

DAFTAR ISI

Sampul Dalam	i
Halaman Awal Disertasi	ii
Halaman Prasyarat Gelar	iii
Lembar Pengesahan	iv
Penetapan Panitia Penguji	v
UCAPAN TERIMAKASIH	vii
RINGKASAN ..	ix
SUMMARY ..	xi
ABSTRACT ..	xiii
DAFTAR ISI	xv
DAFTAR TABEL	xviii
DAFTAR GAMBAR	xx
DAFTAR LAMPIRAN	xxii
DAFTAR ARTI/LAMBANG/SINGKATAN/ISTILAH	xxiii
BAB1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Manfaat Penelitian	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Defek Duramater	7
2.1.1 Komplikasi proses penutupan defek durameter	7
2.2 Penyembuhan Luka	10
2.3 Proses Penutupan Defek Duramater	14
2.4 Peran COX-2 dalam Reaksi Inflamasi	17
2.4.1 Prostaglandin	17
2.4.1.1 Jalur sintesa prostaglandin	18
2.4.1.2 Siklooksigenase (COX)	21
2.5 Peran iNOS dalam proses inflamasi	23
2.5.1 Nitric Oxide (NO)	23
2.5.2 Jalur sintesa NO	23
2.5.3 iNOS (<i>inducible Form Nitric Oxide Synthase</i>)	25
pada sistem saraf	
2.5.4 iNOS (<i>inducible Form Nitric Oxide Synthase</i>)	26
pada kondisi fisiologis	
2.5.5 iNOS pada kondisi patologis	27
2.5.6 Peran inos dalam penyembuhan luka	30
2.6 Peran IL-1 β , IL-6 dan TNF- α dalam proses inflamasi	33
2.6.1 Sitokin proinflamasi	34
2.6.2 Peran IL-1 β , IL 6 dan TNF- α dalam proses penyembuhan Luka	40
2.6.3 Respon imunitas terhadap antigen eksogen	42
2.6.4 Reaksi jaringan terhadap Benda Asing	45
2.7 Membran Amnion	50
2.7.1 Embriologi membran amnion	51

2.7.2 Struktur dan fungsi membran amnion.....	52
2.7.3 Membran amnion sebagai <i>scaffold</i>	57
2.7.4 Keunggulan membran amnion sebagai graft	59
2.7.5 Metode preservasi membran amnion	63
2.7.5.1 Membran amnion beku kering (<i>freeze-dried</i>).....	63
2.7.5.2 Cryopreservasi membran amnion	65
2.7.6 Ekspresi hla pada membran amnion.....	67
2.7.7 Profil membran amnion paska preservasi beku kering	68
2.8 HLA –G	75
2.8.1 Definisi	75
2.8.2 Gen Penyandi	76
2.8.3 Struktur Kimia.....	76
2.8.4 Pengaruh HLA-G terhadap sistem imunitas	77
2.8.4.1 Fungsi imuno-inhibisi langsung melalui blocking sel-sel efektor	78
2.8.4.2 Fungsi imuno-inhibisi tidak langsung melalui produksi sel regulatory.....	79
2.8.4.3 Fungsi-fungsi lain dengan konsekuensi imuno–inhibisi ...	79
2.9 Pewarnaan imunohistokimia	80
2.10 Pewarnaan immunositokimia Annexin V sebagai penanda apoptosis.....	84
2.11 Pewarnaan DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole) sebagai penanda proliferasi sel	87
2.12 Pewarnaan DAPI terhadap DNA yang terfragmentasi pada proses apoptosis	88
2.13 Karakterisasi kultur sel saraf.....	89
2.13.1 GFAP (glial Fibrillary Acidic Protein.....	89
2.13.2 Nestin	91
2.13.3 Sox-21	92
2.13.4 karakterisasi kultur sel dengan <i>Cluster of Differentiation (CD)</i>	93
2.14 Penilaian viabilitas sel dengan menggunakan pemeriksaan MTT	94
2.15 Proses pembacaan oleh ImageJ	95
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
3.1 Kerangka Konseptual dan Penjelasan kerangka konseptual	97
3.2 Hipotesis penelitian	98
BAB 4 METODE DAN MATERI PENELITIAN	
4.1 Penelitian InVitro (Tahap Pertama)	100
4.1.1 Jenis dan rancangan penelitian	100
4.1.2 Unit eksperimen, replikasi dan randomisasi	101
4.1.2.1 Unit eksperimen : kultur sel otak tikus	101
4.1.2.2 Replikasi	101
4.1.2.3 Randomisasi.....	102
4.1.3 Variabel penelitian	102
4.1.3.1 Variabel bebas (independent)	102
4.1.3.2 Variabel tergantung (dependent).....	102

