

**HUBUNGAN ANTARA EKSPRESI PROTEIN TIMP-1 SEL STELATA HATI DENGAN
FIBROSIS PADA TIKUS MODEL FIBROSIS YANG DIINDUKSI DENGAN CCL₄**

Tugas Akhir

Untuk Memenuhi Persyaratan Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran



oleh:

Muhamad Irfan Dzihni

NIM 155070100111026

PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG

2019

DAFTAR ISI

COVER	i
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR SINGKATAN	xiv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	2
1.4 Manfaat Penelitian	2
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Aspek Histologi Hati	3
2.1.1 Daerah Perisinusoid	4

2.2 Fisiologi Perbaikan Jaringan dan Fibrosis	4
2.2.1 Fibrosis.....	5
2.2.2 Fibrosis Hati	6
2.2.3 HSC dan Aktivasinya pada Fibrosis.....	7
2.2.4 Sirosis Hati	8
2.2.5 Model Fibrosis dan Sirosis Hati dengan CCl ₄	9
2.2.6 Pengaruh MMP (<i>Matrix Metalloproteinase</i>) terhadap Apoptosis HSC	10
2.2.7 Hubungan TIMP-1 dan Apoptosis HSC	11
BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	13
3.1 Kerangka Konsep	13
3.2 Hipotesis Penelitian	14
BAB 4 METODE PENELITIAN.....	15
4.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	15
4.1 Rancangan Penelitian.....	15
4.3 Sampel.....	16
4.3.1 Sampel Penelitian	16
4.3.2 Estimasi Jumlah Sampel.....	17
4.4 Variabel Penelitian.....	17
4.4.1 Variabel Bebas	17
4.4.2 Variabel Terikat	17
4.5 Definisi Operasional.....	17

4.6 Alat dan Bahan Penelitian	18
4.6.1 Alat.....	18
4.6.2 Bahan	19
4.7 Pemeliharaan Tikus dan Perlakuan pada Tikus.....	20
4.7.1 Persiapan Sebelum Pemeliharaan	20
4.7.2 Perlakuan Tikus	21
4.7.3 Pemberian CCl ₄	22
4.7.4 Pembedahan dan Pengambilan Organ	22
4.8 Pembuatan preparat dan Pengukuran Histopatologi Fibrosis Hati	23
4.9 Pemeriksaan Patologi Anatomi Jaringan Hati Tikus Model Fibrosis.....	24
4.10 Teknik Imunofluoresensi dan Double Staining α -SMA dan TIMP-1	27
4.10.1 Persiapan Preparat.....	27
4.10.2 Fiksasi.....	28
4.10.3 Permeabilisasi	28
4.10.4 <i>Blocking</i> dan Inkubasi.....	28
4.10.5 <i>Counter Staining</i>	29
4.10.6 Penempelan <i>Coverslip</i>	29
4.11 Pemotoan.....	29
4.12 Perhitungan Intensitas TIMP-1 pada aHSC	29
4.13 Alur Penelitian	32
BAB 5 HASIL DAN ANALISIS DATA.....	33

5.1 Hasil Penelitian	33
5.1.1 Intensitas TIMP-1	33
5.1.2 Luas Area Fibrosis	35
5.2 Analisis Data	36
5.2.1 Uji Statistika Deskriptif	36
5.2.2 Uji Normalitas Data	37
5.2.3 Uji Korelasi	38
BAB 6 PEMBAHASAN	37
6.1 Rangkuman Analisis Data	37
6.2 Hubungan antara Ekspresi Protein TIMP-1 terhadap Luas Area Fibrosis	37
6.3 Keterbatasan	39
BAB 7 PENUTUP	40
7.1 Kesimpulan	40
7.2 Saran	40
DAFTAR PUSTAKA	41
LAMPIRAN 1 CARA PERHITUNGAN INTENSITAS TIMP-1 PADA HSC	44
LAMPIRAN 2 JADWAL PENELITIAN	51

ABSTRAK

Dzihni, Muhamad Irfan. 2019. **Hubungan Antara Ekspresi Protein Timp-1 Sel Stelata Hati Dengan Fibrosis pada Model Tikus Fibrosis Yang Diinduksi Dengan CCl₄**
Tugas Akhir, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) dr. Supriono, Sp.PD-KGEH (2) Dr. dr. Setyawati Soeharto, M. Kes.

Fibrosis hati merupakan tanda sirosis hati secara histopatologis. Karena sel utama pembentuk fibrosis hati adalah sel stelata hati (aHSC, *activated hepatic stellate cells*), apoptosisnya menjadi penting sebagai target utama terapi sirosis hati. TIMP-1 merupakan glikoprotein yang menghambat laju apoptosis melalui inhibisi protein MMP-2/3/7/9. Hal tersebut dapat berarti bahwa protein tersebut dapat meningkatkan fibrosis hati melalui inhibisi apoptosis aHSC. Telah diketahui pula bahwa induksi CCl₄ pada tikus dapat mengakibatkan fibrosis hati dan pada paparan 12 minggu dapat menyebabkan fibrosis dan sirosis mikronoduler, tetapi belum diketahui hubungan ekspresi TIMP-1 aHSC dengan fibrosis hati pada tikus model fibrosis hati. Tujuan penelitian ini adalah untuk menjawab pertanyaan tersebut. Kami melakukan uji imunofluoresensi dan histopatologis untuk mengetahui hubungan antara ekspresi TIMP-1 aHSC dengan area fibrosis pada tikus galur Wistar *Rattus novergicus* terinduksi fibrosis hati (12 minggu paparan) (n = 5) dan tikus kontrol (n = 5). Didapatkan bahwa terdapat pengaruh signifikan antara ekspresi TIMP-1 aHSC dan area fibrosis.

Kata kunci: TIMP-1, HSC, fibrosis, CCl₄

ABSTRACT

Dzihni, Muhamad Irfan. 2019. **Correlation Between Stellate Cell's TIMP-1 Expression and Liver Fibrosis Within CCl₄-Induced Liver Fibrosis Mice Model** Final Assignment, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) dr. Supriono, Sp.PD-KGEH (2) Dr. dr. Setyawati Soeharto, M. Kes.

Fibrosis is a histopathological sign of a liver cirrhosis. For HSCs are the main cellular cause of fibrosis, the apoptosis of these cells becomes significant in delivering cirrhosis treatment strategy. TIMP-1 is a glycoprotein attenuating the apoptosis through MMP-2/3/7/9 inhibition. Thus, can be concluded that the protein can induce fibrosis through aHSC apoptosis inhibition. For it is known that the mice model of CCl₄ induction exhibits fibrosis' as well as advanced micronodular cirrhosis for 12 weeks treatment, the question whether there are some correlation between TIMP-1 aHSC expression and fibrosis in mouse model still remains. The aim of the study was to answer the question. We performed immunofluorescence and histological assessment identifying the correlation between TIMP-1 aHSC expression and fibrosis area within Wistar strain rats *Rattus norvegicus* (n=10) CCl₄-induced (CCl₄(+)) (n=5) and normal rats (CCl₄(-)) (n=5). Given the significant correlation between TIMP-1 aHSC and the fibrosis area.

Keyword: TIMP-1, HSC, fibrosis, CCl₄

BAB 1.

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Fibrosis hati merupakan kriteria sirosis hati yang secara mikroskopis terlihat sebagai *fibrous septa* dan ditandai dengan perubahan jaringan parenkimal menjadi jaringan stromal, menyebabkan perubahan komposisi matriks ekstraseluler, dan perubahan fleksibilitas jaringan (Kumar *et al.*, 2017). Sel-sel stromal yang terlibat dalam patogenesis fibrosis hati terdiri dari beberapa jenis sel, di antara sel-sel tersebut, sel stelata hati (HSC, *hepatic stellate cell*) memegang peranan penting (Mormone, George, dan Nieto, 2011). Jalur patogenesis fibrosis hati melalui HSC bersifat interseluler. (Melhem *et al.*, 2006) membuktikan dalam percobaannya bahwa mencit mutan dengan defisit sel NK lebih mudah mengalami fibrosis hati. Interaksi interseluler ini juga melibatkan sel Kupffer dan hepatosit (Mormone, George, dan Nieto, 2011).

