

**PERBANDINGAN PEMBERIAN DARAH ALLOGRAFT
DAN XENOGRAFT UNTUK INDUKSI AUTOIMMUNE
HEMOLYTIC ANEMIA PADA MENCIT
BERDASARKAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI
LIEN DAN JUMLAH SEL RELATIF CD4⁺**

SKRIPSI

Oleh:

**ALVINDA AYU KARTIKASARI
155130100111046**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

**PERBANDINGAN PEMBERIAN DARAH ALLOGRAFT
DAN XENOGRAFT UNTUK INDUKSI AUTOIMMUNE
HEMOLYTIC ANEMIA PADA MENCIT
BERDASARKAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI
LIEN DAN JUMLAH SEL RELATIF CD4⁺**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:
ALVINDA AYU KARTIKASARI
155130100111046



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Perbandingan Pemberian Darah *Allograft* dan *Xenograft* untuk Induksi
Autoimmune Hemolytic Anemia pada Mencit Berdasarkan Gambaran
Histopatologi Lien dan Jumlah Sel Relatif CD4⁺**

Oleh:
ALVINDA AYU KARTIKASARI
155130100111046

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 16 September 2019
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Edwin Widodo, S.Si., M.Sc., Ph.D
NIP. 19810504 200501 1 001

Pembimbing II

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

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc
NIP. 19631216 198803 1 002

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang berlanda tangan di bawah ini:

Nama : Alvinda Ayu Kartikasari

NIM : 155130100111046

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulis skripsi berjudul:

Perbandingan Pemberian Darah *Allograft* dan *Xenograft* untuk Induksi
Autoimmune Hemolytic Anemia pada Mencit Berdasarkan Gambaran
Histopatologi Lien dan Jumlah Sel Relatif CD4⁺

Dengan ini menyatakan bahwa:

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

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 24 September 2019
Yang menyatakan,



(Alvinda Ayu Kartikasari)
NIM. 155130100111046

Perbandingan Pemberian Darah *Allograft* dan *Xenograft* untuk Induksi *Autoimmune Hemolytic Anemia* pada Mencit Berdasarkan Gambaran Histopatologi Lien dan Jumlah Sel Relatif CD4⁺

ABSTRAK

Autoimmune hemolytic anemia (AIHA) merupakan penyebab anemia yang paling umum ditemukan dengan tingkat mortalitas yang tinggi, terutama pada anjing. Namun belum ada standar resimen terapi yang tetap, sehingga induksi AIHA diharapkan dapat membantu penelitian selanjutnya untuk membantu lebih memahami patogenesa, terapi dan deteksi dini AIHA. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui perbandingan pemberian darah *allograft* dan *xenograft* untuk induksi AIHA pada mencit berdasarkan gambaran histopatologi lien dan jumlah sel relatif CD4⁺. Hewan coba yang digunakan adalah 18 ekor mencit (*Mus musculus*) jantan berumur 8-12 minggu dan berat badan 20-25 gram. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan dibagi menjadi 3 kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif tanpa perlakuan sebagai kontrol pembanding, kelompok P1 yaitu kelompok yang diberi darah *allograft* dari mencit dengan strain yang sama namun berbeda indukan dengan hewan coba, dan kelompok P2 yang diberi darah *xenograft* dari kucing domestik. Masing-masing mencit diinjeksi darah *allograft/xenograft* secara intraperitoneal sebanyak 0,2 ml 5 hari per minggu selama 5 minggu. Parameter yang digunakan adalah gambaran histopatologi lien dengan pewarnaan hematoxyline-eosin dan jumlah sel relatif CD4⁺ yang diukur dengan menggunakan *flow cytometry*. Data dianalisis secara kualitatif menggunakan gambaran histopatologi lien dan secara kuantitatif menggunakan jumlah sel relatif CD4⁺ dengan uji *One Way ANOVA* dan dilanjutkan dengan Uji Tukey $\alpha = 0,5\%$. Hasil penelitian menunjukkan bahwa lien kedua kelompok perlakuan mengalami splenomegali dan nekrosis. Selain itu, juga ditemukan *giant cell* dan hiperplasia pulpa putih pada lien kelompok P2. Jumlah sel relatif CD4⁺ pada kelompok P1 mengalami penurunan, sementara pada kelompok P2 tidak mengalami perubahan yang signifikan. Dari hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa induksi AIHA dengan menggunakan darah *allograft* maupun *xenograft* pada mencit dapat menyebabkan perubahan pada lien dan penurunan signifikan pada jumlah sel relatif CD4⁺, di mana darah *allograft* menyebabkan penurunan yang lebih signifikan dibanding darah *xenograft*.

Kata kunci : *Autoimmune hemolytic anemia*, mencit, histopatologi lien, jumlah sel relatif CD4⁺

Comparison of Allograft and Xenograft Blood Administration for Autoimmune Hemolytic Anemia Induction on Mice Based on the Histopathology of Spleen and Relative CD4⁺ Cell Count

ABSTRACT

Autoimmune hemolytic anemia (AIHA) is a common cause of anemia with a high mortality rate, especially in dogs. However, there is no standardized treatment regimens, so induction of AIHA is expected to facilitate future research in understanding pathogenesis, treatment and early detection of AIHA. The purpose of this study was to compare allograft and xenograft blood transfusion for AIHA induction on mice based on histopathology of spleen and relative CD4⁺ cell count. The experimental animals used in this study were 18 male mice (*Mus musculus*) aged 8-12 months and weighed 20-25 grams. This study used a completely randomized design and was divided into 3 different groups, that were negative control group with no treatment as the comparative control, P1 group that was given allograft blood from mouse with the same strain but different parents as the experimental animal used, and P2 group that was given xenograft blood from domestic cat. Each mouse was injected by 0,2 ml of allograft/xenograft blood intraperitoneally for 5 days in 5 weeks. The parameters used were histopathology of spleen with hematoxyline-eosin stain and relative CD4⁺ cell count that was measured using flow cytometry. The datas were analyzed qualitatively using the histopathology of spleen and quantitatively using relative CD4⁺ cell count with One Way ANOVA test followed by Tukey test $\alpha = 0,5\%$. The results showed that splenomegaly and necrosis were both found on the spleens of P1 and P2. Giant cell and white pulp hyperplasia were also found on the spleen of P2 group. The relative CD4⁺ cell count on P1 group was decreased, while the relative CD4⁺ cell count on P2 group showed no significant changes. From the results, it can be concluded that AIHA induction with allograft and xenograft blood on mice can cause changes on spleen and significant decrease in relative CD4⁺ cell count, in which allograft blood causes a more significant decrease than xenograft blood.

Keyword : Autoimmune hemolytic anemia, mice, spleen histopathology, relative CD4⁺ cell count

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Tuhan Yang Maha Esa karena telah memberi rahmat dan pertolongan-Nya sehingga penelitian dengan judul “Perbandingan Pemberian Darah *Allograft* dan *Xenograft* untuk Induksi *Autoimmune Hemolytic Anemia* pada Mencit Berdasarkan Gambaran Histopatologi Lien dan Jumlah Sel Relatif CD4⁺” dapat terselesaikan dengan baik. Penelitian ini disusun untuk memenuhi tugas akhir/skripsi sebagai persyaratan kelulusan mahasiswa Program Studi Pendidikan Dokter Hewan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya, Malang. Penelitian ini merupakan penelitian dosen dengan drh. Fajar Shodiq Permata, M.Biotech sebagai ketua peneliti.

Dalam penulisan ini, penulis banyak mendapat bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada :

1. Allah Subhanahu wa Ta'ala yang telah memberikan ridhonya sampai skripsi ini selesai.
2. Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc selaku dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya atas dukungan, bimbingan dan kesabarannya untuk memajukan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
3. Edwin Widodo, S.Si., M.Sc., Ph.D selaku dosen pembimbing I dan drh. Fajar Shodiq Permata, M.Biotech selaku dosen pembimbing II atas bimbingan, kesabaran, waktu, serta kritik dan sarannya.
4. drh. Aldila Noviatri, M.Biomed dan drh. M. Arfan Lesmana, M.Sc selaku dosen penguji atas segala ilmu, dukungan serta sarannya dalam penyempurnaan penulisan ini.
5. Gatut Rubiono dan Nurida Finahari selaku orang tua penulis serta saudara-saudari dari penulis yang senantiasa membantu dan memberikan semangat, cinta serta dukungannya kepada penulis.
6. Nabiilah Fairuz Bilqiis dan Nuran Nuri Rifada, sahabat-sahabat penulis yang selalu menyemangati dan menghibur penulis.

7. Teman-teman Toples (Ervy, Irene, Alfiana, Annisa) yang selalu menyemangati dan mendukung penulis.
8. Clara, David, Kevin, William, Luica dan Ike sebagai rekan tim penelitian AIHA yang selalu memberikan semangat dan telah bekerja sama dengan baik selama penelitian.
9. Segenap anggota Enchantress dan Eligoz yang senantiasa memberi semangat dan dorongan kepada penulis.
10. Keluarga besar Decode (Kelas 2015 D) yang telah menjadi keluarga baru selama menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Hewan dan menjadi penyemangat untuk meraih kesuksesan.
11. Semua pihak yang telah memberikan dorongan dan bantuan kepada penulis selama penyusunan skripsi ini.

Skripsi ini sudah disusun dengan sebaik-baiknya, namun penulis menyadari bahwa skripsi ini masih banyak kekurangannya. Oleh karena itu, apabila ada kritik atau saran apapun yang membangun akan diterima dengan senang hati oleh penulis. Akhir kata, penulis sampaikan terima kasih kepada semua pihak yang berperan serta dalam penyusunan skripsi ini hingga akhir.

Malang, 24 September 2019



Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI	iii
LEMBAR PERNYATAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Batasan Masalah	4
1.4 Tujuan Penelitian	6
1.5 Manfaat Penelitian	6
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 <i>Autoimmune Hemolytic Anemia</i>	7
2.2 Respon Autoimun	11
2.2.1 Normal	11
2.2.2 Abnormal	12
2.3 <i>Allograft</i> dan <i>Xenograft</i>	13
2.4 Mencit	14
2.5 Sel T CD4 ⁺	17
2.6 Lien	19
BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	22
3.1 Kerangka Konsep.....	22
3.2 Hipotesis Penelitian	24
BAB 4. METODE PENELITIAN	25
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	25
4.2 Alat dan Bahan.....	25
4.2.1 Alat	25
4.2.2 Bahan	25
4.3 Rancangan Penelitian.....	26
4.4 Sampel Penelitian	26
4.5 Variabel Penelitian.....	27

4.6 Tahapan Penelitian.....	28
4.6.1 Koleksi Darah <i>Allograft</i> dan <i>Xenograft</i>	28
4.6.2 Induksi <i>Autoimmune Hemolytic Anemia</i>	28
4.6.3 Nekropsi dan Isolasi Organ Lien.....	28
4.6.4 Isolasi Sel Limfosit dari Organ Lien	29
4.6.5 Pengukuran Jumlah Sel Relatif CD4 ⁺	30
4.6.6 Pembuatan Preparat Histopatologi Lien.....	30
4.6.7 Pengamatan Preparat Histopatologi Lien	32
4.7 Analisis Data.....	32
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN	33
5.1 Pengaruh Pemberian Darah <i>Allograft</i> dan <i>Xenograft</i> untuk Induksi AIHA terhadap Profil Darah Mencit	33
5.2 Perbandingan Pemberian Darah <i>Allograft</i> dan <i>Xenograft</i> untuk Induksi AIHA pada Mencit Berdasarkan Gambaran Histopatologi Lien	36
5.3 Perbandingan Pemberian Darah <i>Allograft</i> dan <i>Xenograft</i> untuk Induksi AIHA pada Mencit Berdasarkan Jumlah Sel Relatif CD4 ⁺	41
BAB 6 PENUTUP	46
6.1 Kesimpulan	46
6.2 Saran	46
DAFTAR PUSTAKA	47
LAMPIRAN	50

DAFTAR TABEL

Gambar	Halaman
4.1 Kelompok perlakuan	26
5.1 Hasil pemeriksaan darah lengkap	33
5.2 Jumlah sel relatif CD4 ⁺	41
5.3 Hasil uji Tukey jumlah sel relatif CD4 ⁺	42

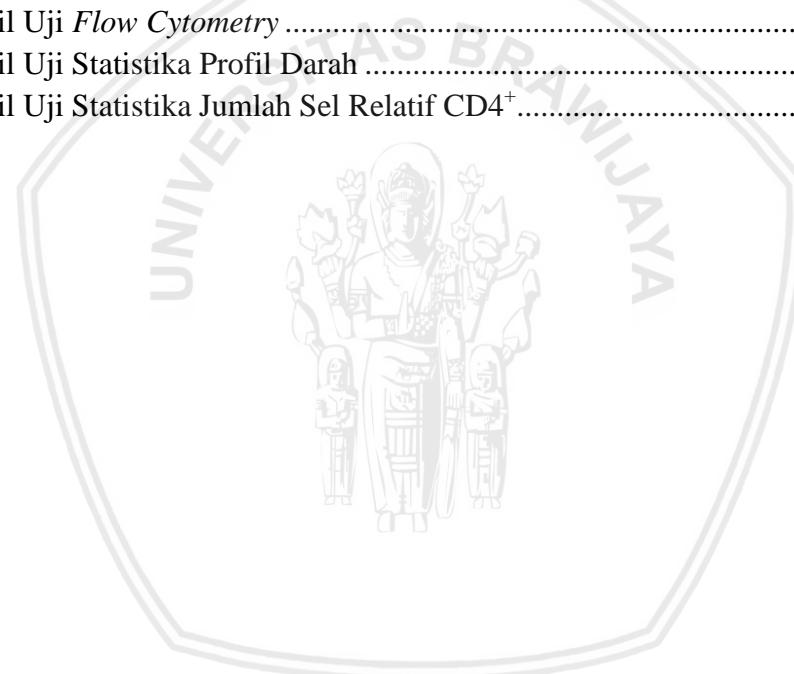


DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Ikterus pada membran mukosa dan palatum molle pasien anjing pengidap AIHA	9
2.2 Perbedaan antara aglutinasi darah dan formasi <i>rouleaux</i> pada darah anjing.....	11
2.3 Mencit sebagai hewan coba penelitian ilmiah	15
2.4 Struktur lien mencit.....	20
2.5 Gambaran histopatologi lien anjing yang menderita AIHA	21
3.1 Kerangka konsep induksi <i>autoimmune hemolytic anemia</i> pada mencit	22
5.1 Ulas darah kelompok kontrol negatif.....	35
5.2 Ulas darah kelompok P1 (<i>allograft</i>)	35
5.3 Ulas darah kelompok P2 (<i>xenograft</i>)	35
5.4 Organ lien mencit secara makros	38
5.5 Organ lien mencit kelompok P2	38
5.6 Histopatologi lien.....	40

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Sertifikat Laik Etik.....	51
2. Hasil Pemeriksaan Darah Lengkap Hewan Donor	52
3. Hasil Uji Ulas Darah Hewan Donor	54
4. Kerangka operasional.....	56
5. Pengambilan Sampel Darah dan Organ Lien.....	57
6. Isolasi Sel Limfosit dari Organ Lien.....	58
7. Pengukuran Jumlah Sel Relatif CD4 ⁺	59
8. Pembuatan Preparat Histopatologi Lien	60
9. Hasil Pemeriksaan Darah Lengkap	61
10. Hasil Uji <i>Flow Cytometry</i>	64
11. Hasil Uji Statistika Profil Darah	66
12. Hasil Uji Statistika Jumlah Sel Relatif CD4 ⁺	72



DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

AIHA	: <i>Autoimmune hemolytic anemia</i>
APC	: <i>Antigen presenting cell</i>
C	: Celcius
Hb	: Hemoglobin
Hct	: Hematokrit
ml	: mililiter
MPS	: <i>Mononuclear phagocytic system</i>
rpm	: <i>revolutions per minute</i>
Th	: Sel T <i>helper</i>
Treg	: Sel T regulasi



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Autoimmune hemolytic anemia (AIHA) atau juga dikenal sebagai *immune-mediated hemolytic anemia* (IMHA) merupakan penyebab anemia yang paling umum pada anjing. AIHA dibedakan menjadi dua kelompok, yaitu AIHA primer dan AIHA sekunder. AIHA primer merupakan penyakit autoimun yang idiopatik, sementara AIHA sekunder diakibatkan oleh penyakit dan kondisi lain seperti agen infeksius, obat-obatan, neoplasia, penyakit autoimun lainnya dan vaksinasi (Ishihara et al., 2010).

AIHA idiopatik atau AIHA primer merupakan reaksi autoimun sejati terhadap *self-antigen* pada eritrosit, di mana sekitar 60-75% ekor anjing mengidap AIHA primer. AIHA sekunder merupakan respon imun tubuh terhadap stimulasi antigen asing yang mengakibatkan destruksi eritrosit tanpa adanya autoantibodi sejati. Pemicu AIHA sekunder yang paling umum adalah infeksi sistemik (protozoa, parasit darah, berbagai macam infeksi akut dan kronis), obat-obatan seperti acetaminophen, penicillin, quinidine dan vaksin, serta neoplasia. AIHA sekunder lebih sering ditemukan pada kucing (Sharp and Kerl, 2008). Pada anjing, AIHA dianggap memiliki prognosis yang buruk, dengan tingkat mortalitas sebesar 50-70% pada penelitian terdahulu, dan 30-40% pada penelitian terbaru (Swann and Skelly, 2016). Pada kucing, tingkat mortalitasnya tidak setinggi pada anjing, yaitu sebesar 23,5% (Swann et al., 2016).

Meskipun AIHA merupakan salah satu penyakit autoimun dan penyebab anemia yang paling umum pada anjing, masih belum ada standar resimen terapinya, bahkan pada beberapa kasus, resimen terapi AIHA pada anjing masih menjadi kontroversi. Hal ini diduga karena kurangnya penelitian terkontrol mengenai terapi AIHA pada dunia kedokteran hewan dalam skala besar agar kemanjuran suatu terapi dapat ditetapkan. Sebagian besar terapi yang diterapkan berasal dari studi retrospektif dan pengalaman serta preferensi pribadi, sehingga belum ada resimen terapi yang tetap (Swann and Skelly, 2016). Beberapa protokol terapi yang ada juga masih memiliki banyak efek samping seperti menyebabkan hiperadrenokortisisme (*Cushing syndrome*), penyakit gastrointestinal, myelosupresi, neoplasia sekunder, dll. Sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengembangkan protokol terapi alternatif dengan efek samping yang lebih sedikit. Selain itu, penelitian lebih lanjut mengenai AIHA juga diperlukan untuk pemahaman patogenesis AIHA primer lebih mendalam (Manev and Marincheva, 2018).

Kondisi AIHA dapat dibuat dengan cara sederhana seperti menginjeksi mencit dengan darah dari tikus. Hal ini tidak hanya memicu respon imun dari mencit terhadap eritrosit tikus, namun respon autoimun terhadap eritrosit mencit itu sendiri juga berkembang. Respon autoimun ini dikontrol dengan cepat oleh sel regulasi dan bertahan selama beberapa hari, namun apabila aktivitas sel regulasi mencit rusak maka respon autoimun ini akan bertahan dan menciptakan kondisi AIHA (Tizard, 2013). Sementara injeksi darah *allograft* pada mencit biasa digunakan untuk meneliti reaksi hemolitik pada transfusi darah (Hod *et al.*, 2008),

namun belum pernah ada mencit model AIHA yang diinduksi dengan darah *allograft* sebelumnya, meskipun pemberian darah *allograft* secara berkala mungkin dapat menimbulkan kondisi AIHA. Untuk pemberian darah *xenograft* dari kucing dalam induksi AIHA sebelumnya juga tidak pernah dilakukan, di mana umumnya darah *xenograft* yang digunakan adalah darah tikus.