4.1.3.3 Variabel kendali	103
4.1.3.4 Definisi operasional variabel	103
4.1.3.4.1 Persiapan membran amnion.....	103
4.1.3.4.2 Viabilitas kultur sel otak setelah terpapar membran amnion	104
4.1.3.4.3 Proliferasi kultur sel otak setelah terpapar membran amnion.....	105
4.1.3.4.4 Apoptosis kultur sel otak setelah terpapar membran amnion.....	105
4.1.4 ... Prosedur Penelitian	105
4.1.4.1 Kultur sel otak tikus dan karakterisasi sel	105
4.1.4.2 Viabilitas kultur sel otak setelah terpapar membran amnion	106
4.1.4.3 Colorimetric assay menggunakan pewarnaan MTT	106
4.1.4.4 Prosedur Pewarnaan Immunositokimia (ICC).....	108
4.1.5 Tehnik analisis data	108
4.1.6 Kerangka Operasional Penelitian	108
4.2 Penelitian Invivo (tahap kedua).....	109
4.2.1 Jenis rancangan Penelitian	109
4.2.2 Unit Eksperimen, Replikasi dan Randomisasi	111
4.2.2.1 Unit eksperimen : tikus wistar (Rattus Norvegicus Wistar)	111
4.2.2.2 Replikasi	111
4.2.2.3 Randomisasi	111
4.2.3 Variabel penelitian	111
4.2.3.2 Variable bebas.....	112
4.2.3.2 Variable tergantung	112
4.2.3.3. Variabel kendali	112
4.2.3.4 Definisi operasional variable	112
4.2.3.4.1 Penilaian reaksi inflamasi	112
4.2.4 Prosedur Penelitian.....	113
4.2.4.1 Prosedur pewarnaan metode imunohistokimi	113
4.2.4.2 Prosedur perlakuan pada hewan coba	114
4.2.5 Tehnik Analisis Data	115
4.2.6 Alur penelitian eksperimental pada hewan coba	116
4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian	117
4.3.1 Lokasi	117
4.3.2 Waktu penelitian	117
4.4 Etika penelitian	118

BAB 5 HASIL DAN ANALISIS DATA PENELITIAN

5.1 Hasil Penelitian Invitro	119
5.2 Uji Toksisitas Paparan Membrane Amnion Terhadap Kultur Sel Otak Tikus.....	124
5.2.1 Hasil Perhitungan Viabilitas kultur sel otak setelah terpapar dengan membran amnion	124
5.3 DAPI	127
5.4 Hasil Perhitungan Apoptosis kultur sel otak setelah terpapar	