TIMP-1 bekerja menghambat ekspresi protein MMP-2/3/7/9 yang salah satu fungsinya berupa induksi apoptosis aHSC pada jaringan fibrosis hati (Jabłońska-Trypuć *et al.*, 2016). Penghambatan protein ini dapat menurunkan fibrosis hati disebabkan oleh fungsi aHSC sebagai miofibrosis yang menyekresikan kolagen berlebih (Tsuchida *et al.*, 2017). Hal ini membawa peneliti kepada satu hipotesis bahwa peningkatan protein TIMP-1 memiliki hubungan terhadap fibrosis. Mengingat bahwa fungsi TIMP-1 juga menghambat MMP lain selain MMP-2/3/7/9 yang memiliki fungsi proteolisis, maka ditekankan bahwa pada penelitian ini hanya diteliti ekspresi TIMP-1 pada aHSC.

CCl₄ telah terbukti dapat menginduksi baik fibrosis (Varga, Brenner dan Phan, 2005) maupun TIMP-1 (Wang, 2011). Pada 12 minggu paparan, telah terbukti bahwa CCl₄ dapat menginduksi sirosis mikronoduler pada tikus (Varga, Brenner, dan Phan, 2005). Fakta-fakta di atas serta kurangnya sumber mengenai pengaruh TIMP-1 terhadap fibrosis pada sirosis mikronoduler dengan induksi CCl₄ kronis membuat peneliti tertarik untuk mengetahui hubungan ekspresi TIMP-1 pada aHSC dengan fibrosis pada tikus model sirosis mikronoduler dengan induksi CCl₄.

1.2 Perumusan Masalah

Perumusan masalah pada penelitian ini adalah:

Apakah terdapat hubungan antara ekspresi TIMP-1 HSC dengan luas area fibrosis pada tikus model fibrosis hati dengan induksi CCl₄?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah membuktikan hubungan antara ekspresi TIMP-1 HSC terhadap fibrosis hati pada tikus yang diinduksi dengan CCl₄

1.4 Manfaat Penelitian

- a) Menambah perbendaharaan ilmu pengetahuan dalam bentuk publikasi.
- b) Sebagai dasar pengembangan penelitian selanjutnya.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

Bab kedua ini berisi tinjauan pustaka mengenai variabel yang akan diteliti. Dalam bab ini dijelaskan mengenai aspek histologi dan fisiologi perbaikan jaringan (regenerasi sel dan pembentukan jaringan parut / fibrosis), jenis sel yang berperan dalam proses tersebut, kondisi patologisnya, mekanisme regresi pada pembentukan jaringan parut, serta sirosis hati.

2.1 Aspek Histologi Hati

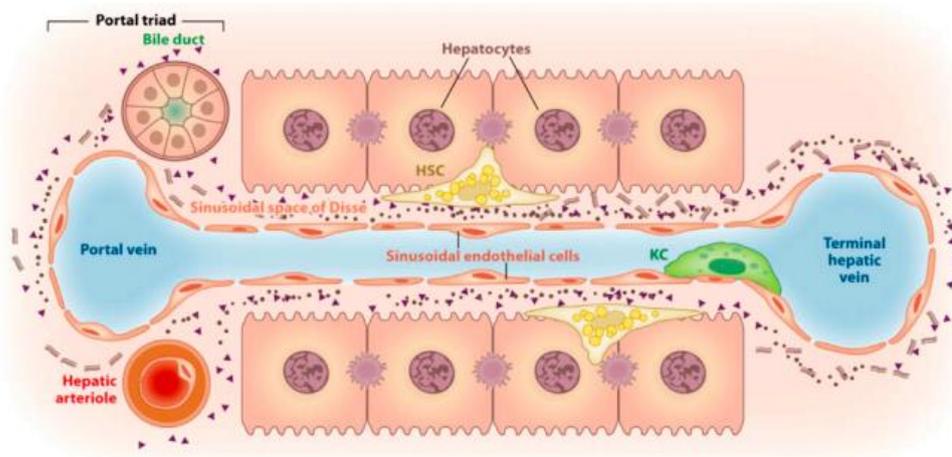
Jaringan parenkim hati terdiri dari lobulus - lobulus yang berbentuk polihedral. Lobul-lobul tersebut biasanya memiliki tiga sampai enam tritunggal porta hepatis yang terdiri dari duktus biliaris, porta hepatis, dan arteri hepatis. (Mescher, 2009).

Lobulus - lobulus hati tersebut merupakan unit fungsional terkecil hati. Jaringan ini terdiri dari sel-sel hepatosit yang menempel pada stroma berupa jaring serabut retikulin (kolagen tipe III). (Mescher, 2009).

Di antara hepatosit, menjalar sinusoid dari vena porta dan arteri hepatis dan bermuara ke vena sentralis, mencampurkan darah dari pembuluh arteri dan vena. Sinusoid dilapisi oleh sel endotel yang tipis dan hilang-timbul (*fenestrated endothelial cells*). Di antara endotel sinusoid dan hepatosit, terdapat daerah perisinusoid. (Mescher, 2009).

2.1.1 Daerah Perisinusoid

Daerah perisinusoid adalah ruang antara sinusoid dan hepatosit. Ruang ini diisi oleh sel stelata hati (sel perisinusoid atau sel Ito). Matriks ekstraseluler daerah perisinusoid dalam keadaan normal merupakan kolagen tipe IV (Kumar *et al.*, 2017). Pada kondisi patologis, terjadi penumpukan kolagen tipe I dan III (Kumar *et al.*, 2017, Hasegawa *et al.*, 2015). Matriks ini sebagian besar dihasilkan oleh miofibroblas yang berasal sel stelata hati (*hepatic stellate cells / HSC*), sel mesenkimal yang terdapat di daerah perisinusoid, meskipun terdapat miofibroblas juga yang berasal dari sel miofibroblas portal dan sel epitel (Hasegawa *et al.*, 2015). Gambar 2.1 menunjukkan histologi perisinusoid dalam keadaan fisiologis.



Gambar 2. 1 Histologi Perisinusoid (Hasegawa et al., 2015)

Keterangan: sel hepatosit (HSC), berwarna kuning, merupakan sel yang memiliki pengaruh besar terhadap patogenesis fibrosis hati

2.2 Fisiologi Perbaikan Jaringan dan Fibrosis

Untuk menjalankan fungsinya, jaringan tubuh perlu menjaga keseimbangan jumlah sel-sel stromal dan parenkimalnya dalam batas yang optimal. Proses ini, sering disebut *remodelling* atau perbaikan jaringan, dilakukan baik dalam keadaan fisiologis maupun jika terjadi cedera. proses ini melibatkan berbagai macam aspek intraseluler dan ekstraseluler

jaringan (Desmoulière, Darby and Gabbiani, 2003). Tubuh memperbaiki jaringannya melalui dua proses, regenerasi dan pembentukan jaringan parut (Kumar *et al.*, 2017).

Jika organ mengalami pengurangan jaringan dari operasi atau cedera, maka akan terjadi proses regenerasi, yaitu penambahan jumlah sel-sel yang akan menggantikan sel yang hilang atau rusak serta fungsinya. Pada proses regenerasi, jaringan melibatkan sel-sel punca dekat lamina basalisnya yang berproliferasi untuk mengisi jaringan yang hilang (Kumar *et al.*, 2017).