Kondisi AIHA dapat menyebabkan berbagai perubahan dalam tubuh, salah satunya yaitu perubahan jumlah sel relatif CD4⁺ dan kondisi histopatologi lien. Reaksi hipersensitivitas yang berkelanjutan akan menyebabkan terganggunya sistem *self-tolerance* tubuh dan menimbulkan persistensi *self-reactive T cells*, sehingga akan menyebabkan peningkatan jumlah sel relatif CD4⁺ (Abbas *et al.*, 2016). Selain itu, menurut penelitian yang dilakukan oleh Xu *et al.* (2012), jumlah sel Th17 yang merupakan salah satu subset dari sel CD4⁺ meningkat, yang mana sel ini berperan dalam reaksi autoimun dan respon antibodi, sehingga mempengaruhi perkembangan AIHA. Pada penderita AIHA juga ditemukan adanya ketidakseimbangan antara sel Th1 dan Th2, di mana sel Th1 mengalami penurunan sementara sel Th2 mengalami kenaikan (Michel, 2014). Subset lain dari sel T CD4⁺ adalah sel T regulasi (Treg), di mana pada penderita AIHA sel Treg ini mengalami penurunan (Barcellini, 2015). Perubahan pada lien yang dapat diamati yaitu infark dan splenomegali, di mana splenomegali disebabkan oleh proses hemolisis ekstravaskuler oleh MPS (*mononuclear phagocytic system*) yang terjadi pada lien (Mackin, 2014), sementara infark terjadi karena kondisi anemia yang disebabkan oleh AIHA dapat menyebabkan hipoksia dan suplai darah pada

berbagai organ-organ tubuh, termasuk lien, tidak dapat terpenuhi (McManus, 2001).

Berdasarkan beberapa pertimbangan di atas, maka penulis melakukan penelitian untuk mengetahui perbedaan pemberian darah *allograft* dan *xenograft* untuk induksi AIHA pada mencit, dan hasil dari penelitian ini diharapkan dapat membantu penelitian-penelitian mengenai AIHA pada hewan, terutama mengenai terapi dan deteksi dini.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka masalah yang dapat dirumuskan adalah sebagai berikut.

1. Bagaimanakah perbandingan pemberian darah *allograft* dan *xenograft* untuk induksi AIHA pada mencit berdasarkan gambaran histopatologi lien?
2. Bagaimanakah perbandingan pemberian darah *allograft* dan *xenograft* untuk induksi AIHA pada mencit berdasarkan jumlah sel relatif CD4⁺?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka batasan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Hewan coba yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) jantan berumur 8-12 minggu dengan berat badan 20-25 gram yang didapat dari Laboratorium Hewan Coba Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Penggunaan hewan coba telah mendapatkan sertifikat

laik etik dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya No. 202/EC/KEPK/07/2019.

2. Darah *allograft* yang akan diberikan untuk menginduksi AIHA pada mencit berasal dari hewan mencit (*Mus musculus*) dengan strain yang sama namun indukan yang berbeda dari mencit coba AIHA. Darah diambil melalui intraorbita dengan menggunakan mikrohematokrit dan disimpan dalam *vacutainer* sodium sitrat dan disimpan dalam suhu 2-6°C.
3. Darah *xenograft* yang akan diberikan untuk menginduksi AIHA pada mencit berasal dari hewan kucing domestik (*Felis catus*) yang diambil melalui vena cephalica dengan menggunakan sputit. Darah *xenograft* disimpan dalam *vacutainer* sodium sitrat dan disimpan dalam suhu 2-6°C.
4. Pemberian darah *allograft* dan *xenograft* pada mencit dilakukan melalui intraperitoneal sebanyak 0,2 ml, dengan interval 5 kali dalam seminggu selama 5 minggu. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah gambaran histopatologi lien dengan pewarnaan hematoxyline-eosin dan jumlah sel relatif CD4⁺ yang diperiksa dengan menggunakan metode *flow cytometry*.
5. Analisa hasil dilakukan secara kualitatif menggunakan gambaran histopatologi lien dan secara kuantitatif menggunakan jumlah sel relatif CD4⁺ dengan uji *One Way ANOVA* dilanjutkan dengan Uji Tukey $\alpha = 0,5\%$.

1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka tujuan penelitian ini adalah:

1. Mengetahui perbandingan pemberian darah *allograft* dan *xenograft* untuk induksi AIHA pada mencit berdasarkan gambaran histopatologi lien.
2. Mengetahui perbandingan pemberian darah *allograft* dan *xenograft* untuk induksi AIHA pada mencit berdasarkan jumlah sel relatif CD4⁺.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai pengetahuan mengenai perbedaan pemberian darah *allograft* dan *xenograft* untuk induksi hewan AIHA pada mencit sehingga dapat digunakan untuk penelitian-penelitian mengenai AIHA, terutama mengenai pemahaman patogenesis AIHA primer, pengembangan obat serta deteksi dini AIHA.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Autoimmune Hemolytic Anemia*

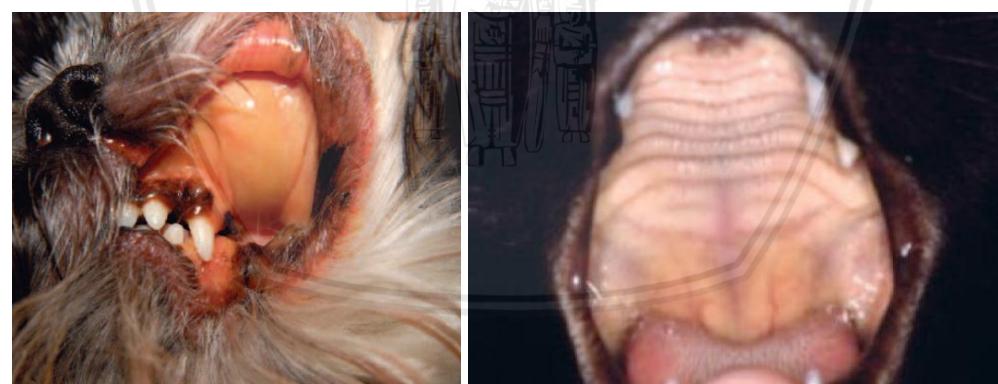
Immune mediated hemolytic anemia (IMHA) atau *autoimmune hemolytic anemia* (AIHA) adalah penyakit hematologis yang mematikan dan umum terjadi pada anjing, namun jarang ditemukan pada kucing. AIHA memiliki ciri-ciri berupa reaksi hipersensitivitas tipe II di mana eritrosit yang dilapisi immunoglobulin, komplemen, atau keduanya dieliminasi dari sirkulasi dengan fagositosis atau destruksi langsung (Sharp and Kerl, 2008). AIHA dibagi menjadi 2, yaitu AIHA idiopatik atau AIHA primer dan AIHA sekunder. AIHA primer adalah penyakit autoimun tanpa ada penyebab yang jelas, dan banyak terjadi pada anjing. AIHA juga dapat terjadi sebagai kondisi sekunder dari berbagai macam proses infeksi, inflamasi atau neoplastik, misalnya Feline Leukemia Virus (FeLV) atau hemobartonellosis pada kucing dan vaksinasi atau neoplasia (terutama limfosarkoma) pada anjing. AIHA sekunder lebih sering ditemukan pada kucing daripada anjing (Yogeshpriya *et al.*, 2017).

AIHA terjadi karena munculnya antibodi IgG atau IgM yang menyerang membran eritrosit. Derajat lisis eritrosit tergantung pada tipe dan banyaknya antibodi yang berikatan pada eritrosit dan keterlibatan fiksasi komplemen. Pada kebanyakan kasus yang terjadi pada anjing, AIHA disebabkan karena IgG dan komplemen yang berikatan pada eritrosit (McCullough, 2003), sementara pada kucing yang mengidap AIHA, lebih banyak ditemukan IgM yang berikatan pada eritrosit (Paes *et al.*, 2010).

Terikatnya antibodi pada membran sel eritrosit memicu destruksi eritrosit dengan beberapa mekanisme. Dengan tingginya kadar antibodi yang berikatan pada membran sel dan fiksasi komplemen, membran sel mungkin mengalami kerusakan parah hingga cairan ekstraseluler masuk ke sitoplasma, menyebabkan eritrosit Bengkak dan mengalami ruptur ketika masih dalam sirkulasi. Hal ini juga disebut dengan hemolisis intravaskuler. Tanpa adanya lisis eritrosit langsung, terikatnya antibodi dan kerusakan membran sel masih dapat menyebabkan peningkatan kecepatan destruksi eritrosit yang terkena oleh makrofag jaringan dalam sistem mononuklear fagositik (*mononuclear phagocytic system* atau MPS), sebuah proses yang terjadi diluar sirkulasi atau disebut juga dengan hemolisis ekstravaskuler. Destruksi eritrosit oleh MPS dimediasi oleh reseptor Fc pada permukaan makrofag, reseptor yang berikatan dengan komponen Fc dari antibodi yang menempel pada membran sel eritrosit. Karena MPS terletak di seluruh tubuh, hemolisis ekstravaskuler dapat terjadi pada berbagai macam organ tubuh, namun biasanya hal ini terjadi di hepar danlien. Pada beberapa pasien dengan kadar antieritrosit yang tinggi, banyak antibodi yang dapat berikatan pada dua eritrosit yang berbeda, sehingga menyebabkan terjadinya aglutinasi eritrosit (Mackin, 2014).

Gejala klinis yang terjadi berhubungan dengan anemia, seperti lethargi, lemas, membran mukosa pucat, dan murmur jantung hemik, dan juga berhubungan dengan respon kompensatoris akibat hipoksia jaringan dan stimulasi sistem saraf simpatik seperti takipnea, takikardia dan denyut jantung yang kuat (Yogeshpriya *et al.*, 2017). Anamnesa pemilik biasanya akan meliputi kolaps,

lemas, tidak dapat beraktivitas berat, lethargi, anoreksia, takipnea, dispnea, muntah, diare, dan terkadang disertai poliuria dan polidipsia. Pada pemeriksaan fisik, biasanya yang dapat ditemukan adalah membran mukosa pucat, takipnea splenomegali, hepatomegali, ikterus, pigmenturia (hemoglobinuria atau bilirubinuria), demam dan limfadenopati. *Jaundice* biasa terjadi dan mudah diamati pada pemeriksaan fisik, biasanya pertama ditemukan pada membran mukosa dan akan terlihat pada kulit ketika konsentrasi bilirubin lebih tinggi (Balch and Mackin, 2007). Petechiae mungkin terjadi karena trombositopenia yang terjadi bersamaan, dan mungkin juga karena pasien juga mengidap *immune-mediated thrombocytopenia* (IMT). Organomegali abdomen cranial juga mungkin ditemukan karena splenomegali dan hepatomegali (Piek, 2011).



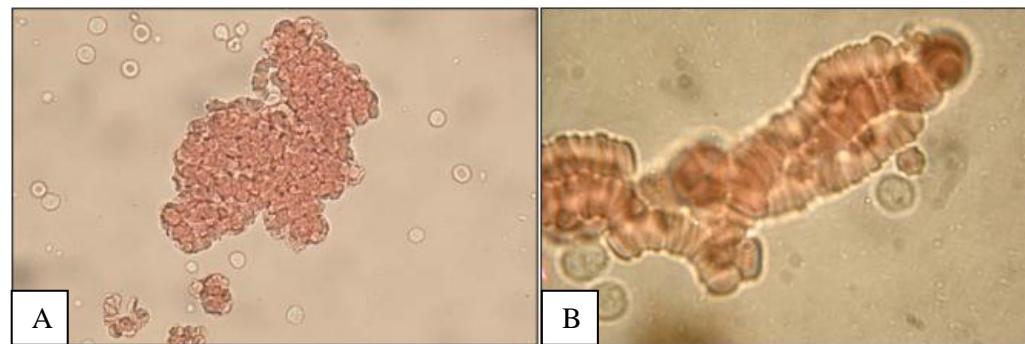
Gambar 2.1 Ikterus pada membran mukosa (kiri) dan palatum molle (kanan) pasien anjing pengidap AIHA (Balch and Mackin, 2007).

AIHA tidak memiliki gejala patognomonis, sehingga perlu dilakukan berbagai diagnosa laboratorium untuk memastikan terjadinya AIHA. Pemeriksaan darah akan menunjukkan terjadinya anemia normositik, normokromik dengan kadar hematokrit yang rendah, yaitu kurang dari 30%. Selain itu, mungkin juga

terjadi trombositopenia atau kombinasi dari AIHA dan IMT (sindrom Evans). Leukositosis dengan neutrofilia menunjukkan reaktivitas sumsum tulang yang berubah akibat mediator inflamasi. Polikromasia, anisositosis, dan spherositosis dapat diamati secara mikroskopis pada ulasan darah dengan pewarnaan. Eritrosit kehilangan bentuk bikonkafnya karena destruksi partial membran sel dan sitoskeleton oleh fagosit pada lien dan hepar (Manev and Marincheva, 2018).

Pemeriksaan biokimia menunjukkan adanya hiperbilirubinemia akibat metabolisme bilirubin berlebih, peningkatan transaminase hepar akibat kerusakan hipoksik hepatosit dan hiperproteinemia akibat hiperglobulinemia. Pemeriksaan koagulasi melengkapi diagnosis, yang ditunjukkan dengan waktu protrombin dan tromboplastin parsial yang meningkat, tingkat fibrinogen yang rendah, serta uji D-dimer yang positif. Pemeriksaan ini menunjukkan adanya kerusakan hemokoagulasi dan kecenderungan protrombotik (Manev and Marincheva, 2018).

Uji imunologis dilakukan untuk menentukan adanya antibodi antieritrosit pada permukaan eritrosit. Uji yang sensitif, sederhana dan cepat adalah uji *self-agglutination*. Campuran eritrosit yang sudah dicuci dengan saline pada ulasan darah akan menunjukkan hasil positif berupa aglutinasi secara makroskopis dan mikroskopis. Sangat penting untuk membedakan aglutinasi akibat reaksi antigen/antibodi dengan formasi *rouleaux* (Manev and Marincheva, 2018). Aglutinasi darah adalah agregasi eritrosit menjadi gumpalan besar yang ireguler, sementara formasi *rouleaux* adalah agregasi eritrosit yang membentuk rantai panjang dari tumpukan eritrosit. Perbedaan antara aglutinasi darah dan formasi *rouleaux* dapat dilihat pada gambar 2.2 (Villiers and Ristić, 2016).



Gambar 2.2 Perbedaan antara aglutinasi darah dan formasi *rouleaux* pada darah anjing. (A) Aglutinasi darah membentuk gumpalan besar yang ireguler; (B) Formasi *rouleaux* membentuk rantai panjang dari tumpukan eritrosit (Villiers and Ristić, 2016).

Uji imunologis yang spesifik untuk deteksi antieritrosit adalah uji *direct antiglobulin* atau uji Coombs. Eritrosit diinkubasi dengan *polyclonal human serum* yang mengandung antibodi terhadap IgM, IgG dan C3b dari sistem komplemen. Antibodi antiglobulin melekat pada antibodi antieritrosit dan menyebabkan aglutinasi eritrosit. Namun, beberapa pasien AIHA mungkin mendapat hasil uji Coombs yang negatif karena rendahnya molekul immunoglobulin (Manev and Marincheva, 2018).

2.2 Respon Autoimun

2.2.1 Normal

Kebanyakan respon autoimun terpicu ketika sel T nontoleran bertemu dengan autoantigen yang tadinya tersembunyi. Sel T hanya bisa toleran terhadap autoantigen apabila sel T diekspos terhadap antigen ini. Banyak autoantigen yang tidak menginduksi toleransi karena autoantigennya tersembunyi di dalam sel atau jaringan (Tizard, 2013).

Meskipun kontrol sistem imun biasanya menyingkirkan *self-reactive cell*, bukan berarti respon autoimun merupakan respon yang buruk, namun beberapa respon autoimun memiliki fungsi fisiologis. Contohnya, eritrosit harus dikeluarkan dari darah ketika eritrosit sudah mencapai batas umurnya. Proses ini dapat terjadi akibat adanya autoantibodi. Ketika eritrosit menua, protein transpor anion bernama CD233 atau protein ban 3 perlahan-lahan teroksidasi, dan epitope baru terbentuk. Epitope ini dikenali oleh autoantibodi IgG. Autoantibodi ini berikatan dengan eritrosit tua dan memicu fagositosis oleh makrofag lien. CD233 ditemukan di berbagai tipe sel, dan kemungkinan eksposurnya pada sel yang sudah tua dan opsonisasinya merupakan jalur yang paling umum (Tizard, 2013).

2.2.2 Abnormal

Meskipun autoimunitas dapat dipicu oleh epitope yang tersembunyi, respon autoimun yang berkelanjutan diperlukan untuk menciptakan suatu kondisi abnormal autoimun. Hal ini mungkin disebabkan oleh kegagalan mekanisme kontrol normal sistem imun. Kondisi autoimun ini dapat dibuat dengan cara sederhana seperti menginjeksi mencit dengan darah dari tikus. Mengikuti injeksi darah tersebut, mencit tidak hanya membuat antibodi terhadap eritrosit tikus, namun respon autoimun terhadap eritrositnya sendiri juga berkembang. Respon autoimun ini dikontrol dengan cepat oleh sel regulasi dan bertahan hanya selama beberapa hari. Namun apabila aktivitas sel regulasi mencit rusak, autoantibodi ini akan bertahan dan menyebabkan destruksi eritrosit dan anemia (Tizard, 2013).

Autoimunitas juga dapat disebabkan oleh peniruan atau mimikri molekuler, yaitu epitop yang dimiliki oleh agen infeksius atau parasit mirip dengan autoantigen. Sel B mungkin terpicu oleh epitop asing yang bereaksi silang dengan autoantigen. Namun, sel B hanya akan merespon epitop ini apabila sel B mendapat bantuan dari sel T. Apabila terdapat sel Th di sekitar sel B yang juga mengenali epitop pada agen infeksius atau parasit tersebut sebagai epitop asing, maka akan terpicu sebuah respon dan sel Th akan mengizinkan sel B *self-reactive* untuk membuat autoantibodi. Ketika respon sel B terpicu melalui proses tersebut, agen infeksius atau parasit yang berkaitan dapat dibasmi, namun respon autoimunnya akan tetap berjalan; proses autoimun ini juga disebut dengan proses ‘tabrak lari’ (Tizard, 2013).

2.3 *Allograft* dan *Xenograft*

Graft adalah jaringan atau organ untuk transplantasi atau implantasi (Studdert *et al.*, 2012). *Graft* dapat diklasifikasikan berdasarkan hubungan genetik donor dan resipiennya. *Allogeneic graft* atau *allograft* adalah *graft* di mana resipien dan donor berasal dari spesies yang sama namun berbeda secara genetik, misalnya induk dan anak atau individual yang tidak memiliki hubungan darah. *Xenogeneic graft* atau *xenograft* adalah *graft* di mana donor dan resipien berasal dari spesies yang berbeda (Doan *et al.*, 2013). *Allograft* dan *xenograft* selalu ditolak oleh resipien dengan sistem imun yang normal. Antigen yang menjadi target penolakan disebut dengan *alloantigen* dan *xenoantigen*, sementara antibodi

dan sel T yang bereaksi terhadap antigen ini disebut *alloreactive* dan *xenoreactive* (Abbas *et al.*, 2016).

Pemberian darah *allograft* dan *xenograft* mungkin dapat memancing terjadinya kondisi AIHA, di mana kondisi autoimun abnormal dapat disebabkan oleh mimikri molekuler, yaitu epitop yang dimiliki oleh benda asing atau agen infeksius mirip dengan autoantigen (Tizard, 2013). Dalam hal ini, darah *allograft* dan *xenograft* memiliki autoantigen yang memiliki kemiripan dengan autoantigen darah resipien, sehingga autoantibodi tidak hanya menyerang darah *allograft* dan *xenograft*, namun juga darah resipien dan menimbulkan kondisi AIHA.