dengan membran amnion.....	131
5.5 Hasil Penelitian in vivo.....	135
5.5.1 Pelaksanaan kraniotomi dan penutupan defek duramater dengan membran amnion.....	136
5.5.2 Pemeriksaan mikroskopis preparat otak hewan coba	128
5.5.3 Hasil perhitungan ekspresi sitokin IL-1 β , IL – 6, dan TNF- α pada jaringan otak yang terpapar dengan membran amnion	138
5.2.4 Hasil Perhitungan Ekspresi Sitokin IL-1 β , IL – 6, Dan TNF-A pada Jaringan Otak Yang Terpapar Dengan Membran Amnion	137
5.6 Hasil Perhitungan Ekspresi COX-2 pada Jaringan Otak Setelah Defek Dura Ditutup Dengan Membran Amnion	147
5.7 Hasil Perhitungan Ekspresi Inos pada Jaringan Otak Setelah Defek Dura Ditutup Dengan Membran Amnion	149
 BAB 6 PEMBAHASAN	152
6.1 Unit Eksperimen Dengan Menggunakan Kultur Sel Otak Tikus ..	153
6.1.1 Proses pembacaan imunositokimia dengan program ImageJ...	155
6.2 Viabilitas Kultur Sel Otak Setelah Dipapar dengan Membran Amnion	157
6.3 Proliferasi Kultur Sel Otak Setelah Dipapar dengan Membran Amnion	158
6.4 Apoptosis Kultur Sel Otak Setelah Dipapar dengan Membrane Amnion	159
6.5 Unit Eksperimental Hewan Model Craniotomy dengan Defek Duramater	161
6.6 Ekspresi Sitokine Proinflamatori ; IL-1 β , IL – 6, Dan TNF-A Pada Jaringan Otak Setelah Terpapar Dengan Membran Amnion	161
6.7 Ekspresi COX-2 Pada Jaringan Otak Setelah Terpapar dengan Membran Amnion	168
6.8 Ekspresi Inos Pada Jaringan Otak Setelah Terpapar dengan Membran Amnion	169
6.9 Temuan Baru	174
6.10 Keterbatasan Penelitian	175
 BAB 7 KESIMPULAN	
7.1 Kesimpulan	176
7.2 Saran	177
 DAFTAR PUSTAKA	178

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1	Mediator kimiawi utama fase inflamasi..... 11
Tabel 2.2	Molekul yang aktif pada berbagai tahapan penyembuhan luka..... 31
Tabel 2.3	Perbedaan kadar faktor pertumbuhan hAM pada beberapa metoda preservasi 71
Tabel 2.4	Perbandingan kadar faktor pertumbuhan pada membran amnion..... 74
Tabel 2.5	Faktor Pertumbuhan dan kadar ekspresinya pada membran amnion setelah preservasi. 83
Tabel 2.6	Tipe reseptor HLA-G dan ekspresi reseptor inhibitor pada sel imun..... 86
Tabel 4.1	Definisi operasional in vitro..... 113
Tabel 4.2	Definisi operasional in vivo..... 123
Tabel 5.1	Persentase sel hidup dengan metode MTT..... 126
Tabel 5.2	Hasil uji ANOVA kultur sel dengan metode pewarnaan MTT..... 127
Tabel 5.3	Deskripsi nilai rerata kelompok pada pewarnaan DAPI.... 129
Tabel 5.4	Hasil uji beda proliferasi kultur sel antar kelompok pewarnaan DAPI dengan metode Kruskal-Wallis 130
Tabel 5.5	Hasil uji beda proliferasi kultur sel antar kelompok pewarnaan DAPI, dengan metode Mann-Whitney..... 130
Tabel 5.6	Deskripsi nilai rerata kelompok perlakuan pada pewarnaan menggunakan Annexin V..... 134
Tabel 5.7	Hasil Uji ANOVA pada data apoptosis sel..... 134
Tabel 5.8	Hasil uji Kruskal-Wallis kultur sel dengan pewarnaan ganda Annexin V dan DAPI..... 135
Tabel 5.9	Uji normalitas Komogorov-Smirnov terhadap data hasil bacaan penelitian invivo..... 138
Tabel 5.10	Nilai median dan rerata ekspresi IL-1 β pada kelompok kontrol dan perlakuan. 139

