

DISERTASI

KAJIAN MOLEKUL ADESI (ICAM-1, VCAM-1 DAN SELEKTIN-L) PADA KEJADIAN ARTRITIS REUMATOID FASE INISIASI, AKTIF DAN KRONIK

Penelitian Eksperimental Laboratoris Pada Tikus Putih
Rattus norvegicus



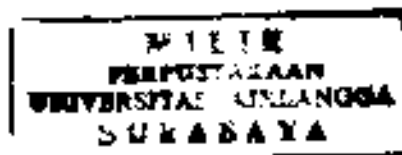
FRYATI DARWIN

PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2004



"Barangsiapa mengamalkan apa-apa yang ia ketahui, maka Allah akan memurahkan kepadanya ilmu yang belum diketahuinya, dan Allah akan menolong dia dalam amalnya sehingga ia mendapatkan surga. Dan barang siapa yang tidak mengamalkan ilmunya, maka ia lewat oleh ilmunya itu, dan Allah tidak menolong dia dalam amalnya, sehingga ia akan mendapatkan neraka."

*Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman di antaranmu dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan beberapa derajat.
(Q.P. Al-Mujadilah (38):11)*



**KAJIAN MOLEKUL ADESI (ICAM-1, VCAM-1 DAN SELEKTIN-L)
PADA KEJADIAN ARTRITIS REUMATOID
FASE INISIASI, AKTIF DAN KRONIK**

**Penelitian Eksperimental Laboratoris Pada Tikus Putih
*Rattus norvegicus***

DISERTASI

**Untuk memperoleh Gelar Doktor
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga
Telah dipertahankan di hadapan
Panitia Ujian Doktor Terbuka
Pada hari : Kamis
Tanggal : 22 Juli 2004
Pukul : 10.00 WIB**

Oleh:

**ERYATI DARWIN
NIM 099913620 D**

LEMBAR PENGESAHAN

**DISERTASI TELAH DISETUJUI
TANGGAL 2 AGUSTUS 2004**

Oleh

PROMOTOR

**Prof.H.Ari Gunawan.dr,MS, PhD
NIP: 130 531 759**

KOPROMOTOR 1

KOPROMOTOR 2

Prof. Dr. Hj. Juliaty Hood A.
**Prof.Dr.Hj.Juliaty Hood A,dr.MS.SpPA.FIAC
NIP: 130 517 159**

Prof. Soetjipto
**Prof. Soetjipto.dr,MS,PhD
NIP:130 687 606**

Telah diuji pada Ujian Doktor Tahap I (Tertutup)

Tanggal 25 Juni 2004-06-29

PANITIA PENGUJI DISERTASI

Ketua : Prof. H. Bambang Rahino Setokocsoemo, dr.

Anggota : 1. Prof. Ari Gunawan, dr, M.S., Ph.D.

2. Prof. Dr. Juliati Hood A., dr, M.S, DSPA, FIAC.

3. Prof. Soetjipto, dr, M.S, Ph.D.

4. Prof. Dr. H. Sarmanu, drh., M.S.

5. Prof. Dr. Sochartojo Hardjopranjoto, drh, M.Sc.

6. Prof. Dr. Ny. Retno Moestiati Lockito, dr.

7. Dr. I Ketut Sudiana, Drs, M.S.

Ditetapkan dengan Surat Keputusan

Rektor Universitas Airlangga

Nomor : 4955/JO3/PP/2004

Tanggal : 7 Juli 2004

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur saya panjatkan kehadiran Allah yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang yang telah memberikan segala karunia, taufik dan hidayahNya, sehingga saya mendapat kekuatan, ketabahan serta tuntunanNya dalam menyelesaikan disertasi ini.

Tersusunnya disertasi ini tidak lepas dari bantuan dan dorongan dari berbagai pihak, maka dari itu dengan hati yang tulus dan dengan penuh rasa syukur saya sampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada yang terhormat :

Prof. H. Ari Gunawan, dr, MS, PhD, sebagai Promotor yang telah dengan ikhtlas dan penuh kesabaran membimbing, membantu, memotivasi, memperluas wawasan keilmuan, serta memberikan saran dan dukungan moril secara terus-menerus, sehingga saya dapat menyelesaikan disertasi ini. Semoga Allah SWT selalu melimpahkan rahmat dan hidayahNya kepada beliau.

Prof. Dr. Hj Juliaty Hood Alsagaff, dr,SpPA, MS, FIAC sebagai Ko promotor I, disamping itu juga sebagai Ketua Program Studi S-3 Ilmu Kedokteran Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga, yang ditengah kesibukannya telah dengan penuh perhatian memberikan dorongan, bimbingan, dan sara-saran yang sangat berharga dalam penyelesaian disertasi ini. Semoga Allah SWT selalu melimpahkan rahmat dan hidayahNya kepada beliau.

Prof. Soetjipto, dr, MS, PhD sebagai Ko promotor II yang dengan tidak pernah jemu-jemu membimbing, memberikan pengarahan, memperluas wawasan keilmuan, sehingga disertasi ini dapat diselesaikan, Semoga Allah SWT akan selalu memberkahi rahmat dan hidayahNya kepada Beliau.

Rektor Universitas Airlangga, Prof. Dr. Med. Puruhito, dr, serta mantan Rektor Prof. H. Soedarto, dr, DTM&H, PhD yang telah memberikan kesempatan bagi saya untuk mengikuti pendidikan Program Doktor di Universitas Airlangga

Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof. Dr. H. Muhammad Amin, dr, SpP dan mantan Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof. Dr. Soedijono Tirtowidarjo, dr, SpTHT yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti Pendidikan Program Doktor Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Ketua Program Studi S-3 Ilmu Kedokteran Program Pascasarjana Universitas Airlangga Prof. Dr. Mandojo Rukmo, drg, M.Sc, SpKG atas bantuan yang telah diberikan sehingga saya dapat menyelesaikan pendidikan S-3 saya.

Staf Pengajar di Program Pascasarjana Universitas Airlangga yang telah membimbing dan memberikan pengetahuan kepada saya. Beliau-beliau yang terhormat adalah: Prof. H. Bambang Rahino Setokoesoemo, dr. Prof. Dr. Pitono Soeparto, dr, SpA-K, Prof. Edy Pranowo Soedibyo, dr, MPH (alm.), Prof. Dr. Josef Glinka. SVD, Prof. Purnomo Suryohudoyo, dr, Prof. Dr. Juliati Hood Alsagaff, dr, MS, SpPA, FIAC, Prof. Dr. H. Muhammad Zainuddin, Apt, Widodo J Pujiraharjo, dr, MS, MPH, DrPH, Prof. Dr. Suhartono Taat Putra, dr, MS, Fuad Amsyari, dr, MPH, PhD, Siti Pariani, dr, MS, PhD, Prof. Kuntoro, dr, MPH, DrPH, Prof. Dr. H. Sarmanu, drh, MS, Prof. H. Ari Gunawan, dr, MS, PhD, Dr. L. Dyson, Drs, MA dan Prof. Soegeng Soekanto M, dr, SpPA, MS, PhD.

Rektor Universitas Andalas Padang Prof. Martis Rahman, Drs, PhD atas izin yang diberikan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Doktor Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang Muchlis Hasan, dr, SpOG dan Rusdan Djamil, dr, MSc mantan Dekan Kedokteran Universitas Andalas yang telah mendorong dan mengizinkan saya mengikuti pendidikan Program Doktor Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Ketua Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas Padang, yang telah memberi kesempatan kepada saya untuk melaksanakan penelitian terhadap hewan coba di Laboratorium Farmakologi FMIPA Unand sehingga penelitian untuk disertasi ini dapat berlangsung.

Seluruh Staf Pengajar Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, yang telah memberikan toleransi yang besar sehingga saya dapat mengikuti pendidikan Program Pascasarjana Universitas Airlangga di Surabaya.

Ketua Bagian Anatomi dan Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga H. Abdoul Kamid Iskandar, dr, MS yang telah memberi izin kepada saya untuk menggunakan fasilitas laboratorium yang beliau pimpin, H Khairul, drh, MS dan Tania Hariadi, Dra, MS yang telah banyak membantu saya dalam perisian penelitian ini.

Ketua bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Unand Hj. Rachma Zuryeti Nizar, dr, SpPA dan Hj. Salmiah Agus, dr, SpPA yang telah membantu saya dan membimbing saya dalam pengamatan sediaan histopatologis pada penelitian ini. Semoga Allah SWT selalu memberkahi rahmat dan hidayahNya kepada beliau berdua.

Ketua Bagian Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Hj. Rismawati Yaswit, dr, SpPK(K) yang memberi izin kepada saya untuk menggunakan fasilitas laboratorium yang beliau pimpin pada pengecatan imunohistokimia dan penotretan.

Temannya sejawat peserta Program Doktor Universitas Airlangga angkatan 99 yang berasal dari Fakultas Kedokteran Universitas Andalas yang telah memberikan semangat dalam kebersamaan dan saling mendukung dalam susah dan senang selama bersama-sama menjalani pendidikan.

Tak lupa penghargaan yang tinggi saya sampaikan kepada Prof. Dr. H. Sarmanu, drh, MS kepala LEMLIT Universitas Airlangga atas bimbingan yang telah diberikan, terutama dalam metodologi dan analisis statistik untuk kesempurnaan penelitian ini.

Kepada seluruh keluarga, terutama Hj. Deswinar Darwin, Dra, SpFRS, Apt, DR. H. Elfi Sahlan Ben Apt. dan anak-anak tercinta Eka Fithra Elfi dan Dwitya Elvira yang dengan segala keikhlasan dan kecintaannya telah memberikan dorongan dan semangat bagi saya dalam menyelesaikan pendidikan saya sehingga disertasi ini dapat saya selesaikan.

Akhirnya untuk almarhum Papa dan almarhumah Mama yang telah menanamkan disiplin dan rasa tanggung jawab yang tinggi dalam menghadapi kehidupan, tiada kata yang dapat mengungkapkan rasa terima kasih saya. Hanya Do'a yang dapat saya panjatkan ke hadapan Allah SWT, semogalah ditempatkan ditempat yang mulia disisinya. Segala Puji dan Syukur akhirnya terpulang kepadaNya, Allah yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang. Amiin.

RINGKASAN

**Kajian molekul adesi (ICAM-1, VCAM-1 dan selektin-L) pada kejadian artritis reumatoid fase inisiasi, aktif dan kronik
(Penelitian eksperimental laboratoris pada tikus putih *Rattus norvegicus*)**

Artritis reumatoid (AR) merupakan penyakit autoimun sistemik dengan etiologi yang belum diketahui sampai saat ini. AR bersifat progresif sehingga menyebabkan destruksi sendi oleh adanya kerusakan matriks. Artritis reumatoid pada manusia dan hewan coba sebagai model artritis reumatoid ditandai oleh adanya reaksi inflamasi yang melibatkan cairan sinovial, membran sinovial, jaringan rawan sendi dan periartikuler. Secara histologis reaksi ini ditandai oleh adanya akumulasi masif dari leukosit PMN (polimorfonuklear) dalam cairan sendi dan pada permukaan rawan sendi, hiperplasia dan neovangiogenesis dari lapisan lining sinovial dan adanya infiltrasi oleh T-limfosit, makrofag, dan sel plasma. Sitokin yang diproduksi oleh sel-sel ini pada tempat inflamasi berperan penting pada patogenesis sinovitis oleh suatu mekanisme termasuk peningkatan molekul adesi.

Molekul adesi berperan penting pada proses inflamasi oleh *mediating leucocyte-endothelial cell adhesion*, migrasi leukosit, dan interaksi sel T dengan *antigen presenting cell (APC)*. Sel imun dan sel inflamasi ini diyakini memberikan kontribusi yang besar terhadap mulainya dan menetapnya respon imun dan respon inflamasi dalam sendi, yang menyebabkan erosi rawan sendi dan kerusakan sendi.

Penelitian ini mencoba mengkaji molekul adesi (ICAM-1, VCAM-1, dan selektin-L), sitokin pro-inflamasi (TNF- α dan IL-1), dan sitokin anti inflamasi (IL-10) pada kejadian artritis reumatoid. Penelitian ini dilakukan pada *collagen type II-induced arthritis (CIA)*. Hewan coba yang dipakai pada penelitian ini adalah tikus putih *Rattus norvegicus strain Wistar*. Tikus diimunisasi dengan kolagen-II yang berasal dari bovin dalam *Complete Freund's adjuvant* diikuti oleh booster 1 minggu kemudian. Dalam penelitian ini tikus dibagi dalam 4 kelompok. Kelompok pertama di preparasi 1 minggu setelah imunisasi, kelompok kedua di preparasi 2 minggu setelah booster, kelompok ketiga dipreparasi 5 minggu setelah booster, sedangkan kelompok keempat merupakan kelompok kontrol yang di preparasi 1 minggu setelah injeksi dengan minyak. Kelompok ini disebut sebagai fase inisiasi, fase aktif, fase kronik, dan kelompok kontrol. Sampel diambil dari cakar tungkai belakang hewan coba untuk sediaan parafin. Pewarnaan haematoksilin eosin dipergunakan pada preparat parafin sebagai konfirmasi gambaran histopatologis dari fase-fase artritis reumatoid. Pewarnaan imunohistokimia indirek dipergunakan untuk melihat ekspresi molekul adesi (ICAM-1, VCAM-1, dan selektin-L), sitokin pro-inflamasi (TNF- α dan IL-1), dan sitokin anti-inflamasi (IL-10).

Secara histologis, jaringan sendi cakar belakang dari hewan coba memperlihatkan gambaran yang sesuai dengan fase inisiasi, fase aktif dan fase kronik dari artritis reumatoid. Pada tes laboratorium untuk faktor reumatoid (FR), memperlihatkan hasil seronegatif pada semua hewan coba. Seronegatif faktor reumatoid pada CIA berhubungan dengan genetik.

Dengan menggunakan tes Manova, Anova dan LSD terlihat bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara molekul adesi ICAM-1, VICAM-1, dan selektin-L yang diekspresikan pada jaringan sinovial kelompok artritis reumatoid bila dibandingkan dengan ekspresinya pada jaringan sinovial kelompok kontrol. Tetapi ekspresi molekul adesi pada jaringan sinovial dari kelompok artritis reumatoid terlihat lebih tinggi pada fase aktif daripada fase inisiasi dan fase kronik, dengan perbedaan yang signifikan secara statistik ($p < 0,05$). Ekspresi sel yang memproduksi sitokin pro-inflamasi (TNF- α dan IL-1) memperlihatkan perbedaan yang bermakna antara kelompok artritis reumatoid dan kelompok kontrol ($p < 0,05$). Tetapi ekspresi sel yang memproduksi TNF- α terlihat lebih tinggi pada fase aktif dan fase kronik artritis reumatoid, dimana ekspresi dari sel yang memproduksi IL-1 terlihat lebih tinggi pada fase aktif.

Interleukin-10 (IL-10) merupakan sitokin anti-inflamasi. Ekspresi dari sel yang memproduksi IL-10 terlihat berbeda secara bermakna pada jaringan sinovial kelompok artritis reumatoid bila dibandingkan dengan kelompok kontrol. Ekspresi yang paling tinggi adalah pada fase kronik artritis reumatoid.

Dari penelitian pada berbagai fase artritis reumatoid ini disimpulkan bahwa :

1. Ekspresi dari molekul adesi ICAM-1, VICAM-1 dan selektin-L meningkat pada semua fase artritis reumatoid bila dibandingkan dengan kelompok kontrol, dan ekspresi yang paling tinggi adalah pada fase aktif
2. Ekspresi sel yang memproduksi sitokin pro-inflamasi TNF- α meningkat pada semua fase dari artritis reumatoid. Peningkatan yang paling tinggi adalah pada fase aktif dan menetap pada fase kronik. Sedangkan ekspresi sel yang memproduksi IL-1 yang paling tinggi adalah pada fase aktif
3. Ekspresi sel penghasil sitokin anti-inflamasi IL-10 meningkat pada semua fase artritis reumatoid bila dibandingkan dengan kelompok kontrol, dan peningkatan yang paling tinggi terlihat pada fase kronik.

Berdasarkan hasil penelitian ini diduga bahwa peningkatan molekul adesi (ICAM-1 VICAM-1) dan selektin-L) dan sitokin pro-inflamasi (TNF- α dan IL-1) mengindikasikan perannya dalam menimbulkan inflamasi aktif dalam sendi, sedangkan peningkatan sitokin pro-inflamasi (TNF- α) dan sitokin anti-inflamasi (IL-10) berperan pada inflamasi kronik.

SUMMARY

**Adhesion Molecules (ICAM-1, VCAM-1 and L-selectin) Study in the
Pathogenesis of Initiation, Active and Chronic phases
Rheumatoid Arthritis
(Experimental and Laboratory Research in *Rattus norvegicus*)**

Rheumatoid arthritis is a systemic autoimmune disease of still-unknown etiology that lead to progressive destruction of affected joints by extracellular matrix degradation. Human arthritis reumatoid and animal models of this disease are associated with a marked inflammatory reaction involving the synovial fluid, synovial membranes, cartilage and periarticular tissues. This reaction is characterized histologically by massive accumulation of polymorphonuclear leucocytes (PMNL) in synovial fluid and on cartilage surfaces, hyperplasia and neoangiogenesis of the synovial lining layer and marked infiltration of the by T lymphocytes, macrophages, and plasma cells. Cytokines produced by these cells at the site of inflammation play a crucial role in the pathogenesis of synovitis by mechanisms that include the up-regulation of adhesion molecules.

Adhesion molecules play a fundamental role in inflammatory proses by mediating leucocyte-endothelial cell adhesion, leukocyte migration, and T Cell-antigen-presenting cell interaction. These immune and inflammatory cells are believed to contribute, in a mayor way, to the initiation and perpetuation of the immune and inflammatory response within the joint, leading to cartilage erosion and joint destruction.

This study was undertaken to explore the adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1 and L-selectin), pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1) and anti-inflammatory cytokine (IL-10) in pathogenesis of rheumatoid arthritis. The study was performed on collagen type II-induced arthritis (CIA) animals. In our model, CIA was elicited in strain Wistar of *Rattus norvegicus* by immunization with native bovine type II collagen in complete Freund's adjuvant, followed by booster 1 weeks later. In this experiments, CIA animals was divided into 4 groups. Disease onset was observed and prepared for 1st group, 1 week after first immunization, for 2nd group was 2 week after booster, for 3rd group was 5 week after booster, and for 4th group as control group was 1 week after injection with oil. There were initiation phase, active phase, chronic phase of rheumatoid arthritis and control group. Samples were taken from the animals hind paw for paraffin sections. The haematoxylin eosin staining were applied on the sections to confirm the histopathologic appearance of the rheumatoid arthritis phases. Indirect immunohistochemical staining methods was used to determine the expression of the adhesion molecule (intercellular adhesion molecule-1 or ICAM-1, vascular adhesion molecule-1 or VCAM-1 and L-selectin), pro-inflammatory cytokines (tumor necrosis factor- or TNF- α and interleukin-1 or IL-1) and anti-inflammatory cytokine (interleukin-10 or IL-10).

Histologically, the hind paw joint tissues of experimental animal showed confirmed appearance with the phases of rheumatoid arthritis. In laboratory test for Rheumatoid Factor (RF) showed the seronegative result in all of the animal. Seronegative RF in CIA is associated with genetic.

Using Manova, Anova and LSD test, it was found that in the rheumatoid arthritis, there was significant difference between the adhesion molecule ICAM-1, VCAM-1 and L-selectin expressed on synovial tissue in compared with control sinovial tissue ($p < 0,05$). But these ekspression of adhesion molecule on synovial tissue of rheumatoid arthritis seem to be predominate in active phase than initiation phase, and chronic phase.

The expression of cells producing pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1) showed any significant difference between rheumatoid arthritis and control group ($p < 0,05$). But the expression of cell producing TNF- α seem to be predominate in active phase and chronic phase of rheumatoid arthritis, whereas the expression of cell producing IL-1 seem to be predominate in aktive phase.

Interleukin-10 (IL-10) is an anti-inflammatory cytokine. The expression of cells producing IL-10 showed significant different on synovial tissue of CIA with control group ($p < 0,05$). The predominate expression was in chronic phase of rheumatoid arthritis.

I conclude that study at different phase of rheumatoid arthritis revealed that:

1. The expression of adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1 and L-selectin) in all phases of rheumatoid arthritis were increased in compared with kontrol group, and predominates during active phase.
2. The expression of the cells producing pro-inflammatory cytokine TNF- α was increased in all phases of rheumatoid arthritis, and predominates during active and chronic phase. Whereas Expression of cells producing IL-1 was predominate during active phase.
3. The expression of the cells producing anti-inflammatory cytokine IL-10 was increase in all phases of rheumatoid arthritis in compared with control group, and predominates during chronic phase.