2.4 Mencit

Mencit telah didomestikasi selama berabad-abad dan telah digunakan dalam penelitian ilmiah sejak tahun 1600-an, namun perkembangan mencit laboratorium sebagai hewan coba penelitian benar-benar dimulai dengan eksperimen genetik pada awal tahun 1900-an. Mencit juga digunakan untuk berbagai jenis penelitian, seperti kanker, imunologi, toksikologi, metabolisme, diabetes, obesitas, dll. Mencit dihargai karena berbagai kualitasnya, misalnya ukurannya yang kecil, periode gestasi yang pendek, dan mudahnya perkembangbiakannya dalam laboratorium. Fakta bahwa mencit memiliki karakteristik yang terbaik secara genetik dari semua mamalia meningkatkan nilai mencit dalam segala bidang studi (Danneman *et al.*, 2013).

Menurut Sirois (2016), taksonomi dari mencit yang biasa digunakan sebagai hewan coba penelitian adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Subordo	: Myomorpha
Superfamili	: Muroidea
Famili	: Muridae
Subfamili	: Murinae
Genus	: <i>Mus</i>
Spesies	: <i>Mus musculus</i>



Gambar 2.3 Mencit sebagai hewan coba penelitian ilmiah (Bogdanske *et al.*, 2010).

Mencit memiliki berbagai karakteristik yang membedakannya dari mamalia lainnya. Pada umumnya, rentang hidup mencit berkisar antara 12-36 bulan, dengan berat mencit jantan sekitar 20-40 gram dan mencit betina sekitar 22-63 gram. Konsumsi pakan setiap harinya sekitar 3-5 gram, sementara konsumsi air minum setiap harinya sekitar 5-8 ml. Mencit memiliki ekor yang lebih panjang daripada badannya, di mana ekor mencit ditutupi oleh rambut yang

jarang-jarang, tidak seperti tikus yang ekornya tidak berambut. Ekornya berfungsi untuk organ keseimbangan dan juga mekanisme temperatur tubuh, di mana mencit tidak memiliki kelenjar keringat dan mengeluarkan panas melalui ekor dan telinganya (Sirois, 2016).

Etiologi dan patogenesa dari AIHA telah banyak diteliti melalui penggunaan hewan coba mencit. Terdapat berbagai macam hewan model mencit AIHA, contohnya yaitu mencit NZB (*New Zealand black*), Playfair dan Marshall-Clarke, serta mencit transgenik seperti mencit HL (*heavy and light*) dan mencit HOD (*hen egg lysozyme*, ovalbumin, Duffy). Mencit NZB merupakan hewan model AIHA di mana pada mencit ini, autoantibodi eritrosit berkembang secara spontan dan mengarah pada anemia hemolitik pada umur 6 bulan. Mencit NZB menunjukkan bahwa faktor genetik berkontribusi dalam berkembangnya AIHA. Mencit model Playfair dan Marshall-Clarke diinjeksi eritrosit tikus secara intraperitoneal setiap minggu untuk menginduksi kondisi AIHA. Mencit model Playfair dan Marshall-Clarke menunjukkan pentingnya peran sel T regulasi dalam mengatur autoimunitas eritrosit. Mencit HL dibuat oleh Okamoto dan koleganya, di mana semua sel B mencit mengekspresikan reseptor sel B yang sama yang terdiri dari rantai *heavy and light* (HL) dari antibodi monoklonal 4C8 yang berasal dari mencit NZB. Mencit HL menyediakan dasar untuk paradigma toleransi sel B terhadap autoantigen eritrosit yang berlaku selama hampir 2 dekade. Mencit HOD mengekspresikan 3 protein fusi *erythrocyte-restricted* yang terdiri dari lisozim telur ayam (*hen egg lysozyme*, HEL), ovalbumin (OVA) dan molekul golongan darah manusia, Duffy. Autoreaktivitas eritrosit pada mencit HOD telah terbukti

dapat menjadi platform yang kuat untuk membedah bagaimana respon sistem imun terhadap antigen pada eritrosit (Howie and Hudson, 2018).

2.5 Sel T CD4⁺

Aktivasi sel T spesifik antigen sangat penting dalam respon imun adaptif. Sel T dibedakan oleh ekspresi reseptor sel T (*T cell receptor* atau TCR) dan kompleks CD3 yang berkaitan. Kebanyakan sel T pada tubuh dibagi menjadi dua subset yang dicirikan dengan ekspresi molekul CD4 (sel T *helper* atau Th) atau molekul CD8 (sel T sitotoksik atau Tc) (Day and Schultz, 2014). CD4 merupakan salah satu dari dua glikoprotein permukaan yang terlibat dalam pengenalan antigen dan aktivasi sel T. CD4 adalah molekul transmembran monomerik tipe I yang terbuat dari 4 domain yang menyerupai imunoglobulin (D1 hingga D4) dan dikodekan oleh gen tunggal. CD4, bersamaan dengan CD8, telah menarik perhatian yang sangat besar sejak penemuan dan karakterisasi awalnya karena sifatnya yang unik (Brenchley and Bosselut, 2014).

Prekursor sel T, yaitu protimosit, bermigrasi dari sumsum tulang ke timus. Protimosit yang telah memasuki bagian kortikal, disebut dengan timosit dan tidak memiliki molekul permukaan TCR, CD3, CD4 dan CD8. Sel-sel ini juga disebut sebagai sel *double negative* (DN). Sel DN kemudian mengalami proliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel *double positive* (DP) yang mengekspresikan CD4 maupun CD8 bersamaan dengan CD3 dan TCR. Sel DP akan mati dalam 3-4 hari kecuali sel ini mengenali pMHC I (berhubungan dengan CD8) atau pMHC II (berhubungan dengan CD4) pada sel epitel kortikal. Hal ini disebut dengan seleksi

positif. Sel yang lolos seleksi positif akan mengekspresikan salah satu dari CD4 atau CD8, dengan tambahan CD3 dan TCR. Sel yang berinteraksi secara kuat dengan *self peptide* pada pMHC I atau pMHC II dari *antigen presenting cell* akan mengalami apoptosis. Hal ini disebut dengan seleksi negatif (Doan *et al.*, 2013).

Sel T CD4⁺ dibagi menjadi sel T *helper* (Th) dan sel T regulasi (Treg). Fungsi utama sel Th adalah menyediakan bantuan untuk produksi antibodi (imunitas humoral) atau sitotoksitas (*cell-mediated immunity*). Sel-sel ini juga memiliki peranan penting dalam supresi atau *down-regulation* respon imun. Sel T *helper* dibagi menjadi beberapa subset, 2 di antaranya adalah sel T *helper* 1 (Th1) dan sel T *helper* 2 (Th2). Keduanya adalah sel T CD4⁺ yang membawa TCR αβ dan merespon pMHC kelas II antigenik pada permukaan APC. Kedua sel ini sangat identik dan susah dibedakan, dan cara membedakannya adalah melalui panel sitokin yang diproduksi oleh setiap subset. Sel Th1 memproduksi IL-2 dan IFN-γ yang menstimulasi sel efektor sitotoksik pada *cell-mediated immune response*. Sel Th2 memproduksi IL-4, IL-5, IL-9 dan IL-13 yang memiliki peranan penting dalam membantu diferensiasi sel B menjadi sel plasma yang mensekresikan antibodi dalam respon imun humoral (Day and Schultz, 2014).

Selain sel Th1 dan sel Th2, subset lain dari sel T *helper* adalah sel Th17. Sel Th17 dicirikan dengan sekresi IL-17, yang diidentifikasi sebagai kunci sel efektor dalam pembersihan patogen intraseluler dan perkembangan berbagai penyakit autoimun. Sebuah penelitian menunjukkan bahwa jumlah sel Th17 pada penderita AIHA meningkat. Sel Th17 berperan dalam respon antibodi, yang kemudian mempengaruhi perkembangan AIHA (Xu *et al.*, 2012).

Sel Treg adalah sel limfosit yang mengekspresikan CD4 dan CD25, yang mempunyai peranan penting dalam mengatur sistem imun dan menjaga keseimbangan antara toleransi periferal dan imunitas. Apabila sel Treg tidak ada, maka akan terjadi penyakit autoimun multiorgan. Sel Treg dibagi menjadi 2, yaitu sel Treg *natural* (nTreg) yang dibentuk di timus dan sel Treg *induced* (iTreg) yang diproduksi oleh organ limfoid sekunder. Mekanisme kerja sel Treg dibagi menjadi 2 tipe, yang pertama yaitu melalui kontak langsung antar sel, di mana tipe ini banyak ditemukan pada kerja sel nTreg, dan inhibisi melalui produksi sitokin supresif yang banyak ditemukan pada kerja sel iTreg (Tizard, 2013).

2.6 Lien

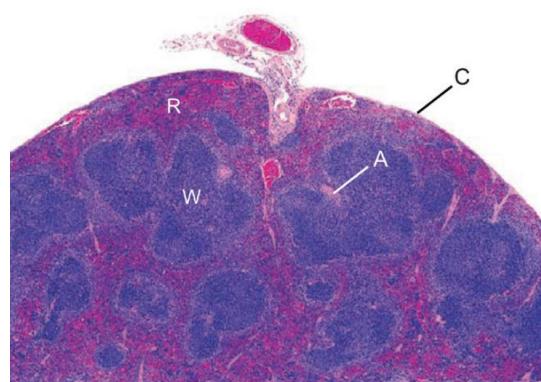
Lien merupakan organ limfoid terbesar dalam tubuh hewan, dan dapat ditemukan pada omentum mayor, berada di dekat kurvatura mayor lambung. Lien tidak memegang peranan penting dalam hidup hewan, sehingga lien dapat diangkat melalui prosedur bedah apabila lien mengalami ruptur atau tumor. Beberapa fungsi lien yaitu (Aspinall and Cappello, 2015):

1. Tempat penyimpanan darah, di mana lien menyimpan eritrosit dan trombosit di dalamnya.
2. Destruksi eritrosit yang sudah tidak layak, di mana sel fagosit memakan dan menghancurkan eritrosit, dan menyimpan kandungan zat besinya untuk digunakan kembali dalam sintesis hemoglobin.
3. Mengeluarkan unsur partikel dari sirkulasi, di mana lien menyaring partikel asing dan bakteri, sementara sel fagosit menghancurkannya.

4. Memproduksi limfosit untuk sistem imunitas.

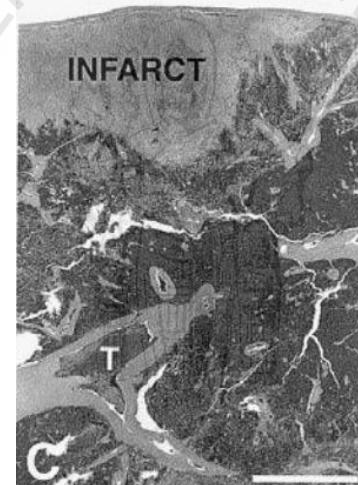
Lien diselimuti oleh kapsul yang terbuat dari jaringan ikat fibrosa dan otot polos. Kapsul itu memiliki cabang-cabang yang disebut trabekula di dalam jaringan lunak lien. Trabekula ini mengandung pembuluh darah, nervus, pembuluh limfa, dan sel otot polos. Ketika sel otot polos mengalami kontraksi, sel darah dalam lien akan keluar dari lien, kembali ke sirkulasi. Hal ini dapat terjadi ketika tubuh membutuhkan lebih banyak eritrosit, misalnya ketika melakukan aktivitas fisik (Colville and Bassett, 2016).

Bagian dalam lien merupakan jaringan lunak yang dibagi menjadi 2 bagian, yaitu pulpa putih dan pulpa merah. Pulpa putih terdiri dari jaringan limfoid yang terlokalisir dan mengandung limfosit yang mengkloning diri mereka sendiri ketika terjadi sebuah respon imun. Pulpa merah terdiri dari pembuluh darah, makrofag jaringan dan tempat penyimpanan eritrosit bernama sinus. Makrofag jaringan menyaring antigen dan partikel asing lainnya dari cairan limfa dan mengeluarkan eritrosit yang sudah tua atau abnormal (Colville and Bassett, 2016).



Gambar 2.4 Struktur lien mencit. C: kapsul; A: arteriole sentral; W: pulpa putih; R: pulpa merah (Treuting *et al.*, 2018).

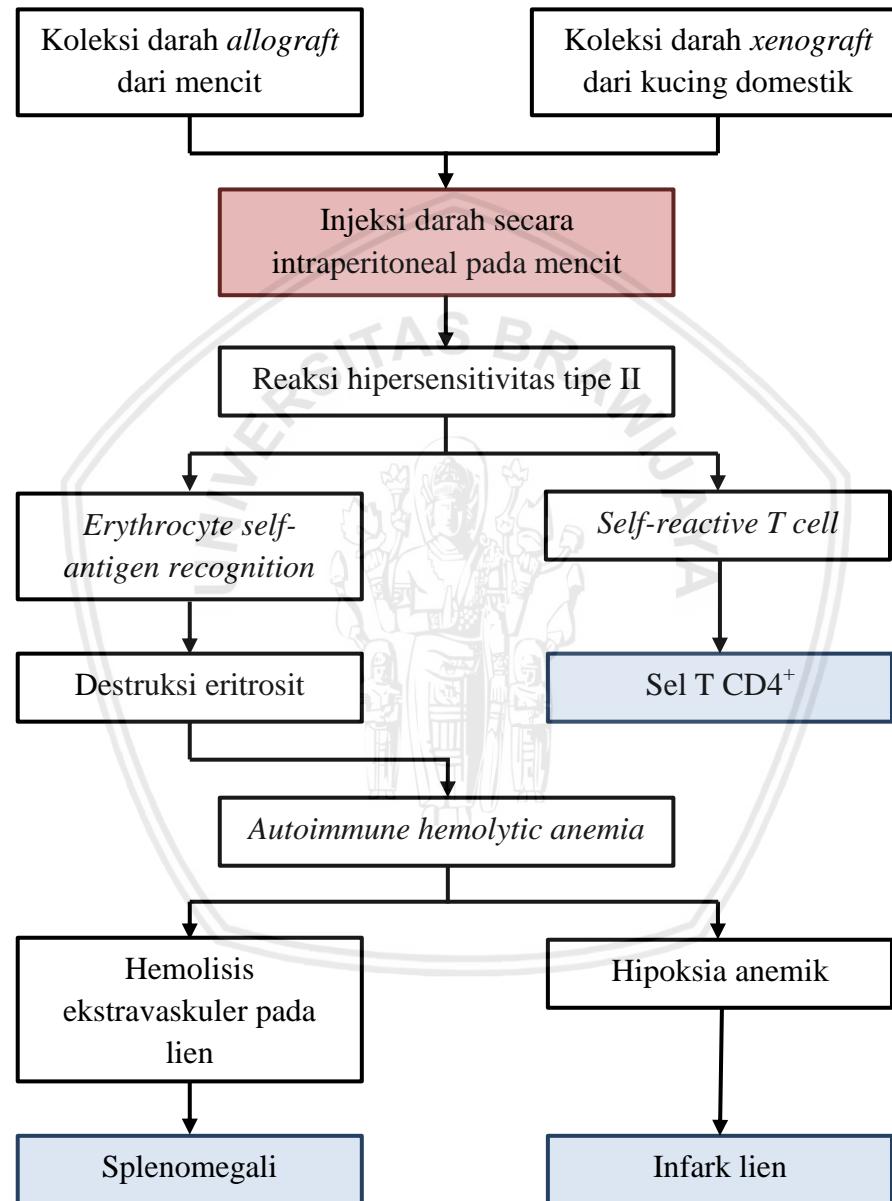
Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh McManus (2001), perubahan yang dapat diamati dari lien hewan yang mengidap AIHA adalah terjadinya infark, baik multifokal maupun ekstensif. Infark ini mungkin terjadi akibat tromboembolisme pulmo atau hipoksia anemik. Selain itu, Yogeshpriya *et al.* (2017) juga menyatakan bahwa pada beberapa kasus, ditemukan adanya splenomegali, karena MPS dalam lien dan hepar merupakan situs utama untuk destruksi eritrosit.



Gambar 2.5 Gambaran histopatologi lien anjing yang menderita AIHA. C: Infark lien yang disebabkan oleh tromboembolisme; T: trombus (McManus, 2001).

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka konsep induksi *autoimmune hemolytic anemia* pada mencit.

Keterangan: : Perlakuan

 : Parameter yang diamati

Mencit diinjeksi dengan darah *allograft* dari mencit dengan strain yang sama dengan hewan coba atau darah *xenograft* dari kucing domestik 5 hari selama 5 minggu. Hal ini akan memicu terjadinya reaksi hipersensitivitas tipe II dan membuat sistem imun mencit menyerang eritrosit mencit lain/kucing yang diinjeksikan. Pemberian darah *allograft* atau *xenograft* secara terus-menerus akan memicu reaksi autoimun terhadap eritrosit mencit itu sendiri pula, sehingga terjadi destruksi eritrosit yang menyebabkan kondisi *autoimmune hemolytic anemia*.

Reaksi hipersensitivitas yang berkelanjutan akan menyebabkan terganggunya sistem *self-tolerance* tubuh dan menimbulkan persistensi *self-reactive T cells* (Abbas *et al.*, 2016). Salah satu subset dari sel T CD4⁺ adalah sel Th17 yang juga berperan dalam reaksi autoimun. Sebuah penelitian menunjukkan bahwa jumlah sel Th17 pada penderita AIHA meningkat. Sel Th17 berperan dalam respon antibodi, yang kemudian mempengaruhi perkembangan AIHA (Xu *et al.*, 2012). Pada penderita AIHA juga ditemukan adanya ketidakseimbangan antara sel Th1 dan Th2, di mana sel Th1 mengalami penurunan sementara sel Th2 mengalami kenaikan (Michel, 2014). Subset lain dari sel T CD4⁺ adalah sel T regulasi (Treg), di mana pada penderita AIHA sel Treg ini mengalami penurunan (Barcellini, 2015). Sehingga, kemungkinan akan terjadi perubahan pada jumlah sel relatif CD4⁺.

Hemolisis terjadi secara intravaskuler dan ekstravaskuler, di mana pada hemolisis ekstravaskuler, terikatnya antibodi pada eritrosit menyebabkan destruksi eritrosit oleh makrofag jaringan dalam sistem mononuklear fagositik (*mononuclear phagocytic system* atau MPS). Destruksi eritrosit oleh MPS

dimediasi oleh reseptor Fc pada permukaan makrofag, reseptor yang berikatan dengan komponen Fc dari antibodi yang menempel pada membran sel eritrosit. Karena MPS terletak di seluruh tubuh, hemolisis ekstravaskuler dapat terjadi pada berbagai macam organ tubuh, namun biasanya hal ini terjadi di hepar dan lien. Hemolisis ekstravaskuler ini dapat menyebabkan terjadinya splenomegali (Mackin, 2014).

Kondisi anemia yang disebabkan oleh AIHA dapat menyebabkan hipoksia dan suplai darah pada berbagai organ-organ tubuh tidak dapat terpenuhi. Hal ini akan menyebabkan terjadinya infark pada jaringan, termasuk organ lien.

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan kerangka konsep yang telah dijabarkan, maka hipotesis dari penelitian ini adalah:

1. Pemberian darah *allograft* dan *xenograft* untuk induksi AIHA pada mencit dapat menyebabkan perubahan pada gambaran histopatologi lien.
2. Pemberian darah *allograft* dan *xenograft* untuk induksi AIHA pada mencit dapat menyebabkan perubahan pada jumlah sel relatif CD4⁺.

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Juni hingga Agustus 2019, yang bertempat di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, Laboratorium Histologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya, Laboratorium Anatomi dan Fisiologi Hewan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya, dan Rumah Sakit Hewan Pendidikan Universitas Brawijaya.

4.2 Alat dan Bahan

4.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi kandang mencit sebanyak 18 kandang beserta tempat minumannya, gunting, pinset, *scalpel blade*, mikroskop cahaya, inkubator, oven, mikropipet, kompor listrik, *freezer*, *waterbath*, cetakan paraffin, vortex, sentrifus, *tissue cassette*, *staining jar* dan *microtome*.