Tabel 5.11	Hasil uji beda Mann-Whitney pada pemeriksaan kadar IL-1 β	140
Tabel 5.12	Nilai median dan rerata kadar IL-6 pada kelompok kontrol dan perlakuan.	142
Tabel 5.13	Hasil uji beda Mann-Whitney pada pemeriksaan ekspresi IL 6.....	143
Tabel 5.14	Nilai rerata kadar TNF- α pada kelompok kontrol dan perlakuan.	144
Tabel 5.15	Hasil uji beda Mann-Whitney pada pemeriksaan kadar TNF- α	145
Tabel 5.16	Nilai median kadar COX-2 pada kelompok kontrol dan perlakuan.	147
Tabel 5.17	Hasil uji beda Mann-Whitney pada pemeriksaan ekspresi COX-2.....	148
Tabel 5.18	Nilai median ekspresi iNOS pada kelompok kontrol dan perlakuan.....	150
Tabel 5.19	Hasil uji beda Mann-Whitney pada pemeriksaan kadar iNOS.....	151

DAFTAR GAMBAR

		Halaman
Gambar 2.1	Fase Penyembuhan Luka dan Sel yang Berperan.....	10
Gambar 2.2	Aktivasi Makrofag.....	12
Gambar 2.3	Struktur kimiawi prostaglandin.....	17
Gambar 2.4	Struktur kimiawi asam arakidonat.....	18
Gambar 2.5	Jalur Produksi Prostaglandin	20
Gambar 2.6	Reaksi kimia terbentuknya NO.....	24
Gambar 2.7	Peran NO pada neurotransmitter NO	26
Gambar 2.8	Skema Respon Pemberian antioksidan	27
Gambar 2.9	Perjalanan dan produksi NO dalam kondisi fisiologis dan patologis pada sistem saraf pusat.....	29
Gambar 2.10	Metabolisme L-arginin	30
Gambar 2.11	Fase-fase kadar NO terhadap waktu penyembuhan luka	33
Gambar 2.12	Peranan IL-1, IL-6, TNF- α dalam respons inflamasi akut.....	38
Gambar 2.13	Aktivasi makrofag berdasarkan sitokin	47
Gambar 2.14	Perkembangan Embriologi Membran Amnion	52
Gambar 2.15	Gambaran Scanning and Transmission Electromicrographs dari membran amnion beku-kering.....	53
Gambar 2.16	Pewarnaan kolagen secara imunohistokimia.....	54
Gambar 2.17	Lapisan-lapisan amnion	56
Gambar 2.18	Pemeriksaan membran amnion dengan menggunakan mikroskop cahaya	69
Gambar 2.19	Grafik perbandingan faktor pertumbuhan membran amnion.	70
Gambar 2.20	Sebaran ekspresi protein pada membran amnion yang telah dipreservasi secara kriopreservasi	73
Gambar 2.21	Pemeriksaan RT-PCR sitokin dari membrane amnion....	75
Gambar 2.22	Molekul Imunosupresif HLA-G	77
Gambar 2.23	Ilustrasi ikatan Annexin V	84
Gambar 2.24	Mekanisme MTT menjadi formazan	94
Gambar 3.1	Kerangka Konseptual	97
Gambar 4.1	Rancangan penelitian in vitro	101
Gambar 4.2	Alur pembersihan amnion	104
Gambar 4.3	Kerangka operasional peneilitan invitro	109
Gambar 4.4	Rancangan penelitian in vivo	110
Gambar 4.5	Alur penelitian eksperimental in vivo	116
Gambar 5.1	Pengecatan Hematoksilin Eosin (HE) kultur sel otak tikus	119
Gambar 5.2	Pengecatan Hematoksilin Eosin (HE) kultur sel otak tikus Pewarnaan kultur sel dengan antibodi CD105, CD90, CD73 dan CD45.....	120
Gambar 5.3	Pewarnaan kultur sel menggunakan antibodi CD105, CD90, CD73 dan CD45 dengan counter stain DAPI...	121