Jaringan parut adalah jaringan yang terbentuk dari sel-sel fibrosa. Hal yang menyebabkan terjadinya pembentukan jaringan parut adalah cedera kronis atau cedera parah pada sel parenkimal, sel epitel, atau jaringan ikat. Terjadinya kerusakan pada sel yang tidak dapat berproliferasi juga akan menyebabkan terbentuknya jaringan parut. Pembentukan jaringan parut dimulai dengan angiogenesis, pembentukan jaringan granulasi (yang berwarna merah muda dan tersusun oleh pembuluh darah, fibroblas, dan jaringan ikat), dan diakhiri dengan pembentukan jaringan parut yang stabil (Kumar *et al.*, 2017).

2.2.1 Fibrosis

Kata fibrosis merupakan gabungan dari akar kata fibr yang berarti serat dan sufiks atau akhiran -osis yang berarti kondisi abnormal (Info.fujita-hu.ac.jp, 2018). Kata ini dapat berarti kondisi abnormal berupa penebalan jaringan ikat. Terminologi fibrosis biasa digunakan untuk deposisi kolagen berlebih yang terjadi di paru-paru, hati, ginjal, dan organ lain sebagai konsekuensi dari inflamasi kronis, atau terjadi di miokardium setelah nekrosis akibat iskemia. Meskipun kata fibrosis dan jaringan parut biasa digunakan secara bergantian, beberapa literatur menggunakan kata fibrosis sebagai pembentukan kolagen masif yang disebabkan oleh inflamasi kronis (Kumar *et al.*, 2017; Mormone, George, dan Nieto, 2011).

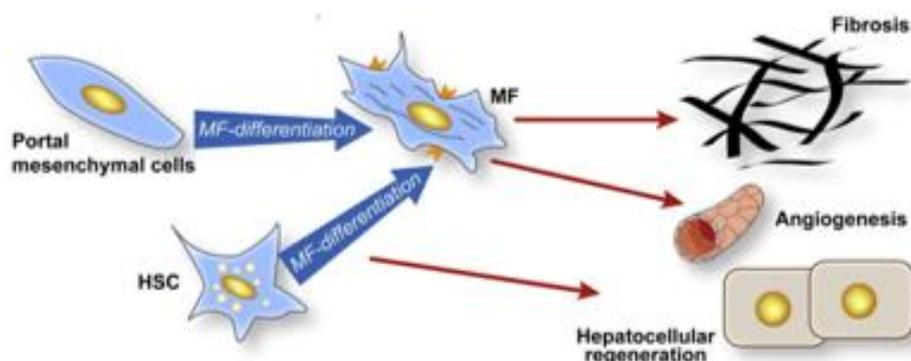
2.2.2 Fibrosis Hati

Fungsi-fungsi hati adalah filtrasi dan penyimpanan sel darah, metabolisme makromolekul, hormon, dan toksin, pembentukan empedu, penyimpanan vitamin dan besi,

dan pembentukan faktor koagulasi untuk pembekuan darah (Hall, 2016). Untuk menjalankan fungsi-fungsi tersebut, jaringan hati begitu juga jaringan-jaringan lainnya di tubuh memerlukan fungsi sel-sel parenkim yang optimal.

Fungsi jaringan parenkim hati dapat menurun akibat terjadinya fibrosis. Penyebab tersering terjadinya fibrosis hati adalah konsumsi alkohol berlebihan, hepatitis kronis, obesitas, penyakit autoimun, infeksi parasit, kelainan metabolis, paparan toksin berlebihan, dan penyakit hati kronis yang diinduksi obat-obatan dan bahan kimia. Sejumlah sel berkontribusi terhadap perkembangan fibrosis hati, di antaranya HSC (*Hepatic Stellate Cell* / sel stelata), fibroblas portal, *bone marrow-derived mesenchymal stem cell*, fibrosit, dan hepatosit (Kumar *et al.*, 2017; Mormone, George, dan Nieto, 2011).

Meskipun banyak jenis sel terlibat dalam patogenesis fibrosis hati, hanya terdapat satu jenis sel yang berfungsi sebagai efektor. Sel tersebut adalah sel miofibroblas (terdapat pada hilir alur patogenesis, gambar 2.2) (Lemoinne *et al.*, 2013). Miofibroblas merupakan sel yang dapat membentuk matriks ekstraselular sekaligus memiliki kontraktilitas sel otot polos. Miofibroblas berasal sebagian besar dari dua jenis sel, sel *portal mesenchymal* dan HSC (Iwaisako, Brenner and Kisseleva, 2012). Lebih jauh, Mederacke dkk. membuktikan secara molekuler bahwa HSC menyusun 82 – 96% dari keseluruhan miofibroblas (Mederacke *et al.*, 2013).



Gambar 2. 2 Miofibroblas Sebagai Efektor Fibrosis (Iwaisako, Brenner dan Kisseleva, 2012)

Keterangan: MF (miofibroblas)

2.2.3 HSC dan Aktivasinya pada Fibrosis

Dapat disimpulkan dari pembahasan sebelumnya bahwa HSC memiliki peran penting dalam patogenesis fibrosis hati. ~~HSC merupakan sel yang terlokalisasi di space of disse dan terdapat di sinusoid hati.~~ HSC terlihat secara mikroskopis sebagai sel yang menyimpan tetes lemak yang berisi vitamin A dan vitamin larut lemak lainnya (Mescher, 2009). ~~HSC termasuk sel yang jika teraktivasi menghasilkan jaringan ikat kolagen (Rojkind dan Reyes-gordillo, 2009). Progresi HSC melibatkan proses interseluler dan terbagi menjadi inisiasi, perpetuasi, dan resolusi, sedangkan regresi HSC melibatkan proses reversi, senescence, dan apoptosis (Friedman, 2008). Salah satu proses regresi HSC, apoptosis, ternyata juga berbanding terbalik terhadap regresi fibrosis (Gonzalez et al., 2009).~~ HSC merupakan jenis sel yang dalam keadaan fisiologis tidak berproliferasi dan berada pada fase G₀ (*quiescent*). Dalam keadaan patologis, sel tersebut akan berubah menjadi sel miofibroblas yang kemudian menimbulkan manifestasi berupa fibrosis (Tsuchida and Friedman, 2017).

Proses aktivasi HSC terbagi ke dalam dua fase utama, yaitu inisiasi dan perpetuasi. Dalam beberapa tipe cedera jaringan, terdapat fase ketiga, yaitu fase regresi. Ketika terjadi cedera pada hati, sel-sel sekitar HSC akan mencetuskan sinyal parakrin yang membuat HSC aktif. Berbagai sitokin yang telah teridentifikasi adalah PDGF, TGF β , TNF, dan IL-1 β dari sel Sel Kupffer, Hepatosit, Makrofag, dan NK. Proses persinyalan inilah yang kemudian menjadi inisiasi aktivasi HSC. HSC aktif inilah yang kemudian menjadi miofibroblas. Perpetuasi terjadi setelah inisiasi, ditandai dengan adanya persinyalan parakrin antara HSC dengan matriks ekstraseluler dan sel-sel di sekitarnya dan juga autokrin dari dalam miofibroblas itu sendiri. Pada fase perpetuasi, jaringan akan memiliki sifat-sifat sebagai berikut, kerap terjadi fibrogenesis, kehilangan retinoid (vitamin A), perubahan keseimbangan deposisi dan degradasi matriks ekstraseluler, kemotaksis HSC pada area cedera, peningkatan proliferasi dan kontraktilitas HSC, dan imunoregulasi oleh HSC (Hasegawa *et al.*, 2015).

Meskipun kedua fase tersebut dapat merubah keseimbangan matriks jaringan dan fungsi HSC, pada beberapa keadaan aktivasi tersebut bersifat reversibel. Deaktivasi atau apoptosis HSC keduanya mencetuskan reversibilitas fibrosis hati (Huang, Deng dan Liang, 2017).