Based on the results, it is suggested that adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1, L-selectin) and pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1) may indicate they relative importance in mediating active inflammation within joint, whereas pro-inflammatory cytokine TNF- α and anti-inflammatory cytokine IL-10 play a role in chronic phase.

ABSTRACT

**Adhesion Molecules (ICAM-1, VCAM-1 and L-selectin) Study in the
Pathogenesis of Initiation, Active and Chronic phases
Rheumatoid Arthritis
(Experimental and Laboratory Research in *Rattus norvegicus*)**

Eryati Darwin

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic autoimmune disease of still-unknown etiology that leads to progressive destruction of cartilage and bone in the affected joints. RA is characterized by proliferation of synovial tissue and accumulation of inflammatory cells in inflamed joints. Synovial cells are markedly activated by cytokines and adhesion molecules, resulting hyperplasia of the synovial tissue. However, the role of adhesion molecules in active inflammatory processes in RA remains unclear.

The aim of this study was to explore the adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1 and L-selectin), pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1) and anti-inflammatory cytokine (IL-10) in pathogenesis of rheumatoid arthritis. This study was performed on *Rattus norvegicus* as an animal model of RA called collagen-induced arthritis (CIA), by immunization with type II collagen emulsified in complete Freund's adjuvant. Samples were taken from the animals hind paw for paraffin sections. The haematoxylin eosin staining were applied on the section to confirm the histopathologic appearance of the rheumatoid arthritis phases. Indirect immunohistochemical staining method was used to determine the expression of the adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1 and L-selectin). Pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1) and anti-inflammatory cytokine (IL-10).

Histologically, the joint tissues showed confirmed appearance with the phases of RA. In laboratory test for rheumatoid factor (RF) showed seronegative titer in all group. Using Manova, Anova and LSD test, it was found that there was significant difference between adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1 and L-selectin) expressed on synovial tissue of RA in compared to control group. It seem to be predominate in active phase than initiation and chronic phases of RA. The expression of cell producing pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1) showed significant difference between RA and control group, and predominate in active phase. The expression of cells producing anti-inflammatory cytokine (IL-10) showed significant difference on RA in compared with control group, and predominate in chronic phase.

Based on the results, it is suggested that adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1, L-selectin) and pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1) may indicate they relative importance in mediating active inflammation within joint, whereas pro-inflammatory cytokine TNF- α and anti-inflammatory cytokine IL-10 play a role in chronic phase.

Key words: Arthritis Rheumatoid (RA), CIA, Adhesion molecules.

DAFTAR ISI

	Halaman
SAMPUL DEPAN	i
SAMPUL DALAM	ii
PRASYARAT GELAR	iii
PERSETUJUAN	iv
PENETAPAN PANITIAN	v
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
RINGKASAN	ix
SUMMARY	xi
ABSTRACT	xiii
DAFTAR ISI	xiv
DAFTAR TABEL	xix
DAFTAR GAMBAR	xx
DAFTAR SINGKATAN	xxii
DAFTAR LAMPIRAN	xxiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.3.1 Tujuan Umum	6
1.3.2 Tujuan Khusus	6
1.4 Manfaat Penelitian	6

1.4.1	Manfaat Ilmiah	7
1.4.2	Manfaat Terapan	7
BAB 2	TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1	Arthritis Reumatoid	8
2.2	Manifestasi Klinis Arthritis Reumatoid	11
2.3	Diagnosis Arthritis Reumatoid	12
2.3.1	Kriteria diagnostik	13
2.3.2	Penilaian derajat kerusakan sendi arthritis Reumatoid	14
2.3.3	Prediktor kerusakan sendi arthritis reumatoid	14
2.4	Etiologi Arthritis Reumatoid	17
2.5	Patogenesis Arthritis Reumatoid	19
2.5.1	Sendi dan rawan sendi	20
2.5.2	Membrana sinovial	23
2.5.3	Cairan sinovial	27
2.5.4	Inflamasi Sinovium (Sinovitis)	28
2.5.5	Neovaskularisasi Sinovium	34
2.5.6	Mekanisme kerusakan sendi	37
2.6	Imunopatogenesis Arthritis reumatoid	39
2.6.1	Molekul Adesi	42
2.6.1.1	Selektin	43
2.6.1.2	Integrin	45
2.6.1.3	Imunoglobulin Superfamili	46

	2.6.2 Sitokin	49
	2.6.3 Kemokin	55
	2.7 Apoptosis Pada Arthritis Reumatoid	57
	2.8 Limfosit T Sebagai Sentral Pada Patogenesis Arthritis Reumatoid	59
	2.9 Keseimbangan Th1 dan Th2	64
	2.10 Immunogenetik Arthritis Reumatoid	65
	2.11 Model Patogenesis Arthritis Reumatoid	67
	2.12 Hewan Coba Pada Arthritis Reumatoid	70
	2.12.1 Antigen induced arthritis	70
	2.12.2 Ajuvan-induced arthritis (AIA)	70
	2.12.3 Streptococcal cell wall-induced arthritis	71
	2.12.4 Collagen-induced arthritis (CIA)	72
	2.12.5 MRL-1 arthritis	72
BAB 3	KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	73
	3.1 Kerangka Konseptual Penelitian	73
	3.2 Hipotesis Penelitian	76
BAB 4	METODE PENELITIAN	77
	4.1 Jenis Penelitian	77
	4.2 Rancangan Penelitian	78
	4.3 Bagan Rancangan Penelitian	78
	4.4 Kerangka Operasional Penelitian	79

4.5	Penjelasan kerangka operasional	80
4.5	Populasi Sampel	81
4.6	Besar Sampel	81
4.7	Kelompok Perlakuan dan Kelompok Kontrol	82
4.8	Variabel penelitian	84
4.8.1	Variabel bebas	84
4.8.2	Variabel kendali	84
4.8.3	Variabel tergantung	85
4.9	Definisi Operasional Variabel	85
4.9.1	Tikus collagen-induced arthritis (CIA)	85
4.9.2	Fase inisiasi artritis reumatoid	86
4.9.3	Fase aktif artritis reumatoid	86
4.9.4	Fase kronik artritis reumatoid	86
4.9.5	Sitokin pro-inflamasi	87
4.9.6	Sitokin anti-inflamasi	87
4.9.7	Perubahan respon imun	87
4.10	Prosedur Pelaksanaan Penelitian	88
4.10.1	Teknik Pembuatan Preparat Histologis	88
4.10.2	Teknik Pewarnaan Immunohistokimia	89
4.11	Tempat dan Waktu Penelitian	92
4.11.1	Tempat penelitian	92
4.11.2	Waktu penelitian	92
4.12	Persyaratan Etik	92
4.13	Analisis data	93

BAB 5	ANALISIS DAN HASIL PENELITIAN	94
5.1	Hasil Perilaku Pada Hewan Coba	94
5.2	Gambaran Histopatologis	95
5.3	Hasil Pemeriksaan Faktor Reumatoid (FR)	103
5.4	Hasil Uji Statistik Sampel	103
5.4.1	Uji homogenitas sampel	103
5.4.2	Uji normalitas	104
5.4.3	Hasil penelitian imunohistokimia	104
5.4.3.1	Ekspresi ICAM-1	106
5.4.3.2	Ekspresi VCAM-1	106
5.4.3.3	Ekspresi Selektin-E	107
5.4.3.4	Persentase Ekspresi Molekul Sel Penghasil Sitokin Pro-inflamasi TNF- α (<i>tumor necrotic factor-α</i>)	107
5.4.3.5	Persentase Ekspresi Molekul Sel Penghasil Sitokin Pro-inflamasi IL-1 (interleukin-1)	108
5.4.3.6	Persentase Ekspresi Molekul Sel Penghasil Sitokin IL-10 (interleukin-10)	109
5.4.3.7	Gambaran jaringan sinovial sendi dengan pewarnaan imunohistokimia	109
BAB 6	PEMBAHASAN	118
6.1	Hasil Perlakuan Pada Hewan Coba	118

6.2	Gambaran Histopatologis	119
6.3	Hasil Pemeriksaan Faktor Reumatoid (FR)	123
6.4	Hasil Penelitian Immunohistokimia	123
6.4.1	Persentase molekul adesi ICAM-1, VCAM-1 dan selektin-L	123
6.4.2	Persentase ekspresi sel penghasil sitokin pro-inflamasi (TNF- α dan IL-1)	129
6.4.3	Persentase ekspresi sel penghasil sitokin anti-inflamasi (IL-10)	131
BAB 7	KESIMPULAN DAN SARAN	133
7.1	Kesimpulan	133
7.2	Saran	134
	DAFTAR PUSTAKA	135
	LAMPIRAN	143

DAFTAR TABEL

	Halaman	
Tabel 2.1	Mekanisme kerusakan sendi pada artritis reumatoid	37
Tabel 5.1	Rerata persentase ekspresi molekul adesi ICAM-1, VCAM-1 dan selektin-L pada kelompok kontrol (K) artritis reumatoid fase inisiasi (P1), fase aktif (P2) dan fase kronik (P3)	105
Tabel 5.2	Rerata persentase ekspresi molekul sel penghasil TNF- α , IL-1 dan IL-10 pada kelompok kontrol (K) artritis reumatoid fase inisiasi (P1), fase aktif (P2) dan fase kronik (P3)	105



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Stimulasi terhadap makrofag untuk memproduksi sitokin pro-inflamasi terutama TNF α , yang menyebabkan erosi sendi	10
Gambar 2.2 Sendi diartrosis pada sendi lutut	22
Gambar 2.3 Gambaran sinovium tipe areolar yang khas (A) dibandingkan dengan tipe adiposa (B) dan tipe fibrosa (C)	25
Gambar 2.4 Diagram perbandingan gambaran patologis sendi artritis disatu sisi dengan sendi normal disisi lain	33
Gambar 2.5 Redistribusi sefektin	44
Gambar 2.6 Proses migrasi sel ke jaringan	48
Gambar 2.7 Komunikasi antar sel melalui sitokin	50
Gambar 2.8 Regulasi sitokin pada patogenesis artritis Reumatoid model autokrin/ parakrin	63
Gambar 2.9 Regulasi sitokin pada patogenesis artritis Reumatoid model autokrin/ parakrin	68
Gambar 3.1 Skema kerangka konseptual	73
Gambar 4.1 Bagan rancangan penelitian	78
Gambar 4.2 Kerangka operasional penelitian	79
Gambar 5.1 Gambaran histologis sendi tikus normal (A), dibandingkan dengan gambaran histopatologis sendi tikus artritis reumatoid fase aktif (B)	97
Gambar 5.2 Perbandingan gambaran histopatologis panus dan jaringan sinovial dari sendi tikus artritis reumatoid fase aktif (A) dan fase kronik (B).	98
Gambar 5.3 Gambaran histopatologis panus pada sendi tikus artritis reumatoid fase aktif	99
Gambar 5.4 Gambaran histopatologis jaringan sinovial pada sendi tikus artritis reumatoid fase aktif	99

Gambar 5.5	Gambaran histopatologi jaringan sinovial pada sendi tikus artritis reumatoid fase kronik	100
Gambar 5.6	Gambaran histopatologis kerusakan tulang rawan sendi pada tikus artritis reumatoid fase aktif (A) dan fase kronik (B).	101
Gambar 5.7	Gambaran pewarnaan imunohistokimia dengan monoklonal antibodi terhadap selektin-L, untuk mendeteksi ekspresi selektin-L di jaringan sinovial sendi tikus artritis reumatoid fase akut (x400).	110
Gambar 5.8	Ekspresi ICAM-1 dengan pewarnaan imunohistokimia di panus sendi tikus artritis reumatoid fase aktif	111
Gambar 5.9	Ekspresi ICAM –1 dengan pewarnaan imunohistokimia di jaringan sinovial sendi tikus artritis reumatoid fase inisiasi (A) dan fase aktif (B)	112
Gambar 5.10	Ekspresi VCAM –1 dengan pewarnaan imunohistokimia di jaringan panus sendi tikus artritis reumatoid fase inisiasi (A) dan fase aktif (B)	113
Gambar 5.11	Ekspresi selektin-L dengan pewarnaan imunohistokimia pada jaringan sinovial sendi tikus artritis reumatoid fase inisiasi (A) dan fase aktif (B)	114
Gambar 5.12	Perbandingan gambaran histopatologis jaringan sinovial sendi tikus artritis reumatoid fase kronik dengan pUpewarnaan HE (Adibandingkan dengan pewarnaan imunohistokimia	115
Gambar 5.13	Ekspresi sel penghasil IL-1 dengan pewarnaan imunohistokimia pada jaringan sinovial sendi tikus artritis reumatoid fase inisiasi dengan (A) dan fase kronik (B)	116
Gambar 5.14	Ekspresi VCAM-1 dengan pewarnaan imunohistokimia pada jaringan sinovial sendi tikus artritis reumatoid fase inisiasi dengan (A) dan fase aktif (B)	116

DAFTAR SINGKATAN

ACR	American College of Rheumatology
AIA	Ajufan Induced Arthritis
APC	Antigen Presenting Cell
AR	Arthritis Reumatoid
Athero-ELAM	Athero-Endothelial
CD	Cluster Designation/ Cluster of Differentiation
CLA	Collagen Induced Arthritis
CPJ	Cartilage-Pannus Junction
CRP	C-Reactive Protein
DC	Dendritic cell
ELAM	Endothelial-lymphocyte Adhesion Molecule
EPV	Epstein BarR Virus
FGF	Fibroblast Growth Factors
FLS	Fibroblast-Like Cell
FR	Faktor Reumatoid
GM-CSF	Granulocyte Monocyte-Colony Stimulating Factors
HEV	High Endothelial Venules
HLA	Human Lymphocyte Antigens
HSP	Heat Shock Protein
ICAM	Intercellular Adhesion Molecules
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LFA	Leucocyte Function Antigens
MMP	Matrix Metalloproteinase
M ϕ	Macrophage
NK	Natural Killer
NO	Nitric Oxide
PAF	Platelet- Activating Factor
PBS	Phosphat Buffer Saline
PECAM	Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule
PMN	Poly Morpho Nuclear
RANK	Receptor Activator Nuclear Factor kB
RANKL	Receptor Activator Nuclear Factor kB Ligand
Tc	T Cytotoxic
TGF	Transforming Growth Factor
Th	T Helper
TNF	Tumor Necrosis Factor
VCAM	Vascular Adhesion Molecule
VLA	Very Late Antigen
UPGD	Uridine Diphospho Glucose Dehydrogenase

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman	
Lampiran 1	Perbandingan berat badan tikus kelompok kontrol (P), Artritis reumatoid fase inisiasi (P1), fase aktif (P2) dan Fase kronik (P3) sebelum dan sesudah imunisasi	143
Lampiran 2	Persentase ekspresi ICAM-1 di jaringan sinovial sendi tikus kelompok kontrol (P), artritis reumatoid fase inisiasi (P1), fase aktif (P2) dan fase kronik (P3) sebelum dan sesudah imunisasi	144
Lampiran 3	Persentase ekspresi VCAM-1 di jaringan sinovial sendi tikus kelompok kontrol (P), artritis reumatoid fase inisiasi (P1), fase aktif (P2) dan fase kronik (P3)	145
Lampiran 4	Persentase ekspresi selektin-L di jaringan sinovial sendi tikus kelompok kontrol (P), artritis reumatoid fase inisiasi (P1), fase aktif (P2) dan fase kronik (P3)	146
Lampiran 5	Persentase ekspresi IL-1 di jaringan sinovial sendi tikus kelompok kontrol (P), artritis reumatoid fase inisiasi (P1), fase aktif (P2) dan fase kronik (P3)	147
Lampiran 6	Persentase ekspresi TNF- α di jaringan sinovial sendi tikus kelompok kontrol (P), artritis reumatoid fase inisiasi (P1), fase aktif (P2) dan fase kronik (P3)	148
Lampiran 7	Persentase ekspresi IL-10 di jaringan sinovial sendi tikus kelompok kontrol (P), artritis reumatoid fase inisiasi (P1), fase aktif (P2) dan fase kronik (P3)	149
Lampiran 8	Uji Homogenitas Sampel	150
Lampiran 9	Uji Distribusi Variabel	153
Lampiran 10	Uji Anova dan LSD perubahan berat badan tikus kelompok kontrol dan kelompok perlakuan sebelum dan sesudah imunisasi	154
Lampiran 11	Uji Anova dan LSD Ekspresi molekul adesi (ICAM-1, VCAM-1 dan selektin-L) pada tikus kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.	156
Lampiran 12	Uji Anova dan LSD ekspresi sel penghasil sitokin pro-inflamasi (TNF- α dan IL-1) dan sitokin anti-inflamasi (IL-10) pada tikus kelompok kontrol dan kelompok perlakuan	161

Lampiran 13	Uji multivariat ekspresi molekul adesi (ICAM-1, VCAM-1 dan selektin-L) pada tikus kelompok kontrol dan kelompok perlakuan	166
Lampiran 14	Uji multivariat ekspresi sel penghasil sitokin pro-inflamasi (TNF- α dan IL-1) dan sitokin anti-inflamasi (IL-10) pada tikus kelompok kontrol dan kelompok perlakuan	170
Lampiran 15	T test untuk perbedaan ekspresi molekul adesi (ICAM-1, VCAM-1 dan selektin-L) pada tikus kelompok kontrol dan kelompok perlakuan	175
Lampiran 16	T test untuk perbedaan ekspresi sel penghasil sitokin pro-inflamasi (TNF- α dan IL-1) dan sitokin anti-inflamasi (IL-10) pada tikus kelompok kontrol dan kelompok perlakuan	182
Lampiran 17	Surat keterangan melaksanakan penelitian dari Ketua Jurusan Farmasi FMIPA Unand	191
Lampiran 18	Gambaran sendi artritis reumatoid fase kronik pada sendi cakar rungkai belakang tikus	195
Lampiran 19	Surat Keterangan <i>Animal Ethics</i> dari Lembaga Penelitian Universitas Andalas Padang	196

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Artritis reumatoid (AR) merupakan penyakit inflamasi autoimun sistemik yang dapat mengenai seluruh organ tubuh dengan manifestasi utama pada persendian, dengan sasaran jaringan sinovial. Sebagian besar penyakit ini perjalanannya kronik, fluktuatif, progresif dan cenderung menyebabkan kerusakan sendi yang ireversibel sehingga dapat menimbulkan kecacatan yang menetap. Keadaan yang ditimbulkan oleh artritis reumatoid dapat berdampak langsung, yaitu akibat dari kebutuhan biaya yang tinggi untuk pengobatan dan berdampak tidak langsung, yaitu akibat dari kehilangan penghasilan karena penurunan aktifitas, morbiditas dan kehilangan kesempatan bekerja atau berkarir. Di Indonesia sebagian besar biaya ditanggung oleh penderita, akibatnya pengobatan sering tidak tuntas sehingga berakibat pada meningkatnya beban sosio ekonomi bukan saja bagi penderita tetapi juga bagi pemerintah (Nasution dan Setiobadi, 1999).

Di Amerika Serikat studi tentang biaya pengobatan artritis reumatoid secara nasional memperlihatkan jumlah yang sangat besar. Pada tahun 1994 biaya yang telah dikeluarkan untuk menanggulangi dampak langsung penyakit ini adalah 8,74 miliar Dolar Amerika. Sedangkan untuk dampak tidak langsung karena penderita penyakit ini pada umumnya terjadi pada usia produktif adalah 3,07 miliar Dolar Amerika (Callahan, 1998)



Artritis reumatoid tersebar diseluruh dunia dengan prevalensi yang bervariasi antara satu populasi dengan populasi lainnya. Perempuan lebih banyak menderita artritis reumatoid dari pada laki-laki dengan perbandingan tiga berbanding satu. Di Amerika Serikat dan Kanada prevalensi artritis reumatoid berkisar 1% pada Kaukasia dewasa. Prevalensi paling tinggi terdapat pada penduduk asli Amerika yaitu Chipewa dari Minnesota dan Indian Pima dari Arizona yaitu 5,3%. Prevalensi paling rendah terdapat pada penduduk Brittany di Perancis bagian barat yaitu 0,32% pada laki-laki dan 0,86% pada perempuan (Saraux et al.,1999). Prevalensi artritis reumatoid di Eropa berkisar antara 0,8-1,1%, sedangkan di Asia 0,3%. Di negara berkembang prevalensi artritis reumatoid 0,5-0,8 % (Edmonds, 1997). Di Indonesia, dari survei epidemiologi di Bandungan Jawa tengah prevalensi artritis reumatoid 0,3% sedangkan di Malang pada penduduk yang berusia diatas 40 tahun prevalensi artritis reumatoid di Kotamadya 0,5% sedangkan di Kabupaten 0,6% (Kalim dan Handono, 2000).

