus, dan TnD = Perlakuan Pemberian Rotavirus dan Deksametason)