Apoptosis HSC juga ditunjukkan berkorelasi dengan penurunan jumlah HSC aktif (miofibroblas) pada tikus dengan perlakuan ligasi duktus biliaris (Issa, 2015). ~~HSC memegang peranan dalam mengungkap fisiologi fibrosis hati (Melhem et al., 2006; Gonzalez et al., 2009; Rojkind dan Reyes-gordillo, 2009). Meskipun fisiologi fibrosis hati melibatkan banyak jalur interseluler dan intermolekular (Mormone, George, dan Nieto, 2011), penelitian pada HSC menunjukkan korelasi antara jumlah HSC dengan kejadian fibrosis hati (Gonzalez et al., 2009; Melhem et al.)~~

2.2.4 Sirosis Hati

Sirosis merupakan suatu kondisi patologis yang ditandai dengan pembentukan nodul regeneratif atau nodul anaplastik dan displastik. Nodul- nodul ini berisi sel hepatosit yang tidak mendapatkan nutrisi disebabkan terganggunya suplai akibat fibrosis. Nodul-nodul ini dikelilingi oleh septa matriks ekstraseluler (Kumar *et al.*, 2017; Hanna *et al.*, 2008).

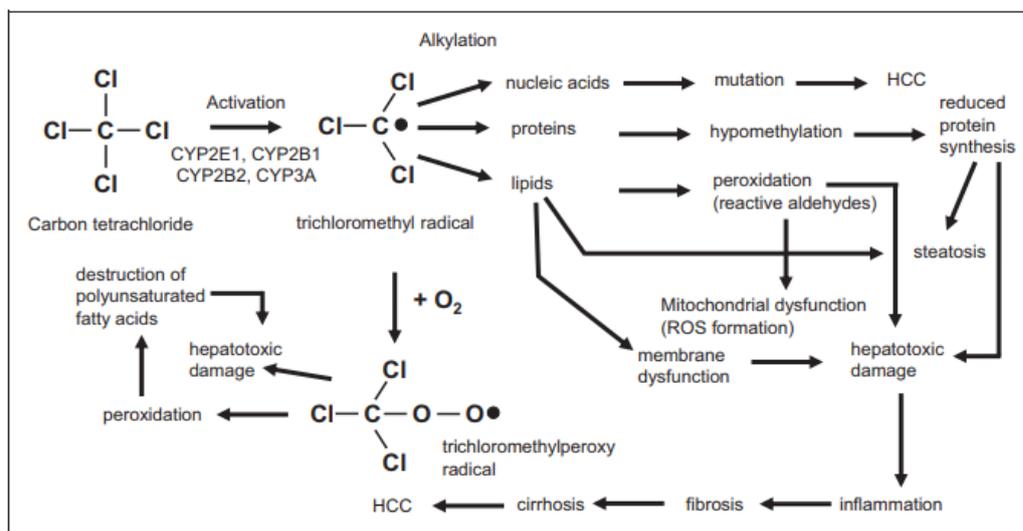
Seluruh gejala yang berhubungan dengan sirosis hati fatal biasanya berasal dari salah satu di antara tiga jalur: kegagalan hepar, hipertensi portal, dan karsinoma hepatoseluler (Kumar *et al.*, 2017). Induksi fibrosis hati dengan CCl₄ pada 12 minggu dapat menyebabkan sirosis mikronoduler pada hati (Varga, Brenner dan Phan, 2005).

2.2.5 Model Fibrosis dan Sirosis Hati dengan CCl₄

Beberapa model fibrosis yang telah diketahui sampai saat ini adalah model genetik, model dengan intervensi bedah, dan model hepatotoksik (Liedtke *et al.*, 2013). Salah satu model hepatotoksik yang paling sering digunakan adalah penggunaan CCl₄ (karbon tetraklorida) sebagai toksin. Berbagai eksperimen berbeda-beda dalam dosis, metode pemberian, dan metode anestesi pada tikus model fibrosis dengan CCl₄. Model fibrosis hati dengan CCl₄ terbagi menjadi model akut dan kronis. Pada paparan selama empat minggu

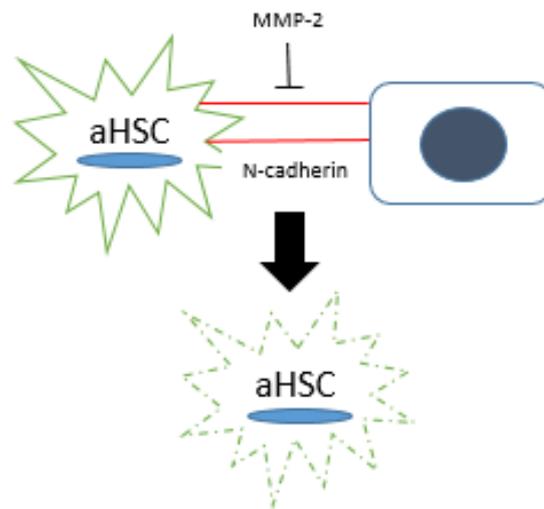
dengan pemberian dua kali dalam seminggu, terjadi fibrosis dan aktivasi sel stelata dan telah diketahui bahwa CCl_4 dalam waktu delapan minggu dengan pemberian dua kali dalam seminggu dan waktu 12 minggu dengan pemberian yang sama dapat menginduksi sirosis hati dan sirosis hati mikronoduler (Varga *et al.*, 2005).

CCl_4 dimetabolisme pada hepar oleh monooksigenase sitokrom P450 (CYP) menjadi suatu zat radikal, triklorometil CCl_3 . Zat ini kemudian berikatan dengan asam nukleat, protein, lipid, dan mengubah jalur-jalur utama seluler yang berakhir pada perubahan metabolisme lipid (steatosis dan degenerasi asam lemak) dan berkurangnya protein (gambar 2.3). penggabungan CCl_3 dan DNA mengakibatkan mutasi dan pembentukan HCC. Adanya zat radikal triklorometilperoksi (CCL300) yang berasal dari oksigenasi CCl_3 selanjutnya mengakibatkan terjadinya peroksidasi lipid dan kerusakan dari asam lemak tidak jenuh. Akibatnya, permeabilitas membran pada semua bagian sel (mitokondria, RE, dan membran plasma) menurun dan kerusakan hepar yang ditandai oleh inflamasi, fibrosis, sirosis, dan HCC terjadi.



Gambar 2. 3 Jalur Intoksikasi CCl_4 (Liedtke et al, 2013)

2.2.6 Pengaruh MMP (*Matrix Metalloproteinase*) terhadap Apoptosis HSC



Gambar 2. 4 MMP-2 pada Apoptosis aHSC

Metaloproteinase matriks (MMP) juga dikenal sebagai matriksin, adalah endopeptidase mengandung seng tergantung kalsium, anggota keluarga lainnya adalah adamalisin, serralisin, dan astacin. MMP termasuk ke dalam besar protease dikenal sebagai superfamili metzincin (Verma *et al*, 2007).

Secara kolektif, enzim ini mampu mendegradasi semua jenis protein matriks ekstraselular. Enzim ini dapat juga memproses sejumlah molekul bioaktif. Mereka diketahui terlibat dalam pembelahan reseptor permukaan sel, pelepasan ligan apoptosis (seperti ligan FAS), dan inaktivasi kemokin/sitokin (Van *et al*, 2007). MMP juga dipertimbangkan perannya dalam perilaku sel, seperti proliferasi sel, migrasi (adhesi/dispersi), diferensiasi, angiogenesis, apoptosis, dan pertahanan inang.