4.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan meliputi 18 ekor mencit (*Mus musculus*) jantan, darah mencit, darah kucing domestik, spuit 1 cc, spuit 3 cc, *vacutainer* sodium sitrat, mikrohematokrit, PBS, pot sampel, formalin 10%, tabung *eppendorf*,

antibodi monoklonal *fluorescein isothiocyanate* (FITC) *anti-mouse CD4*, *object glass*, *cover glass*, ethanol 70%, 80%, 90%, 95%, ethanol absolut, alkohol asam, paraffin cair, xylol, entelan, EWIT, HE (hematoxylin-eosin) *stain* dan PBS.

4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL), yaitu membagi subjek menjadi 3 kelompok secara acak. Setiap kelompok terdiri dari 6 ekor mencit. Kelompok perlakuan dijelaskan dalam tabel 4.1.

Tabel 4.1 Kelompok perlakuan.

Tahapan	Pengaplikasian Perlakuan	Hasil yang Diharapkan
Kontrol Negatif	Mencit dibiarkan hidup normal dengan pakan dan air minum standar selama 5 minggu, pada hari ke 36 dilakukan pengambilan sampel darah, euthanasia dan nekropsi	Kontrol pembanding P1 dan P2
Perlakuan 1 (P1)	Mencit diinjeksi darah dari mencit lain (<i>allograft</i>) sebanyak 0,2 ml untuk masing-masing mencit	AIHA
Perlakuan 2 (P2)	Mencit diinjeksi darah dari kucing domestik (<i>xenograft</i>) sebanyak 0,2 ml untuk masing-masing mencit	AIHA

4.4 Sampel Penelitian

Hewan coba yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) jantan berumur 8-12 minggu dengan berat badan antara 20-25 gram yang diberi pakan

standar serta air minum, dan dilakukan aklimatisasi terhadap mencit selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan kondisi laboratorium. Adapun estimasi besar sampel dapat dihitung menggunakan rumus:

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

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

$$3n-3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Keterangan:

p : Jumlah kelompok perlakuan

n : Jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk 3 macam kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan paling sedikit 6 kali dalam setiap kelompok, sehingga diperlukan 18 ekor mencit.

4.5 Variabel Penelitian

Adapun variabel dari penelitian ini yaitu:

Variabel bebas : Injeksi darah *allograft* dan *xenograft* pada mencit

Variabel terikat : Gambaran histopatologi lien dan jumlah sel relatif CD4⁺

Variabel kendali : Hewan coba mencit jantan berumur 8-12 minggu dan berat badan 20-25 gram

4.6 Tahapan Penelitian

4.6.1 Koleksi Darah *Allograft* dan *Xenograft*

Darah *allograft* diperoleh dari mencit dengan strain yang sama namun berbeda indukan dengan hewan coba. Mencit diambil darahnya melalui intraorbita dengan menggunakan mikrohematokrit (Danneman *et al.*, 2013), sementara darah *xenograft* diperoleh dari kucing domestik yang diambil darahnya melalui vena cephalica (Taylor, 2016). Darah kemudian disimpan dalam tabung *vacutainer* sodium sitrat, dalam suhu 2-6°C (Yagi and Holowaychuk, 2016). Darah donor juga dilakukan pemeriksaan darah lengkap untuk mengetahui jumlah eritrositnya dan ulas darah untuk memastikan bahwa darah bebas dari parasit darah.

4.6.2 Pembuatan Hewan Model *Autoimmune Hemolytic Anemia*

Pembuatan hewan model AIHA dilakukan dengan cara menginjeksikan darah *allograft* atau *xenograft* pada mencit. Darah yang telah dikoleksi diinjeksikan pada mencit melalui intraperitoneal sebanyak 0,2 ml dengan menggunakan sputis 1 cc. Perlakuan ini dilakukan dengan interval 5 kali dalam seminggu, selama 5 minggu (Cox and Keast, 1973).

4.6.3 Nekropsi dan Isolasi Organ Lien

Mula-mula mencit dianesthesi dengan menggunakan xylazine, kemudian dikoleksi darahnya dengan menggunakan mikrohematokrit secara infraorbita sebanyak ±1 ml. Darah yang dikoleksi kemudian disimpan dalam *vacutainer* EDTA (Danneman *et al.*, 2013).

Mencit kemudian dieuthanasia dengan cara dislokasi leher. Setelah dipastikan bahwa mencit sudah mati, keempat kaki mencit difiksasi dengan jarum dan dibuat sayatan kecil di daerah pubis dengan *scalpel blade*, lalu sayatan diperpanjang hingga ke rahang bawah mencit. Cavum abdomen dibuka dengan mengangkat sebagian kecil muskulus pada *midline abdomen* dengan pinset dan memotongnya dengan gunting. Hasil sayatan kemudian diperpanjang hingga os xiphoid dan pubis. Setelah cavum abdomen terbuka, lambung mencit diangkat untuk mengekspos lien. Lien kemudian dikoleksi, dibagi menjadi dua bagian dan masing-masing bagian disimpan dalam pot sampel berisi formalin 10% dan pot sampel berisi PBS steril (Scudamore, 2014).

4.6.4 Isolasi Sel Limfosit dari Organ Lien

Lien yang sudah dikoleksi dicuci dengan PBS steril sebanyak 2-3 kali, kemudian diletakkan pada cawan petri PBS dan dipencet dengan pangkal sputit searah jarum jam. Lien tersebut kemudian disaring dengan *wire*, dimasukkan ke dalam tabung propilen 15 ml dan diberi PBS sebanyak \pm 5 ml pada saringan sel. Suspensi sel tersebut disentrifugasi pada 2500 rpm suhu 4°C selama 5 menit, kemudian peletnya diresuspensi dengan PBS sebanyak 1 ml dan dihomogenisasi dalam tabung *eppendorf*. Diambil sebanyak 70 μ l sel dan dimasukkan ke dalam *microtube*, lalu ditambahkan 500 μ l PBS dan disentrifugasi pada 1500 rpm dengan suhu 10°C selama 5 menit (Roffico dan Djati, 2014).

4.6.5 Pengukuran Jumlah Sel Relatif CD4⁺

Pelet yang telah diisolasi dari lien ditambahkan antibodi monoklonal *fluorescein isothiocyanate* (FITC) *anti-mouse CD4* sebanyak 50 µl, kemudian disimpan di dalam *ice box* dan diinkubasi dalam kondisi gelap selama 15 menit. Dilakukan koneksi antara komputer dengan *flow cytometry* pada keadaan ‘acquiring’ dan setting *software BD Cell Quest Pro*TM sesuai kebutuhan. Sampel kemudian dipindahkan ke dalam kuvet pada *flow cytometry* dengan menggunakan mikropipet, ditambahkan 500 µl PBS dan dihomogenkan dengan pipeting. Kuvet dipasang pada *nozzle BD Biosciences FACSCalibur*TM *flow cytometry* (Roffico dan Djati, 2014). Penghitungan jumlah sel relatif CD4⁺ berdasarkan sel yang terdeteksi positif CD4⁺, yaitu jumlah sel pada kuadran kanan atas (*upper right*; UR) dan kuadran kanan bawah (*lower right*; LR).

4.6.6 Pembuatan Preparat Histopatologi Lien

Organ lien yang telah dikoleksi diambil satu bagian yang diduga terdapat lesi dan dilakukan 8 langkah, yaitu fiksasi, dehidrasi, *clearing*, infiltrasi paraffin, *embedding*, *sectioning*, *staining* dan *mounting*. Mula-mula sampel organ lien difiksasi dalam larutan formalin 10% selama minimal 10 jam (fiksasi), kemudian dimasukkan ke dalam *tissue cassette* dan dimasukkan ke dalam alkohol bertingkat mulai dari 70%, 80%, 90% dan 95%, lalu dilanjutkan ke ethanol absolut I, II dan III selama masing-masing 1 jam (dehidrasi). Setelah itu, dilakukan *clearing* dengan cara sampel organ lien dimasukkan ke dalam xylol I, II dan III selama masing-masing 20 menit. Infiltrasi paraffin dilakukan dengan cara sampel organ

lien dimasukkan ke dalam paraffin cair I, II dan III pada oven suhu 58-60°C. *Embedding* dilakukan dengan cara paraffin IV dicairkan di atas alas kompor listrik, kemudian dituangkan pada cetakan paraffin. Sampel organ lien dikeluarkan dari *tissue cassette* dan ditanamkan pada cetakan paraffin berisi paraffin IV yang cair dengan posisi lesi di bawah dan ditutup kembali dengan *tissue cassette*. Paraffin berisi sampel organ lien dibiarkan mengeras dan disimpan ke dalam *freezer*. *Sectioning* dilakukan dengan cara blok paraffin sampel organ lien dipasang pada *microtome* dan diratakan hingga mendapatkan organ. Sampel organ dipotong dengan ketebalan 5 µm dan potongannya diletakkan pada wadah berisi air. Potongan tersebut kemudian diambil dengan *object glass* berlapis EWIT dan dipindahkan ke *waterbath* berisi air dengan suhu ±40°C. Setelah itu, preparat organ lien tersebut diangin-anginkan. *Staining* dilakukan dengan menggunakan pewarnaan hematoxyline-eosin, yaitu dengan cara preparat organ lien dimasukkan ke dalam inkubator selama 15, kemudian dikeluarkan dan diangin-anginkan selama 10 menit. Setelah itu, preparat dimasukkan ke dalam *staining jar* dan diberi xylol I, II dan III selama masing-masing 20 menit. Setelah itu, preparat diberi ethanol absolut I, II dan III, 95%, 90%, 80% dan 70% selama masing-masing 5 menit. Preparat diberi pewarna hematoxylin selama 5-20 menit, dilanjutkan dengan pemberian larutan alkohol asam selama 4 detik. Preparat kemudian dicuci dengan air mengalir selama 20 menit dan diberi pewarna eosin selama 10-30 menit. Setelah itu, preparat diberi ethanol 70%, 80%, 90%, 95%, ethanol absolut I dan II selama masing-masing 5 detik, dan dilanjutkan dengan ethanol absolut III selama 5 menit. Lalu, preparat diberi xylol I, II dan II selama

10 menit. Terakhir, dilakukan proses *mounting* yaitu dengan cara *object glass* dengan potongan sampel organ lien dibersihkan bagian belakangnya, kemudian pada bagian sampel organ lien ditetesi entelan dan xylol dengan perbandingan 1:1. Bagian sampel organ lien kemudian ditutup dengan *cover glass* dan diangin-anginkan sampai kering (Mescher, 2016).

4.6.7 Pengamatan Preparat Histopatologi Lien

Preparat histopatologi lien mencit diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 40x, 100x, 40x dan 100x. Pengamatan dilakukan dengan mencari bagian lien yang mengalami perubahan patologis.

4.7 Analisis Data

Data yang diperoleh adalah data kuantitatif berupa jumlah sel relatif CD4⁺ dari *flow cytometry* yang kemudian dianalisis dengan menggunakan analisis kuantitatif statistik dan data kualitatif berupa gambaran histopatologi lien. Analisis kualitatif deskriptif dilakukan dengan mengamati histopatologi lien menggunakan mikroskop dengan perbesaran 4x, 10x, 40x dan 100x. Analisis kuantitatif statistik dilakukan dengan menggunakan program SPSS 15.0 dengan uji analisis ragam *One-Way ANOVA* untuk melihat efektivitas bermakna pada setiap kelompok uji dan dilanjutkan dengan Uji Tukey $\alpha = 0,5\%$ untuk mengetahui perbedaan rata-rata setiap perlakuan.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Pemberian Darah *Allograft* dan *Xenograft* untuk Induksi AIHA terhadap Profil Darah Mencit

Immune mediated hemolytic anemia (IMHA) atau *autoimmune hemolytic anemia* (AIHA) adalah penyakit hematologis yang memiliki ciri-ciri berupa reaksi hipersensititas tipe II di mana eritrosit yang dilapisi immunoglobulin, komplemen, atau keduanya dieliminasi dari sirkulasi dengan fagositosis atau destruksi langsung (Sharp and Kerl, 2008). AIHA tidak memiliki gejala patognomonis, sehingga perlu dilakukan berbagai diagnosa laboratorium untuk memastikan terjadinya AIHA. Salah satu diagnosa yang dapat dilakukan adalah pemeriksaan darah lengkap dan pemeriksaan ulasan darah (Manev and Marincheva, 2018). Hasil pemeriksaan darah lengkap yang diambil untuk konfirmasi AIHA pada mencit adalah jumlah eritrosit, kadar hemoglobin (Hb), dan hematokrit (Hct).

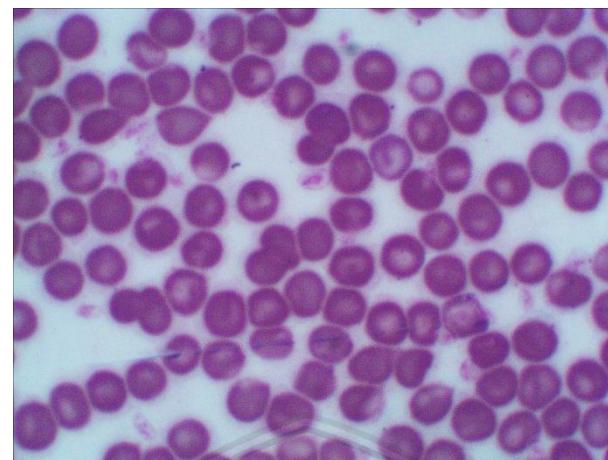
Tabel 5.1 Hasil pemeriksaan darah lengkap kelompok kontrol negatif dan kelompok perlakuan.

	Rata-Rata Jumlah Eritrosit ($10^6/\mu\text{l}$) \pm SD	Rata-Rata Kadar Hemoglobin (g/dl) \pm SD	Rata-Rata Hematokrit (%) \pm SD
Kontrol Negatif	$6,61 \pm 2,26^{\text{b}}$	$6,93 \pm 1,48^{\text{b}}$	$31,16 \pm 11,06^{\text{b}}$
Induksi <i>Allograft</i>	$1,76 \pm 1,07^{\text{a}}$	$0,40 \pm 0,63^{\text{a}}$	$7,75 \pm 4,63^{\text{a}}$
Induksi <i>Xenograft</i>	$3,64 \pm 1,07^{\text{a}}$	$1,52 \pm 0,92^{\text{a}}$	$15,00 \pm 4,82^{\text{a}}$

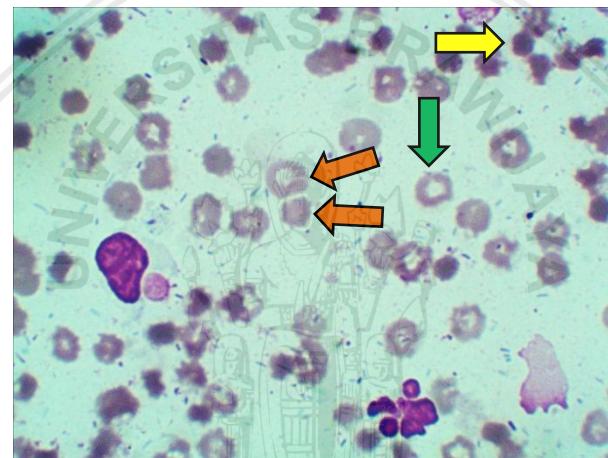
Keterangan: Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan antar perlakuan ($p < 0,05$); SD = Standar Deviasi

Pada tabel 5.1, ditunjukkan bahwa baik jumlah eritrosit, kadar Hb dan Hct pada mencit kelompok P1 (*allograft*) dan P2 (*xenograft*) berbeda signifikan dengan jumlah eritrosit, kadar Hb dan Hct mencit kelompok kontrol negatif, di mana jumlah eritrosit, kadar Hb dan Hct mencit kelompok perlakuan mengalami penurunan. Definisi dari anemia adalah menurunnya eritrosit yang bersirkulasi, sehingga pasien anemik akan memiliki jumlah eritrosit, kadar hemoglobin dan kadar hematokrit yang menurun. Jumlah eritrosit menunjukkan jumlah eritrosit dalam unit volume. Kadar Hb menunjukkan jumlah hemoglobin yang terkandung dalam darah. Hct menunjukkan massa eritrosit dalam persentase darah (Rosenfeld and Dial, 2010). Penurunan ketiga parameter tersebut kemungkinan disebabkan karena terikatnya antibodi pada membran sel eritrosit, yang kemudian memicu destruksi eritrosit secara intravaskuler maupun ekstravaskuler (Mackin, 2014).

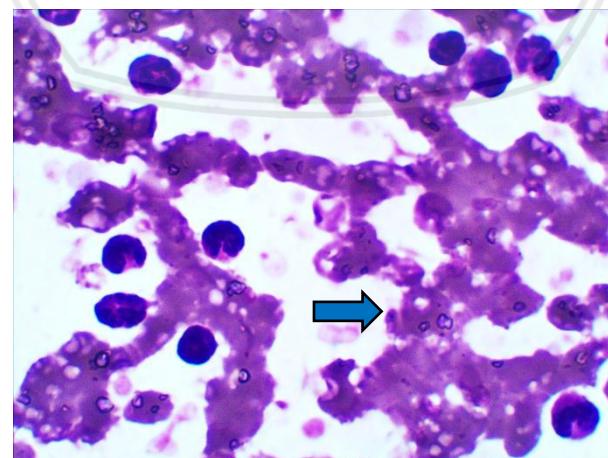
Selain itu, juga dilakukan pemeriksaan ulas darah untuk konfirmasi AIHA pada mencit. Pada hasil ulasan darah kelompok kontrol negatif (Gambar 5.1), eritrosit mencit tampak normal dengan bentuknya yang bikonkaf dan terlihat jelas batasnya, serta tidak ditemukan banyak leukosit pada darah. Menurut Reagan *et al.* (2008) normalnya eritrosit berukuran kecil, tidak memiliki nukleus, berwarna kemerahan, dan berbentuk diskus bikonkaf. Pada hasil ulasan darah kelompok P1 (Gambar 5.2), ditemukan adanya abnormalitas berupa anisositosis, polikromasia dan spherositosis. Ketiga abnormalitas tersebut dapat ditemukan pada ulasan darah penderita AIHA (Manev and Marincheva, 2018). Anisositosis adalah perbedaan ukuran eritrosit, di mana anisositosis biasa ditemukan pada anemia regeneratif seperti AIHA (Reagan *et al.*, 2008). Polikromasia adalah eritrosit yang berukuran



Gambar 5.1 Ulas darah kelompok kontrol negatif, perbesaran 100X.



Gambar 5.2 Ulas darah kelompok P1 (*allograft*), perbesaran 100X.
➡ : Anisositosis; ➡ : Polikromasia; ➡ : Spherosit.



Gambar 5.3 Ulas darah kelompok P2 (*xenograft*), perbesaran 100X.
➡ : Eritrosit yang mengalami lisis.

lebih besar daripada eritrosit normal, dan biasanya memiliki bagian pucat tengah yang besar dan berwarna kebiruan. Polikromasia juga dapat ditemukan pada anemia regeneratif seperti AIHA. Spherosit adalah eritrosit kecil yang tidak memiliki bagian tengah yang pucat, menunjukkan bahwa eritrosit tersebut tidak memiliki bentuk bikonkaf. Spherosit merupakan ciri khusus dari penyakit AIHA, dan terbentuk ketika makrofag memfagosit bagian abnormal dari membran eritrosit, menyebabkan eritrosit berbentuk menyerupai bola (*sphere*) (Rosenfeld and Dial, 2010).

Pada hasil ulasan darah kelompok P2 (Gambar 5.3), ditemukan banyaknya eritrosit yang mengalami lisis. Diduga eritrosit mengalami lisis karena terjadinya hemolisis intravaskuler, yaitu tingginya kadar antibodi yang berikatan pada membran eritrosit dan fiksasi komplemen menyebabkan membran sel mengalami kerusakan parah hingga cairan ekstraseluler masuk ke sitoplasma, menyebabkan eritrosit bengkak dan mengalami ruptur ketika masih dalam sirkulasi (Mackin, 2014).