Gambar 5.4	Gambar besaran ekspresi antibody terhadap CD105, CD90, CD73 sel dan CD45 pada kultur sel otak tikus...	122
Gambar 5.5	Gambaran pewarnaan imunositokimia dengan menggunakan antibodi GFAP, nestin dan SOX21.....	122
Gambar 5.6	Karakterisasi kultur sel untuk menilai tendensi berkembang ke arah neuron	124
Gambar 5.7	Kultur sel otak tikus untuk pemeriksaan metode MTT..	125
Gambar 5.8	Histogram hasil perhitungan persentase sel hidup.....	126
Gambar 5.9	Pewarnaan dengan menggunakan DAPI pada kelompok kontrol, perlakuan dengan media kondisi dan membrane amnion.	128
Gambar 5.10	Grafik sebaran nilai rerata hasil bacaan sel kultur dengan pengecatan DAPI.....	129
Gambar5.11	Hasil pewarnaan sel	132
Gambar 5.12	Grafik sebaran nilai rerata pengecatan dengan Annexin-V	133
Gambar 5.13	Prosedur kraniotomi pada tikus Whitstar.....	137
Gambar 5.14	Grafik perbandingan nilai rerata IL-1 β antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan.....	140
Gambar 5.15	Gambaran mikroskopis ekspresi IL-1 β pada pewarnaan imunohistomikia dengan antibody IL-1 β	141
Gambar 5.16	Grafik perbandingan nilai rerata IL-6 antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan	142
Gambar 5.17	Gambaran mikroskopis ekspresi IL 6 pada pewarnaan imunohistomikia dengan antibody IL 6	143
Gambar 5.18	Grafik perbandingan nilai rerata TNF- α antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan.....	145
Gambar 5.19	Gambaran mikroskopis ekspresi TNF- α pada pewarnaan imunohistomikia dengan antibody TNF- α	146
Gambar 5.20	Dekripsi perbandingan nilai rerata ekspresi COX-2 antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan.....	148
Gambar 5.21	Gambaran mikroskopis ekspresi COX-2 pada pewarnaan imunohistomikia dengan antibody COX-2	149
Gambar 5.22	Grafik perbandingan nilai rerata ekspresi iNOS antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan	150
Gambar 5.23	Gambaran mikroskopis ekspresi iNOS pada pewarnaan imunohistomikia dengan antibody iNOS	151

DAFTAR LAMPIRAN

		Halaman
Lampiran 1	Sertifikat Layak Etik.....	183
Lampiran 2	Hasil Uji Statistik.....	196
Lampiran 3	Referensi Anti Rat.....	213
Lampiran 4	Surat Ijin Penelitian.....	222

Daftar singkatan

AA	Asam arakhidonat
ab	Antiboddi
ABC	Avidin-Biotin Complex
Ag	Antigen
AM	<i>Amniotic Membrane</i>
APC	<i>antigen presenting cells</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
COX	Cyclooxygenase
CSF	<i>Colony Stimulating Factor</i>
CT	<i>Computerized Tomography</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
ECM	<i>Extra Cellular Matrix</i>
EGF	Epidermal Growth Factor
FBGC	<i>foreign body-type giant cells</i>
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	<i>fibroblast growth factor receptor</i>
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
HAE	<i>Human amniotic epithelial</i>
HAM	<i>Human amniotic mesenchymal</i>
hCG	<i>human chorionic gonadotropin</i>
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
IFN	Interferon
IHK	Imunohistokimia
IL	Interleukin
KGF	<i>keratinocyte growth factor</i>
kGy	<i>Kilo Guyton</i>
MA	Membran Amnion
MGC	<i>Macrophag Giant Cell</i>
MHC	<i>Mayor Hystocompatablity Complex</i>
MIF	<i>macrophage migration-inhibitory factor</i>
MRI	<i>Magnetic Resonance Imaging</i>
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartate
NO	Nitrit Oxide
PAP	<i>Peroxidase-anti-Peroxidase</i>
PBS	<i>phosphate-bound saline</i>
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PLA	Phospholipase
PTP	<i>protein tyrosine phosphatase</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RT-PCR	<i>reverse transcription-polymerase chain reaction</i>
SOX	<i>SRY-related HMG-box</i>
TGF	<i>transforming growth factor β</i>
TIMP	<i>tissue inhibitors of metalloproteinase</i>

TNF	Tumor Necrotizing Factor
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TXA	Tromboxane
VEGFR	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>