Sejauh ini, terdapat 28 MMP yang telah teridentifikasi. MMP memiliki efek proapoptosis dan efek antiapoptosis. Beberapa jalur antiapoptosis MMP antara lain, merusak ligan Fas, proteolisis protein MHC kelas I, dan aktivasi protein kinase AKT / protein kinase B. MMP menjalankan peran proapoptosisnya biasanya dengan mendegradasi komponen matriks ekstraseluler. Beberapa MMP merusak molekul pengikat antarsel. MMP-3 mendegradasi laminin. MMP yang memiliki peran apoptosis adalah MMP-2, MMP-3, MMP-7, dan MMP-9 (Jabłońska-Trypuć *et al*, 2016). MMP-2 merupakan salah satu MMP pencetus

apoptosis pada aHSC. Jalur apoptosis aHSC oleh MMP-2 adalah melalui protein N-cadherin (Gambar 2.3). MMP-2 dapat memediasi autokrin regenerasi N-Cadherin dan penghambatannya akan melindungi N-Cadherin dari proteolisis (Hartland *et al.*, 2017).

2.2.7 Hubungan TIMP-1 dan Apoptosis HSC

TIMP (*Tissue Inhibitor of Metalloproteinase*) adalah glikoprotein yang menjadi inhibitor alami protein MMP pada sel. Selain menjadi inhibitor MMP, TIMP juga menginduksi proliferasi sel dan memiliki efek antiapoptosis TIMP terdiri dari TIMP-1, TIMP-2, TIMP3, dan TIMP4.

TIMP-1 bekerja dengan mengikat kofaktor *zinc*. TIMP-1 bekerja sebagai inhibitor pada MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, dan MMP-16 (Uniprot.org, 2019). TIMP-1 dapat membantu kesintasan aHSC melalui inhibisi MMP (Murphy *et al.*, 2002). Pada apoptosis aHSC, peran TIMP-1 sebagai inhibitor pada MMP-2/3/7/9 sangat dipertimbangkan karena protein-protein MMP tersebut berperan langsung sebagai pencetus apoptosis aHSC (Jabłońska-Trypuć *et al.*, 2016).

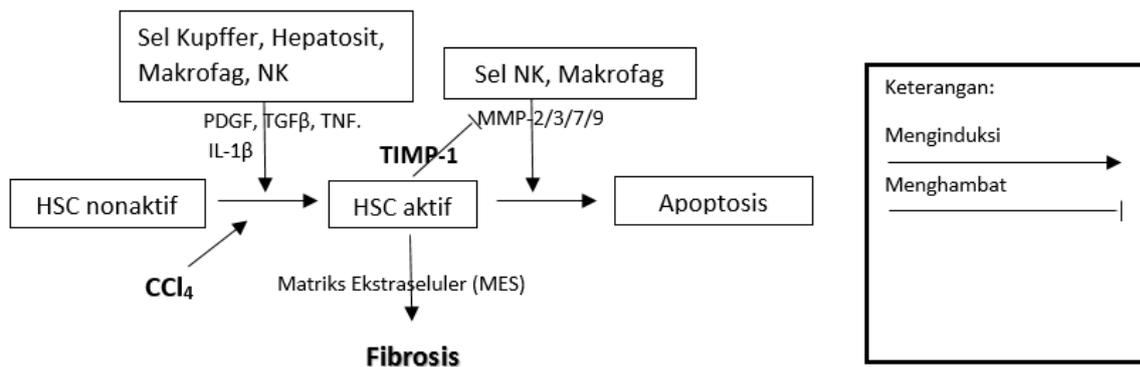
Hal-hal yang telah dijelaskan, mulai dari pengaruh TIMP-1 terhadap MMP, pengaruh MMP terhadap apoptosis aHSC, dan pengaruh apoptosis aHSC terhadap fibrosis merupakan landasan pengambilan keputusan peneliti untuk meneliti pengaruh ekspresi TIMP-1 sel stelata hati terhadap fibrosis hati.

BAB 3.

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep

Dapat dilihat dari gambar 3.1, seperti yang dapat disimpulkan dari



Gambar 3. 1 Kerangka Konsep

pembahasan sebelumnya, berbagai sitokin dari sel Kupffer, hepatosit, makrofag, dan NK menginduksi HSC sehingga terjadi aktivasi dan berpengaruh terhadap perubahan ekspresi matriks ekstraseluler pada fase progresi, proses yang reversibel, sedangkan MMP-2/3/7/9 dari sel NK dan makrofag mencetuskan apoptosis. TIMP-1 menghambat protein-protein MMP tersebut sehingga menghambat apoptosis dan menghambat regresi fibrosis hati. CCl₄ akan menginduksi progresi fibrosis dan apoptosis HSC. Penurunan TIMP-1 memengaruhi regresi fibrosis hati melalui apoptosis aHSC (Melhem *et al.*, 2006; Gonzalez *et al.*, 2009; Issa 2015).

3.2 Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian ini adalah terdapat hubungan antara ekspresi protein TIMP-1 sel stelata hati terhadap fibrosis hati pada tikus model fibrosis hati yang diinduksi dengan CCl₄.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi FKUB untuk proses pemeliharaan, induksi CCl₄, dan pembedahan. Proses pembuatan preparat sampai dengan parafinisasi dilakukan di Laboratorium Patologi FKUB. Pengecatan dilakukan di Laboratorium Biomedik FKUB, sedangkan dilakukan di Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya pengambilan foto menggunakan mikroskop bidang gelap. Induksi CCl₄ dilakukan selama 14 minggu, dengan tujuan munculnya mikronodul-mikronodul sirosis (Bravo *et al.*, 2012) mulai dilaksanakan bulan Juli sampai dengan November 2018. Proses-proses selanjutnya sampai pengumpulan dan analisis data dilakukan sampai dengan bulan Maret 2019.

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian tahap pertama dan berbentuk eksperimental laboratorium dengan design *true experimental laboratory*. Penelitian ini termasuk ke dalam penelitian eksperimental *in vivo* pada hewan coba tikus. Metode yang digunakan adalah *randomized post-test only controlled group design*. Hewan coba di penelitian ini dibuat model fibrosis hati dengan diinduksi oleh CCl₄ dan diberi perlakuan dengan diberikan ekstrak etanol dari *Moringa oleifera*. Sebelum diberi perlakuan, hewan coba diadaptasikan terlebih

dahulu selama tujuh hari kemudian dibagi menjadi lima kelompok secara acak, dengan rincian sebagai berikut :

Tabel 4.1 Rancangan Penelitian

No	Nama kelompok	Perlakuan	
		Injeksi CCl ₄ 10% 1cc/kgBB atau 1ml/kgBB	Injeksi NaCl 1cc/kgBB atau 1ml/kgBB
1.	K-negatif	-	Intraperitoneal 2x/minggu selama 97 hari
2.	K-positif	Intraperitoneal 2x/minggu selama 97 hari	-

Tikus kelompok kontrol negatif tidak diberikan injeksi CCl₄ tetapi diinjeksi dengan NaCl 1 cc / kgBB selama 99 hari atau 14 minggu, sedangkan kelompok kontrol positif diberikan injeksi CCl₄ 10% selama 97 hari 2 kali perminggu. Semua tikus dikorbankan dua hari setelah pemberian CCl₄ / NaCl yang terakhir.

4.3 Sampel

4.3.1 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini menggunakan tikus putih *Rattus norvegicus strain wistar*. Penelitian ini mempunyai kriteria inklusi dan eksklusi. Kriteria inklusinya

yaitu tikus jantan, umur kurang lebih tiga bulan, berat badan 150 - 250 gram, belum pernah mengalami perlakuan apapun, dan tikus sehat (gerak aktif dan bulu tidak rontok). Kriteria eksklusinya adalah tikus yang hilang atau mati selama perlakuan.