Etiologi artritis reumatoid belum diketahui sampai saat ini. Tetapi di duga faktor genetik, etnik, lingkungan, jenis kelamin dan infeksi berperan penting untuk terjadinya penyakit ini. Faktor genetik telah terbukti secara signifikan memberi kontribusi terhadap perkembangan terjadinya penyakit artritis reumatoid. *Human lymphocyte antigen* (HLA) terutama alel HLA-DRB1 pada manusia mempunyai asosiasi yang kuat dengan kerentanan seseorang terhadap timbulnya penyakit artritis reumatoid, disamping itu diduga berhubungan dengan beratnya manifestasi klinis, dan terjadinya erosi sendi pada kelompok etnik tertentu (German et al.,2004).

Walaupun teknologi biologi molekuler telah berkembang sehingga dapat mengidentifikasi subset sel, membuat penanda (*marker*) molekul permukaan sel dan produksi sel, namun dengan belum diketahuinya etiologi artritis reumatoid, maka patogenesis artritis reumatoid baru menghasilkan bermacam-macam hipotesis (Breedveld, 1998).

Patogenesis artritis reumatoid sampai saat ini baru sebagian diketahui. Penelitian dan penemuan baru terus berkembang untuk menjelaskan rahasia yang selama ini masih belum terungkap (Sumariyono, 2000).

Beberapa peneliti telah mengungkapkan patogenesis penyakit artritis reumatoid, seperti Issekutz et al., 1994; Choy et al., 1999; Mutafchieva et al., 2000 dan Taylor et al., 2000 telah membuktikan bahwa beberapa mediator sitokin seperti *tumor necrosis factor* α (TNF- α) dan interleukin-1 (IL-1) berperan penting untuk terjadinya migrasi leukosit ke jaringan sehingga menimbulkan reaksi inflamasi pada artritis reumatoid. TNF- α dan IL-1 mengaktifkan molekul adesi ICAM (*intercellular adhesion molecule*) dan VCAM (*vascular adhesion molecule*). ICAM dan VCAM yang di ekspresikan oleh sel endotel pembuluh darah di jaringan sinovial dengan kemampuan adhesinya akan menyebarkan sel-sel limfosit dan trombosit dalam pembuluh darah melekat ke endotel, selanjutnya menembus endotel dan berpindah ke jaringan. Tetapi hasil penelitian-penelitian tersebut belum dapat mengungkapkan dengan jelas peranan molekul adesi ICAM dan VCAM terhadap kejadian inflamasi aktif artritis reumatoid.

Migrasi atau berpindahnya sel dari pembuluh darah ke jaringan merupakan kunci dari respon inflamasi pada artritis reumatoid. Leukosit yang sudah diaktifasi mengekspresikan molekul selektin-L dengan afinitas tinggi dan integrin

seperti LFA-1 (*Leukocyte function antigen-1*) pada permukaannya. Molekul molekul tersebut akan menyebabkan leukosit mampu berlekatan dengan sel lain. Perlekatan leukosit dengan sel endotel terjadi melalui ligasi antara selektin-L dan LFA-1 dari leukosit dengan ICAM-1 dan VCAM-1 dari endotel. Perlekatan leukosit diikuti oleh proses menggelindingnya leukosit sepanjang endotel pembuluh darah (*rolling*) dan di akhiri dengan migrasi sel ke jaringan, sehingga sel inflamasi terakumulasi di jaringan (Austyn and Wood,1994; Bradley and Watson,1996).

Interaksi dari molekul adesi dengan leukosit yang menyebabkan ekstravasasi leukosit diikuti oleh inflamasi. Peranan molekul adesi tersebut terhadap inflamasi jaringan sinovial pada artritis reumatoid tidak diketahui. Tetapi beberapa molekul adesi seperti famili ICAM, LFA-1 dan CD44 berperan pada patogenesis artritis reumatoid. Beberapa aspek dari adesi sel dan molekul yang berperanan telah di teliti pada binatang coba, karena keterbatasan penelitian pada manusia (Halloran et al.,1996).

Pada artritis reumatoid terjadi pembentukan pembuluh darah baru atau neovaskularisasi di jaringan sinovial (Firestein,1999). Neovaskularisasi diikuti dengan peningkatan ekspresi ICAM-1 dan VCAM-1 yang berhubungan dengan akumulasi sel di jaringan. Pemberian anti inflamasi seperti glukokortikoid dapat menghambat ekspresi molekul adesi untuk mencegah perlekatan leukosit pada endotel sehingga menghambat respon inflamasi (Tessier et al.,1996).

Pemberian anti-ICAM yang bekerja langsung menghambat aktifitas molekul adesi pada penderita artritis reumatoid, diharapkan dapat mencegah proses migrasi leukosit ke jaringan. Ternyata hasil penelitian memperlihatkan

bahwa monoterapi dengan monoklonal antibodi anti-ICAM tidak memberikan efek penyembuhan terhadap artritis reumatoid. Hal ini memperlihatkan bahwa ada faktor-faktor lain yang berperanan (Kavanaugh et al., 1997).

Pada studi tentang etiopatogenesis artritis reumatoid dikenal beberapa model patogenesis yang disimpulkan dari hasil penelitian baik secara klinis maupun laboratoris, pada manusia maupun hewan coba. Hewan coba yang dipergunakan secara luas sebagai model artritis reumatoid adalah tikus yang diimunisasi dengan emulsi kolagen tipe II dalam ajuvan. Gejala artritis reumatoid yang timbul pada sendi tikus ini dikenal sebagai *collagen-induced arthritis (CIA)*. Dipilihnya hewan ini adalah karena memiliki gambaran patologis yang spesifik dengan artritis reumatoid pada manusia (Kadowaki et al., 1994).

Dalam upaya untuk mengungkap patogenesis artritis reumatoid maka perlu diketahui dan diungkapkan peranan molekul adesi (ICAM-1, VCAM-1 dan selektin) terhadap kejadian inflamasi pada artritis reumatoid. Untuk ini dilakukan penelitian yang memperlihatkan ekspresi molekul adesi (ICAM-1, VCAM-1 dan selektin-L) dan sitokin (anti-inflamasi dan pro-inflamasi) di jaringan sinovial dari sendi artritis reumatoid pada fase inisiasi, fase aktif dan fase kronik pada hewan coba.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, maka masalah penelitian dapat dirumuskan sebagai berikut:

- 1.2.1 Apakah ada peningkatan ekspresi molekul adesi (ICAM-1, VCAM-1 dan selektin-L) di jaringan sinovial pada fase inisiasi, fase aktif dan fase kronik artritis reumatoid
- 1.2.2 Apakah ada peningkatan ekspresi sitokin pro-inflamasi (TNF- α dan IL-1) di jaringan sinovial pada fase inisiasi dan fase aktif artritis reumatoid
- 1.2.3 Apakah ada peningkatan ekspresi sitokin anti-inflamasi (IL-10) di jaringan sinovial pada fase kronik artritis reumatoid

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Untuk mengungkapkan peranan molekul adesi (ICAM-1, VCAM-1 dan selektin-L) terhadap kejadian inflamasi pada fase inisiasi, fase aktif dan fase kronik artritis reumatoid.

1.3.2 Tujuan khusus

- 1.3.2.1 Membuktikan adanya peningkatan ekspresi molekul adesi (ICAM-1, VCAM-1 dan selektin-L) di jaringan sinovial pada fase inisiasi, fase aktif dan fase kronik artritis reumatoid
- 1.3.2.2 Membuktikan adanya peningkatan ekspresi sitokin pro-inflamasi (TNF- α dan IL-1) di jaringan sinovial pada fase inisiasi dan fase aktif artritis reumatoid
- 1.3.2.3 Membuktikan adanya peningkatan ekspresi sitokin anti-inflamasi (IL-10) di jaringan sinovial pada fase kronik artritis reumatoid.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat sebagai sumbangan bagi pengembangan ilmu pengetahuan dan pemanfaatannya dalam tambahan informasi untuk pola pemberian terapi artritis reumatoid.

1.4.1 Manfaat Ilmiah

Dengan terungkapnya peranan molekul adesi (ICAM-1, VCAM-1 dan selektin-L) terhadap kejadian inflamasi pada artritis reumatoid, dapat memberikan tambahan informasi baru dalam memahami patogenesis terjadinya artritis reumatoid, serta memberikan wawasan baru guna pengembangan penelitian lebih lanjut dalam usaha mengungkap etologi penyakit artritis reumatoid serta pengobatan yang lebih tepat.

1.4.2 Manfaat Terapan

Dengan terungkapnya peranan molekul adesi (ICAM-1, VCAM-1 dan selektin-L) terhadap kejadian inflamasi artritis reumatoid maka pola pemberian imunoterapi yang saat ini sedang dikembangkan untuk upaya penyembuhan penyakit artritis reumatoid akan dapat disesuaikan dengan patogenesis perjalanan penyakitnya. Berdasarkan hal tersebut efek samping dari pemberian obat-obatan anti inflamasi oral yang selama ini diberikan akan dapat dihindari dan kecacatan akibat penyakit artritis reumatoid ini diharapkan dapat dihindari.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Arthritis Reumatoid

Arthritis reumatoid (AR) termasuk pada kelompok penyakit rematik yang merupakan penyakit kronik, ditandai oleh adanya gejala nyeri kronik dan kerusakan fisik yang progresif pada sendi dan jaringan lunak. Penyakit rematik meliputi lebih dari 100 macam penyakit seperti osteoarthritis (OA), arthritis reumatoid (AR), fibromialgia, lupus eritematosus sistemik (SLE), gout, bursitis dan lain-lain (Klippel, 2001).

Arthritis reumatoid adalah penyakit autoimun yang etiologinya belum diketahui sampai saat ini. Arthritis reumatoid ditandai oleh sinovitis yang bersifat erosif, mengenai beberapa sendi yang simetris dan kadang-kadang melibatkan banyak sistem. Sebagian besar perjalanan penyakit arthritis reumatoid bersifat kronis fluktuatif dan dapat diderita oleh pasien selama beberapa dekade dalam kehidupannya, sehingga bila tidak diobati dapat menyebabkan kerusakan sendi yang progresif, menimbulkan deformitas, disabilitas yang mengakibatkan berkurangnya kualitas hidup (Goodson et al., 2002).

Arthritis reumatoid dapat meningkatkan resiko kematian. Resiko kematian makin meningkat pada penyakit arthritis reumatoid berat, yang ditandai oleh adanya kerusakan sendi lanjut, gangguan fungsi, kecacatan, penyakit ekstra artikuler dan faktor reumatoid (FR) serum yang positif. Komorbiditas lebih tinggi pada penderita AR dari pada orang yang tidak menderita AR dengan usia dan

jenis kelamin yang sama. Beratnya penyakit dan komorbiditas berhubungan dengan angka kematian dari artritis reumatoid (Navaro-Cano et al.,2003)

Artritis reumatoid menyerang penderita pada usia produktif sehingga kecacatan yang ditimbulkannya akan memberikan dampak ekonomi yang besar. Bila artritis reumatoid menyerang pada usia tua terutama perempuan, maka gangguan fungsional yang menyebabkan berkurangnya kualitas hidup, menjadi enam kali lebih tinggi dibanding dengan berkurangnya kualitas hidup perempuan pada usia sama yang tidak menderita AR (Mikulic et al.,2003)

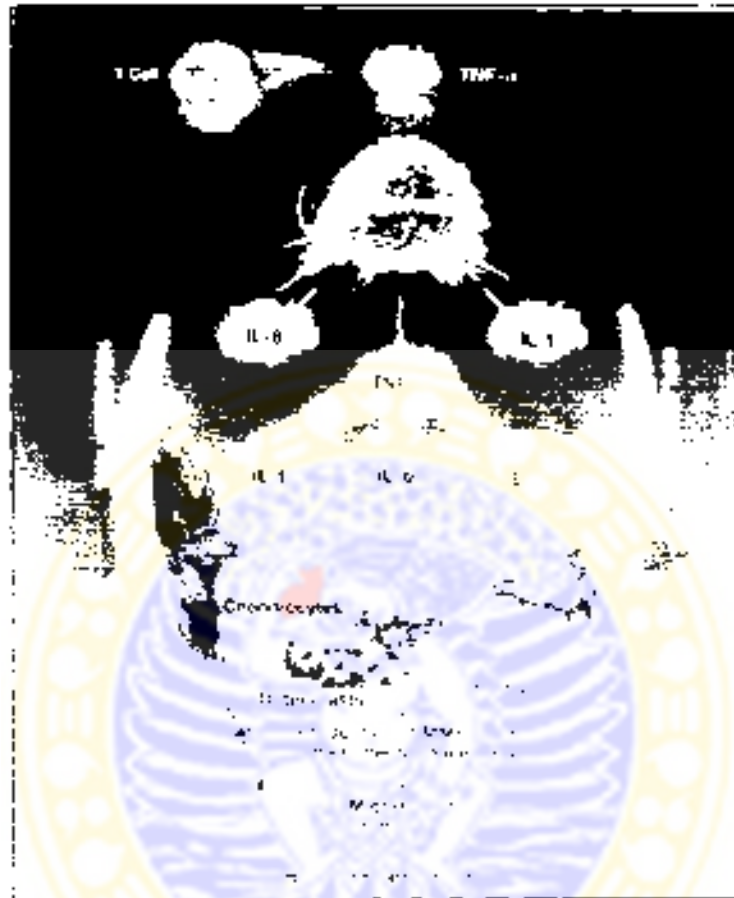
Inflamasi sinovium atau jaringan sinovial pada artritis reumatoid ditandai oleh infiltrasi sel sinovial sendiri. Sel sinovial seperti fibroblas, *macrophage-like cell*, dan sel-sel yang bermigrasi dari pembuluh darah ke jaringan sinovial seperti limfosit T dan B yang menyebabkan hiperplasia membrana sinovial. Hiperplasia membrana sinovial pada artritis reumatoid diikuti dengan pembentukan pembuluh darah baru membentuk *pannus* yang bersifat invasif (Lipsky, 2000).

Interaksi sel yang terdapat di jaringan sinovial melalui mediator sitokin akan mempengaruhi dan mengaktifasi molekul adesi yang terdapat pada permukaan sel terutama endotel pembuluh darah sehingga menyebabkan terjadinya migrasi sel (Janeway and Travers, 1994).

Walaupun peranan imunologi pada awal mulainya terjadi artritis reumatoid masih belum terungkap secara keseluruhan, tetapi adanya gangguan keseimbangan sitokin didalam sendi pasien AR telah diketahui berperan penting untuk terjadinya penyakit ini (Dalbeth and Callan 2002).

Stimulasi terhadap makrofag menyebabkan produksi TNF- α , IL-1 dan IL-6. TNF- α akan menstimulasi IL-1, IL-6 dan IL-8 yang akan mengaktifasi

kondrosit, osteoklas dan fibroblas untuk mensintulasi metaloproteinase seperti *matrix metalloproteinases 1* (MMP-1 dan MMP-3 MMP-1 dan MMP-3 menyebabkan erosi pada sendi (gambar 2.1) (Tomita et al., 2002)



Gambar 2 Stimulasi terhadap makrofag untuk memproduksi stokim pro-inflamasi terutama TNF- α yang menyebabkan erosi sendi (Di kutip dari Tomita et al., 2002)

Kerusakan sendi pada artritis reumatoid disebabkan oleh invasi tulang rawan sendi oleh *pannus*, osteoporosis lokal, dan erosi lokal, pembengkakan sendi dan kerusakan struktur periankular. Proses biologis yang menyebabkan perubahan morfologis ini adalah inflamasi, proliferasi dan apoptosis. Pada artritis reumatoid komponen antigen menetap pada membrana sinovial sehingga proses morfologis tersebut berlangsung terus menerus. Hal ini juga mungkin disebabkan

karena tingginya kadar faktor reumatoid (FR). dimana FR akan berikatan dengan komplemen atau mengalami agregasi sendiri sehingga proses inflamasi berjalan terus (Sumariyono, 2000).

2.2 Manifestasi Klinis Arthritis Reumatoid

Gejala arthritis reumatoid dapat timbul berupa serangan poliartritis akut yang cepat dalam beberapa hari. tapi pada umumnya gejala penyakit ini berkembang secara perlahan dalam beberapa minggu. Gejala umum arthritis reumatoid adalah berupa keluhan lemah, nafsu makan menurun, demam dan pucat, sedangkan manifestasi klinis pada sendi terlihat adanya pembengkakan sendi disertai warna kemerahan, rasa nyeri terutama pagi hari, sendi-sendi terasa kaku dan sukar di gerakkan.

Palindromic rheumatism merupakan manifestasi klinis arthritis reumatoid dini, yaitu timbulnya gejala monoartritis yang hilang timbul dan berlangsung antara tiga sampai lima hari dan diikuti masa remisi sempurna sebelum bermanifestasi sebagai arthritis reumatoid yang khas

Keluhan dan gejala arthritis reumatoid pada sendi adalah gejala inflamasi akibat sinovitis dan gejala akibat kerusakan struktur sendi. Gejala inflamasi sinovitis bersifat reversibel. Sedangkan gejala akibat kerusakan struktur sendi biasanya bersifat ireversibel. Sinovitis pada arthritis aktif menimbulkan gejala kaku pada pagi hari, poliartritis yang nyata pada sendi terutama sendi kecil dan biasanya simetris. Sendi-sendi yang terlibat terbanyak adalah *metacarpophalangeal* dan *proximal interphalanx* (90%), *metatarso phalangeal* (90%), pergelangan tangan (80%), pergelangan kaki/subtalar (80%), lutut (80%), bahu

(60%) dan siku (50%). Sendi yang di kenai akan mengalami pembengkakan, nyeri, rasa panas dan kemerahan di sertai gangguan fungsi. Gangguan fungsi pada artritis reumatoid diklasifikasi dengan mempergunakan kriteria *Steinbrocker* (Soenarto,1999)

Derajat kerusakan sendi dapat ditilai melalui pemeriksaan radiologi mempergunakan metode *Larson*. Beberapa kelainan dapat dipergunakan sebagai prediksi kerusakan sendi seperti, FR serum positif, CRP (*C-reactive protein*), laju endap darah, HLA dan tipe munculan penyakit artritis reumatoid (Sumariyono, 2000).

2.3 Diagnosis Artritis Reumatoid

Diagnosis artritis reumatoid ditegakkan berdasarkan kombinasi berbagai gejala klinis, laboratoris dan radiologis yang mengalami penyempurnaan dari tahun ketahun sesuai dengan perkembangan ilmu pengetahuan.

Klasifikasi artritis reumatoid pertama kali dipublikasi pada tahun 1958 oleh *American Rheumatism Association* (ARA), dimana penyakit artritis reumatoid dibagi menjadi empat kategori penyakit yaitu: *possible*, *probable*, *definit* dan *classic*. Kriteria ini kemudian direvisi pada menjadi satu kategori saja yaitu artritis reumatoid (Edmonds,1997).

Gambaran klinis yang penting adalah sinovitis crosif yang bersifat kronis dan simctris pada sendi-sendi perifer. Sebagian besar penderita juga menunjukkan tingginya kadar faktor reumatoid dalam serum pada pemeriksaan laboratorium (Setiohadi, 2000).



2.3.1 Kriteria diagnostik

Kriteria diagnostik yang sekarang di pergunakan untuk menegakkan diagnosis artritis reumatoid adalah berdasarkan kriteria diagnostik dari *American College of Rheumatology* (ACR) 1987 yang sudah direvisi. Susunan kriteria tersebut adalah sebagai berikut:

1. Kaku pagi hari pada persendian dan daerah sekitar sendi selama lebih dari satu jam sekurang-kurangnya selama 6 minggu
2. Artritis pada lebih dari tiga sendi sekurang-kurangnya selama 6 minggu
3. Artritis pada sendi kecil tangan sekurang-kurangnya selama 6 minggu
4. Artritis pada sendi simetris sekurang-kurangnya selama 6 minggu
5. Nodul subkutan pada penonjolan tulang atau permukaan ekstensor atau daerah juksta artikular
6. FR serum positif
7. Perubahan gambaran radiologis yang khas pada tangan dan pergelangan tangan, yang menunjukkan adanya erosi atau dekalsifikasi tulang pada sendi atau daerah yang berdekatan dengan sendi.