5.2 Perbandingan Pemberian Darah *Allograft* dan *Xenograft* untuk Induksi AIHA pada Mencit Berdasarkan Gambaran Histopatologi Lien

Pada kasus AIHA, terikatnya antibodi pada membran sel eritrosit memicu destruksi eritrosit dengan beberapa mekanisme, salah satunya yaitu hemolisis ekstravaskuler. Pada hemolisis ekstravaskuler, destruksi eritrosit oleh MPS (*mononuclear phagocytic system*) dimediasi oleh reseptor Fc pada permukaan makrofag, reseptor yang berikatan dengan komponen Fc dari antibodi yang

menempel pada membran sel eritrosit. Karena MPS terletak di seluruh tubuh, hemolisis ekstravaskuler dapat terjadi pada berbagai macam organ tubuh, namun biasanya hal ini terjadi di hepar dan lien (Mackin, 2014). Pada penelitian ini, salah satu parameter yang digunakan adalah histopatologi lien dengan menggunakan pewarnaan *hematoxyline-eosin* (HE).

Lien merupakan organ limfoid terbesar dalam tubuh hewan, dengan fungsi antara lain sebagai tempat penyimpanan darah, destruksi eritrosit di mana sel fagosit memakan dan menghancurkan eritrosit, mengeluarkan partikel asing dan bakteri dari sirkulasi dan memproduksi limfosit untuk sistem imunitas (Aspinall and Cappello, 2015). Bagian dalam lien merupakan jaringan lunak yang dibagi menjadi 2 bagian, yaitu pulpa putih dan pulpa merah. Pulpa putih terdiri dari jaringan limfoid yang terlokalisir dan mengandung limfosit yang mengkloning diri mereka sendiri ketika terjadi sebuah respon imun. Pulpa merah terdiri dari pembuluh darah, makrofag jaringan dan tempat penyimpanan eritrosit bernama sinus. Makrofag jaringan menyaring antigen dan partikel asing lainnya dari cairan limfa dan mengeluarkan eritrosit yang sudah tua atau abnormal (Colville and Bassett, 2016).

Gambar 5.4 menunjukkan kondisi lien mencit kelompok kontrol negatif dan kelompok P1 serta P2 secara makros. Tampak lien kelompok P1 dan P2 mengalami splenomegali, ditunjukkan dengan ukuran lien yang lebih besar dibanding lien kelompok kontrol negatif. Menurut Yogeshpriya *et al.* (2017), splenomegali pada kasus AIHA terjadi karena MPS dalam lien dan hepar merupakan situs utama untuk destruksi eritrosit. Selain itu, lien kelompok P2

tampak lebih pucat (Gambar 5.5), diduga karena lien mengalami nekrosis. Nekrosis adalah bentuk dari kematian sel di mana membran sel terpecah sehingga enzim seluler keluar dari sel dan mencerna sel (Kumar *et al.*, 2018). Nekrosis dapat terjadi karena hipoksia anemik, di mana suplai darah ke lien tidak mencukupi (McManus, 2001).



Gambar 5.4 Organ lien mencit secara makros, tampak perbedaan ukuran antara lien kelompok kontrol negatif dengan lien kelompok P1 dan P2.



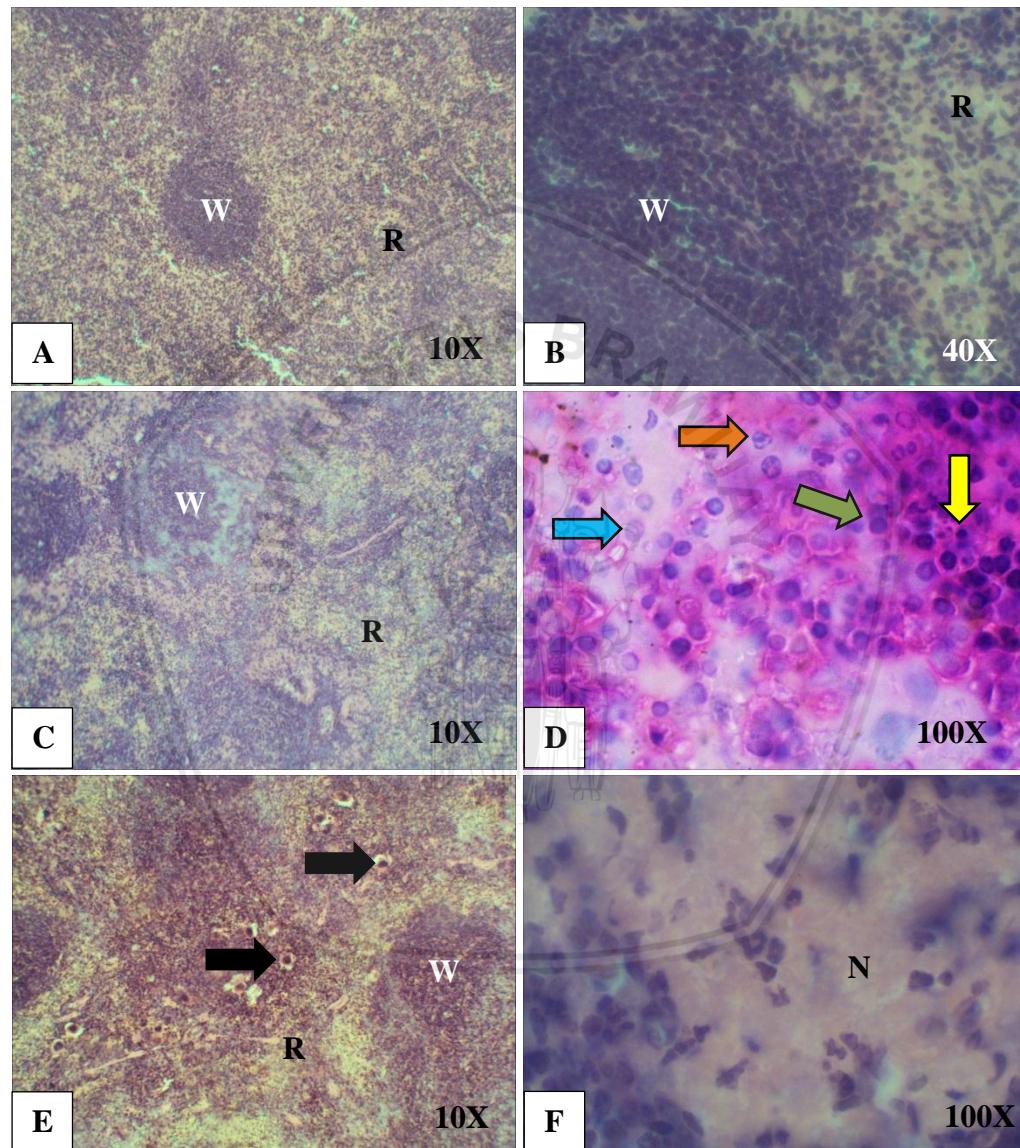
Gambar 5.5 Organ lien mencit kelompok P2 (*xenograft*) tampak pucat dibanding lien kelompok kontrol negatif dan lien kelompok P1 (*allograft*).

Gambar 5.6A dan 5.6B menunjukkan gambaran histologi lien mencit kelompok kontrol negatif, di mana mencit tidak diberi perlakuan apa-apa. Pada kelompok kontrol negatif tersebut, lien tidak menunjukkan adanya abnormalitas, baik pada pulpa putih maupun pulpa merah. Gambar 5.6C dan 5.6D menunjukkan gambaran histopatologi lien mencit kelompok perlakuan 1, di mana mencit

diinduksi AIHA dengan menggunakan darah *allograft*. Pada kelompok perlakuan 1, lien mengalami nekrosis di berbagai bagian, sehingga tidak ada batasan yang jelas antara pulpa merah dan pulpa putihnya. Nekrosis diduga terjadi karena hipoksia anemik , di mana lien tidak menerima suplai darah yang cukup akibat anemia (McManus, 2001). Pada perbesaran 100X (Gambar 5.6D) tampak adanya sel yang mengalami nekrosis pada berbagai tahapan, yaitu piknosis, karyoreksis dan karyolisis. Piknosis ditunjukkan dengan mengecilnya ukuran nukleus akibat DNA memadat menjadi massa gelap yang menyusut. Karyoreksis ditunjukkan dengan nukleus yang mengalami ruptur sehingga terjadi fragmentasi nukleus. Karyolisis ditunjukkan dengan memudarnya warna basofilik pada nukleus, akibat peleburan kromatin oleh aksi DNase (Kumar *et al.*, 2018).

Pada kelompok perlakuan 2, ditemukan adanya hiperplasia pulpa putih/hiperplasia limfoid, *giant cell* dan nekrosis koagulatif. Hiperplasia pulpa putih terjadi sebagai respon autoimun terhadap darah *xenograft* yang diinjeksikan, di mana lien berusaha memproduksi limfosit lebih banyak untuk menghancurkan darah tersebut (Aspinall and Cappello, 2015). *Giant cell* terbentuk dari makrofag yang teraktivasi dan menyatu. Ketika respon imun persisten seperti pada kasus AIHA terjadi, makrofag akan mengaktifasi sel T untuk memproduksi sitokin seperti IL-2, yang kemudian akan mengaktifasi sel T lainnya, sehingga respon imun terus terjadi dan aktivasi makrofag pun terus berjalan, menyebabkan terbentuknya *giant cell*. Nekrosis koagulatif sendiri merupakan ciri-ciri dari infark, di mana organ yang terkena tidak mendapat suplai darah yang cukup

(Kumar *et al.*, 2018). Diduga infark tersebut terjadi karena hipoksia anemik yang disebabkan oleh AIHA (McManus, 2001).



Gambar 5.6 Histopatologi lien kelompok kontrol negatif (A, B), kelompok P1 (C, D) dan kelompok P2 (E, F). W: Pulpa putih; R: Pulpa merah; ➔: Sel normal; ➤: Sel piknosis; ➡: sel karyoreksis; ➙: sel karyolisis. ➡: Giant cell; N: Nekrosis koagulatif.

5.3 Perbandingan Pemberian Darah *Allograft* dan *Xenograft* untuk Induksi AIHA pada Mencit Berdasarkan Jumlah Sel Relatif CD4⁺

CD4 merupakan salah satu dari dua glikoprotein permukaan yang terlibat dalam pengenalan antigen dan aktivasi sel T (Brenchley and Bosselut, 2014). Sel T CD4⁺ dibagi menjadi sel T *helper* (Th) dan sel T regulasi (Treg). Fungsi utama dari sel Th adalah menyediakan bantuan untuk produksi antibodi (imunitas humoral) atau sitotoksitas (*cell-mediated immunity*) (Day and Schultz, 2014), sementara sel Treg berperan dalam mengatur sistem imun dan menjaga keseimbangan antara toleransi periferal dan imunitas (Tizard, 2013). Jumlah sel relatif CD4⁺ diukur dengan metode *flow cytometry* dan hasil pengukurannya dianalisis secara statistik dengan uji *One-Way ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji Tukey. Hasil jumlah sel relatif CD4⁺ dari kelompok kontrol negatif dan kelompok perlakuan dapat dilihat pada tabel 5.2.

Tabel 5.2 Jumlah sel relatif CD4⁺ kelompok kontrol negatif dan kelompok perlakuan.

	Kontrol Negatif (%)	Induksi <i>Allograft</i> (%)	Induksi <i>Xenograft</i> (%)
M1	23,68	7,39	12,90
M2	16,57	9,53	12,15
M3	19,70	4,61	18,94
M4	16,63	3,41	11,91
M5	11,97	9,49	9,01
M6	13,82	12,60	13,01
Mean ± SD	$17,06 \pm 4,19$	$7,84 \pm 3,42$	$12,99 \pm 3,26$

Untuk mengetahui apakah data yang telah didapatkan dari hasil pengamatan terdistribusi dengan normal ($p > 0,05$), maka dilakukan uji normalitas Kolmogorov-Smirnov (Lampiran 12.2). Didapatkan hasil uji untuk jumlah sel relatif CD4⁺ pada kelompok kontrol negatif yaitu $p = 0,200$, untuk kelompok perlakuan 1 yaitu $p = 0,200$, dan untuk kelompok perlakuan 2 yaitu $p = 0,039$. Nilai p dari kelompok kontrol negatif dan kelompok P1 menunjukkan angka lebih besar dari 0,05, sehingga dapat disimpulkan bahwa data yang didapatkan terdistribusi normal, sementara nilai p dari kelompok P2 menunjukkan angka lebih kecil dari 0,05, sehingga dapat disimpulkan bahwa data yang didapatkan tidak terdistribusi normal. Untuk mengetahui apakah data yang didapatkan homogen atau tidak, maka dilakukan uji Levene Statistic (Lampiran 12.3), dan didapatkan hasil yaitu $p = 0,696$ ($p > 0,05$), sehingga dapat disimpulkan bahwa data yang didapatkan dari semua kelompok adalah homogen. Hasil uji Tukey dari jumlah sel relatif CD4⁺ dapat dilihat pada Tabel 5.3.

Tabel 5.3 Hasil uji Tukey jumlah sel relatif CD4⁺.

	Rata-Rata Jumlah Sel Relatif CD4 ⁺ (%) ± SD	P
Kontrol Negatif	$17,06 \pm 4,19^b$	0,163
Induksi <i>Allograft</i>	$7,84 \pm 3,42^a$	0,001
Induksi <i>Xenograft</i>	$12,99 \pm 3,26^{ab}$	0,066

Keterangan: Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan antar perlakuan ($p < 0,05$); SD = Standar Deviasi

Hasil uji Tukey pada tabel di atas menunjukkan bahwa jumlah sel relatif CD4⁺ kelompok perlakuan 1 jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif

menunjukkan hasil yang berbeda signifikan ($p < 0,05$) yang ditandai dengan perbedaan notasi, namun kelompok perlakuan 2 jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif tidak menunjukkan hasil yang berbeda signifikan ($p > 0,05$) di mana kelompok perlakuan 2 dan kelompok kontrol negatif maupun kelompok perlakuan 1 memiliki notasi yang sama. Menurut Kirkley (1999), ketika darah ditransfusikan kepada resipien, maka leukosit dari darah donor dapat menjadi *antigen presenting cell* (APC) yang ‘non-profesional’ karena leukosit dari darah donor ini tidak dapat mengaktifasi sel T *helper* (Th), sehingga menyebabkan anergi sel Th. Leukosit donor hanya mengekspresikan sedikit kostimulator B7 yang nantinya akan berikatan dengan CD28 pada sel Th dalam aktivasi sel Th. Namun pada permukaan sel Th juga ditemukan molekul CTLA-4 yang juga berikatan dengan B7, dan kemungkinan memiliki peran dalam menghambat respon sel Th. Ketika ekspresi B7 pada APC rendah, maka CTLA-4 akan lebih banyak berikatan pada B7 dibanding CD28 karena afinitas ikatannya yang lebih tinggi, sehingga sel Th gagal teraktivasi dan menjadi anergik, menyebabkan turunnya jumlah sel relatif CD4⁺. Subset lain dari sel T CD4⁺ adalah sel T regulasi (Treg), di mana pada penderita AIHA sel Treg ini mengalami penurunan (Barcellini, 2015). Penurunan ini mungkin disebabkan karena injeksi darah terus-menerus akan menyebabkan sistem regulasi autoimun rusak, sehingga sel Treg mengalami kerusakan dan terjadi AIHA (Tizard, 2013). Selain itu, rendahnya jumlah sel relatif CD4⁺ pada kelompok perlakuan 1 juga mungkin berhubungan dengan terjadinya nekrosis pada lien kelompok perlakuan 1. Pada Gambar 5.6C, tampak bahwa pulpa putih dan pulpa merah pada lien

kelompok perlakuan 1 tidak memiliki batasan yang jelas dan banyak mengalami nekrosis, sehingga kemungkinan produksi sel limfosit menjadi tidak maksimal.

Jumlah sel relatif CD4⁺ pada kelompok perlakuan 2 yang tidak berbeda signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif maupun kelompok perlakuan 1 menunjukkan bahwa jumlah sel relatif CD4⁺ mulai mengalami penurunan. Sel T CD4⁺ memiliki beberapa subset, yaitu Th1, Th2, Th17 dan sel Treg. Menurut Xu *et al.* (2012), jumlah sel Th17 meningkat pada kasus AIHA, di mana sel Th17 berperan penting dalam produksi antibodi dan proses autoimun. Menurut Michel (2014), pada penderita AIHA ditemukan adanya ketidakseimbangan antara sel Th1 dan Th2, di mana sel Th1 mengalami penurunan sementara sel Th2 mengalami kenaikan. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Kirkley (1999), ketidakseimbangan ini mungkin terjadi karena adanya sel Th2 yang bersifat supresif terhadap Sel Th1, dengan cara melepaskan faktor penghambat seperti IL-10 dan TGF-β ketika aktivasi sel Th, sehingga sel Th terdiferensiasi menjadi sel Th2 atau bahkan menjadi sel T anergik. Menurut Tizard (2013) dan Barcellini (2015), juga terjadi kerusakan sel Treg akibat injeksi darah yang terus-menerus, sehingga jumlah dari sel T regulator pun menurun. Jumlah sel relatif CD4⁺ dari kelompok perlakuan 2 yang tidak berbeda signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif disebabkan oleh kenaikan dan penurunan berbagai subset dari sel T CD4⁺. Subset dari sel T CD4⁺ yang mengalami peningkatan merupakan sel T CD4⁺ yang berperan dalam membantu produksi antibodi. Selain itu, sel T CD4⁺ pada kelompok perlakuan 2 juga diduga mengalami respon autoimun seperti pada kelompok perlakuan 1, namun

penurunannya tidak seperti kelompok perlakuan 1 karena kondisi lien kelompok perlakuan 2 yang mengalami hiperplasia pulpa putih, di mana pulpa putih memproduksi sel limfosit dan ditemukannya banyak *giant cell* yang terbentuk dari makrofag yang menyatu, di mana dalam respon imun makrofag tersebut akan terus-menerus mengaktivasi sel T.



BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Induksi *autoimmune hemolytic anemia* (AIHA) pada mencit menggunakan darah *allograft* dan *xenograft* menyebabkan berbagai perubahan pada lien berupa splenomegali. Selain itu, induksi dengan darah *allograft* menyebabkan terjadinya nekrosis pada lien, sementara induksi dengan darah *xenograft* juga menyebabkan hiperplasia pulpa putih dan banyaknya *giant cell*.
2. Induksi *autoimmune hemolytic anemia* (AIHA) pada mencit menggunakan darah *allograft* dan *xenograft* menyebabkan penurunan jumlah sel relatif CD4⁺ yang signifikan, di mana darah *allograft* menyebabkan penurunan yang lebih signifikan dibandingkan darah *xenograft*.