4.3.2 Estimasi Jumlah Sampel

Jumlah sampel yang akan digunakan dalam eksperimen dengan metode *random* (acak), menggunakan rumus Federer (1963), yaitu : $(t-1)(r-1) \geq 15$, dimana:

t : banyaknya kelompok perlakuan

r : jumlah pengulangan (replikasi)

Pada penelitian ini $t = 2$, sehingga didapatkan pengulangan sebesar :

$$(2 - 1)(r - 1) \geq 15$$

$$(r - 1) \geq 16$$

Jadi, jumlah tikus untuk pengulangan yang diperlukan di setiap kelompok perlakuan adalah minimal 17. Sehingga total semua tikus yaitu $17 \times 2 = 34$ tikus.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekspresi protein TIMP-1 pada HSC

4.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah luas area fibrosis

4.5 Definisi Operasional

1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus *Rattus norvegicus* strain wistar jantan yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi FKUB.
2. Diet normal berupa pakan standart konsentrat BR1 dicampur dengan tepung dengan perbandingan 3:1 dengan total berat 40 gram perhari pertikus dan air secukupnya.
3. Paparan CCl₄ adalah pemberian injeksi CCl₄ 10% (CCl₄ / *corn oil* = 1:9 *volume*) intraperitoneal dengan dosis 1,0 ml/KgBB, dua kali seminggu (Joshi *et al.*, 2017) selama 97 hari atau 14 minggu (Issa *et al.*, 2004)..
4. Ekspresi TIMP-1 HSC pada penelitian ini dilihat dengan teknik imunofloresensi bersamaan dengan pewarnaan alfa-SMA dan luas area fibrosis dilihat dengan pewarnaan MT
5. Ekspresi TIMP-1 HSC dinyatakan dalam satuan *binary values* untuk gambar 8-bit. Pengukuran dilakukan dengan menentukan *mean gray values* yang berarti rata-rata satuan 8-bit dibagi seluruh piksel gambar.
6. Luas area fibrosis dihitung dalam satuan mikrometer (µm), diukur secara kuantitatif dengan menggunakan mikroskop dengan sistem analisis komputer pada sampel biopsi hati setelah pengecatan.

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Alat

4.6.1.1 Alat Pemeliharaan Tikus

Kandang dari kotak berukuran 45 cm x 35,5 cm, 14,5 cm dengan alas sekam yang bersih dan kering serta diganti dua hari sekali, tutup kandang dari

anayaman kawat, botol air dan tempat pakan tikus. Penimbangan berat badan dengan menggunakan neraca sartorius.

4.6.1.2 Alat Pembuatan Pakan Tikus

Baskom plastik, timbangan, handscoon, gelas ukur, pengaduk, penggilingan pakan, nampan.

4.6.1.3 Alat Pembedahan Tikus

Alat yang akan digunakan untuk pembedahan tikus adalah gunting jaringan, *sputit* 3 cc, kertas label, dan *handscoon*.

4.6.1.4 Alat Pemeriksaan Mikroskopi dan Teknik Imunofluoresensi

Rotari mikroton merek LEICA, mikroskop cahaya merek Nikon Eclipse C 600, dengan kamera Nikon digital Net Camera DN 100 dengan pembesaran 40X, 100X, dan 200X, disertai lensa okuler 10X dan lensa obyektif 100X, kaca obyek dan kaca penutup. Pemeriksaan imunofluoresensi menggunakan mikroskop Olympus FSX 100

4.6.2 Bahan

4.6.2.1 Hewan Coba

Tikus *Rattus norvegicus strain wistar* sesuai kriteria inklusi.

4.6.2 2 Alat perawatan tikus

Air, sekam, pakan tikus.

4.6.2.3 Bahan pembuatan pakan standar

pakan BR1 dibanding tepung 3:1 dan air secukupnya dengan total pakan 40 gram tiap tikus

4.6.2.4 Bahan pembuatan CCl₄

CCl₄ 10% dan minyak jagung.

4.6.2.5 Bahan Reagensia

Reagen untuk pengecatan TIMP-1 yang dibeli dari CV. Duta Sarana Medika.

4.6.2.6 Bahan Bedah Tikus

Bahan untuk pembedahan adalah 20 cc ketamin 100 mg/mL dan formalin.4.8

Pembuatan CCl₄

- CCl₄ ini diambil dengan pipet sebanyak 5 mL
- Di dalam beaker glass CCl₄ ini dilarutkan dengan minyak jagung dengan rasio perbandingan 1:9, (1 mL CCl₄ dan 9 mL minyak jagung), lalu diaduk hingga rata.

4.7 Pemeliharaan Tikus dan Perlakuan pada Tikus

4.7.1 Persiapan Sebelum Pemeliharaan

- Tikus *Rattus norvegicus* galur Wistar didapatkan dari Laboratorium Farmakologi FKUB.
- Mempersiapkan kandang tikus sejumlah 10 kandang. Setiap kandang isi satu ekor tikus dan kandang diberi label sesuai dengan perlakuan dan diikuti oleh identitas tikus (ditulis dengan angka), contoh: label K-neg (1), K-pos (1), K-pos (2), dan seterusnya.

- Kandang ditutup dengan menggunakan anyaman kawat berongga sehingga tikus tetap bisa bernafas dengan ventilasi udara yang cukup.
- Ruang untuk menempatkan kandang bersuhu 25-28°C dengan kelembapan udara 50-70%.
- Alas kandang berupa sekam dengan ketebalan secukupnya dan melakukan pergantian sekam pada hari Senin dan Kamis.

4.7.2 Perlakuan Tikus

- Sebelum diberi perlakuan, tikus diadaptasikan terlebih dahulu selama satu minggu terhadap kondisi laboratorium. Tikus diberikan diet normal. Tikus ditimbang saat awal adaptasi dan akhir adaptasi untuk bisa dipantau bahwa tikus tidak mengalami penurunan berat badan dan tetap dalam kondisi yang sehat.
- Minum yang diberikan setiap hari adalah aquades yang ditempatkan pada botol minum ukuran 100 mL dan ada pipa dengan bola katup tempat keluarnya air minum dan ini diletakkan di atas kawat penutup kandang.
- Memberikan pakan yang BR1 dibanding tepung 3:1 dan air secukupnya dengan total pakan 40 gram tiap tikus
- Tikus dikeluarkan dari kandang untuk diberikan perlakuan seperti menimbang berat badan dan induksi fibrosis hati dengan karbon tetraklorida (CCl₄). Sebelum memegang tikus, peneliti mendekatkan diri dengan tikus agar tikus mengetahui keberadaan orang disekitarnya dan menghindari gigitan tikus. Pengeluaran tikus dari kandang dengan memegang ekor yang dekat dengan badan, setelah itu tikus didekatkan ke bagian lengan tangan yang memegang ekor tikus. Sedangkan tangan satunya memegang tubuh bagian atas dengan posisi kaki depan tikus diantara jari telunjuk dan jari tengah peneliti. Saat

memegang bagian tubuh yang atas jangan terlalu kencang agar tikus dapat bernafas. Lalu, tangan lain memegang tubuh bagian bawah kemudian tikus diposisikan secara vertikal.

- Untuk kelompok kontrol negatif diinjeksi NaCl 0.9% dengan dosis 1 ml/kgBB dengan frekuensi dua kali seminggu yang digunakan sebagai plasebo.
- Memberikan ekstrak *Moringa oleifera* peronde dengan dosis yang telah ditentukan. Pemberian ini sesuai dengan kelompok yang dimulai pada hari pertama saat injeksi CCl₄. Untuk kelompok perlakuan hanya diberikan satu kali 48 jam setelah injeksi CCl₄.