Artritis yang dimaksud pada kriteria diatas adalah pembengkakan jaringan lunak atau adanya cairan sendi, yang ditentukan oleh dokter. Untuk diagnosis artritis reumatoid klasik dibutuhkan ketujuh gejala dari kriteria diagnostik diatas. Tapi seseorang sudah dapat dikatakan menderita artritis reumatoid apabila ditemui sekurang-kurangnya empat dari tujuh kriteria ACR di atas (Setiyohadi,2000;Klippel 2001)

2.3.2 Penilaian derajat kerusakan sendi artritis reumatoid

Pemeriksaan radiologi digunakan untuk menilai beratnya AR. Terdapat cara penilaian kelainan radiologis pada AR, antara lain adalah metode *Steinbrocker*. Dengan metode ini AR dibagi menjadi empat stadium, yaitu:

1. Stadium 1 (penyakit dini)
 - Bisa ditemukan osteopenia
 - Tidak ada erosi atau penyempitan ruang sendi.
2. Stadium 2 (penyakit moderat)
 - Osteopenia
 - Bisa didapatkan penyempitan ruang sendi ringan dan sedikit erosi.
 - Tidak ada deformitas sendi atau *malalignment*
3. Stadium 3 (Penyakit berat)
 - Didapatkan erosi dan penyempitan sendi
 - Didapatkan deformitas atau *malalignment*
4. Stadium 4 (penyakit terminal)
 - Didapatkan ankilosis
 - Gambaran stadium 3

(Sumariyono,2000)

2.3.3 Prediktor kerusakan sendi artritis reumatoid

Untuk memprediksi terjadinya kerusakan sendi pada artritis reumatoid dilakukan pemeriksaan sebagai berikut:

Faktor reumatoid (FR)

FR adalah autoantibodi imunoglobulin G terhadap *Factor crystalline* (Fc). Kompleks imun yang terdapat dalam serum dan cairan sinovial penderita artritis reumatoid akan menstimulasi limfosit untuk memproduksi IgM FR. Sel yang mensekresi FR diduga berada di jaringan sinovial, karena jumlah prekursor sel B spesifik untuk FR pada pasien seronegatif tidak berbeda dengan pasien seropositif. FR di temukan dalam serum dari 75-80% penderita artritis reumatoid (Williams, 1994).

Semula dipercaya bahwa faktor reumatoid adalah spesifik untuk artritis reumatoid, tetapi ternyata pada 3% orang normal ditemukan faktor reumatoid dalam serum darahnya. Prevalensi faktor reumatoid positif akan meningkat sesuai dengan bertambahnya usia (Kim and Weisman, 2000).

Seropositif FR berhubungan dengan HLA-DR/DR4 pada kelompok etnis tertentu. Seperti pada suku Pima Indian, dimana tercatat merupakan rekor tertinggi insiden AR. Namun dari penelitian selama lebih dari tiga dekade, terjadi penurunan insiden sampai 50%, yang signifikan dengan penurunan seropositif FR. Walaupun sudah terbukti bahwa adanya FR merupakan prediktor terjadinya AR yang berat, tapi hubungan antara seropositif FR dengan perjalanan artritis reumatoid belum diketahui. Secara individual FR lebih berperan sebagai prediktor terjadinya AR yang berat dengan adanya kerusakan sendi dthanding sebagai diagnostik (Enzer et al., 2002)

C-reactive protein (CRP)

CRP merupakan protein yang mampu mengadakan presipitasi dengan polisakarida C dari pneumokokus. CRP memulai kaskade komplemen

melalui aktivasi C1 oleh kompleks CRP. CRP diproduksi oleh hepatosit, dan produksinya dipicu oleh IL-1, IL-6, TNF- α dan TGF- β . Peningkatan CRP di dapatkan pada respon inflamasi terhadap kerusakan jaringan seperti pada AR dan infeksi bakteri.

Anemia

Anemia sering didapatkan pada pasien AR karena defisiensi besi atau anemia karena penyakit kronik. Beratnya anemia berkorelasi dengan beratnya penyakit. Sitokin-sitokin yang biasanya meningkat pada AR seperti IL-1 dan TNF- α akan mengganggu metabolisme besi dan eritropoesis di sumsum tulang.

Laju Endap Darah (LED)

Naiknya kecepatan sedimentasi eritrosit (ESR=LED) dan fase protein akut seperti protein C reaktif lebih tinggi pada kerusakan sendi berat dibandingkan dengan kerusakan sendi normal. Kecepatan sedimentasi eritrosit mempunyai korelasi dengan derajat inflamasi sinovial. Tapi korelasi ini sangat bervariasi dari satu pasien dengan pasien lain.

Nodul reumatoid

Adanya nodul reumatoid pada AR memprediksi buruknya prognosis dan dengan kerusakan sendi yang lebih berat. Gejala ekstra artikular lain dengan HLA-DR yang mengekspresika *shared-epitop* memiliki hubungan dengan inflamasi sendi yang progresif (Sumariyono 2000).

2.4 Etiologi Arthritis Reumatoid

Seperti telah disebutkan sebelumnya bahwa etiologi arthritis reumatoid belum diketahui sampai saat ini. Etiologi arthritis reumatoid sangat kompleks dan multifaktorial, dimana faktor genetik dan beberapa faktor non genetik telah lama diduga berperan dalam timbulnya penyakit ini. Hal ini terbukti dari terdapatnya hubungan antara MHC kelas II, khususnya HLA-DR4 dengan arthritis reumatoid seropositif. Pengemban HLA-DR4 memiliki resiko relatif empat kali lebih besar untuk menderita arthritis reumatoid (Edmonds, 1997; Klippel 2001)

Fenomena utama yang juga terlihat berhubungan dengan arthritis reumatoid seperti faktor reumatoid dan respon sel T terhadap autoantigen yang berhubungan dengan sinovitis, seperti kolagen tipe II, *heat shock proteins* (HSP) dan proteoglikan. Kolagen tipe II termasuk komponen utama dari matriks ekstrasel tulang rawan sendi. Kolagen tipe II dapat menjadi pencetus yang potensial untuk terjadinya respon antigen spesifik di jaringan sinovial. Proteoglikan terdapat pada cairan sinovial, jaringan sinovial dan tulang rawan sendi, dan dapat memicu imunitas seluler dan humoral (Wordsworth and Pile, 1994).

HSP termasuk protein yang bersifat imunostimulator dan dikenal sebagai superantigen, yang dibentuk oleh hampir seluruh spesies sebagai respon imun terhadap stress, dan terhadap adanya infeksi bakteri, mikobakterium, protozoa dan cacing. Antibodi yang terbentuk terhadap HSP diproduksi oleh tikus yang di imunisasi dengan *Mycobacterium tuberculosis* yaitu Antibodi HSP70, 60, 18 dan 12. HSP60 manusia dan HSP70 mikobakterial memiliki sekuensi yang sama (60% homolog). Hal ini menyokong kemungkinan terjadinya induksi autoimunitas pada infeksi bakteri. Pada manusia HSP60 tidak di ekspresikan pada

sinovium normal, namun ditemukan sebagai protein imunoreaktif pada jaringan sinovial penderita artritis reumatoid dan osteoartritis. HSP60, 70 dan 90 diekspresikan oleh sitoplasma sel-sel pada membrana sinovial dan cairan sinovial. Proteoglikan merupakan antigen artikuler yang mampu menimbulkan respon sel T pada sinovium (Williams).

Faktor hormonal diduga merupakan faktor yang berpengaruh pada timbulnya penyakit artritis reumatoid. Dari data epidemiologi terdapat fluktuasi pada umur dan jenis kelamin penderita artritis reumatoid. Pada umur lima puluhan perempuan tiga kali lebih banyak menderita artritis reumatoid dari pada laki-laki. Insiden akan menjadi sama antara perempuan dan laki-laki pada umur lebih dari 60 tahun. Sedangkan pada penderita artritis reumatoid yang masih muda perbandingan antara perempuan dengan laki-laki adalah 6:1. Disamping itu dari data terlihat dimana terjadi perbaikan penyakit selama masa kehamilan dan kecenderungan terjadinya *flare up* pada periode setelah melahirkan (Cutolo et al., 1998). Walaupun demikian pemberian hormon estrogen eksternal tidak terlihat memberikan perbaikan, sehingga belum dapat dipastikan bahwa faktor hormonal merupakan penyebab artritis reumatoid.

Androgen pada manusia dan hewan coba dapat melindungi laki-laki dari penyakit autoimun. Seperti testosteron, yang berperan pada proteksi terjadinya artritis pada *ovarian-induced arthritis* (Edmonds, 1997).

Usia seseorang, jenis kelamin dan status menopause juga berpengaruh terhadap terjadinya artritis reumatoid. Di Amerika prevalensi artritis pada orang berusia lebih dari 60 tahun adalah 2%. prevalensi ini lebih tinggi pada perempuan, dan kelompok penduduk Meksiko Amerika dengan pendidikan kurang. Aktifitas

penyakit dan terjadinya destruksi sendi lebih tinggi pada orang yang berusia lanjut, pada perempuan dan pada postmenopause (Kuiper et al., 2001; Rasch et al., 2003).

Diet dipercaya oleh masyarakat sebagai penyebab terjadinya artritis reumatoid, tapi tidak satupun literatur yang mendukung dugaan ini. Demikian juga dengan rokok, sebagian peneliti menemukan bahwa merokok dapat menurunkan resiko terjadinya artritis reumatoid, tapi peneliti lain menemukan sebaliknya, dimana merokok meningkatkan resiko terjadinya artritis reumatoid (Edmonds, 1997). Mikuls et al., 2002 menemukan bahwa meminum empat cangkir kopi tanpa kafein dalam sehari dapat meningkatkan resiko terjadinya artritis reumatoid. Hal ini berbeda dengan perempuan yang meminum tiga cangkir teh sehari akan menurunkan resiko terjadinya artritis reumatoid bila dibandingkan dengan yang tidak minum teh.

Pada tahun tiga puluhan di duga bahwa artritis reumatoid disebabkan oleh infeksi, karena terlihat dari permulaan timbulnya penyakit yang terjadi secara mendadak, dan timbul dengan di sertai oleh gambaran inflamasi yang menyolok. Walaupun hingga kini belum berhasil di isolasi suatu mikroorganisme dari jaringan sinovial, hal ini tidak menyingkirkan kemungkinan terdapatnya suatu komponen peptidoglikan atau endotoksin dari mikroorganisme yang dapat menjadi pencetus kejadian artritis reumatoid (Utsinger et al., 1985)

2.5 Patogenesis Artritis Reumatoid

Dari penelitian mutakhir diketahui bahwa patogenesis artritis reumatoid terjadi akibat rantai peristiwa imunologis. Inisiator dari artritis reumatoid diduga

merupakan antigen spesifik yang menimbulkan proses inflamasi dengan di perantarai oleh limfosit T. Antigen yang artropatik ini belum diketahui sampai sekarang, tapi bisa berupa retrovirus, produk-produk bakteri, atau suatu mikroorganisme seperti spirochaeta, khlamidia atau mikobakterium (Firestein,1997)

Sampai saat ini patogenesis artritis reumatoid baru sebagian yang diketahui, namun hasil penelitian telah memperlihatkan peran sendi, peran tulang rawan sendi, peran sinovium pada sinovitis kronik, peran sitokin, dan peran genetik pada kejadian artritis reumatoid.

2.5.1 Sendi dan Tulang Rawan Sendi

Tulang berhubungan satu sama lain oleh jaringan ikat yang memungkinkan adanya pergerakan antara tulang yang berhubungan, yang disebut sendi. Sendi dapat dilihat sebagai struktur organ yang terdiri dari sinovium, tulang rawan sendi, tulang subkondral dan cairan sinovial. Komponen-komponen ini secara fungsional dan metabolik saling berhubungan, dan masing-masingnya berperan penting dalam menjaga homeostasis sendi. Pada artritis reumatoid terjadi gangguan homeostasis sendi, yang pada akhirnya akan menimbulkan destruksi tulang dan tulang rawan sendi, sehingga sendi akan kehilangan integritasnya.

Struktur sendi sangat bervariasi, tergantung kepada gerakan dan tulang yang dihubungkan. Secara anatomis ada tiga macam sendi, yaitu *synarthroses*, *amphiarthroses*, dan *diarthroses*

Synarthroses merupakan sendi yang tidak dapat bergerak. Diantara kedua tulang yang saling berhubungan terdapat lapisan jaringan ikat tipis yang di sebut

sinde smosis seperti sutura pada tulang tengkorak. Jaringan lain dapat berupa tulang rawan yang disebut sinkondrosis, misalnya diantara kedua tulang pubis pada orang dewasa. Bila pada persambungan antar dua tulang terdapat jaringan tulang, disebut sinostosis, misalnya persambungan antara tulang ilium, iski um dan pubikum.

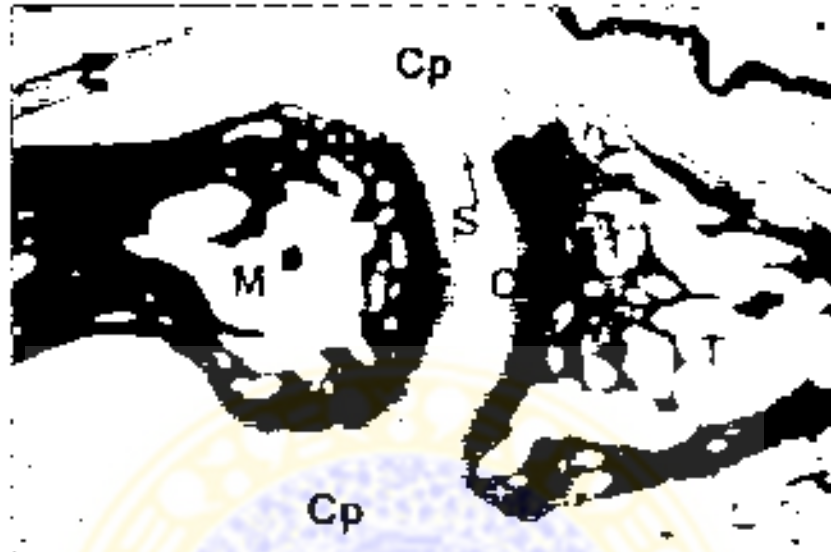
Amphiarthrosis merupakan sendi yang memungkinkan tulang-tulang yang saling berhubungan dapat bergerak sedikit seperti pada intervertebra, dimana jaringan sendi dibentuk oleh jaringan fibrosa dan tulang rawan.

Diarthroses merupakan sendi yang dapat bergerak secara bebas terdapat pada tulang yang benar-benar terpisah. Sendi *diarthroses* disebut juga sendi sinovial, yang terdiri dari bonggol sendi atau kapsul artikulare dan bursa serta ligamentum sendi. Sendi *diarthroses* dilapisi oleh membrana sinovial.

Permukaan tulang pada sendi *diarthroses* disebut permukaan sendi yang dilapisi oleh tulang rawan hialin yang khas dan dibagian paling luar dilapisi oleh kapsul fibrosa. Diantara tulang rawan sendi terdapat rongga atau ruang yang disebut rongga sinovial. Dalam keadaan normal permukaan sendi dapat bergerak dengan lancar melalui rongga sinovial dengan adanya lubrikasi oleh sejumlah kecil cairan berupa lapisan tipis yang melapisi permukaan sendi, disebut cairan sinovial.

Gambaran mikroskopis sendi interfalang distal jari tangan kera terlihat pada gambar 2.2. T adalah falang terminal dan M adalah falang yang ditutupi oleh tulang rawan hialin (C). Rongga sendi terlihat lebar. Secara *invivo*, permukaan sendi dipertahankan saling merapat oleh kapsul fibrosa (Cp) yang tertanam didalam tulang sendi, sedikit di belakang tulang rawan sendi. Sinovium

Se adalah lapisan khusus aringan kolagen yang melapisi permukaan dalam kapsul. Lendo ekstensor (L) tertanam dalam basis dari talang terminal (Burkitt et al, 1995).



Gambar 2.2. Sendi diartrosis pada sendi panjangan kera. Di kutip dari Burkitt et al., 1995.

Tulang rawan sendi di bentuk oleh sel tulang rawan sendi yang disebut kondrosit dan matriks tulang rawan. Kondrosit bertanggung jawab mensintesis matriks tulang rawan sedangkan matriks berfungsi sebagai bantalan. Kondrosit memperoleh suplai nutrisi dan oksipen terutama dari cairan sinovial yang melapisi permukaan bebas tulang rawan sendi. Matriks sendi di susun terutama oleh air kolagen tipe II dan proteoglikan. Proteoglikan bersama-sama dengan asam hauronat membentuk agregat yang dapat mengisap air di sekitarnya sehingga matriks mengembang sedemikian rupa sesuai dengan fungsinya sebagai bantalan sendi.

Kolagen merupakan molekul protein yang sangat kuat yang membentuk serat kolagen. Pada serat terdapat beberapa tipe kolagen yang dibedakan masing-

masing dari struktur asam amino primer pada rantai yang membentuk serat kolagen. Berdasarkan perbedaan tersebut kolagen pada sendi terdiri dari kolagen tipe I, II, III, IV dan V. Kolagen tipe I dengan struktur $\{\alpha 1(I)\}_2\alpha 2$ terdapat pada tulang dan sinovium. Kolagen tipe II, III dan IV tersusun dari 3 rantai alfa yang membentuk gulungan *triple-helix*. Kolagen tipe II terdapat terutama pada kartilago artikuler, tipe III pada tendon, tipe IV pada membrana basalis. Sedangkan kolagen tipe V tersusun dari satu rantai αA dan dua rantai αB dan terdapat pada eksoskeleton. Kolagen berfungsi sebagai kerangka bagi tulang rawan sendi yang akan membatasi penguembangan berlebihan dari agregat proteoglikan.

Pada tulang rawan sendi tidak terdapat pembuluh darah. Nutrisi untuk jaringan tulang rawan sendi diperoleh melalui proses osmosis dari jaringan sekitarnya, seperti cairan sinovial dan kapiler yang terdapat pada membrana sinovial (Burkit et al., 1995).

2.5.2 Membrana sinovial

Membrana sinovial disebut juga sinovium, berasal dari kata *syn* yang berarti dengan dan *ovium* yang berarti telur. Sinovium didefinisikan sebagai jaringan lunak yang menutupi sendi diartrosis (sendi sinovial), tendon dan bursa.

Membrana sinovial melapisi seluruh permukaan intraartikular kecuali pada area tulang rawan sendi dan tulang yang berdekatan dengan tempat sinovium-tulang berhubungan, yang disebut sebagai *bare area*.

Membrana sinovial merupakan jaringan dengan struktur yang relatif sedikit mengandung sel. Sel-sel yang terdapat pada membrana sinovial

memproduksi cairan sinovial seperti asam hialuronat. Disamping itu membrana sinovial juga mensintesis kolagen dan fibronektin yang merupakan komponen struktur jaringan dari interstisium sinovium. Membrana sinovial merupakan sumber utama dalam mencukupi kebutuhan oksigen dan nutrisi untuk tulang rawan sendi, karena tulang rawan merupakan jaringan yang avaskuler.

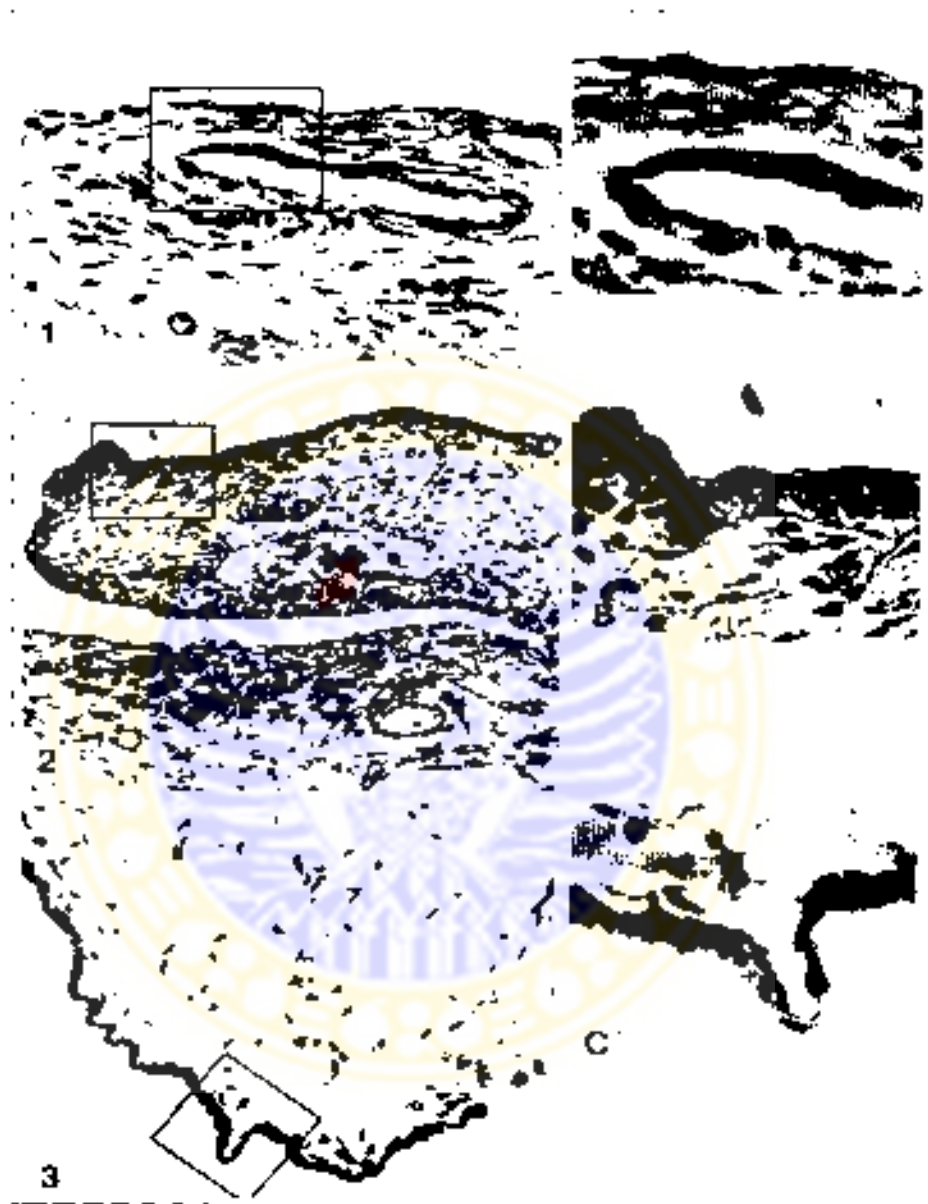
Secara anatomis membrana sinovial di klasifikasikan atas:

1. *Articular synovia* atau sinovium sendi
2. *Vaginal synovia* atau sarung tendon, terdapat terutama pada tangan dan kaki dimana membrana sinovial melapisi dan menutup tendon
3. *Synovial bursae* atau kantong jaringan ikat, ditutupi oleh membrana sinovial, berada di antara ligamen yang bergerak, otot, tulang dan lain-lain.