6.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah didapatkan, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh induksi darah *allograft* dan *xenograft* untuk AIHA terhadap profil genetik mencit untuk mengetahui adanya perubahan pada profil genetik mencit sehingga dapat digunakan sebagai dasar deteksi dini AIHA pada hewan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Pillai, S. 2016. *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System, Fifth Edition*. Philadelphia: Elsevier Inc., 204, 220.
- Aspinall, V. and Cappello, M. 2015. *Introduction to Veterinary Anatomy and Physiology Textbook, Third Edition*. Philadelphia: Elsevier Inc., 90.
- Balch, A. and Mackin, A. 2007. Canine Immune-Mediated Hemolytic Anemia: Pathophysiology, Clinical Signs, and Diagnosis. *Compend* 29(4): 217-225.
- Barcellini, W. 2015. New Insight in the Pathogenesis of Autoimmune Hemolytic Anemia. *Transfus Med Hemother* 42: 290.
- Bogdanske, J. J., Hubbard-Van Stelle, S., Riley, M. R., and Schiffman, B. M. 2010. *Laboratory Mouse Procedural Techniques: Manual and DVD*. Boca Raton: CRC Press.
- Brenchley, J. M. and Bosselut, R. 2014. "CD4 and CD8 Molecules: Molecular Biology, Expression, and Function." *Reference Module in Biomedical Research, Third Edition*. Maryland: National Institutes of Health, 1-9.
- Colville, T. and Bassett, J. M. 2016. *Clinical Anatomy and Physiology for Veterinary Technicians, Third Edition*. Philadelphia: Elsevier Inc, 314.
- Cox, K. O. and Keast, D. 1973. Erythrocyte Autoantibodies Induced in Mice Immunized with Rat Erythrocytes. *Immunology* 25: 531-539.
- Danneman, P. J., Suckow, M. A., and Brayton, C. F. 2013. *The Laboratory Mouse, Second Edition*. Boca Raton: CRC Press, 1, 160, 164.
- Day, M. J. And Schultz, R. D. 2014. *Veterinary Immunology: Principles and Practice, Second Edition*. Boca Raton: CRC Press, 95, 102-103.
- Doan, T., Melvoid, R., Viselli, S. and Waltenbaugh, C. 2013. *Lippincott's Illustrated Reviews: Immunology, Second Edition*. Philadelphia: Lippincott William and Wilkins, 115-116, 262.
- Hod, E. A., Cadwell, C. M., Liepkalns, J. S., Zimring, J. C., Sokol, S. A., Schirmer, D. A., Jhang, J., and Spitalnik, S. L. 2008. Cytokine Storm in a Mouse Model of IgG-Mediated Hemolytic Transfusion Reactions. *Blood* 112: 891-894.
- Howie, H. L. and Hudson, K. E. 2018. Murine Models of Autoimmune Hemolytic Anemia. *Curr Opin Hematol* 25(6): 473-481.

- Ishihara, M., Fujino, Y., Setoguchi, A., Takahashi, M., Nakashima, K., Ohno, K., and Tsujimoto, H. 2010. Evaluation of Prognostic Factors and Establishment of a Prognostic Scoring System for Canine Primary Immune Mediated Hemolytic Anemia. *J. Vet. Med. Sci.* 72(4): 465-470.
- Kirkley, S. A. 1999. Proposed Mechanisms of Transfusion-Induced Immunomodulation. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 6(5): 653-654.
- Kumar, V., Abbas, A. K., and Aster, J. C. 2018. *Robbins Basic Pathology, Tenth Edition*. Philadelphia: Elsevier Inc., 34-35, 84.
- Mackin, A. 2014. Immune-Mediated Hemolytic Anemia: Pathophysiology and Diagnosis. *Delaware Valley Academy Veterinary Medicine*: 1-54.
- Manev, I. and Marincheva, V. 2018. Canine Immune-Mediated Hemolytic Anemia – Brief Review. *Tradition and Modernity in Veterinary Medicine* 3(1): 59-64.
- McCullough, S. 2003. Immune-Mediated Hemolytic Anemia: Understanding the Nemesis. *Vet Clin Small Anim* 33: 1295-1315.
- McManus, P. M. 2001. Correlation Between Leukocytosis and Necropsy Findings in Dogs with Immune-Mediated Hemolytic Anemia: 34 Cases (1994-1999). *JAVMA* 218(8): 1308-1313.
- Mescher, A. L. 2016. *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, Fourteenth Edition*. New York: McGraw-Hill Education, 1-3, 288.
- Michel, M. 2014. Warm Autoimmune Hemolytic Anemia: Advances in Pathophysiology and Treatment. *Presse Med.* 43: e98.
- Paes, G., Paepe, D., Veldeman, J., Campos, M., and Daminet, S. 2010. Immune-Mediated Hemolytic Anemia (IMHA) in Cats – Part 1: A Review. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 79: 415-423.
- Piek, C. J. 2011. Canine Idiopathic Immune-Mediated Haemolytic Anaemia: A Review with Recommendations for Future Research. *Veterinary Quarterly* 31(3): 129-141.
- Roffico, dan Djati, M. S. 2014. Efektivitas Pemberian Ekstrak Ethanol Daun *Polyscias obtusa* dan *Elephantopus scaber* terhadap Modulasi Sel T CD4⁺ dan CD8⁺ pada Mencit Bunting BALB/c. *Biotropika* 2(3): 174-180.
- Rosenfeld, A. J. and Dial, S. M. 2010. *Clinical Pathology for the Veterinary Team*. New Jersey: Blackwell Publishing Ltd., 20-21.

- Scudamore, C. L. 2014. *A Practical Guide to the Histology of the Mouse*. New Jersey: John Wiley and Sons, Ltd., 6-10.
- Sharp, C. and Kerl, M. E. 2008. Immune-Mediated Hemolytic Anemia. *Standards of Care – Emergency and Critical Care Medicine* 10(10): 1-6.
- Sirois, M. 2016. *Laboratory Animal and Exotic Pet Medicine: Principles and Procedures, Second Edition*. Philadelphia: Elsevier Inc, 96, 98.
- Studdert, V. P., Gay, C. C., and Blood, D. C. 2012. *Saunders Comprehensive Veterinary Dictionary, Fourth Edition*. Philadelphia: Elsevier Inc, 497.
- Swann, J. W. and Skelly, B. J. 2016. Canine Autoimmune Hemolytic Anemia: Management Challenges. *Veterinary Medicine – Research and Reports* 7: 101-112.
- Swann, J. W., Szladovits, B. and Glanemann, B. 2016. Demographic Characteristics, Survival and Prognostic Factors for Mortality in Cats with Primary Immune-Mediated Hemolytic Anemia. *J Vet Intern Med*: 147-156.
- Taylor, S. M. 2016. *Small Animal Clinical Techniques, Second Edition*. Philadelphia: Elsevier Inc., 1-3.
- Tizard, I. 2013. *Veterinary Immunology, Ninth Edition*. Philadelphia: Elsevier Inc., 216, 402-403.
- Treuting, P. M., Dintzis, S. M., and Montine, K. S. 2018. *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse, Rat, and Human Atlas, Second Edition*. Cambridge: Academic Press, 393.
- Villiers, E. and Ristić, J. 2016. *BSAVA Manual of Canine and Feline Clinical Pathology, Third Edition*. Quedgeley: British Small Animal Veterinary Association, 49.
- Xu, L., Zhang, T., Liu, Z., Li, Q., Xu, Z. And Ren, T. 2012. Critical Role of Th17 Cells in Development of Autoimmune Hemolytic Anemia. *Experimental Hematology* 40(12): 994-1004.
- Yagi, K. and Holowaychuk, M. K. 2016. *Manual of Veterinary Transfusion Medicine and Blood Banking*. New Jersey: John Wiley and Sons, Ltd., 250.
- Yogeshpriya, S., Jayalakshmi, K., Veeraselvam, M., Krishnakumar, S., and Selvaraj, P. 2017. Review on Immune Mediated Haemolytic Anemia. *International Journal of Science, Environment and Technology* 6(1): 267-275.



Lampiran 1. Sertifikat Laik Etik


KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN
 Jalan Veteran Malang - 65145, Jawa Timur - Indonesia
 Telp. (62) (0341) 551611 Ext. 168; 569117; 567192 - Fax. (62) (0341) 564755
<http://www.fk.ub.ac.id> e-mail : kep.fk@ub.ac.id

KETERANGAN KELAIKAN ETIK <i>("ETHICAL CLEARANCE")</i>	
No. 202 / EC / KEPK / 07 / 2019	
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA, SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN	
JUDUL	: Perbandingan Hewan Model <i>Auto Immune Hemolytic Anemia</i> (AIHA) dengan Induksi Darah Xenograft dan Allograft.
PENELITI UTAMA ANGGOTA	: drh. Fajar Shodiq Permata, M.Biotech : 1. Dr. Dra. Med. Vet. Herawati, MP 6. David Christian P 2. drh. Dyah Ayu Oktaviani AP, M.Biotech 7. Ike Aurorah Afifah 3. Dhita Evi Aryani, S.Farm, M.Farm.Klin, Apt 8. William Putra Utomo 4. Alvinda Ayu Kartikasari 9. Immanuel Kavisson J 5. Clara Widya Pithaloka 10. Luica Leony Allo L
UNIT / LEMLBAGA	: Fakultas Kedokteran Hewan – Universitas Brawijaya Malang.
TEMPAT PENELITIAN	: Laboratorium Hewan Coba UIN, Laboratorium Patologi Klinik FKUB, Laboratorium Histologi FKH UB dan Laboratorium Biomol FMIPA UB
DINYATAKAN LAIK ETIK.	
Malang, Ketua	
 Prof. Dr. dr. Moch. Istiadjid ES, SpS, SpBS(K), SH, M.Hum, Dr(Hk) NIPK. 20180246051611001	
Catatan : Keterangan Laik Etik Ini Berlaku 1 (Satu) Tahun Sejak Tanggal Dikeluarkan Pada Akhir Penelitian, Laporan Pelaksanaan Penelitian Harus Diserahkan Kepada KEPK-FKUB Dalam Bentuk Soft Copy. Jika Ada Perubahan Protokol Dan / Atau Perpanjangan Penelitian, Harus Mengajukan Kembali Permohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol)	

Lampiran 2. Hasil Pemeriksaan Darah Lengkap Hewan Donor

2.1 Donor *Allograft* (Mencit)

RUMAH SAKIT HEWAN PENDIDIKAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Kampus II UB, Puncak Dieng Eksklusif, Desa Kalisongo, Dau, Malang, Jawa Timur 65151

Telp. 081230232044, Email: rshp.brawijaya@gmail.com

No. Kartu	:	No. Lab	766
Nama Pasien	: mencit1	Pemilik	: Lucia
Jenis/Ras Hewan	: mencit	Alamat/Telp	:
Jenis Kelamin	:	Tanggal Periksa	: 02/08/2019
Umur	: 15-20 minggu	Dokter Hewan	: drh. Fajar
Anamnese	:		

PEMERIKSAAN	HASIL	SATUAN	KISARAN NORMAL
			TIKUS
Hematologi:			
Sel Darah Putih (WBC)	5,3	$10^3/\mu\text{L}$	3,48-14,03
Sel Darah Merah (RBC)	15,04	$10^6/\mu\text{L}$	6,93-12,24
Hemoglobin (Hb)	7,8	g/dL	12,6-20,5
Hematokrit (HCT)	74,7	%	42,1-68,3
MCV	49,7	fL	50,7-64,4
MCH	5,2	pg	13,2-17,6
MCHC	10,4	g/dL	23,3-32,7
Trombosit (PLT)	829	$10^3/\mu\text{L}$	420-1698
Limfosit	79,1	%	48,81-83,19
Monosit	14,1	%	3,29-12,48
Granulosit	6,8	%	9,86-39,11
Limfosit	4,2	$10^3/\mu\text{L}$	2,22-9,83
Monosit	0,8	$10^3/\mu\text{L}$	0,21-1,25
Granulosit	0,3	$10^3/\mu\text{L}$	0,58-3,83
RDW	15,1	%	16,9-23,4
MPV	5,3	fL	4,6-5,9
Hasil Interpretasi:	total leukosit dan differential leukosit terkesan normal. Total eritrosit dan hematokrit meningkat indikasi polistemia antisipasi terhadap kemungkinan dehidrasi. Total trombosit terkesan normal.		

Keterangan:

Pemeriksa,

(drh. Ulvi Hudriyah)



Penanggung Jawab Lab. harian

(drh. Ahmad Fauzi, M.Sc)

2.2 Donor *Xenograft* (Kucing)

RUMAH SAKIT HEWAN PENDIDIKAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Kampus II UB, Puncak Dieng Eksklusif, Desa Kalisongo, Dau, Malang, Jawa Timur 65151
Telp. 081230232044, Email: rshp.brawijaya@gmail.com

No. Kartu	:	No. Lab	763
Nama Pasien	:kitty	Pemilik	:luica
Jenis/Ras Hewan	: cat	Alamat/Telp	:
Jenis Kelamin	: female	Tanggal Periksa	:02/08/2019
Umur	: 3 thn	Dokter Hewan	: drh. Fajar
Anamnese	:		

PEMERIKSAAN	HASIL	SATUAN	KISARAN NORMAL	
			ANJING	KUCING
Hematologi:				
Sel Darah Putih (WBC)	22,3	10 ³ /µL	6.0 - 17.0	5.5 - 19.5
Sel Darah Merah (RBC)	13,6	10 ⁶ /µL	5.5 - 8.5	5.0 - 10.0
Hemoglobin (Hb)	10,2	g/dL	12.0 - 18.0	8.0 - 15.0
Hematokrit (HCT)	67	%	37.0 - 55.0	24.0 - 45.0
MCV	49	fL	60.0 - 77.0	39.0 - 55.0
MCH	7,5	pg	19.5 - 24.5	12.5 - 17.5
MCHC	15,2	g/dL	32.0 - 36.0	30.0 - 36.0
Trombosit (PLT)	265	10 ³ /µL	200 - 500	300 - 800
Limfosit	16,3	%	12.0 - 30.0	20.0 - 55.0
Monosit	5,2	%	3.0 - 10.0	1.0 - 4.0
Granulosit	78,5	%	60.0 - 80.0	35.0 - 78.0
Limfosit	3,4	10 ³ /µL	1.0 - 4.8	1.5 - 7.0
Monosit	1,1	10 ³ /µL	0.15 - 1.35	0.0 - 0.85
Granulosit	17,8	10 ³ /µL	3.5 - 14.0	2.5 - 14
RDW-CV	18,7	%	12.0 - 16.0	13.0 - 17.0
RDW-SD	41,1	fL	35-56	35-56
PCT	0,274	%	0.0 - 2.9	0.0 - 2.9
MPV	10,4	fL	6.7 - 11.0	12.0 - 17.0
PDW	10,4	%	0.0 - 50.0	0.0 - 50.0
P-LCR	38,9	%	13-43	13-43
Hasil Interpretasi:	Leukositosis granulositosis indikasi respon patologi sistemik terkait infeksi atau inflamasi yang bersifat akut. Total eritrosit dan hematokrit meningkat indikasi polisitemia antisipasi terhadap kemungkinan dehidrasi. Trombositopenia indikasi penurunan trombosit dalam sirkulasi, antisipasi terhadap kemungkinan perdarahan atau gangguan fungsi hati.			

Keterangan:
Pemeriksa,

(drh. Ulvi Hudriyah)

Penanggung Jawab lab. harian
(drh. Ahmad Faizal, M.Sc.)



Lampiran 3. Hasil Uji Ulas Darah Hewan Donor

RUMAH SAKIT HEWAN PENDIDIKAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Kampus II UB, Puncak Dieng Eksklusif, Desa Kalisongo, Dau, Malang, Jawa Timur 65151

Telp. 081230232044, Email: rsdp.brawijaya@gmail.com

LAPORAN SITOLOGI

Spesimen : ulas darah

No. Kartu	:	Mencit1	No. Lab	:	drh Fajar
Nama Pasien	:	Mencit1	Pemilik	:	
Jenis/Ras hewan	:		Alamat/Telp	:	4 Agustus 2019
Jenis Kelamin	:		Tanggal Periksa	:	
Umur	:	15-20 minggu	Dokter Hewan	:	drh. Ahmad Faizi
Anamnese	:				

Eritrosit		Leukosit		Trombosit		Parasit Darah	
Morfologi	Sebaran	Abnormalitas	Dominan	Jumlah sel	Sebaran	Eritrosit	Leukosit
Seragam	merata	Tear drop	dominasi sel mononuklear (monosit dan limfosit)	1--2	merata	merata	

No. Kartu	:	Mencit2	No. Lab	:	drh Fajar		
Nama Pasien	:	Mencit	Pemilik	:			
Jenis/Ras Hewan	:		Alamat/Telp	:	4 Agustus 2019		
Jenis Kelamin	:		Tanggal Periksa	:			
Umur	:	15-20 minggu	Dokter Hewan	:	drh. Ahmad Faizi		
Anamnese	:						

Eritrosit		Leukosit		Trombosit		Parasit Darah	
Morfologi	Sebaran	Abnormalitas	Dominan	Jumlah sel	Sebaran	Eritrosit	Leukosit
sedikit ber variasi	merata	Tear drop, helmet cell, bur cell, spherocyte	monosit	1-2	merata	merata	

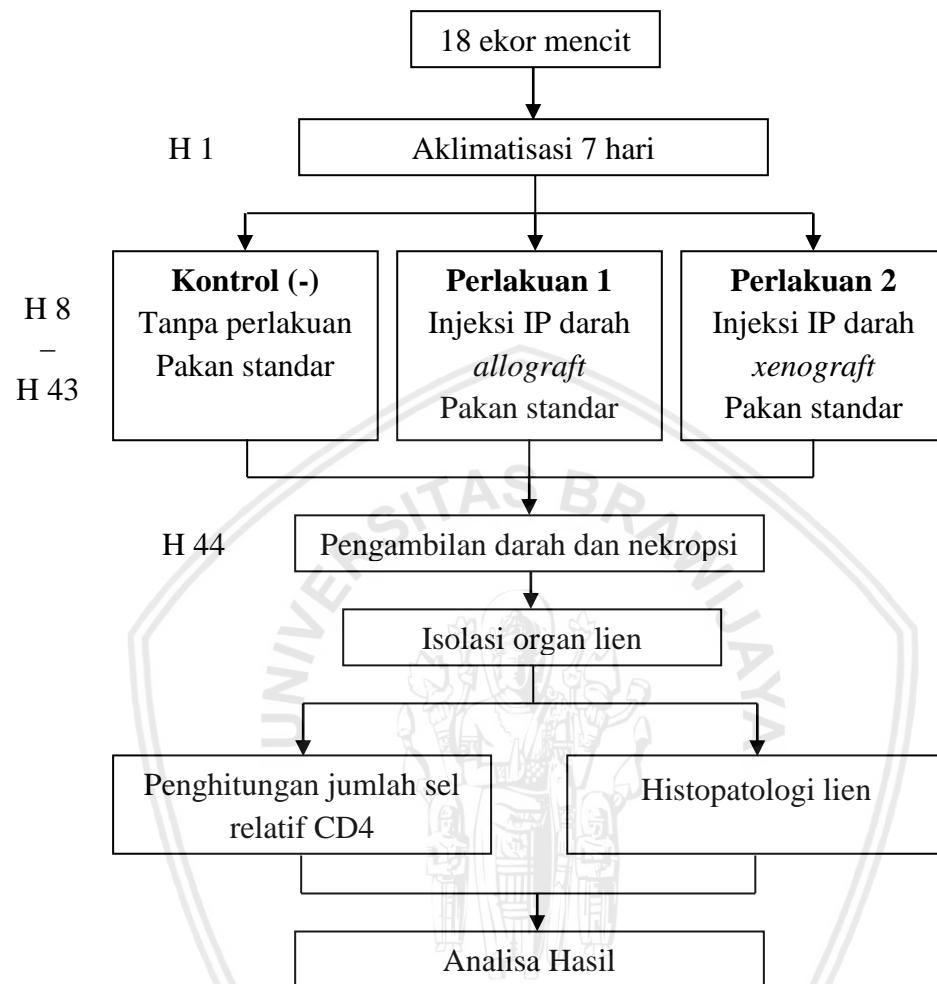
No. Kartu	:	Mencit3	No. Lab	:	drh Fajar
Nama Pasien	:	Mencit	Pemilik	:	
Jenis/Ras Hewan	:		Alamat/Telp	:	
Jenis Kelamin	:		Tanggal Periksa	:	4 Agustus 2019
Umur	:	15-20 minggu	Dokter Hewan	:	drh. Ahmad Fauzi
Anamnesis	:				

Morfologi	Eritrosit		Leukosit		Trombosit		Parasit Darah	
	Sebaran	Abnormalitas	Dominan	Jumlah sel	Sebaran	Distribusi	Eritrosit	Leukosit
bervariasi	merata	Tear drop, helmet cell, bur cell, spherocyte, acanthocyte	monosit	1-2	merata	merata		