4.7.3 Pemberian CCl₄

- Setelah adaptasi selama satu minggu, dilakukan injeksi CCl₄ secara intraperitoneal.
- Untuk setiap injeksi dosisnya yaitu 1 cc / kg BB setiap 2 kali per minggu selama 99 hari untuk kelompok perlakuan. Dan sebelum melakukan injeksi timbang dulu berat badannya untuk menentukan dosis karbon tetraklorida.
- Di bagian yang akan disuntik harus di bersihkan dulu dengan kapas yang diberi alkohol dengan arah sirkuler dari medial ke lateral.
- CCl₄ disuntikkan di bagian kuadran kanan bawah abdomen untuk menghindari tertusuknya organ-organ vital.

4.7.4 Pembedahan dan Pengambilan Organ

Pembedahan dilakukan 48 jam setelah perlakuan terakhir (Aoyama *et al.*, 2010). Sebelum dilakukan pembedahan, tikus harus dibius terlebih dahulu. Proses pembiusan ini dilakukan dengan menginjeksikan ketamin 50 mg / mL sebanyak 0,3 cc (AVMA Euthanasia Guidelines, 2007). Berikut adalah langkah atau tahapan yang harus dilakukan saat pembedahan :

- Tikus dibius terlebih dahulu dengan injeksi ketamin 50 mg / mL sebanyak 0,3 cc secara intraperitoneal.
- Tikus di tempatkan di atas papan bedah dengan alas *styrofoam*
- Dipastikan tubuh terutama tangan dan kaki tikus terfiksasi dengan baik agar mudah dalam melakukan pembedahan.
- Pembedahan dilakukan di bagian abdomen, sebelum dibedah bulu dibagian abdomen dapat dicukur terlebih dahulu kemudian dibersihkan.
- Pembedahan dapat dilakukan dengan menggunakan gunting bengkok.
- Cuci organ dengan aquades berulang-ulang hingga bersih hingga tidak ada lemak-lemak yang menempel pada organ.
- Setelah cuci organ dengan NaCl 0,9%
- Tempatkan organ diatas kertas saring
- Lalu organ dipindah ke cawan petri untuk ditimbang jika air sudah berkurang. Catat hasil timbangan.
- Organ yang sudah di timbang di masukkan ke dalam pot berisi formalin 4% dan buffer formalin.
- Pembedahan dilakukan 48 jam setelah perlakuan terakhir.
- Setelah dilakukan pembedahan maka tubuh tikus akan dikubur dan area pembedahan dibersihkan.

4.8 Pembuatan preparat dan Pengukuran Histopatologi Fibrosis Hati

Pembuatan slide jaringan hati dilakukan sebagai langkah awal dalam pengukuran derajat fibrosis dan ekspresi Kolagen-1 jaringan hati. Proses pembuatan dilakukan di Lab Patologi Anatomi (PA) FKUB dengan cara sebagai berikut:

- Jaringan atau spesimen penelitian harus sudah terfiksasi dengan formalin atau dengan bafer formalin 10% minimal selama 7 jam sebelum dilakukan proses pengerjaan berikutnya
- Jaringan dipilih yang terbaik sesuai dengan lokasi yang diteliti (lobus medial hati tikus)
- Jaringan dipotong kurang lebih ketebalan 2-3 milimeter
- Dimasukkan ke kaset dan diberi kode sesuai dengan kode gross peneliti
- Jaringan kemudian diproses dengan alat Automatik Tissue Tex Prosesor atau dengan cara manual
- Standar di Lab PA FKUB menggunakan Tissue Tex Prosesor selama 90 menit. Jika alarm menyala tandanya proses selesai.
- Jaringan diangkat dari mesin Tissue Tex Prosesor kemudian diblok dengan paraffin sesuai kode jaringan
- Jaringan dipotong dengan alat microtome ketebalan 3-5 mikron
- Jaringan yang akan dilakukan pewarnaan dideparafinisasi terlebih dulu
- Jaringan dideparafinisasi yaitu dengan menaruh dalam oven selama 30 menit dengan suhu panas 70-80oC
- Masukkan jaringan ke dalam 2 tabung larutan xylool masing-masing 20 menit
- Masukkan jaringan ke 4 tabung alkohol masing-masing tempat 3 menit (hidrasi)
- Masukkan jaringan ke air mengalir selama 15 menit

4.9 Pemeriksaan Patologi Anatomi Jaringan Hati Tikus Model Fibrosis

Pengukuran derajat fibrosis di jaringan hati tikus model fibrosis hati dilakukan menggunakan metode histopatologi yang ditentukan dengan skor Metavir. Metode histopatologi dilakukan sesuai dengan petunjuk yang diterapkan pada lab Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Jenis pengecatan histopatologi yaitu dengan menggunakan Masson's Trichrome (MT) dengan prosedur sebagai berikut:

- Preparat yang sudah dideparafinisasi kemudian panaskan larutan Bouin's (untuk membuka epitope jaringan) di waterbath 56-64 oC di lemari asam/ area yang berventilasi bagus
- Kemudian teteskan 5-10 tetes larutan tersebut ke jaringan selama 6 menit. Lalu tempatkan slide di chamber, kemudian chamber dimasukkan ke waterbath atau cuci 1x tap water selama 3-5 menit
- Kemudian cuci lagi dengan aquades 1x
- Lalu campur Weigert A dan Weigert B 1:1, setelah dicampur lalu teteskan ke jaringan selama 5-10 menit, jangan sampai kering
- Keringkan dengan tissue, bagian jaringan tidak boleh dibersihkan
- Cuci slide dengan air mengalir selama 2 menit
- Cuci slide dengan aquades
- Teteskan 5-10 tetes larutan Acid Fuchsin ke jaringan selama 5-15 menit. Lalu cuci kembali dengan aquades

- Bedakan bagian jaringan yang diwarnai dengan 5-10 tetes larutan Phosphomolybdic selama 10-15 menit atau setelah kolagen tidak berwarna merah
- Tanpa dicuci, teteskan 5-10 larutan Anilin Blue ke jaringan selama 5-10 menit. Cuci lagi slide dengan Aquades
- Teteskan 5-10 larutan acid 1% ke jaringan selama 3-5 menit (untuk mempertajam warna
- Dehidrasi dengan cepat di 2 perubahan alcohol absolut selama 3-5 menit
- Lalu lakukan cleaning xylol selama 3-5 menit
- Dapat dilakukan pengamatan di bawah mikroskop.
- Organ hati yang diambil dibuat potongan jaringan hati, potongan jaringan hati tidak lebih dari 2 cm dengan ketebalan 4-5 mm lalu direndam dalam larutan formalin 10% selama 18-24 jam. Tujuan dari fiksasi ini yaitu untuk mengawetkan sel-sel melalui denaturasi protein, sehingga struktur inti sel tidak berubah. Cara pencuciannya yaitu dengan air mengalir selama 15 menit untuk menghilangkan sisa-sisa bahan fiksasi. Jaringan di simpan di dalam kapsul yang berlubang-lubang dan diberi label untuk identifikasi.
- Selanjutnya yaitu dilakukan *embedding*, dimana potongan jaringan hati ini di rendam dalam acetone 4x1 jam. Lalu potongan ini di rendam lagi ke dalam xylol selama 4x1 jam. Kemudian, di rendam kembali ke dalam parafin cair dengan suhu 60°C selama 4x1 jam. Tahap rendaman terakhir yaitu dengan parafin blok selama 24 jam.