Secara histologis gambaran membrana sinovial sangat bervariasi, tergantung pada asal jaringan, dan dimana jaringan tersebut berada. Berdasarkan gambaran histologisnya membrana sinovial di klasifikasikan menjadi tiga tipe yaitu tipe areolar, adiposa dan fibrosa (gambar 2.3).

Sinovium areolar merupakan bentuk membran yang khas, dimana jaringan dapat bergerak bebas di atas jaringan yang ditutupinya. Jaringan ini membentuk lipatan-lipatan berbentuk vili yang akan menghilang jika terjadi regangan. Permukaan sinovium areolar di tutupi oleh satu sampai dua lapis sel. Dibawah lapisan sel terdapat kapiler darah. Pada bagian yang lebih dalam terdapat pleksus vena dan syaraf. Disekitar pembuluh darah terdapat sel mast. Sebagai matriks pada bagian intima kadang-kadang terdapat serat kolagen halus. Pada bagian yang lebih dalam terdapat lapisan yang mengandung banyak serat kolagen yang merupakan dasar membran. Langsung di bawah lapisan ini terdapat lapisan jarang

yang melingkupikan membran dapat bergerak secara bebas terhadap piringan di bawahnya seperti ligamen, tasia, tendon, periosteum, epimisium atau jaringan ikat lainnya.



Gambar 2.3 Gambaran histologi tipe areolar yang khas (A), dibandingkan dengan tipe adiposa (B) dan tipe fibrosa (C).
Dikutip dari: Cornack, 1987

Selain itu, adiposa merupakan jaringan yang didominasi oleh lemak. Jaringan ini juga membentuk vili. Pada adiposa ini terdapat sel yang melapisi

permukaan, kapiler dan sel mast. Di antara sel lemak terdapat serat-serat kolagen tipis. Pada bagian yang lebih dalam terdapat jaringan lemak dengan pembuluh darah yang tidak begitu teratur. Jumlah lemak sangat bervariasi, dimana makin tua usia jumlah lemak makin berkurang dan diikuti dengan peningkatan jaringan fibrosa.

Sinovium fibrosa merupakan jaringan yang mempunyai struktur yang keras, karena mengandung jaringan fibrosa seperti ligamen atau tendon. Jaringan ini ditutupi oleh lapisan sel yang tidak kontinyu dan sangat bervariasi. Pembuluh darah terdapat dalam jumlah yang juga bervariasi.

Sinovium fibrosa sulit dibedakan dari fibrokartilago, terutama pada sendi jari yang kecil (Cormack, 1987; Edwards, 1996). Pada manusia dewasa membran sinovial memiliki ketebalan 100 μ m sampai dengan 5 mm. Lapisan sel superficial memiliki ketebalan lebih kurang 20 μ m. Membran sinovial terdiri dari dua lapis:

1. Lapisan intima (*synovial lining*).
2. Lapisan subintima (*subsynovium atau sublining*).

Lapisan intima terdiri dari satu sampai tiga lapis yang sel berbentuk gepeng atau kuboid, tersusun tidak beraturan dan tidak mempunyai lamina basalis. Sehingga terdapat bagian dimana lapisan subintima berhubungan langsung dengan rongga intra artikular. Pada lapisan ini terdapat tiga macam sel yang di kenal sebagai sinoviosit tipe A, tipe B dan tipe intermediet yang disebut tipe U.

Fenotipe sinoviosit A merupakan karakteristik dari makrofag yang berasal dari sumsum tulang, disebut *macrophage like cell*. Ultrastruktur sinoviosit A seperti makrofag di jaringan, yaitu aparat Golgi yang menonjol, vakuola lisosom, endoplasmik retikulum kasar dan mengekspresikan CD14 serta MHC kelas II

(IIA-DR). Pada lapisan intima membrana sinovial normal terdapat kira-kira 20-30% sinoviosit A. Sinoviosit B berasal dari mesenkim dengan gambaran fibroblas bipolar dan disebut sebagai *fibroblast like cell* (FLS) . Sinoviosit B mengandung endoplasmik retikulum, ribosom dan *uridin diphosphoglucose dehydrogenase* (UDPGD). Enzim ini ikut berperan dalam memproduksi asam hialuronat. Sinoviosit tipe U terlihat juga pada *synovial lining*. Tapi tidak jelas asal dari sel ini, atau pada tingkat perkembangan sinoviosit.

Lapisan subintima mengandung banyak pembuluh darah, sel lemak fibroblas, sejumlah kecil sel mononuklear seperti makrofag dan limfosit. Kapiler dan venula terdapat langsung dibawah lining sedangkan pembuluh darah yang lebih besar seperti arteriol terdapat dibagian dalam jaringan subintima. Matriks ekstraselular sinovium mengandung bermacam macam makro molekul seperti kolagen, fibronektin dan proteoglikan (Firestein,1994).

Fungsi membrana sinovial adalah:

1. Lapisan superfisial intima sebagai barier yang melindungi sendi.
2. Lapisan intima memproduksi glukosaminoglikan seperti asam hialuronat yang memberikan kekentalan khas pada cairan sinovial dalam fungsinya untuk lubrikasi agar permukaan sendi tidak melekat atau saling bergeser satu sama lain waktu bergerak.
3. Mengontrol volume cairan sinovial
4. Memberi nutrisi pada kondrosit.

2.5.3 Cairan Sinovial

Pada sendi manusia normal cairan sinovial merupakan cairan berupa film tipis yang melapisi permukaan sinovium dan rawan sendi didalam rongga sendi.

Cairan ini berfungsi sebagai pelumasan untuk mencegah permukaan rawan sendi melekat satu sama lain, sehingga memungkinkan sendi bergerak secara bebas. Cairan sinovial mempunyai kekentalan seperti putih telur, sesuai dengan nama *synovia* yang berarti putih telur. Kekentalan dan berat molekul cairan sinovial disebabkan oleh kandungan asam hialuronat.

Cairan sinovial diproduksi oleh sel yang terdapat pada lapisan intima membrana sinovial. Sedangkan asam hialuronat diproduksi oleh sel sinoviosit. Cairan sinovial tidak mempunyai saluran masuk dan keluar tertentu. Cairan dan molekul-molekul yang masuk dari lapisan intima membrana sinovial ke dalam rongga sinovial, akan keluar melalui tempat masuknya melalui proses difusi.

Pengaturan volume cairan sinovial belum diketahui. Tapi asam hialuronat diduga berperan dalam mengatur volume cairan sinovial. Volume cairan sinovial yang konstan penting untuk jaringan sinovial dan cadangan pelumasan rawan sendi. Terjadinya peningkatan jumlah atau efusi cairan sinovial adalah karena kegagalan kontrol volume cairan sinovial.

Sel yang terdapat pada cairan sinovial adalah leukosit, dengan jumlah tidak lebih dari 200/ml. Dari hitung jenis leukosit biasanya ditemukan jumlah granulosit kurang dari 50% (Klippel, 2001).

2.5.4 Inflamasi Sinovium (Sinovitis)

Abnormalitas dari struktur dan fungsi sinovium merupakan manifestasi klinis yang utama pada penyakit artritis reumatoid. Kelainan yang terjadi adalah inflamasi pada membrana sinovial yang disebut dengan sinovitis (Kirkham, 1996).

Karakteristik sinovitis sangat bervariasi, tergantung pada lamanya dan aktifitas penyakit, sehingga gambaran histologis sendi artritis reumatoid memiliki sangat banyak variasi. Pada suatu keadaan yang ekstrim terlihat adanya proliferasi dari granulasi dini jaringan dengan tanda-tanda edema, bengkakan dan eksudasi leukosit polimorfonuklear. Pada keadaan ekstrim yang lain dapat terlihat gejala *burned out*, yaitu terjadinya fibrosis yang menyeluruh dipadati oleh infiltrasi sel inflamasi.

Kejadian yang paling dini pada artritis reumatoid sulit untuk ditentukan, namun kemungkinan kerusakan mikrovaskular dan adanya proliferasi sedang dari sel sinovial merupakan lesi yang pertama. Biopsi jaringan sinovial pada fase inisiasi hanya memperlihatkan proliferasi sedang dari sel *synovial lining* dan limfosit perivaskuler. Leukosit polimorfonuklear kadang-kadang terlihat pada bagian superfisial jaringan sinovial. Pembuluh darah kecil yang abnormal terlihat dipenuhi oleh sel inflamasi dan trombosit.

Pada fase akut artritis reumatoid, leukosit polimorfonuklear bermigrasi bersama-sama dengan cairan edema kedalam rongga sinovial. Sel infiltrasi utama terutama pada lesi yang baru adalah limfosit kecil. Sel-sel ini tersebar dalam dua pola, yaitu tersebar merata pada bagian superfisial jaringan sinovial. Sedangkan pola lain yaitu sel-sel berkelompok dalam bentuk agregasi noduler kecil, biasanya sel-sel tersusun sekitar pembuluh darah kecil. Nodul ini berbeda dengan nodul limfoid, dimana tidak terdapat kerangka retikuler. Bila lesi berlangsung lama kadang-kadang dapat juga terlihat folikel limfoid dengan *germinal center*.

Pada artritis reumatoid yang berlangsung lama, sel yang menginfiltrasi jaringan didominasi oleh sel plasma yang memproduksi imunoglobulin.

Dari gambaran histopatologis jaringan sinovial pada artritis reumatoid terlihat adanya hiperplasia sel sinovial, infiltrasi oleh sel plasma, limfosit, makrofag dan sel mast. Disamping itu terjadi pertumbuhan yang berlebihan dari jaringan granulasi fibrovaskular yang dapat meluas dan bersifat destruktif, dikenal sebagai *pannus*. Bila penyakit artritis reumatoid menjadi lanjut dan progresif, *pannus* akan menutupi rawan sendi, bersifat invasif terhadap rawan sendi dan tulang, terutama pada bagian tulang yang tidak di lindungi oleh membrana sinovial (*bare area*) sehingga dapat menimbulkan terjadinya erosi tulang rawan sendi. Hiperplasia sinovium pada artritis reumatoid merupakan salah satu karakteristik dari artritis reumatoid. Komponen utama dari *pannus* adalah pembentukan pembuluh darah baru (Schreiber, 1994).

Inflamasi merupakan respon yang terjadi untuk melindungi tubuh dari penyebab kerusakan sel seperti mikroba atau toksin dan konsekuensi dari kerusakan sel tersebut seperti nekrosis sel atau jaringan. Respon inflamasi terjadi pada jaringan ikat yang mempunyai pembuluh darah. Respon inflamasi ini melibatkan pembuluh darah, plasma, sel dalam sirkulasi (netrofil, monosit, eosinofil, limfosit, basofil dan trombosit), sel di jaringan ikat (sel mast, fibroblas, makrofag dan limfosit). Disamping itu respon inflamasi juga melibatkan ikat matriks ekstraseluler di jaringan seperti protein yang berstruktur serat (kolagen dan elastin), glikoprotein adesif (fibronektin, laminin, kolagen nonfibril, tenaskin dan lain-lain) dan proteoglikan.

Secara klinis respon inflamasi memperlihatkan lima gejala klasik yaitu:

1. *Rubor* (warna kemerahan)
2. *Tumour* (adanya pembengkakan)

3. *Calor* (rasa panas)
4. *Dolor* (nyeri)
5. *Functio laesa* (gangguan fungsi).

Gambaran utama respon inflamasi adalah vasodilatasi pembuluh darah untuk meningkatkan aliran darah, peningkatan permeabilitas pembuluh darah yang memungkinkan komponen cair memasuki tempat terjadinya proses inflamasi, dan infiltrasi seluler oleh kemotaksis atau pergerakan spontan dari sel inflamasi menembus dinding pembuluh darah ketempat terjadinya proses inflamasi.

Kemotaksis merupakan proses pergerakan leukosit di jaringan sesudah keluar dari pembuluh darah karena adanya tarikan secara kimia. Granulosit, monosit dan limfosit memberikan respon terhadap stimulus kemotaktis dengan kecepatan yang bervariasi. Sebagai kemoatraktan dari agen eksogen adalah peptida dari terminal asam amino *N-formyl-methionin* dan lemak yang merupakan produk bakteri. Sedangkan mediator kimia yang merupakan kemoatraktan dari agen endogen adalah komponen komplemen terutama C5a, produk dari lipoksigenase terutama leukotren B4 (LTB4) dan sitokin terutama dari famili kemokin seperti IL-8 (Cotran et al., 1999).

Respon inflamasi terjadi dalam empat fase:

1. Respon vaskular akut terjadi beberapa detik setelah injuri dan berakhir dalam beberapa menit. Vasodilatasi dan peningkatan permeabilitas kapiler menimbulkan hiperemia yang menyebabkan eritema dan edema jaringan, dan dikenal sebagai reaksi *wheal* dan *flare*.

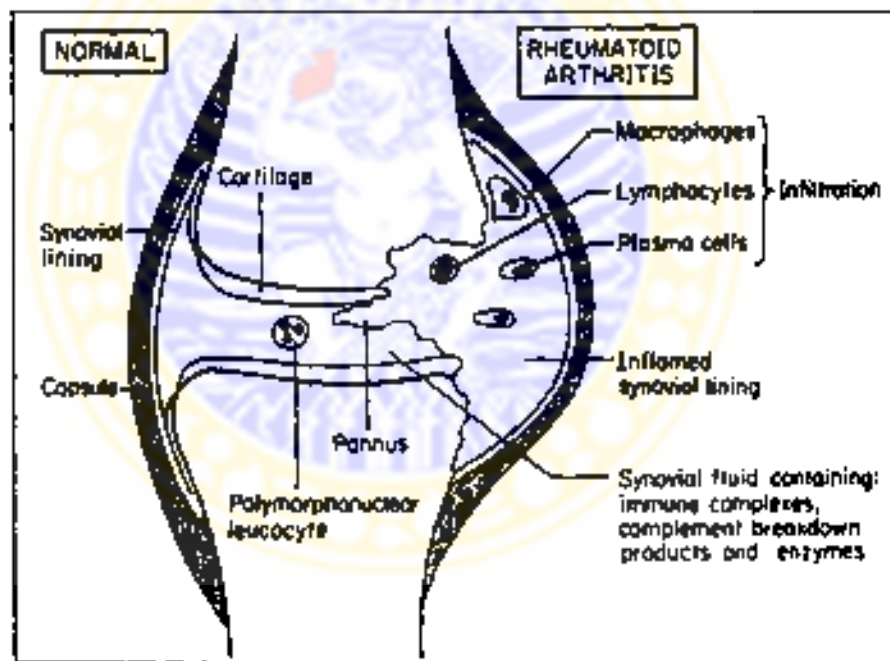
2. Respon seluler akut terjadi setelah beberapa jam berikutnya. Tanda yang khas dari fase ini adalah adanya infiltrat sel polimorfonuklear terutama netrofil di jaringan. Sel ini melekatkan diri pada sel endotel pembuluh darah dan kemudian melalui proses diapedesis berpindah ke jaringan. Pada fase ini eritrosit dapat juga menembus pembuluh darah sehingga menimbulkan hemoragi.
3. Respon kronik seluler terjadi bila kerusakan yang terjadi berat, dan terjadi beberapa hari berikutnya. Tanda yang khas dari fase ini adalah adanya infiltrat sel mononuklear yang terdiri dari monosit dan limfosit.
4. Fase resolusi yaitu fase pemulihan jaringan menjadi normal yang terjadi setelah beberapa minggu berikutnya. Jaringan dapat menjadi jaringan parut atau terbentuk granuloma.

Berdasarkan keempat fase di atas respon inflamasi dibagi menjadi dua yaitu akut atau kronik. Inflamasi akut meliputi fase 1 dan 2, sedangkan inflamasi kronik meliputi fase 3 dan 4 (Austyn and Wood, 1994)

Pada artritis reumatoid, sinovium berubah secara dramatis. Perubahan yang terjadi sangat bervariasi sehubungan dengan kronisitas penyakit. Pada awal penyakit, edema jaringan merupakan gambaran yang menonjol. Pada fase ini proliferasi pembuluh darah terlihat nyata dan hiperplasia *synovial lining* sudah dapat terlihat sedangkan pada lapisan *sublining* terdapat sedikit infiltrat inflamasi. Infiltrat inflamasi mengandung sel limfosit dan neutrofil. Apabila penyakit masuk pada fase kronik, hiperplasia lapisan intima (*synovial lining*) lebih menonjol, kadang-kadang jaringan hiperplasia ini meluas ke bagian dalam sampai mencapai ketebalan 10 sel. Penebalan ini adalah karena peningkatan jumlah sinovisit A dan

B. Tidak diketahui apakah peningkatan jumlah sel ini terjadi karena replikasi insitu atau oleh migrasi sel baru ke *synovial lining* (gambar 2.1) (Chapel and Haeney, 1988).

Lapisan subintima (*sublining*) pada artritis reumatoid kronik, juga mengalami perubahan yang dramatis dalam jumlah dan jenis sel yang menginfiltrasi. Lapisan ini diinfiltrasi oleh sel mononuklear meliputi sel T, sel B, makrofag dan sel plasma. Dari jenis sel yang menginfiltrasi terdapat tiga zona yaitu zona sel plasma yang mengandung 75% sel plasma, zona limfosit yang mengandung 80% limfosit dan zona transisi yang mengandung sel blas, limfosit kecil, makrofag, *macrophage like cell* dan sel dendrit.



Gambar 2.4 : Diagram perbandingan gambaran patologi sendi artritis di satu sisi dengan gambaran normal disisi lain
Dikutip dari : Chapel and Haeney (1988)

Sinovium memperlihatkan adanya gambaran folikel dengan *germinal center* sehingga terlihat sebagai limfonodus aktif. Karena itu kuat dugaan bahwa

sintesis imunoglobulin oleh jaringan sinovial berasal dari limfonodus ini (Roit,1997).

Pembuluh darah pada sinovium meningkat jumlahnya secara sangat menyolok. Pada beberapa kasus jumlah vena meningkat dengan ekstrim sehingga terlihat gambaran histologis yang khas berupa jaringan yang berlubang-lubang, menyerupai "Swiss cheese" (Firestein,1994).

Dalam rongga intra artikular pada artritis reumatoid yang aktif terjadi peningkatan jumlah cairan sinovial sehingga membentuk efusi. Cairan sinovial tidak berwarna, transparan dan kental. Kekentalan cairan sinovial berkurang dari pada normal. Hal ini terlihat dari rentangan tetesan cairan sinovial, di mana pada keadaan normal terdapat rentangan sepanjang kurang lebih 10 cm. Sedangkan pada AR rentangan hanya terlihat kurang dari 5 cm. Kurangnya kekentalan cairan sinovial adalah karena tingginya jumlah sel inflamasi dan adanya enzim-enzim yang mengurangi hialurona.

Jumlah sel leukosit dalam cairan sinovial pasien AR mengandung leukosit dengan jumlah 2.000-30.000/ml. Kadang-kadang pada pasien AR terjadi peningkatan leukosit yang ekstrim sampai lebih dari 50.000/ml.

Jenis leukosit yang terdapat dalam cairan sinovial terdiri dari 70% sel netrofil, 20% sel mononuklear, sel lining, sel dendrit dan sel histiosit. Disamping itu terdapat enzim protease dan kolagenase, kompleks imun dan kriopresipitat yang mengandung IgG dengan faktor reumatoid (Chapel and Haency, 1988; Klippel, 2001)

2.5.5 Neovaskularisasi Sinovium

Neovaskularisasi atau angiogenesis adalah pembentukan pembuluh darah baru pada hiperplasia membrana sinovial merupakan ciri utama artritis reumatoid (Buckley, 1997).