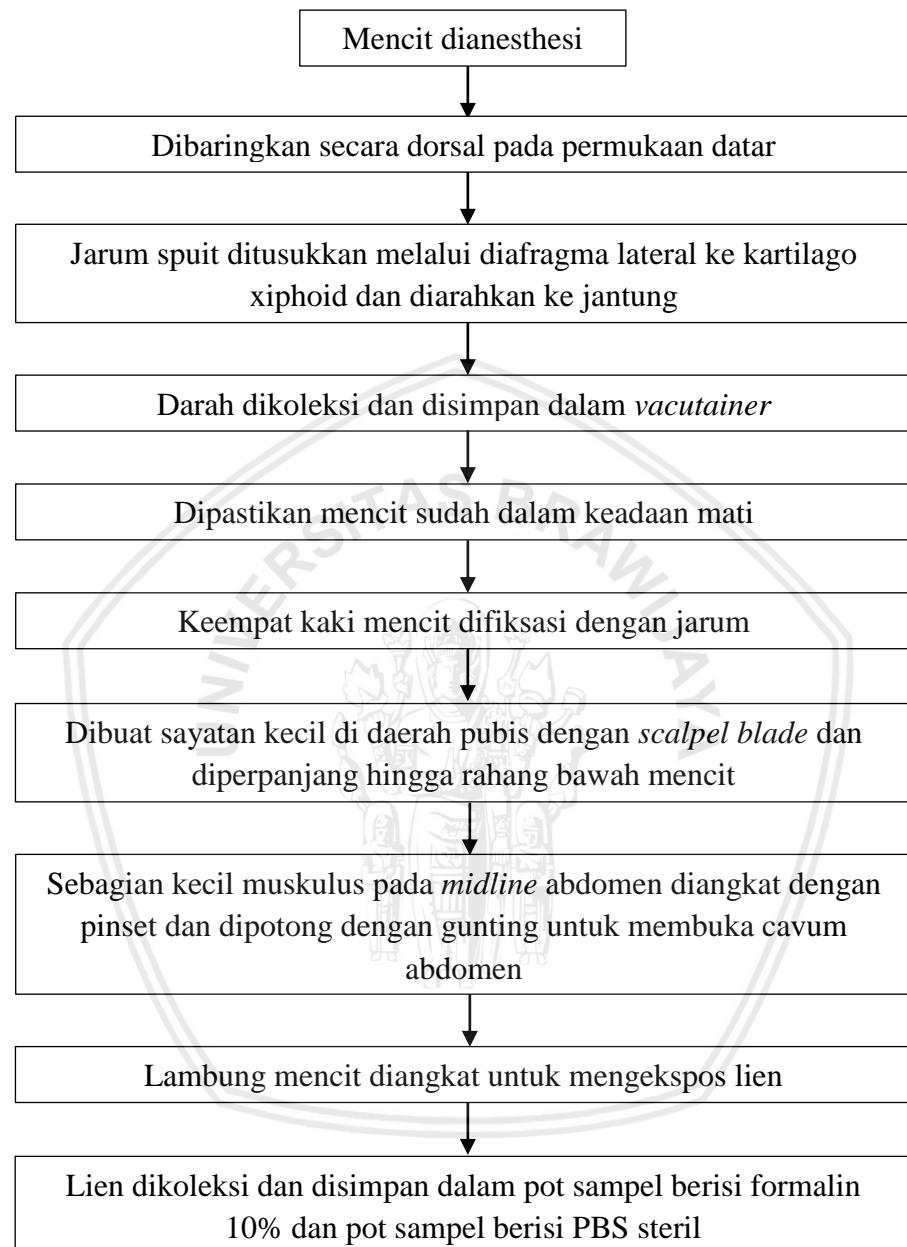
No. Kartu	:	Kucing Wity	No. Lab	:	drh Fajar
Nama Pasien	:	Kucing	Pemilik	:	
Jenis/Ras Hewan	:		Alamat/Telp	:	
Jenis Kelamin	:		Tanggal Periksa	:	4 Agustus 2019
Umur	:	3 tahun	Dokter Hewan	:	drh. Ahmad Fauzi
Anamnesis	:				

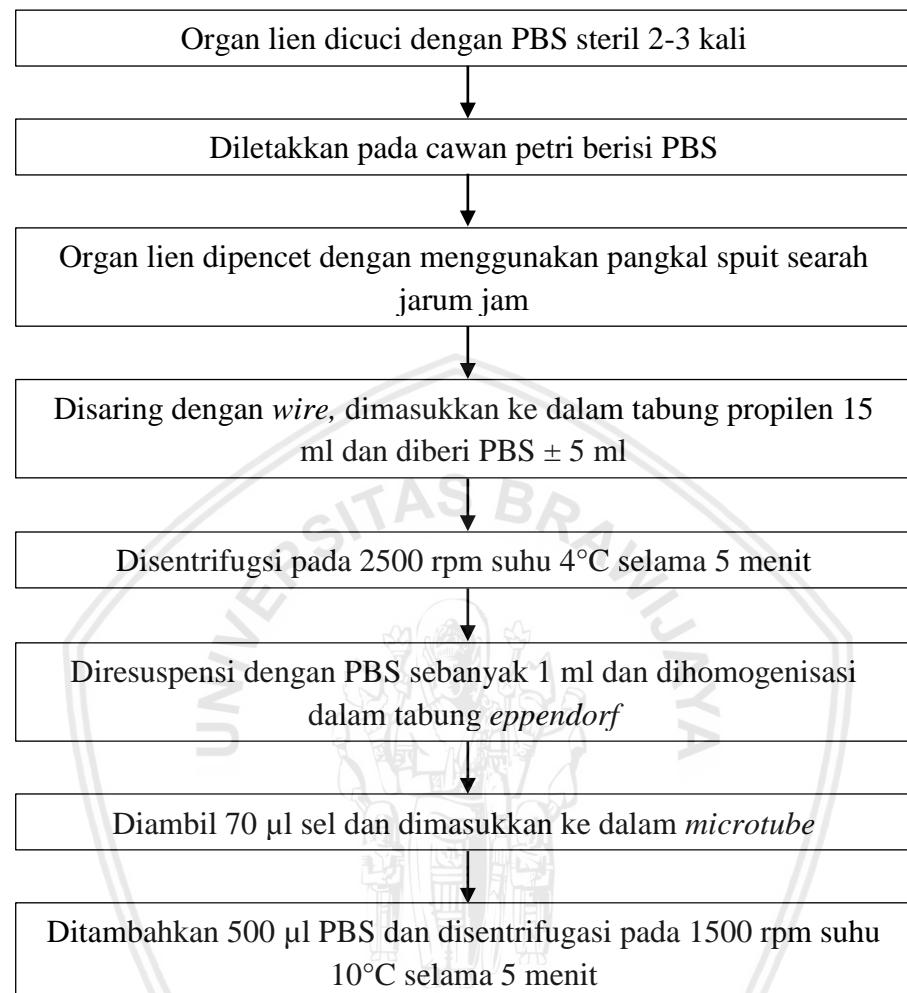
Morfologi	Eritrosit		Leukosit		Trombosit		Parasit Darah	
	Sebaran	Abnormalitas	Dominan	Jumlah sel	Sebaran	Distribusi	Eritrosit	Leukosit
sedikit bervariasi	merata	Tear drop, helmet cell, bur cell, Howel jolly acanthocyte	Neutrofil	1-2	merata	merata		

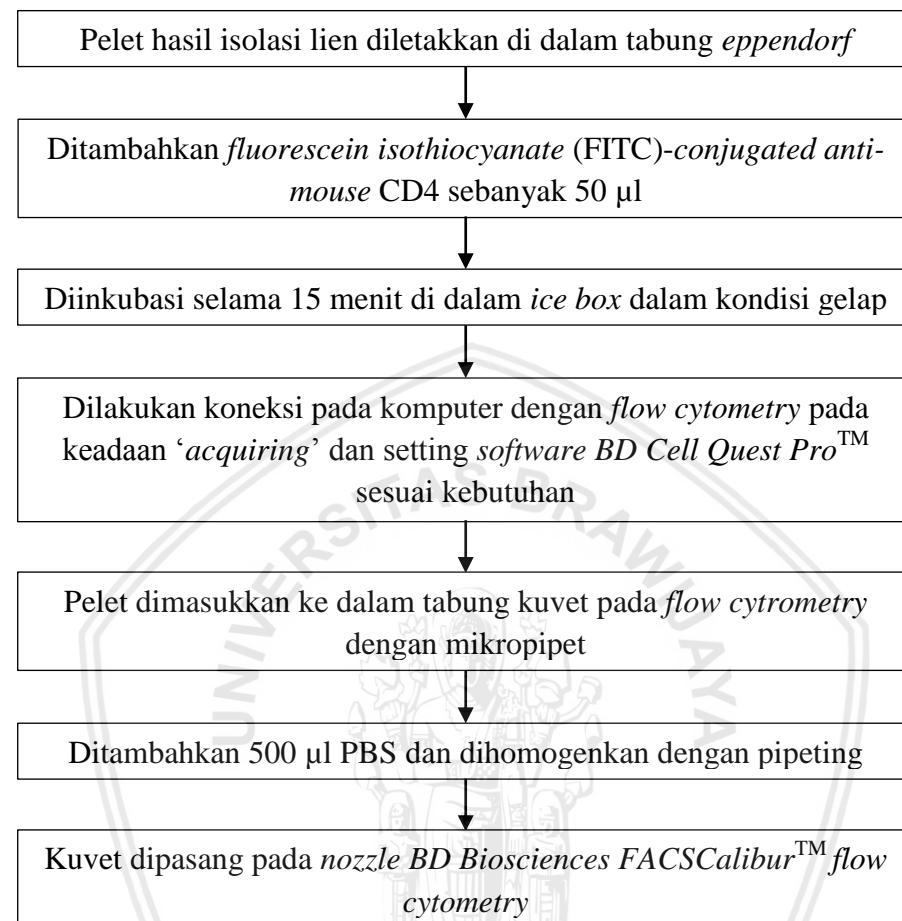
Lampiran 4. Kerangka Operasional



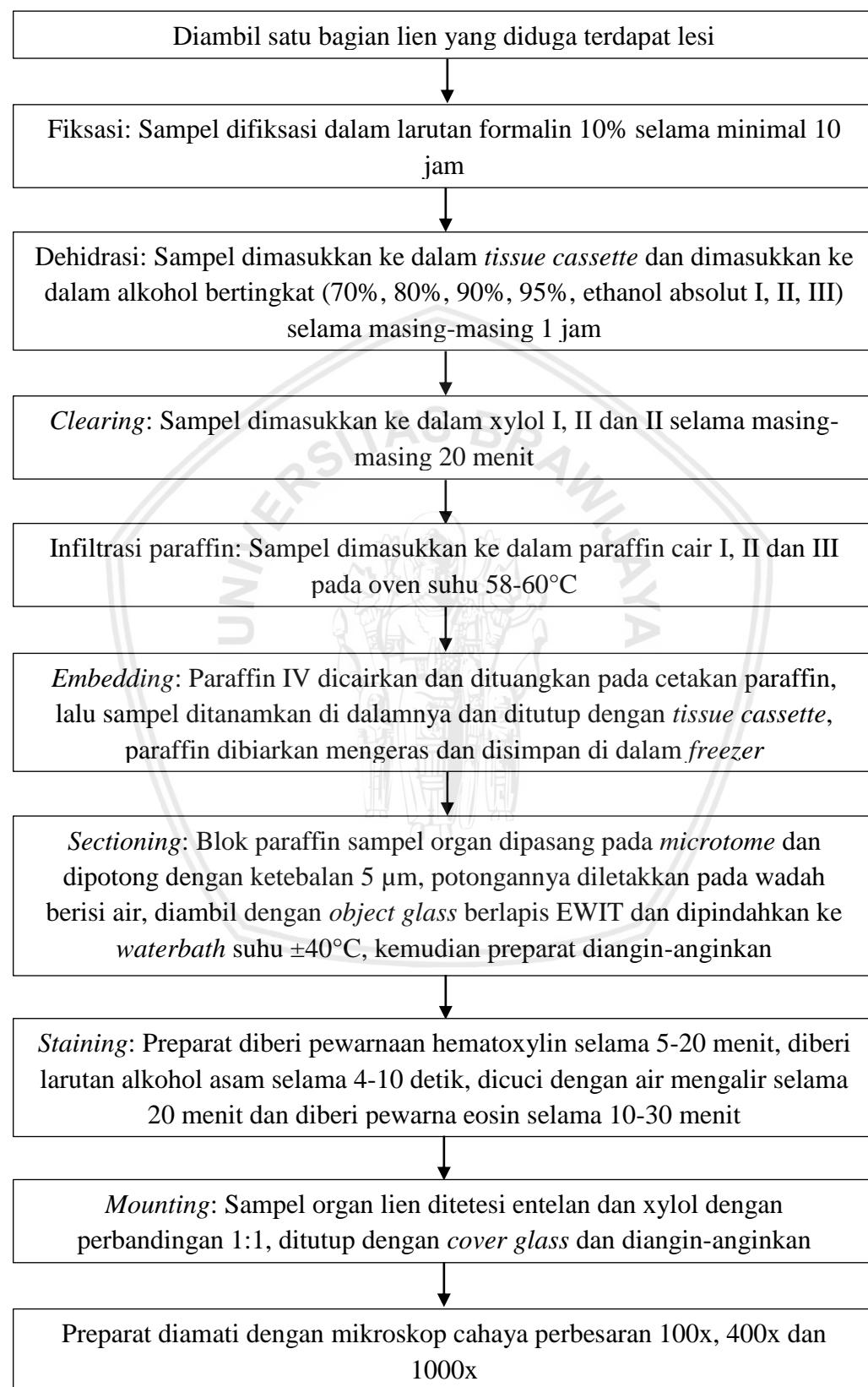
Lampiran 5. Pengambilan Sampel Darah dan Organ Lien



Lampiran 6. Isolasi Sel Limfosit dari Organ Lien

Lampiran 7. Pengukuran Jumlah Sel Relatif CD4⁺

Lampiran 8. Pembuatan Preparat Histopatologi Lien



Lampiran 9. Hasil Pemeriksaan Darah Lengkap

9.1 Kontrol Negatif

RUMAH SAKIT HEWAN PENDIDIKAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA

ampus II UB, Puncak Dieng Eksklusif, Desa Kalisongo, Dau, Malang, Jawa Timur 65
Telp. 081230232044, Email: rshp.brawijaya@gmail.com

No. Kartu	799	No. Lab	799
Nama Pasien	mencit N4	Pemilik	
Jenis/Ras Hewan	: tikus	Alamat/Telp	:
Jenis Kelamin	male	Tanggal Periksa	12/08/2019
Umur	: 1 thn	Dokter Hewan	: drh. Fajar
Anamnese	:		

PEMERIKSAAN	HASIL	SATUAN	KISARAN NORMAL
			TIKUS
Hematologi:			
Sel Darah Putih (WBC)	10,7	$10^3/\mu\text{L}$	3,48-14,03
Sel Darah Merah (RBC)	10,19	$10^6/\mu\text{L}$	6,93-12,24
Hemoglobin (Hb)	9	g/dL	12,6-20,5
Hematokrit (HCT)	48,5	%	42,1-68,3
MCV	47,6	fL	50,7-64,4
MCH	8,8	pg	13,2-17,6
MCHC	18,6	g/dL	23,3-32,7
Trombosit (PLT)	1154	$10^3/\mu\text{L}$	420-1698
Limfosit	90,5	%	48,81-83,19
Monosit	7,5	%	3,29-12,48
Granulosit	2	%	9,86-39,11
Limfosit	9,7	$10^3/\mu\text{L}$	2,22-9,83
Monosit	0,8	$10^3/\mu\text{L}$	0,21-1,25
Granulosit	0,2	$10^3/\mu\text{L}$	0,58-3,83
RDW	14,6	%	16,9-23,4
MPV	10,4	fL	4,6-5,9
Hasil Interpretasi:	Total leukosit normal, granulositopenia. Total Eritrosit dan hematokrit normal, Hb menurun. Antisipasi kemungkinan kekurangan zat besi. Trombosit terkesan normal, mean platelet volume (MPV) meningkat indikasi pembentukan platelet yg baru.		

Keterangan:

Pemeriksa,

(drh. Ulvi Hudriyah)



Penanggung Jawab Lab. harian

(drh. Ahmad Fauzi, M.Sc)

9.2 P1 (*Allograft*)

RUMAH SAKIT HEWAN PENDIDIKAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Kampus II UB, Puncak Dieng Eksklusif, Desa Kalisongo, Dau, Malang, Jawa Timur 65151
Telp. 081230232044, Email: rshp.brawijaya@gmail.com

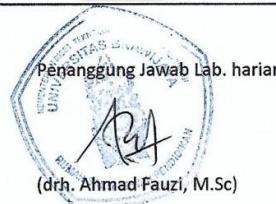
No. Kartu	:	No. Lab	787
Nama Pasien	: tikus allograf 4	Pemilik	
Jenis/Ras Hewan	: tikus	Alamat/Telp	:
Jenis Kelamin		Tanggal Periksa	10/08/2019
Umur	:	Dokter Hewan	: drh. Fajar
Anamnese	:		

PEMERIKSAAN	HASIL	SATUAN	KISARAN NORMAL
			TIKUS
Hematologi:			
Sel Darah Putih (WBC)	13.3	$10^3/\mu\text{L}$	3,48-14,03
Sel Darah Merah (RBC)	2.21	$10^6/\mu\text{L}$	6,93-12,24
Hemoglobin (Hb)	0.1	g/dL	12,6-20,5
Hematokrit (HCT)	10.5	%	42,1-68,3
MCV	47,4	fL	50,7-64,4
MCH	0.5	pg	13,2-17,6
MCHC	1	g/dL	23,3-32,7
Trombosit (PLT)	201	$10^3/\mu\text{L}$	420-1698
Limfosit	99,8	%	48,81-83,19
Monosit	0,1	%	3,29-12,48
Granulosit	0,099	%	9,86-39,11
Limfosit	13,3	$10^3/\mu\text{L}$	2,22-9,83
Monosit	0	$10^3/\mu\text{L}$	0,21-1,25
Granulosit	0	$10^3/\mu\text{L}$	0,58-3,83
RDW	16,7	%	16,9-23,4
MPV	5,6	fL	4,6-5,9
Hasil Interpretasi:	Tikus allograft 4: Total leukosit terkesan normal, limfositosis indikasi infeksi/inflamasi yg bersifat kronis. Anemia mikrositik hipokromik indikasi anemia non regeneratif antisipasi terhadap kemungkinan anemia hemolitika. Trombositopenia indikasi penurunan jumlah Trombosit terkait perdarahan internal/eksternal.		

Keterangan:

Pemeriksa,

(drh. Ulvi Hudriyah)



Penanggung Jawab Lab. harian

(drh. Ahmad Fauzi, M.Sc.)