- Tahap selanjutnya yaitu dilakukan penyayatan. Penyeyatan ini menggunakan mikrofon rotatory/sliding dengan ketebalan 4-6 mikron. Sayatan ditempatkan di water bath dengan suhu 60°C. Kemudian sayatan diusap dengan mayer albumin, setelah itu ditempatkan pada obyek glass, dan di diamkan selama 24 jam.
- tahap selanjutnya yaitu dilakukan pewarnaan MT:
 - 1) Pertama-tama preparat dicelupkan pada xylol selama 3x15 menit.
 - 2) Setelah itu dicelupkan kedalam alkohol 95% selama 3 x 15 menit.
 - 3) Kemudian cuci dengan air mengalir selama 15 menit.
 - 4) Setelah itu preparat diwarnai dengan hematoxilin selama 15 menit, dan di cuci lagi selama 15 menit.
 - 5) Preparat dicelupkan lagi pada alkohol asam 1 dip dan dicuci lagi dengan air mengalir selama 15 menit.
 - 6) Celupkan pada eosin selama 15 menit.
 - 7) Tahap akhir yaitu preparat dicelupkan pada alkohol 95% selama 3x15 menit, lalu tutup dengan objek glass.
 - 8) Hematoxilin akan memberikan warna biru-ungu pada inti sel, dan eosin akan memberikan pewarnaan merah pada membran sel. Dengan begini struktur dan jenis sel didalam jaringan hepatosit akan lebih jelas.

4.10 Teknik Immunofluoresensi dan Double Staining α -SMA dan TIMP-1

Harus diperhatikan penggunaan double staining menggunakan α -SMA sebagai *marker* HSC. Sel-sel yang mengekspresikan kedua antibodi secara bersamaan berarti memiliki TIMP-1 dan α -SMA. (Abcam.com, 2019)

4.10.1 Persiapan Preparat

1. Deparafinisasi dengan *xylene* 2 x 5 menit.
2. Hidrasi dengan etanol 100 % 2 x 3 menit.
3. Hidrasi dengan etanol 95 % selama satu menit.
4. Bilas dengan aquadest dan fiksasi.

4.10.2 Fiksasi

1. Fiksasi sampel pada metanol, aseton (1 – 10 menit), atau pada paraformaldehid 3 – 4 % pada PBS dengan pH 7,4 selama 15 menit pada suhu ruangan.
2. Bilas sampel dua kali dengan PBS beku.

4.10.3 Permeabilisasi

Jika protein target diekspresikan di luar sel, sangat penting tindakan permeabilisasi. Catatan: sampel dengan aseton tidak perlu permeabilisasi.

1. Inkubasi sampel dengan PBS yang mengandung Triton X – 100 selama 10 menit. Triton X – 100 adalah deterjen yang paling terkenal untuk meningkatkan penetrasi antibodi ke dalam sel dan tidak cocok untuk antigen membran karena merusak membran.
2. Bilas sel pada PBS tiga kali selama lima menit.

4.10.4 Blocking dan Inkubasi

1. Inkubasi sel dengan BSA 1%, glisin 22.52 mg/mL pada PBST (PBS+ 0,1 %) selama 30 menit untuk memblokir ikatan-ikatan tidak spesifik pada antibodi.
2. Inkubasi sel dalam gabungan dua antibodi berbeda dalam BSA dalam PBST dalam kotak lembab selama satu jam dalam temperatur ruangan atau selama satu malam dengan suhu 4 derajat celcius.
3. Tuang larutan campuran tersebut dan basuh sel tiga kali dalam PBS, 5 menit untuk setiap basuhan.
4. Inkubasi sel dalam gabungan dua antibodi sekunder yang telah didapatkan dari dua spesies berbeda dalam BSA 1 % selama satu jam dalam temperatur ruangan dalam gelap.
5. Tuang larutan campuran antibodi sekunder tersebut dan basuh tiga kali dengan PBS, 5 menit setiap basuhan dalam gelap.

4.10.5 Counter Staining

1. Inkubasi sel dalam Hoechst atau DAPI (pewarnaan DNA) selama satu menit.
2. Bilas dengan PBS.

4.10.6 Penempelan Coverslip

1. Tempelkan *coverslip* dengan medium
2. Lindungi *coverslip* dengan cat kuku untuk mencegah pengeringan dan pergerakan *coverslip* pada pengamatan di bawah mikroskop
3. Simpan pada ruangan gelap dalam suhu – 20° C atau 4 ° C.

4.11 Pemotoan

Untuk uji imunofluoresensi, preparat diamati dengan mikroskop *Olympus* FSX 100 pada perbesaran 200 x dan 5 lapang pandang dengan tetap

memperhatikan pengaturan awal dan tanpa mengubah *exposure time*. Pada setiap lapang pandang, diperoleh satu foto dengan tiga warna, merah untuk rhodamin (TIMP-1), hijau untuk FITC (α -SMA), dan biru untuk DAPI.

4.12 Perhitungan Intensitas TIMP-1 pada aHSC

Intensitas TIMP-1 aHSC dihitung dengan menggunakan aplikasi FijiimageJ untuk Windows 64 bit yang dirangkum pada lampiran 3 dengan langkah-langkah sebagai berikut:

1. Buka aplikasi FijiimageJ
2. *File – open* - Buka *file* hasil foto imunofluoresensi yang akan dinilai intensitasnya.
3. Buka *file* dengan pewarnaan hijau / FITC (α -SMA), kemudian *image – type – 8 bit*. Gambar akan berubah menjadi *grayscale* atau gambar dengan warna abu- abu.
4. Klik *Image – Threshold* – ketik angka 10 dan 255 pada kolom *threshold*.
5. Klik *Edit – Selection – Mark Selection* untuk membuat *Region of Interest* (ROI). Kemudian tekan tombol T pada *keyboard* untuk menyimpan ROI pada *ROI manager*.
6. Buka *file* dengan pewarnaan DAPI (nukleus) untuk melakukan pemilihan struktur nukleus HSC. aHSC adalah sel yang mengekspresikan FITC dengan nukleus berstruktur pipih secara bersamaan.
7. Buka ROI manager dan klik ROI yang telah ditentukan melalui tahap 1 – 5 pada gambar dengan pewarnaan DAPI. Gambar akan menunjukkan ekspresi FITC di atas nukleus.

8. Pilih nukleus berbentuk pipih dan FITC dengan cara klik *Multipoint Tool* pada toolbar dan klik pada nukleus pipih yang dikelilingi oleh ROI FITC. Tekan tombol T untuk menyimpan pilihan pada ROI *manager*
9. Tahap selanjutnya adalah penentuan aHSC dengan ekspresi TIMP-1. Lakukan tahap 1 – 5 pada gambar yang mengekspresikan rhodamin atau gambar berwarna merah.
10. Setelah ROI tersimpan pada ROI *manager*, buka gambar dengan warna biru dan kuning, lalu klik pada ROI manager ROI yang telah ditentukan pada tahap 6 – 8 dan tahap 9. Perlu ditekan B terlebih dahulu pada *keyboard* agar ROI dapat bertumpang – tindih.
11. Tentukan kembali ROI baru dengan *Multipoint Tool* untuk menentukan aHSC yang mengekspresikan TIMP-1. aHSC dengan TIMP-1 adalah ROI dengan rhodamin (warna merah) di sekelilingnya. Simpan kembali hasil pilihan pada ROI *manager*
12. Lakukan kembali langkah 1 – 4 pada gambar dengan warna merah / rhodamin. Kemudian pilih ROI pada langkah 11 di atasnya. Setelah itu, tandai TIMP-1 di sekitar aHSC pada ROI di langkah 11.
13. Setelah seluruh ROI TIMP-1 pada aHSC terpilih, tekan tombol M pada keyboard untuk menilai intensitas warna rhodamin yang menggambarkan ekspresi TIMP-1. Hasil yang diperoleh merupakan *mean gray value* yang berarti rata – rata intensitas seluruh piksel yang mengekspresikan warna merah.
14. Seluruh data kemudian dikumpulkan dan dianalisis menggunakan IBM SPSS 25 dengan uji normalitas, statistika deskriptif, dan uji korelasi.

4.13 Alur Penelitian