Proses terjadinya angiogenesis sangat kompleks, dimana pembuluh darah baru berkembang dari membrana basalis akibat adanya stimulus angiogenik. Faktor-faktor yang merangsang terjadinya angiogenesis antara lain adalah molekul solubel seperti yang di sekresi oleh tumor yang solid, *fibroblast growth factors* (FGF)- α dan β , *transforming growth factors*- β (TGF- β), TNF- α , heparin, prostaglandin E dan *platelet activating factor*. Faktor yang tidak merupakan molekul solubel yang dapat merangsang angiogenesis adalah molekul yang terdapat pada matriks ekstra seluler seperti laminin, fibronectin, kolagen. Faktor mekanik seperti sinyal kimia dapat juga mempengaruhi pembentukan pembuluh darah baru.

Beberapa tipe sel seperti makrofag, limfosit, leukosit PMN, sel mast dan fibroblas dengan sekret yang diproduksinya dapat merangsang terjadinya angiogenesis. Tipe sel ini terlibat meningkat jumlahnya pada artritis reumatoid, dan kombinasi dari sel dan sekretnya berperan pada pembentukan pembuluh darah baru selama perkembangan terjadinya panus. Makrofag yang diisolasi dari membrana sinovial dapat menstimulasi angiogenesis, di duga yang berperan pada proses ini adalah TNF- α dan TGF- β (Schreiber, 1994).

Gambaran histologis dari membrana sinovial artritis reumatoid memperlihatkan gambaran adanya hiperplasia sel sinovium, infiltrasi oleh sel plasma, limfosit, makrofag dan sel mast, dan pertumbuhan yang berlebihan

jaringan granulasi fibrofaskular yang dikenal sebagai panus. Komponen utama pada panus adalah pembentukan pembuluh darah baru. Hal ini telah dibuktikan dari hasil penelitian Folkman dkk, bahwa pembentukan panus dan destruksi tawar sendi tidak terjadi tanpa adanya pembentukan pembuluh darah baru. Faktor-faktor yang mengontrol angiogenesis pada jaringan sinovial artritis reumatoid belum diketahui dengan pasti (Schreiber, 1996).

Walaupun jaringan sinovial di penuhi oleh pembuluh darah dengan densitas yang tinggi, tapi tidak cukup untuk memenuhi suplai jaringan di sekitarnya. Hal ini terlihat dengan adanya hipoksia dan asidosis jaringan. Dari pemeriksaan morfometri kapiler terlihat bahwa pertumbuhan jaringan sinovial tidak sebanding dengan pembentukan pembuluh darah baru, akibatnya akan terjadi iskemia lokal. Pengulangan gerak fleksi dan ekstensi ikut berperan dalam menyebabkan iskemia. Demikian juga dengan akumulasi makrofag yang sudah diaktifasi dan neutrofil, merupakan sumber nitrogen dan oksigen reaktif yang berbahaya pada sendi. Peningkatan metabolisme jaringan dan penurunan suplai karena peningkatan tekanan intra artikular dan kapiler yang kolaps mengaktifkan faktor angiogenesis yang mendorong terjadinya pertumbuhan pembuluh darah.

Hipoksia jaringan dan adanya IL-1 akan menstimulasi *fibroblast like synoviosyte* (FLS) untuk memproduksi *vascular endothelial growth factor* (VEGF) pada lapisan intima dari sinovial lining. Faktor angiogenesis lain seperti *fibroblast growth factor* (FGF), TNF- α dan selektin-E solubel yang diproduksi pada sendi artritis reumatoid ikut berperan pada proliferasi pembuluh darah.

Pembuluh darah, terutama HEV (*high endothelial vessels*) pada jaringan sinovial mengekspresikan molekul adesi yang berperan dalam merekrut sel

inflamasi. Reseptor untuk VLA-4 (*very late activation antigen-4*) (seperti VCAM-1, CS1 fibro-nectin), ligan integrin- β 2 (seperti ICAM), selektin-E dan selektin-P berikatan dengan jaringan sinovial yang inflamasi (Firestein, 1999).

2.5.6 Mekanisme Kerusakan Sendi

Kerusakan sendi pada artritis reumatoid terjadi pada tulang rawan sendi, ligamen, tendon dan tulang. Proses kerusakan pada jaringan tersebut terjadi dengan melibatkan beberapa mekanisme (tabel 2.1). Mediator-mediator inflamasi dan enzim yang terdapat didalam cairan sinovial memberikan efek langsung pada tulang rawan sendi. Pusat erosi tulang berkembang pada bagian tepi antara tulang dan rawan sendi yang di invasi oleh membrana sinovial (*pannus*).

Tabel 2.1: Mekanisme kerusakan sendi pada artritis reumatoid

Mekanisme	Molekul yang berperan	Asal sel
Diferensiasi makrofag di jaringan sinovial menjadi osteoklas	<i>Osteoclast-differentiating factor</i>	Sel T, fibroblas di jaringan inovial
Diferensiasi dan aktivasi osteoklas	IL-1, TNF- α , IL-6, IL-11, IL-17	Sel T, makrofag di jaringan sinovial
Penurunan produksi proteoglikan oleh khondrosit	IL-1, TNF- α	Makrofag di jaringan sinovial
Menurunnya kolagen, proteoglikan, laminin, fibronektin, elastin	<i>Matrix metalloproteinases (MPS)</i>	Makroag dan fibroblas di jaringan sinovial, khondrosit
Menurunnya kolagen, proteoglikan, laminin, fibronektin, elastin	<i>Cathepsins L, B</i>	Makroag dan fibroblas di jaringan sinovial, khondrosit
Menurunnya kolagen tipe II	<i>Cathepsins K, tartrate-resistant acid phosphatase</i>	Osteoklas

Di kutip dari : Klippel (2001).

Osteolisis pada jaringan subkondral mungkin di mulai dari sumsum tulang terlebih dahulu dari pada inflamasi jaringan sinovial. Pada proses kerusakan jaringan, tidak hanya tulang rawan sendi dan tulang yang menjadi sasaran, tetapi khondrosit dan osteoklas secara aktif ikut menyebabkan hilangnya matriks ekstra sel (Klippel,2001).

Proses erosi tulang dan kerusakan tulang rawan sendi mungkin merupakan proses yang berbeda. Erosi tulang terutama terjadi akibat osteoklas yang aktif, sedangkan proses kerusakan tulang rawan sendi terjadi akibat degradasi tulang rawan sendi oleh enzim proteolitik yang di hasilkan oleh sinoviosit pada daerah panus, atau yang dilepaskan oleh sel granulosit pada cairan sinovial. Osteoklas akan mengekspresi RANK (*Receptor activator nuclear factor κ B*) yang akan teraktifasi setelah berikatan dengan ligandnya yaitu RANKL (*Receptor activator nuclear factor κ B ligand*), yang di produksi oleh FLS atau limfosit T (Sunaryono, 2002).

Sel netrofil sangat sedikit ditemukan pada jaringan sinovial yang berproliferasi. Hal ini sangat berlawanan dengan cairan sinovial, dimana terdapat sangat banyak netrofil. Hal ini di sebabkan karena netrofil beradesi dengan endotel pada vena poskapiler karena adanya aktivasi oleh mediator TGF- β dan IL-8 yang meningkatkan kemampuan netrofil untuk berkumpul di dalam cairan sinovial. Disamping itu melalui jalur klasik, kemoatraktan dan C5a yang terdapat di jaringan sinovial sendi akan mengaktifkan pembentukan kompleks imun dan lekotrin-B₄. Dengan adanya sitokin dan fagositosis kompleks imun oleh netrofil merangsang produksi prostaglandin dan leukotrin dan degranulasi netrofil yang menyebabkan akumulasi proteinase aktif dan metabolit oksigen.

Degradasi tulang rawan dan tulang subkondral terjadi sebagai akibat adanya enzim-enzim proteolitik. Mekanisme proteolitik bisa di kelompokkan menjadi dua jalur, yaitu jalur ekstra seluler yang melibatkan *matrix metalloproteinase* (MMP) dan proteinase serine yang aktif pada pH rendah. Pada AR di dapatkan sejumlah besar MMP1 terutama pada daerah *cartilage-pannus junction* (CPJ), serta MMP13 dan MMP3 dalam jumlah yang lebih kecil. MMP1 akan merusak kolagen tipe I, II, III IV dan X. Pada CPJ sel yang memproduksi MMP1 adalah FLS, selain itu khondrosit juga dapat memproduksi MMP1 dalam jumlah yang lebih kecil. Pada daerah non CPJ, MMP1 di produksi oleh FLS, makrofag dan sel-sel pada lapisan *sublining*, sedangkan MMP13 hanya diproduksi oleh FLS. MMP13 ini dapat mendegradasi kolagen tipe II, IV, IX dan X serta *agrecan* (proteoglikan). Matriks ekstraseluler tulang rawan terutama terdiri dari kolagen tipe II dan proteoglikan. Proteoglikan cepat didegradasi tetapi juga dapat segera di ganti. Kolagen, lambat di degradasi, tetapi sekali didegradasi tidak pernah di ganti kembali, sehingga degradasi kolagen merupakan kunci pada kerusakan jaringan ikat (Sumaryono, 2002).

2.6 Imunopatogenesis Arthritis Reumatoid

Walaupun etiologi arthritis reumatoid belum diketahui, tapi dengan kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi telah terjadi perkembangan yang pesat tentang patogenesis artitis reumatoid. Kalau dahulu arthritis reumatoid di kenal sebagai penyakit kolagen maka saat ini telah diketahui bahwa arthritis reumatoid merupakan penyakit autoimun.

Dasar imunopatogenesis artritis reumatoid:

1. Klinis
 - a. Limfadenopati dan splenomegali pada sebahagian kecil pasien
 - b. Perbaikan setempat setelah di lakukan sineviektoni
 - c. Perbaikan menyeluruh setelah drainase duktus torasikus atau radiasi total l
imfonodus
2. Model eksperimental
 - a. *Antigen-induced arthritis*
 - b. *Adjuvant-induced arthritis*
 - c. *Streptococcal cell wall-induced arthritis*
 - d. *Collagen Induced-arthritis*
 - e. *MRL/l arthritis*
3. Genetik
 - a. Riwayat keluarga dan insiden pada kembar monozigot
 - b. Hubungan yang kuat dengan gen utama dari sistem histokompatibilitas
4. Humoral
 - a. Immunoglobulin serum meningkat
 - b. Sering terjadi anti-immunoglobulin (Faktor reumatoid)
 - c. Produksi immunoglobulin dan anti-immunoglobulin oleh sel plasma pada jaringan sinovial setempat
 - d. Adanya kompleks imun dan komponen komplemen dalam cairan sinovial yang signifikan dengan aktivasi imun
 - e. Sering di temukan antibodi terhadap tipe kolagen tertentu

5. Selular

- a. Gambaran histopatologi jaringan sinovial yang khas, dengan infiltrasi limfosit, sel blast, plasmablast, sel plasma dan makrofag
- b. Infiltrasi limfosit-T di jaringan sinovial
- c. Kemampuan non-sel T di cairan sinovial dan *macrophagelike cell* yang mengekspresikan HLA-DR di jaringan sinovial, untuk menstimulasi limfosit T autologus dan alogenk
- e. Reaktivitas seluler terhadap tipe kolagen tertentu
- f. Aktifasi limfosit secara spontan di cairan sinovial secara invitro (Silver and Zveifler, 1985)

Artritis reumatoid termasuk penyakit autoimun kompleks ditandai oleh inflamasi sendi kronik, yang menyebabkan erosi rawan sendi dan sendi. Pencetus terjadinya inflamasi diduga karena adanya sel T autoreaktif, yaitu sel T yang secara spontan keluar dari pembuluh darah untuk merespon *self-antigen* yang bersifat artritogenik di jaringan sinovial (Thomas and Lipsky, 1996; Klingerhöfer et al, 1999).

Respon imun yang terjadi di jaringan adalah dengan memproduksi sitokin TNF- α dan GM-CSF (*granulocyte monocyte-colony stimulating factor*). TNF- α berperan dalam perubahan sel T *naive* menjadi sel T memori sehingga sel T memori dapat menjalankan fungsinya sebagai respon imun seluler, melalui kemampuan dalam memproduksi sitokin.

Pada artritis reumatoid sitokin yang berperan pada proses inflamasi (sitokin pro-inflamasi) adalah sitokin yang di sekresi oleh sel T memori grup CD4 dari subset Th1 yaitu interleukin-2 (IL-2) dan interferon- γ (IFN- γ).

Sedangkan Th2 mensekresi sitokin IL-10 (sitokin anti-inflamasi) yang bekerja menghambat aktifitas Th1. Karena itu artritis reumatoid di kenal sebagai penyakit autoimun yang di atur oleh sitokin Th1 atau *Th1 dependent* (Thomas and Lipsky,1997; Cutolo et al., 1998)

Patogenesis inflamasi sendi pada artritis reumatoid melibatkan sel yang merupakan komponen intrinsik pada jaringan sinovial (sel fibroblas, sinoviosit A dan sel dendritik) dan sel inflamasi yang bermigrasi dari pembuluh darah ke jaringan sinovial (monosit/ makrofag dan limfosit T terutama dari grup CD4). Sel-sel tersebut saling mempengaruhi secara unik untuk mengaktifkan ekspresi molekul adesi ICAM-1 dan VCAM-1 pada sel endotel pembuluh darah. Kemokin dari *stimulating factor* dan sitokin pro-inflamasi yang dihasilkan oleh sel pada tempat inflamasi secara intensif berperan pada terjadinya inflamasi (Sieper, 2000).

2.6.1 Molekul Adesi

Fenomena *homing* yang di miliki oleh leukosit sangat penting bagi sistem imun dalam kapasitasnya untuk melindungi jaringan, yaitu dengan kemampuan leukosit terutama subpopulasi limfosit T bermigrasi ke jaringan.

Limfosit T yang berasal dari timus (*resting T lymphocyte*) akan berlokasi dalam jaringan limfoid sekunder. Stimulasi oleh antigen spesifik melalui kompleks peptida-MHC akan mengaktifasi limfosit T (*activated T lymphocyte*). Pada keadaan inflamasi, limfosit T yang telah di aktifasi ini meningkat dan melalui pembuluh darah akan menuju ketempat proses inflamasi kemudian bermigrasi ke jaringan. Untuk dapat masuk ke jaringan non-limfoid, limfosit T

pertama kali harus melekat (adesi) pada endotel pembuluh darah setempat dan menembus dinding pembuluh darah dengan diapedesis (Austyn and Wood,1994).

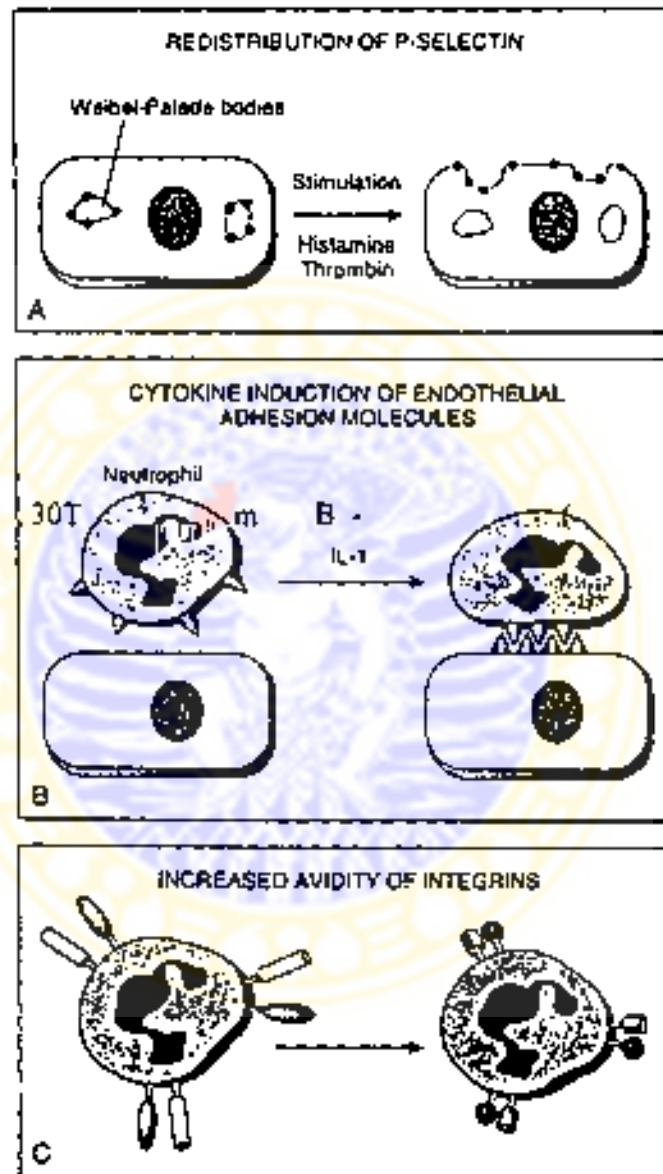
Molekul sel endotel yang berperan sebagai molekul adesi untuk leukosit di sebut sebagai *vascular addressin*. Ekspresi molekul adesi dapat di induksi pada sel endotel yang berdekatan dengan tempat terjadinya inflamasi. Populasi leukosit yang berbeda akan direkrut secara spesifik ke area tertentu tergantung pada ekspresi molekul adesi yang sesuai. Kemotaksis atau pergerakan sel langsung ke jaringan selanjutnya di kontrol oleh molekul kemotaktik yang di produksi pada tempat terjadinya inflamasi (Bradley and Watson ,1996)

Vascular addressin yang di ekspresikan oleh leukosit berperan sebagai mediator untuk adesi leukosit dengan sel endotel dan interaksinya dengan sel tipe lain serta matriks ekstraselular di jaringan. Jenis molekul adesi utama yang berperan pada proses migrasi sel adalah *selectin*, *integrin*, *immunoglobulin superfamily*, *mucin-like molecule* dan CD44 (Austyn and Wood ,1994)

2.6.1.1 Selektin

Selektin merupakan glikoprotein transmembran, di tandai dengan adanya domain *lectin-like* pada porsi ekstraselular yang berikatan dengan terminal-N dari karbohidrat. Ikatan selektin terjadi melalui domain lektinnya dengan bentuk sialat dari oligosakarida (*sialylated Lewis X*). Sialat secara kovalen berikatan dengan beberapa *mucin-like glycoproteins* seperti Gly CAM-1, PSGL-1, ESL-1 dan CD34. Selektin terutama diperlukan untuk migrasi leukosit ke jaringan yang spesifik. Selektin dapat di ekspresikan oleh leukosit, sel endotel dan trombosit. Tergantung kepada jenis sel yang mengekspresikannya, selektin diklasifikasikan menjadi tiga yaitu selektin-L, selektin-E dan selektin-P.

Selektin-L (CD62L) merupakan selektin yang di ekspresikan oleh leukosit pada umumnya dan di sebut juga sebagai MEL-14, berfungsi sebagai reseptor homing dengan peran utama adalah dalam proses *rolling* atau menggelindingnya sel neutofil, monosit dan limfosit sepanjang endotel dinding pembuluh darah.



Gambar 2.5 : Redistribusi selektin
 Di kutip dari : Cotran et al. (1999).

Selektin-E (CD62E) merupakan selektin yang diekspresikan oleh sel endotel dan dikenal sebagai ELAM-1 (*endothel-leucocyte adhesion molecule-1*).

Dalam keadaan normal molekul selektin-E tidak diekspresikan oleh sel endotel. Selektin-E disintesis oleh sel endotel sebagai respon terhadap adanya agen inflamasi yaitu dengan induksi oleh IL-1 dan TNF. Molekul ini berperan sebagai mediator untuk adhesi dengan reseptornya pada sel T memori, NK, neutrofil dan monosit.

Selektin P (CD62P) diekspresikan oleh *platelet* (trombosit) dan endotel, dikenal sebagai GMP 140 atau PADGEM. Selektin-P biasanya terdapat di dalam granula dari sel endotel dan trombosit. Granula ini disebut *Weibel-Palade bodies*. Molekul selektin dimobilisasi ke permukaan sel sebagai respon terhadap adanya agen trombogenik yang diproduksi selama reaksi kloting seperti histamin, trombin dan *platelet-activating factor* (PAF) pada tempat inflamasi. Proses redistribusi molekul selektin-P ke permukaan sel terjadi hanya dalam beberapa menit. Proses ini terutama penting untuk awal mengelindingnya leukosit pada endotel (gambar 2.3) (Bradley and Watson, 1996; Cotran et al., 1999).