9.3 P2 (Xenograft)

RUMAH SAKIT HEWAN PENDIDIKAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA

ampus II UB, Puncak Dieng Eksklusif, Desa Kalisongo, Dau, Malang, Jawa Timur 65
Telp. 081230232044, Email: rshp.brawijaya@gmail.com

No. Kartu	801	No. Lab	801
Nama Pasien	mencit X3	Pemilik	
Jenis/Ras Hewan	: tikus	Alamat/Telp	:
Jenis Kelamin	male	Tanggal Periksa	12/08/2019
Umur	: 1 thn	Dokter Hewan	: drh. Fajar
Anamnese	:		

PEMERIKSAAN	HASIL	SATUAN	KISARAN NORMAL
			TIKUS
Hematologi:			
Sel Darah Putih (WBC)	4,8	$10^3/\mu\text{L}$	3,48-14,03
Sel Darah Merah (RBC)	2,5	$10^6/\mu\text{L}$	6,93-12,24
Hemoglobin (Hb)	2,3	g/dL	12,6-20,5
Hematokrit (HCT)	10	%	42,1-68,3
MCV	40,1	fL	50,7-64,4
MCH	9,2	pg	13,2-17,6
MCHC	22,9	g/dL	23,3-32,7
Trombosit (PLT)	304	$10^3/\mu\text{L}$	420-1698
Limfosit	81,5	%	48,81-83,19
Monosit	17,7	%	3,29-12,48
Granulosit	0,8	%	9,86-39,11
Limfosit	3,9	$10^3/\mu\text{L}$	2,22-9,83
Monosit	0,9	$10^3/\mu\text{L}$	0,21-1,25
Granulosit	1,19	$10^3/\mu\text{L}$	0,58-3,83
RDW	14,5	%	16,9-23,4
MPV	5	fL	4,6-5,9
Hasil Interpretasi:	Total leukosit normal-rendah, dan differential leukosit terkesan normal. Anemia mikrositik hipokromik indikasi anemia non regeneratif. Trombositopenia indikasi perdarahan internal atau eksternal.		

Keterangan:

Pemeriksa:

(drh. Ulvi Hudriyah)



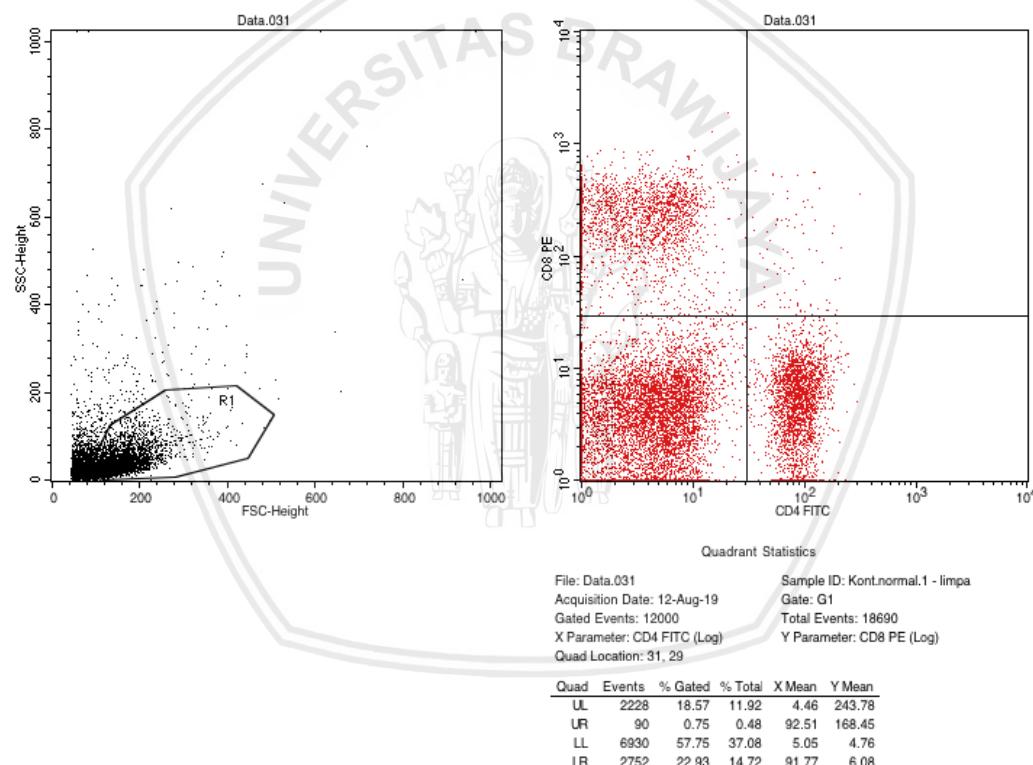
Penanggung Jawab Lab. harian

(drh. Ahmad Fauzi, M.Sc)

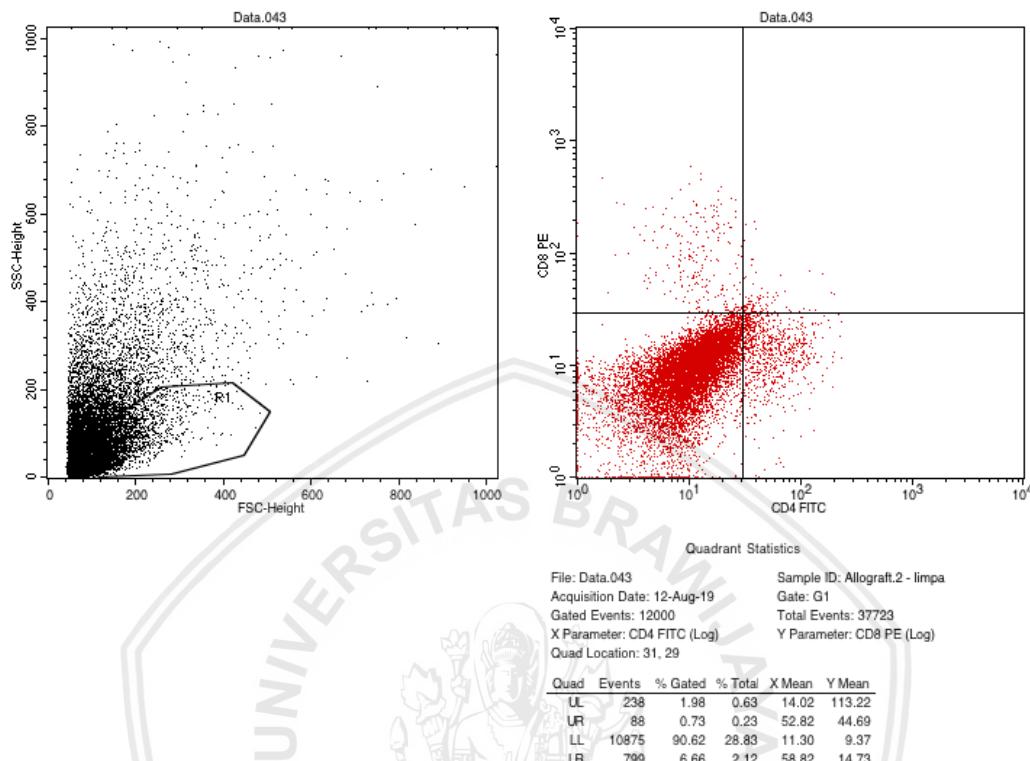
Lampiran 10. Hasil Uji *Flow Cytometry* (Jumlah Sel Relatif CD4⁺)

	Kontrol Negatif (%)	Perlakuan 1 (%)	Perlakuan 2 (%)
M1	22,93	6,66	12,82
M2	15,81	5,46	11,81
M3	12,30	3,58	18,41
M4	15,67	3,24	11,04
M5	11,79	9,03	8,08
M6	13,37	11,82	12,53
Rata-Rata	15,31	6,63	12,45

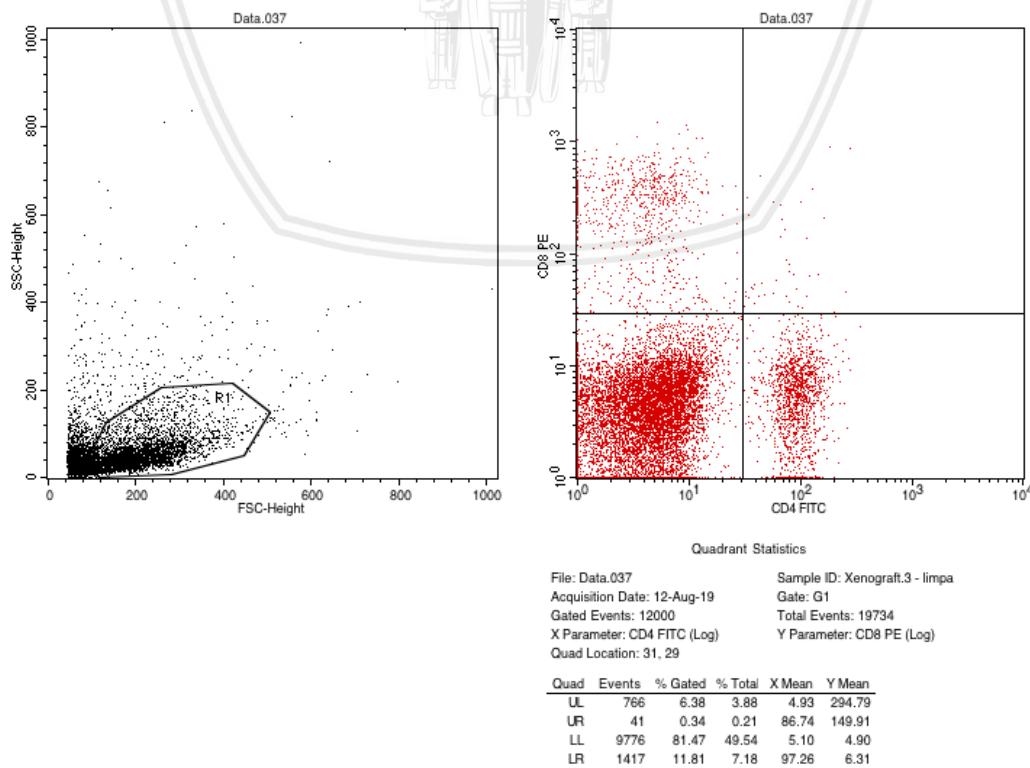
10.1 Kontrol Negatif



10.2 P1 (Allograft)



10.3 P2 (Xenograft)



Lampiran 11. Hasil Uji Statistika Profil Darah

11.1 Uji Deskriptif

Descriptives

RBC	Kelompok		Statistic	Std. Error
Kontrol Negatif		Mean	6,6127	1,01205
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound Upper Bound	3,8028 9,4226
		5% Trimmed Mean	6,5580	
		Median	6,6100	
		Variance	5,121	
		Std. Deviation	2,26301	
		Minimum	4,02	
		Maximum	10,19	
		Range	6,17	
		Interquartile Range	3,58	
		Skewness	,985	,913
		Kurtosis	2,003	2,000
		Mean	1,7625	,47801
Induksi Allograft		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound Upper Bound	,4353 3,0897
		5% Trimmed Mean	1,7744	
		Median	1,7625	
		Variance	1,142	
		Std. Deviation	1,06886	
		Minimum	,19	
		Maximum	3,12	
		Range	2,93	
		Interquartile Range	1,81	
		Skewness	-,447	,913
		Kurtosis	1,149	2,000
		Mean	3,6425	,47572
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound Upper Bound	2,3217 4,9633
Induksi Xenograft		5% Trimmed Mean	3,6111	
		Median	3,6300	
		Variance	1,132	
		Std. Deviation	1,06375	
		Minimum	2,50	
		Maximum	5,35	
		Range	2,85	
		Interquartile Range	1,70	
		Skewness	1,149	,913
		Kurtosis	2,053	2,000

Hb	Kontrol Negatif	Mean			,66433
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	5,0882	
			Upper Bound	8,7771	
		5% Trimmed Mean		6,9363	
		Median		6,9333	
		Variance		2,207	
		Std. Deviation		1,48549	
		Minimum		4,80	
		Maximum		9,00	
		Range		4,20	
Induksi Allograft		Interquartile Range		2,14	
		Skewness		-,110	,913
		Kurtosis		1,999	2,000
		Mean		,4000	,28460
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	-,3902	
			Upper Bound	1,1902	
		5% Trimmed Mean		,3611	
		Median		,1000	
		Variance		,405	
		Std. Deviation		,63640	
Induksi Xenograft		Minimum		,00	
		Maximum		1,50	
		Range		1,50	
		Interquartile Range		,95	
		Skewness		1,901	,913
		Kurtosis		3,610	2,000
		Mean		1,5250	,41155
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,3823	
			Upper Bound	2,6677	
		5% Trimmed Mean		1,5667	
HCT	Kontrol Negatif	Median		1,6000	
		Variance		,847	
		Std. Deviation		,92026	
		Minimum		,00	
		Maximum		2,30	
		Range		2,30	
		Interquartile Range		1,49	
		Skewness		-1,483	,913
		Kurtosis		2,417	2,000
		Mean		31,1667	4,94665
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	17,4326	
			Upper Bound	44,9008	
		5% Trimmed Mean		30,9297	

Induksi Allograft	Median	31,1667	
	Variance	122,347	
	Std. Deviation	11,06104	
	Minimum	18,10	
	Maximum	48,50	
	Range	30,40	
	Interquartile Range	17,33	
	Skewness	,893	,913
	Kurtosis	2,000	2,000
	Mean	7,7500	2,07376
Induksi Xenograft	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	
		Upper Bound	
			13,5077
	5% Trimmed Mean	7,8278	
	Median	7,7500	
	Variance	21,502	
	Std. Deviation	4,63708	
	Minimum	,90	
	Maximum	13,20	
	Range	12,30	
Induksi Xenograft	Interquartile Range	8,20	
	Skewness	-,590	,913
	Kurtosis	,501	2,000
	Mean	15,0000	2,15801
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	
		Upper Bound	
			20,9916
	5% Trimmed Mean	14,8444	
	Median	14,9000	
	Variance	23,285	

11.2 Uji Normalitas

Tests of Normality

Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
RBC	Kontrol Negatif	,300	5	,161	,919	5	,522
	Induksi Allograft	,214	5	,200*	,976	5	,910
	Induksi Xenograft	,300	5	,161	,908	5	,457
Hb	Kontrol Negatif	,299	5	,163	,894	5	,375
	Induksi Allograft	,300	5	,161	,738	5	,023
	Induksi Xenograft	,300	5	,161	,845	5	,178
HCT	Kontrol Negatif	,300	5	,161	,921	5	,539
	Induksi Allograft	,185	5	,200*	,977	5	,915
	Induksi Xenograft	,300	5	,161	,901	5	,414

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

a. Lilliefors Significance Correction

11.3 Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df 1	df 2	Sig.
RBC	,739	2	12	,498
Hb	,353	2	12	,709
HCT	,857	2	12	,449

11.4 Uji One Way ANOVA

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
RBC	Between Groups	59,801	2	29,900	12,130	,001
	Within Groups	29,581	12	2,465		
	Total	89,382	14			
Hb	Between Groups	121,974	2	60,987	52,901	,000
	Within Groups	13,834	12	1,153		
	Total	135,808	14			
HCT	Between Groups	1437,115	2	718,558	12,898	,001
	Within Groups	668,537	12	55,711		
	Total	2105,652	14			

11.5 Uji Tukey

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
RBC	Kontrol Negatif	Induksi Allograft	4,85017*	,99299	,001	2,2010	7,4993
		Induksi Xenograft	2,97017*	,99299	,028	,3210	5,6193
	Induksi Allograft	Kontrol Negatif	-4,85017*	,99299	,001	-7,4993	-2,2010
		Induksi Xenograft	-1,88000	,99299	,183	-4,5292	,7692
	Induksi Xenograft	Kontrol Negatif	-2,97017*	,99299	,028	-5,6193	-,3210
		Induksi Allograft	1,88000	,99299	,183	-,7692	4,5292
Hb	Kontrol Negatif	Induksi Allograft	6,53267*	,67907	,000	4,7210	8,3443
		Induksi Xenograft	5,40767*	,67907	,000	3,5960	7,2193
	Induksi Allograft	Kontrol Negatif	-6,53267*	,67907	,000	-8,3443	-4,7210
		Induksi Xenograft	-1,12500	,67907	,261	-2,9367	,6867
	Induksi Xenograft	Kontrol Negatif	-5,40767*	,67907	,000	-7,2193	-3,5960
		Induksi Allograft	1,12500	,67907	,261	-,6867	2,9367
HCT	Kontrol Negatif	Induksi Allograft	23,41673*	4,72065	,001	10,8227	36,0108
		Induksi Xenograft	16,16673*	4,72065	,013	3,5727	28,7608
	Induksi Allograft	Kontrol Negatif	-23,41673*	4,72065	,001	-36,0108	-10,8227
		Induksi Xenograft	-7,25000	4,72065	,310	-19,8441	5,3441
	Induksi Xenograft	Kontrol Negatif	-16,16673*	4,72065	,013	-28,7608	-3,5727
		Induksi Allograft	7,25000	4,72065	,310	-5,3441	19,8441

*. The mean difference is significant at the .05 level.

RBC

Tukey HSD^a

Kelompok	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Induksi Allograft	5	1,7625	
Induksi Xenograft	5	3,6425	
Kontrol Negatif	5		6,6127
Sig.		,183	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

Hb

Tukey HSD^a

Kelompok	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Induksi Allograft	5	,4000	
Induksi Xenograft	5	1,5250	
Kontrol Negatif	5		6,9327
Sig.		,261	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

HCTTukey HSD^a

Kelompok	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Induksi Allograft	5	7,7500	
Induksi Xenograft	5	15,0000	
Kontrol Negatif	5		31,1667
Sig.		,310	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.



Lampiran 12. Hasil Uji Statistika Jumlah Sel Relatif CD4⁺

12.1 Uji Deskriptif

Descriptives

Kelompok				Statistic	Std. Error
Kadar_CD4	Kelompok Kontrol Negatif	Mean		17,0617	1,70904
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	12,6684	
			Upper Bound	21,4549	
		5% Trimmed Mean		16,9769	
		Median		16,6000	
		Variance		17,525	
		Std. Deviation		4,18628	
		Minimum		11,97	
		Maximum		23,68	
		Range		11,71	
		Interquartile Range		7,34	
		Skewness		,581	,845
		Kurtosis		,017	1,741
Induksi Allograft		Mean		7,8383	1,39638
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	4,2488	
			Upper Bound	11,4278	
		5% Trimmed Mean		7,8198	
		Median		8,4400	
		Variance		11,699	
		Std. Deviation		3,42042	
		Minimum		3,41	
		Maximum		12,60	
		Range		9,19	
		Interquartile Range		5,99	
		Skewness		-,024	,845
		Kurtosis		-1,018	1,741
Induksi Xenograft		Mean		12,9867	1,33071
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	9,5660	
			Upper Bound	16,4074	
		5% Trimmed Mean		12,8769	
		Median		12,5250	
		Variance		10,625	
		Std. Deviation		3,25955	
		Minimum		9,01	
		Maximum		18,94	
		Range		9,93	
		Interquartile Range		3,31	
		Skewness		1,267	,845
		Kurtosis		3,102	1,741

12.2 Uji Normalitas

Tests of Normality

Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Kadar_CD4	,208	6	,200*	,963	6	,841
Kelompok Kontrol Negatif	,185	6	,200*	,955	6	,783
Induksi Allograft	,330	6	,039	,860	6	,190
Induksi Xenograft						

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

a. Lilliefors Significance Correction

12.3 Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Kadar_CD4

Levene Statistic	df 1	df 2	Sig.
,372	2	15	,696

12.4 Uji One Way ANOVA

ANOVA

Kadar_CD4

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	256,362	2	128,181	9,650	,002
Within Groups	199,245	15	13,283		
Total	455,606	17			

12.5 Uji Tukey

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Kadar_CD4

Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kelompok Kontrol Negatif	Induksi Allograft	9,22333*	2,10420	,001	3,7577	14,6889
	Induksi Xenograft	4,07500	2,10420	,163	-1,3906	9,5406
Induksi Allograft	Kelompok Kontrol Negatif	-9,22333*	2,10420	,001	-14,6889	-3,7577
	Induksi Xenograft	-5,14833	2,10420	,066	-10,6139	,3173
Induksi Xenograft	Kelompok Kontrol Negatif	-4,07500	2,10420	,163	-9,5406	1,3906
	Induksi Allograft	5,14833	2,10420	,066	-,3173	10,6139

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Kadar_CD4

Tukey HSD^a

Kelompok	N	Subset f or alpha = .05	
		1	2
Induksi Allograft	6	7,8383	
Induksi Xenograft	6	12,9867	12,9867
Kelompok Kontrol Negatif	6		17,0617
Sig.		,066	,163

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

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