2.6.1.2 Integrin

Integrin termasuk famili glikoprotein heterodimer transmembran. Integrin merupakan mediator adhesi antara sel dan antara sel dengan matriks ekstra sel pada respon imun dan respon inflamasi. Integrin dalam keadaan normal diekspresikan oleh leukosit dengan afinitas rendah sehingga tidak dapat berikatan dengan ligan ICAM-1 pada endotelium. Induksi oleh sitokin dan kemokin akan mengaktifkan leukosit sehingga terjadi konversi afinitas integrin. Integrin dengan afinitas tinggi dapat berikatan dengan ligan ICAM-1 dari endotelium.

Terdapat beberapa subfamili dari integrin yaitu rantai α , β 1, β 2 dan β 3. Rantai α ditandai sebagai CD11a, CD11b dan CD11c. Rantai β 1 dan β 3 ditandai sebagai CD29, CD49 dan CD51/61, diekspresikan dalam waktu lama sesudah aktivasi sel T sehingga disebut sebagai *very late antigen* (VLA). Sedangkan integrin rantai β 2 ditandai sebagai CD18. Dari semua subunit ini yang utama adalah *leucocyte integrins*, yang merupakan kloning rantai β 2 dan α . Integrin ini ditandai sebagai CD11a/CD18. Semua limfosit T mengekspresikan integrin leukosit dan dikenal sebagai *Lymphocyte function-associated antigen-1* (LFA-1). LFA-1 berperan sebagai mediator untuk adesi limfosit T dengan sel dari tipe yang lain, termasuk APC (*antigen presenting cells*). LFA-1 diekspresikan oleh limfosit T dan limfosit B, sel myeloid (monosit, makrofag dan granulosit), sel NK dan sel dendrit. Prekursor sel myeloid dan eritroid tidak mengekspresikan LFA-1.

Reseptor integrin yang utama untuk ICAM-1 adalah LFA-1 (integrin- β) dan MAC-1 (CD11a/CD18 dan CD11b/CD18). Sedangkan reseptor integrin untuk VCAM-1 adalah VLA-4 (integrin- α 4 β 1) (Bradley and Watson, 1996; Cotran et al., 1999).

2.6.1.3 Immunoglobulin Superfamili

Vascular addressin utama yang merupakan bagian dari *immunoglobulin gene superfamily* adalah ICAM (*intercellular adhesion molecule*) dan VCAM (*vascular cell adhesion molecule*).

Terdapat tiga macam *intercellular adhesion molecules* yang mirip satu sama lain dan semuanya berikatan dengan integrin LFA-1 dari sel T yaitu ICAM-1, ICAM-2 dan ICAM-3. ICAM-1 dan ICAM-2 diekspresikan oleh sel endotel

dan juga APC, dimana ikatan ini memungkinkan limfosit bermigrasi melalui dinding pembuluh darah. Sedangkan ICAM-3 di ekspresikan oleh leukosit, untuk ikut berperan pada adesi antara limfosit T dan APC.

ICAM-1 (CD54) merupakan *vascular addressin* utama untuk limfosit T. Ekspresinya pada sel endotel dapat diinduksi oleh sitokin seperti IL-1, TNF- α dan IFN- γ . ICAM-1 juga di ekspresikan sedikit oleh sel limfosit dalam darah perifer. Ekspresi ICAM-1 akan meningkat dengan stimulasi mitogen limfosit T atau transformasi Epstein-Barr virus (EBV) limfosit B. Ekspresi ICAM-1 penting untuk adesi limfosit T dengan sel endotel dan LFA-1 APC (Collins et al., 1994).

VCAM-1 terdiri dari Athero-ELAM yang terdapat pada lesi aterosklerosis pada kelinci, dan PECAM-1 yang merupakan *addressin* untuk monosit dan neutrofil. VCAM-1 berperan penting dalam adesi limfosit, monosit dan eosinofil pada sel endotel melalui interaksi antara integrin β 1. Ekspresi VCAM-1 pada sel endotel di tempat inflamasi di induksi oleh monokin (Tessier et al., 1996).

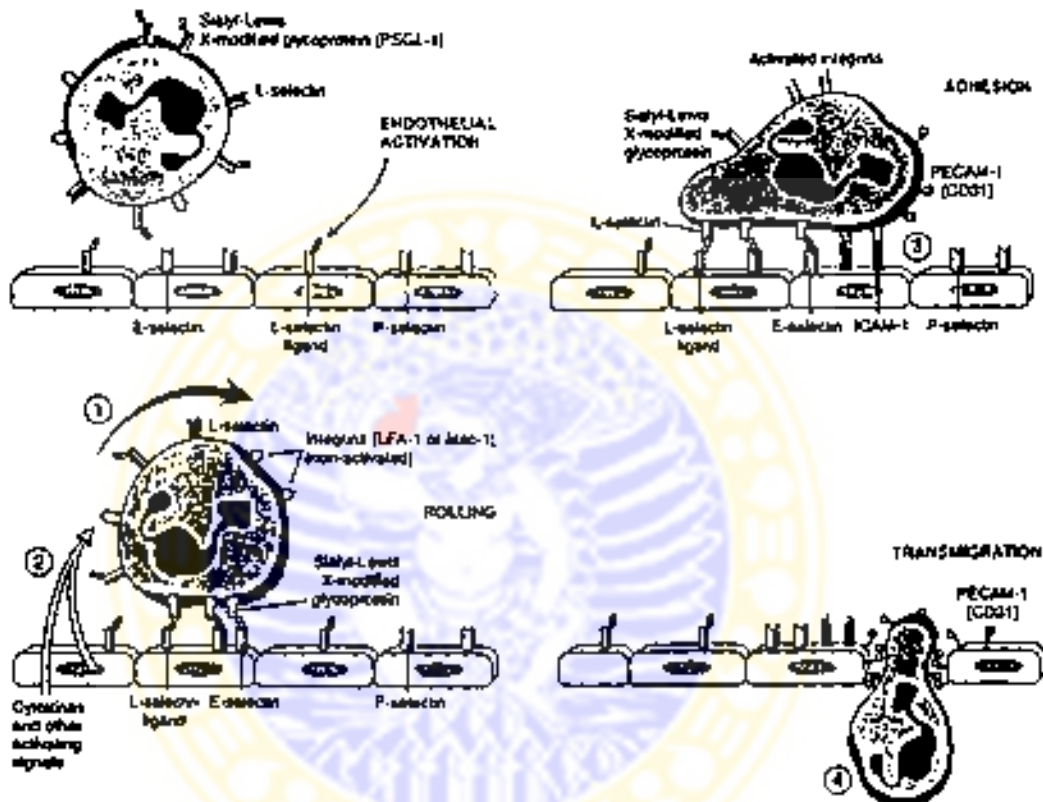
Bila terdapat suatu antigen di jaringan, maka makrofag dan limfosit T jaringan akan memproduksi sitokin. Sitokin akan mengaktifasi sel endotel untuk mengekspresikan selektin-E, VCAM-1 dan ICAM-1 sehingga dapat berikatan dengan reseptor VLA-1 dan LFA-1 dari sel limfosit T yang sudah diaktifasi. Keadaan ini memudahkan migrasi sel ke jaringan.

Proses migrasi sel ke jaringan terjadi melalui beberapa tahap yaitu (Janeway and Travers, 1994; Gabriel and Kindermann, 1997; Cotran et al., 1999):

Tahap I : Selektin-P dan selektin-E di ekspresikan oleh sel endotel beberapa saat setelah adanya induksi TNF α . Selektin ini akan berikatan

dengan leukosit, menimbulkan perlekatan yang lemah antara leukosit dengan sel endotel.

Tahap 2: Aliran darah tidak dapat melepaskan ikatan ini, bahkan akan pembunuh darah.



Gambar 2.6 : Proses migrasi sel ke jaringan
Di kutip dari : Cotran et al.(1999)

Tahap 3: Terjadi perlekatan yang lebih kuat antara leukosit dengan endotel dengan adanya interaksi antara integrin leukosit (LFA-1, Mac-1) dengan ICAM-1. Ekspresi ICAM-1 pada sel endotel diinduksi oleh TNF α . Perlekatan ini makin kuat karena leukosit di aktifasi oleh faktor kemotaktik seperti leukotrin B₄, *platelet activating factor* dan IL-8, yang meningkatkan afinitas LFA-1 dan Mac-1

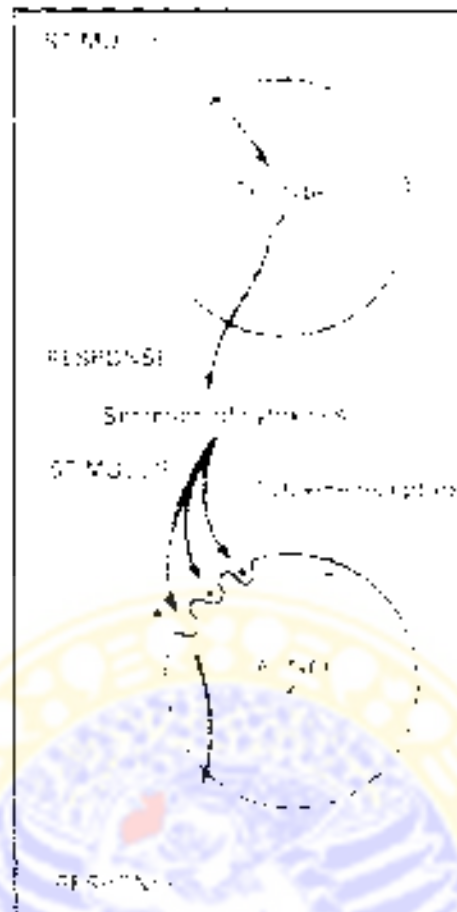
untuk ICAM-1. Kuatnya perlekatan antara leukosit dengan sel endotel menyebabkan sel berhenti menggelinding.

Tahap 4: Leukosit menembus dinding pembuluh darah dengan proses diapadesis melalui celah antar sel. Molekul adesi yang berperan pada tahap ini adalah LFA-1 dan Mac-1 yang diekspresikan oleh leukosit, dan PECAM (CD31) yang diekspresikan oleh leukosit dan sel endotel pada daerah antar sel (gambar 2.6).

2.6.2 Sitokin

Sel dalam sistem imun dapat berkomunikasi satu sama lain selama respon imun melalui molekul yang disebut sebagai sitokin. Sitokin disekresi oleh satu sel yang berikatan dengan reseptor spesifik dari membran sel yang sama atau sel yang berbeda. Dalam sistem imun sitokin dapat diidentikkan dengan hormon (gambar 2.7) (Austyn and Wood, 1994).

Sitokin merupakan mediator yang penting untuk interaksi antara sel imunokompeten. Sitokin berperan sebagai mediator jarak jauh untuk komunikasi antara sel yang tersebar luas didalam tubuh, atau komunikasi jarak dekat antara sel yang berdekatan. Secara umum sitokin berperan sebagai parakrin bila diproduksi oleh satu sel dan beraksi terhadap sel yang lain, atau autokrin bila beraksi terhadap sel yang sama.



Gambar 2.7. Komunikasi antar sel melalui sitokin.
 Di kutip dari : Austin and Wood (1994)

Sitokin yang di produksi oleh sel berbeda akan memberikan efek yang berbeda pula. Berdasarkan kepada jenis sel dan bagaimana sitokin tersebut diproduksi, maka terdapat bermacam-macam nama sitokin. Sitokin yang diproduksi limfosit disebut limfokin, sedangkan sitokin yang diproduksi monosit disebut monokin. Penamaan lain dari sitokin dapat berasal dari mana sel tersebut asalnya, seperti *interferon* (IFN) dan *tumor necrosis factor* (TNF). Sedangkan istilah *interleukin* berasal dari molekul yang berkomunikasi diantara leukosit (*inter-leucocyte*) (O'Garra and Murphy, 1994).

Sitokin yang diproduksi oleh leukosit dapat memberikan reaksi terhadap leukosit atau sel selain leukosit. Sebagai contoh, interleukin yang diproduksi oleh

sal epitel dapat menstimulasi sel dari organ non-limfoid seperti otak dan hati dan memberi efek yang berbeda dalam tubuh. Keadaan ini disebut sebagai efek pleiotropik.

Sitokin yang di produksi oleh limfosit tergantung pada subset sel limfosit yang memproduksinya. Limfosit T terdiri dari CD4 (T helper) dan CD8 (T sitotoksik). Sel T *helper* terdiri dari empat subset yaitu Th0 yang disebut juga sel T *naive*, Th1 yang disebut sel T *inflammatory*, Th2 yang di sebut sel T *helper* dan Th3 yang di sebut sel T *regulatory* atau Tr.

Sel Th1 terutama memproduksi IL-2, IFN- γ , TNF- α dan GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*). Th2 terutama memproduksi IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 dan IL-13. Sedangkan Th3 memproduksi IL-10 dan TGF- β . Monosit dan makrofag di jaringan memproduksi IL-1, IL-6, TNF- α dan faktor stimulating (Cutolo et al., 1998; Yudoh et al., 2000).

Secara fungsional, sitokin di klasifikasikan menjadi lima, yaitu:

1. *Colony-stimulating factors (CSFs)*
2. *Growth and differentiation factors*
3. *Immunoregulatory cytokines*
4. *Pro-inflammatory cytokines*
5. *Anti-inflammatory cytokines and growth and differentiation factor inhibitors*

2.6.2.1 *Colony-stimulating factors (CSFs)*

Colony-stimulating factors (CSFs), terdiri dari: GM-CSF (*granulocyte-macrophage CSF*), G-CSF (*granulocyte CSF*), M-CSF (*macrophage VSF/CSF-1*), IL-3, dan *Erythropoietin*

2.6.2.2 *Growth and differentiation factors*, terdiri dari PDGF (*platelet-derived growth factor*), EGF (*epidermal growth factor*), FGF (*fibroblast growth factor*), TGF- β (*transforming growth factor- β*), ODF (*osteoclast differentiation factors*).

2.6.2.2 *Immunoregulatory cytokines* terdiri dari IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL7, IL-9 dan IL-18.

Interferon

Interferon (IFN) berasal dari *viral interference*, yaitu suatu fenomena yang di temukan apabila binatang coba diinfeksi oleh satu jenis virus, sering terjadi proteksi terhadap jenis virus lain. IFN terdapat dalam tiga tipe yaitu IFN- α , β dan γ . IFN- α , dan IFN- β disebut sebagai interferon tipe I, sedangkan IFN- γ yang di kenal karena kemampuannya untuk melindungi sel terhadap efek sitopatik dari virus sebagai interferon tipe II. Perbedaan tipe I dan tipe II adalah bahwa interferon α dan β diproduksi leukosit dan fibroblas karena induksi oleh infeksi virus. Sedangkan IFN- γ diproduksi oleh sel T selama respon imun. Di sebabkan karena perbedaan ini maka interferon biasa juga disebut sebagai interferon leukosit, interfero fibroblas, interferon T.

Dalam aktifitas untuk imunoregulasi, IFN menstimulasi sel NK dan protein MHC, memodulasi sintesis antibodi yang tergantung limfosit T maupun tidak tergantung dengan limfosit T. Di samping itu IFN berikatan dengan *fas ligand* dari limfosit T sitotoksik CD8 dalam menginduksi apoptosis (*programed cell death*) dalam arti kata sebagai efek antiproliferasi.

Interleukin-2

Interleukin-2 (IL-2) merupakan pusat respon imun. Fungsi primer dari IL-2 adalah dalam proses proliferasi dan diferensiasi limfosit T secara autokrin dan parakrin. IL-2 diproduksi oleh limfosit T yang sudah diaktivasi. Di samping itu IL-2 mengatur ekspresi reseptor untuk IL-2 pada permukaan selnya sendiri terhadap adanya antigen. IL-2 juga berperan untuk aktivasi dan diferensiasi sel B menjadi sel yang dapat mensekresikan imunoglobulin (Austyn and Wood, 1994; O'Garra and Murphy, 1994).

2.6.2.4. *Pro-inflammatory cytokines* Sitokin yang merangsang respon imun disebut sitokin pro-inflamasi yaitu TNF- α , IL-1, IL-6 dan IL-8.

Tumour Necrosis Factor (TNF)

TNF adalah penamaan untuk molekul sitokin karena kemampuannya menyebabkan proses nekrosis untuk membunuh sel sarkoma yang ditanamkan pada tikus percobaan. Terdapat dua tipe TNF yaitu TNF- α dan β .

TNF- α atau *cachectin*, merupakan molekul yang pertama kali ditemukan menyebabkan kelaparan (*cachexia*) pada binatang coba yang menderita penyakit infeksi kronis atau keganasan. TNF- α diproduksi terutama oleh makrofag yang telah diaktivasi. Sitokin ini dan juga diproduksi oleh limfosit T, sel NK, sel tumor sel otot polos, keratinosit yang telah diaktivasi dan sel otak. Stimulus yang dapat merangsang produksi TNF- α adalah adanya infeksi seperti virus, jamur, parasit, endotoksin, enterotoksin dan C5a yang menimbulkan respon inflamasi.

Sitokin lain seperti IL-1 dan IL-2 dapat juga merupakan stimulus yang merangsang produksi TNF- α .

TNF- α mempunyai efek sitostatis langsung terhadap sel tumor dengan menginduksi proses nekrosis pada sel tumor sesuai namanya. Di samping itu mempunyai efek tidak langsung terhadap sintesis mediator lain seperti prostaglandin, protease, radikal bebas dan enzim lisosom. TNF- α dan IL-1 secara sinergis bersifat artrogenik pada hewan coba. Sitokin ini di temukan dengan konsentrasi tinggi dalam cairan dan jaringan sinovial artritis reumatoid.

TNF- β atau *lymphotoxin* dikenal sebagai mediator respon inflamasi pada hipersensitivitas tipe lambat. TNF- β di produksi oleh limfosit T yang telah di aktivasi.

Interleukin-1 (IL-1)

Pada awal mulanya IL-1 di sebut sebagai *lymphocyte activating factor (LFA)*, karena perannya dalam menstimulasi limfosit bila terdapat mitogen yang suboptimal. *Thymocyte proliferation assay* di lakukan untuk menentukan aktifitas IL-1 secara *in vitro*, dengan mitogen dosis tinggi. Pada keadaan dimana konsentrasi mitogen menurun, penambahan makrofag yang telah diaktifasi mampu mempertahankan proliferasi timosit. Agen yang diproduksi oleh makrofag tersebut memiliki karakteristik IL-1. Beberapa jenis sel lain seperti fibroblas, sel endotel, limfosit T dan B juga memiliki kemampuan untuk memproduksi IL-1.

IL-1 berperan penting dalam proses proliferasi limfosit B dan T, menginduksi netrofil dan molekul adesi pada sel endotel, dan menginduksi

GM-CSF, IL-1 dan TNF- α mempunyai aktifitas yang sama terhadap jaringan sinovial walaupun berikatan pada reseptor sel yang berbeda

Interleukin-6 (IL-6)

IL-6 merupakan contoh tipikal dari sitokin yang multifungsi. Aktifitas biologis molekul ini meliputi *B Cell differentiation factors B cell* (BCDF) dan *stimulatory factor 2* (BSF-2). IL-6 mempunyai efek stimulasi terhadap sel B untuk dapat memproduksi antibodi dan faktor reumatoid lokal pada artritis reumatoid. Sel yang memproduksi IL-6 pada AR berlokasi pada *synovial lining*, tapi fenotipe selnya berbeda dengan sel yang memproduksi IL-1 dan TNF- α .

2.6.2.5 *Anti-inflammatory cytokines and growth and differentiation factor inhibitors* adalah sitokin yang menghambat respon imun yaitu IL-1Ra (IL-1 receptor antagonist), IL-4, IL-10, IL-13 dan OPG (*osteoprotegerin*).

Interleukin-4 (IL-4)

IL-4 bersama dengan sitokin lain yang diproduksi oleh Th2 menstimulasi proliferasi dan diferensiasi limfosit B menjadi sel plasma yang mampu memproduksi antibodi. IL-4 berfungsi juga menghambat aktivasi makrofag.

Interleukin-10 (IL-10)

IL-10 merupakan sitokin yang di produksi oleh Th2 dan Th3, mulanya dikenal sebagai *cytokine synthesis inhibitory factor*. IL-10 adalah suatu sitokin imunoregulator yang diproduksi oleh sel T, monosit dan makrofag. IL-10 mempunyai efek inhibisi terhadap sitokin pro-inflamasi seperti IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ dan GM-CSF. IL-10 berperan dalam proses inhibisi

terhadap fungsi aktivasi dan efektor dari sel T, makrofag dan monosit (Sieper, 2000).

Sitokin dan aktifasinya pada molekul adesi berperan penting pada inflamasi yang kronik seperti arthritis reumatoid, yaitu pada proses infiltrasi dan aktivasi pada fase inisiasi (Kirkham, 1996).

2.6.3 Kemokin

Kemokin termasuk kelompok sitokin yang mempunyai kemampuan menstimulasi leukosit untuk bergerak (kemokinesis) dan berpindah spontan (kemotaksis). Kemokin terdiri dari dua grup yaitu kemokin- α dan kemokin- β . Kemokin- α pada manusia terletak di suatu daerah pada kromosom 4 sedangkan kemokin- β terletak pada kromosom 17. Kemokin di produksi oleh berbagai macam sel sebagai respon terhadap adanya produk bakteri, virus, bahan yang dapat menyebabkan kerusakan secara fisik seperti silika dan asam urat (Janeway and Travers, 1994).

Kemokin merupakan protein superfamili yang mempunyai sistein berpasangan dengan dua rantai disulfida. Berdasarkan susunan sisteinnya, kemokin diklasifikasi menjadi empat yaitu:

1. Kemokin- α (C-X-C) seperti IL-8 yang bereaksi terutama pada netrofil. Kemokin ini di sekresi terutama oleh makrofag dan sel endotel yang sudah diaktivasi. IL-8 diinduksi oleh IL-1 dan TNF α .
2. Kemokin- β (C-C) seperti *monocyte chemoattractant protein* (MCP-1), *cotxin*, *macrophage inflammatory protein- α 1* (MIP- α 1) dan Rantes

(*regulated and normal T cell expressed and secreted*). Kemokin ini terutama beraksi pada monosit, eosinofil, basofil dan limfosit, tapi tidak pada netrofil.

3. Kemokin- γ C seperti limfotaktin, spesifik untuk limfosit
4. Kemokin CX3C untuk memicu adesi kuat antara monosit dan sel T.

2.7 Apoptosis Pada Arthritis Reumatoid

Apoptosis atau *program cell death* adalah suatu proses kematian sel yang terjadi secara fisiologis untuk menjaga keseimbangan populasi sel. Proses ini terjadi tanpa melibatkan respon imun. Tipe kematian sel pada apoptosis berhubungan dengan perkembangan, seleksi dan aktifitas limfosit. Apoptosis akan memusnahkan sel imun reaktif yang dalam perkembangan dan sel yang sudah diaktivasi di perifer, untuk menghindari respon imun dan inflamasi yang berkepanjangan (Mann and Cidlowski, 1999).

Beberapa rangsangan seperti glukokortikoid, TNF- α , tidak adanya *growth factor*, protein virus, penyinaran dan obat anti kanker dapat menyebabkan apoptosis, yang berbeda untuk sel yang berbeda pula. Rangsangan tersebut akan menginduksi sinyalnya melalui reseptor permukaan meliputi CD40 dan Fas/Apo-1. Pada sejenis nematoda gen yang dapat menerima induksi untuk apoptosis adalah Ced-3 dan Ced-4, berfungsi pada kematian sel. Sedangkan gen yang menghambat apoptosis adalah Ced-9. Apoptosis diatur oleh keseimbangan antara gen yang menginduksi dan menghambat apoptosis.

Pada mamalia Ced-9 identik dengan bcl-2 yang merupakan onkogen penyebab kanker. Ced-3 identik dengan Caspase (famili dari protease), yang berkembang luas. Ini adalah petunjuk untuk ikatan langsung Caspase 8 dan 10

(subfamili FLICE)/grup aktivasi) dengan kompleks reseptor Fas melalui domain efektor untuk kematian sel. Ikatan ini mengaktifasi *Caspase cascade*, yang akan menyebabkan aktivasi Caspase 3,6,7 (subfamili CPP32/grup efektor). Caspase 1,4,5 (Subfamili ICE/grup inflamasi) dapat berperan sebagai pembuat sitokin. Sedangkan Caspase 2,9 (subfamili ICH) mungkin untuk merespon signal mitokondria untuk apoptosis. Di samping itu dalam sistem ini diproduksi ceramid. Ceramid berperan sebagai mediator untuk menyampaikan sytal agar terjadi apoptosis sel.

Secara struktur dan fungsi pada mamalia Ced-4 identik dengan *apoptosis protease activating factors-1* (Apaf-1). Fungsi protein ini pada pengaturan *caspase cascade* /Apaf adalah untuk mengaktifasi kematian sel setelah sitokrom c dilepaskan dari mitokondria dari sel mamalia. Jadi mitokondria berperan penting pada regulasi apoptosis (Winkler, 1999).

Pada artritis reumatoid apoptosis tidak adekuat sehingga meningkatkan akumulasi sel di jaringan sinovial. Dengan pemeriksaan elektron mikroskop terlihat sel apoptosis dalam jumlah kecil. Fragmen DNA yang menandakan terjadinya apoptosis di jaringan sinovial terlihat lebih tinggi dari jaringan normal. Ketidakcocokan ini mungkin karena fragmen DNA merupakan akibat dari produksi oksida nitrat (NO) lokal dan oksigen radikal. Proporsi sel yang memperlihatkan putusnya rangkaian DNA cukup besar sehingga perbedaan ini diduga karena terhambatnya apoptosis.

Mekanisme lain yang menghambat apoptosis pada artritis reumatoid sehingga apoptosis limfosit T sangat sedikit, kemungkinan karena efek dari sitokin spesifik dan gen anti apoptosis. Limfosit T pada artritis reumatoid dapat

dibedakan dari sensitivitasnya terhadap Fas yang menginduksi apoptosis. Interaksi Fas dengan Fas-ligand, granzyme B, perforin dan TNF α dapat menginduksi apoptosis. Pada jaringan sinovial Fas diekspresikan oleh limfosit T dan *fibroblast-like synoviocytes* (FLS), sedangkan di cairan sinovial terdapat peningkatan Fas soluble yang akan menghambat interaksi Fas dengan FasL. Akibatnya pada artritis reumatoid proses apoptosis sangat kurang, sehingga terhambatnya interaksi Fas dengan FasL berperan penting pada patogenesis artritis reumatoid (Tak and Firestein, 1999).

2.8 Limfosit T Sebagai Sentral Pada Patogenesis Artritis Reumatoid

Antigen pencetus terjadinya artritis reumatoid yang berada pada membrana sinovial akan diproses oleh APC yang terdiri dari sel sinoviosit A, sel dendrit dan makrofag yang mengekspresikan determinan HLA-DR pada membran selnya. Antigen yang telah di proses akan dipresentasikan, dikenali dan diikat oleh limfosit T sub tipe CD4 bersama dengan determinan HLA-DR dan membentuk kompleks trimolekuler. IL-1 yang diproduksi oleh monosit/makrofag akan berperan sebagai mediator kompleks trimolekuler ini untuk mengaktifkan CD4. Pada tahap selanjutnya kompleks trimolekuler tersebut akan mengekspresikan reseptor IL-2 pada permukaan sel CD4. IL-2 yang di produksi oleh CD4 akan mengikatkan diri pada permukaan selnya sendiri sehingga mengakibatkan mitosis dan proliferasi sel CD4. Proliferasi sel CD4 akan terus berlangsung selama antigen tetap berada dalam lingkungan tersebut (Breedveld, 1998)

Sel CD4 yang teraktifasi akan mensekresi berbagai limfokin seperti IFN- γ , TNF- β , IL-3, IL-4 dan GM-CSF serta beberapa mediator lain. Sitokin merangsang makrofag untuk meningkatkan aktifitas fagositnya dan merangsang proliferasi dan aktifasi limfosit B untuk memproduksi antibodi. Antibodi akan mengikat antigen membentuk kompleks imun yang akan berdifusi ke ruang sendi. Pengendapan kompleks imun di jaringan akan mengaktifasi sistem komplemen dan membebaskan C5 aktif. C5 aktif merupakan faktor kemotaktik yang akan meningkatkan permeabilitas vaskuler juga akan menarik sel PMN dan monosit ke lokasi inflamasi.

Fagositosis kompleks imun oleh sel inflamasi akan disertai pembentukan dan pembebasan oksigen radikal bebas, leukotrin, prostaglandin dan protease netral (kolagenase dan stromelisin). Selain fungsi fagositnya, makrofag juga menghasilkan berbagai mediator seperti IL-1, TNF- α , *platelet deriver growth factors* (PDGF), *fibroblast growth factors* (FGF) dan *transforming growth factors* (TGF). IL-1 dan TNF- α berperan merangsang produksi prostaglandin, kolagenase dan stromelisin oleh *fibroblast like cells*.

Menurut Thomas & Lipsky (1997) patogenesis perjalanan penyakit AR terjadi dalam tiga fase (gambar 2.7)

1 Fase inisiasi (*initiation*)

Pada model patogenesis ini, diduga bahwa salah satu pencetus pertama terjadinya artritis reumatoid adalah produksi sitokin non spesifik seperti TNF- α dan GM-CSF pada sendi. Beberapa kejadian non spesifik dalam jaringan sinovial seperti trauma minor, infeksi, reaksi alergi atau reaksi vaksinasi atau deposit dari imun kompleks di jaringan dapat memulai

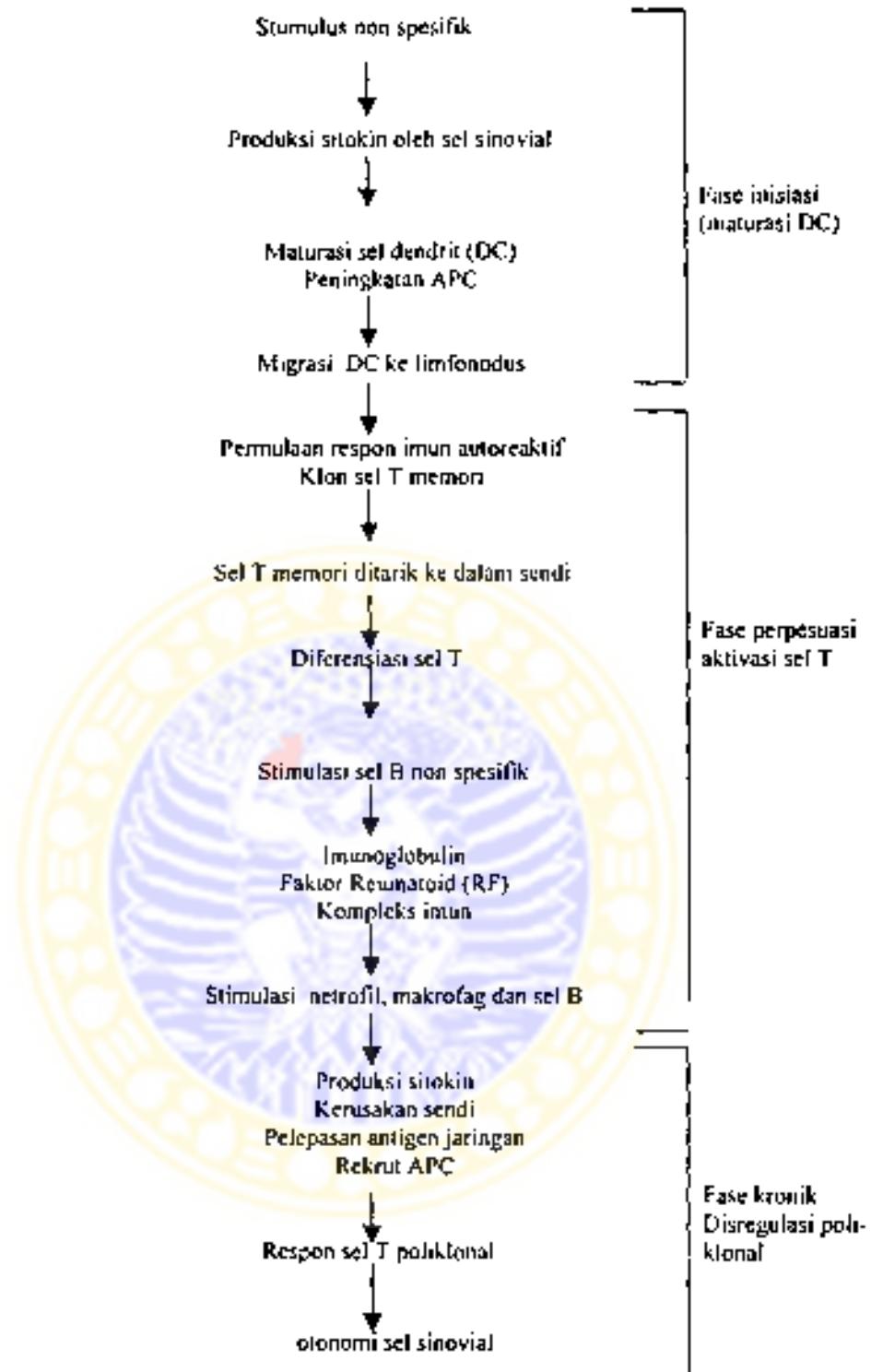
produksi sitokin lokal, yang menyebabkan stimulasi makrofag dan sel-sel lain pada lapisan lining sinovial. Stimulasi non spesifik lokal yang berulang merubah lingkungan yang menyebabkan sel dendrit (Dendritic Cell - DC) berdeferensiasi untuk menstimulasi sel T autoreaktif secara lokal maupun mengikuti cairan limf ke limfonodus. Proses selanjutnya terjadi secara individual, sehubungan dengan *shared epitop*, dimana sel dendrit mengekspresikan molekul MHC klas I dan klas II. Sel dendrit mengalami maturasi dan diferensiasi sehingga dapat meninggalkan jaringan menuju limfonodus dan mengaktifkan makrofag. Sitokin yang dihasilkan oleh makrofag menstimulasi sel T menjadi sel T memori. Seiring dengan maturasi sel dendrit, terjadi peningkatan ekspresi MHC dan molekul adesi.

2. Fase menetap (*perpetuation*):

Fase ini merupakan fase dimana terjadi proses inflamasi yang menetap. Aktifasi limfosit T pada artritis reumatoid berperan dalam menginduksi agresifitas penyakit sehingga menyebabkan kerusakan sendi yang cepat dan dapat disertai dengan gejala ekstra artikuler. Disisi lain ada korelasi infiltrasi makrofag pada sinovium dengan kerusakan sendi. Karena itu asal dan peranan limfosit T pada proses inflamasi artritis reumatoid masih dalam perdebatan. Walaupun demikian, dari analisis fenotipe limfosit T di jaringan sinovial yang memperlihatkan adanya limfosit T memori dalam jumlah besar akan membantu limfosit B memproduksi imunoglobulin. Limfosit T memori juga dapat menstimulasi monosit untuk mensekresi sitokin melalui kontak antar sel.

3. Fase kronik:

Fase kronik pada model artritis reumatoid ini, respon autoimun menyebabkan penarikan sel efektor ke jaringan dan distregulasi poliseluler. *Antigen presenting cell* (APC) yang berasal dari antigen endogen *self* dan yang berasal dari antigen jaringan lain dapat menyebabkan kerusakan jaringan. Respon limfosit T dapat merupakan respon poliklonal terhadap sejumlah antigen yang di ekspresikan oleh APC. Pada artritis reumatoid yang kronik ditandai oleh adanya otonomi sel sinovial. Pada fase ini respon autoimun limfosit T terhadap antigen *self* tidak begitu penting dalam hal menimbulkan kerusakan sendi di bandingkan dengan peran sel yang lain seperti sel mast, fibroblas, sinoviosit dan netrofil yang mensekresikan enzim dan/atau sitokin yang menyebabkan kerusakan.



Gambar 2.8 : Model patogenesis terjadinya penyakit artritis reumatoid
Di kutip dari : Thomas and Lipsky (1996)

Kerusakan sendi pada AR di mulai dari erosi tulang rawan sendi yang menimbulkan kerusakan tulang rawan sendi, tulang subkondrat dan jaringan periartikuler. Erosi terjadi melalui mediator sitokin pro-inflamasi yang dihasilkan oleh makrofag ($\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ dan IL-6) dan enzim proteolitik seperti kolagenase, stomelin, elastase dan gelatinase (Youscf et al.,1999; Sumariyono 2000).

2.9 Keseimbangan Th1 dan Th2

Sebagai penyakit autoimun yang bersifat destruktif, keseimbangan sel Th1/Th2 berperan penting dalam perkembangan penyakit artritis reumatoid. Rasio Th1/Th2 pada limfosit jaringan sinovial penderita artritis reumatoid berhubungan dengan aktifitas penyakit secara klinis, intensitas dari hiperplasia sinovial dan infiltrasi limfosit ke jaringan sinovial. Ekspresi Th1 pada tempat terjadinya inflamasi jaringan sinovial berhubungan erat dengan derajat inflamasi dan hiperplasia.

Dominasi Th1 ini di duga terjadi karena supresi IL-10 yang merupakan negatif regulator potensial untuk respon imunoproliferatif dan respon inflamasi (Yudoh et al., 2000). Dominasi Th1 terhadap respon imun Th2 mengganggu keseimbangan Th1/Th2 sehingga mempengaruhi pola sitokin yang disekresi. Sitokin yang berperan dalam patogenesis penyakit artritis reumatoid pada fase awal atau fase inisiasi berbeda dengan pada fase kronik. Hal ini terlihat dari hasil penelitian dimana dalam darah penderita artritis reumatoid fase inisiasi terdapat peningkatan jumlah sel mononuklear yang mensekresi IL-2 dan $\text{IFN-}\gamma$. Pada artritis reumatoid fase kronik terdapat peningkatan jumlah sel mononuklear yang

mensekresi IL-6, IL-10 dan TNF- α (Charlton and Lafferty, 1995; Cutolo et al., 1998).

2.10 Imunogenetik Arthritis Reumatoid

Faktor genetik telah lama di ketahui berperan pada terjadinya arthritis reumatoid. Ini terlihat dari studi pada kelompok keluarga yang memperlihatkan data bahwa pasangan kembar arthritis reumatoid akan menderita arthritis reumatoid 4-8 kali lebih besar dari pada prevalensi pada populasi pada umumnya (MacGregor et al., 2000).

Diantara faktor genetik yang penting dalam menentukan tingkat kerentanan terhadap suatu penyakit adalah MHC (*major histocompatibility antigen*). MHC sebagai kompleks yang menempati lengan pendek pada kromosom 6 mempunyai struktur sedemikian rupa sehingga memiliki tingkat keberubahan yang tinggi sesuai dengan tuntutan kehidupan. Fenotipe serologis MHC dikenal sebagai HLA (*human leucocyte antigen*) karena produk molekul yang di hasilkan terutama di temukan pada leukosit.

HLA terdiri dari beberapa kelas, yaitu HLA klas I , HLA klas II dan non HLA klas III. HLA klas I diekspresikan oleh hampir semua sel berinti dan berperan dalam pengendalian *self-non self*. HLA klas I terdiri atas lokus HLA-A, HLA-B dan HLA-C. HLA klas II Dibedakan atas HLA-DR, HLA-DQ dan HLA-DP, diekspresikan oleh makrofag, sel T, B, APC dan M. HLA klas II berperan dalam respon imun humoral. Dari klas ini terdapat alel tertentu yang berpotensi membentuk antibodi atau alel kerentanan seperti HLA-DR.

Lokus HLA-DR mengalami polimorfis yang tinggi sehingga menampilkan 34 bentuk alternatif alelnya. HLA-DR4 memiliki sedikitnya lima subtipe yaitu Dw10, Dw13, Dw14 dan Dw15. Variabilitas subtipe ini terletak pada segmen asam amino nomor 70-74 yang terletak pada suatu daerah disebut *region hypervariable III*. Kombinasi serangkaian asam amino yang menempati posisi 67-74 dalam rangkaian asam amino HLA-DR berkaitan dengan patogenesis artritis reumatoid.

Determinan antigen atau epitop yang menempati daerah hipervariabel III pada posisi asam amino 67-74 tersebut di kenal sebagai *shared epitop* yang berperanan untuk proteksi artritis reumatoid. (Breedveld, 1998; Kasjmir, 2000)

Pengemban alel HLA-DR akan memiliki resiko 5-7 kali lebih besar menderita artritis reumatoid dibanding yang tidak memiliki. Pengemban HLA-DRB1 disertai faktor reumatoid positif, memberikan resiko 13 kali lebih besar untuk terjadinya erosi dalam kurun waktu satu tahun (Kasjmir , 2000).

Pada penelitian yang dilakukan di beberapa Rumah Sakit di Jawa dan Bali dilaporkan bahwa perbandingan frekuensi perempuan dan laki-laki adalah 5:1. Pengemban HLA-DRB1 yang di duga membawa *shared epitop* pada populasi Indonesia cukup rendah, kecuali frekuensi *human lymphocyte antigen-DRB1** (HLA-DRB1*4) yang di dapatkan mencapai 22.5% pada kasus artritis reumatoid dan tidak menunjukkan perbedaan pada sub kelompok etnis cina dan non cina (Soeroso, 2003).

2.11 Model Patogenesis Arthritis Rheumatoid

Karena patogenesis arthritis reumatoid belum seluruhnya terungkap, maka penelitian tentang patofisiologi arthritis reumatoid berkembang dengan pesat dan dinamis. Beberapa model patogenesis arthritis reumatoid yang telah diungkapkan oleh para peneliti adalah sebagai berikut (Firestein,1994; Breedveld,1998):

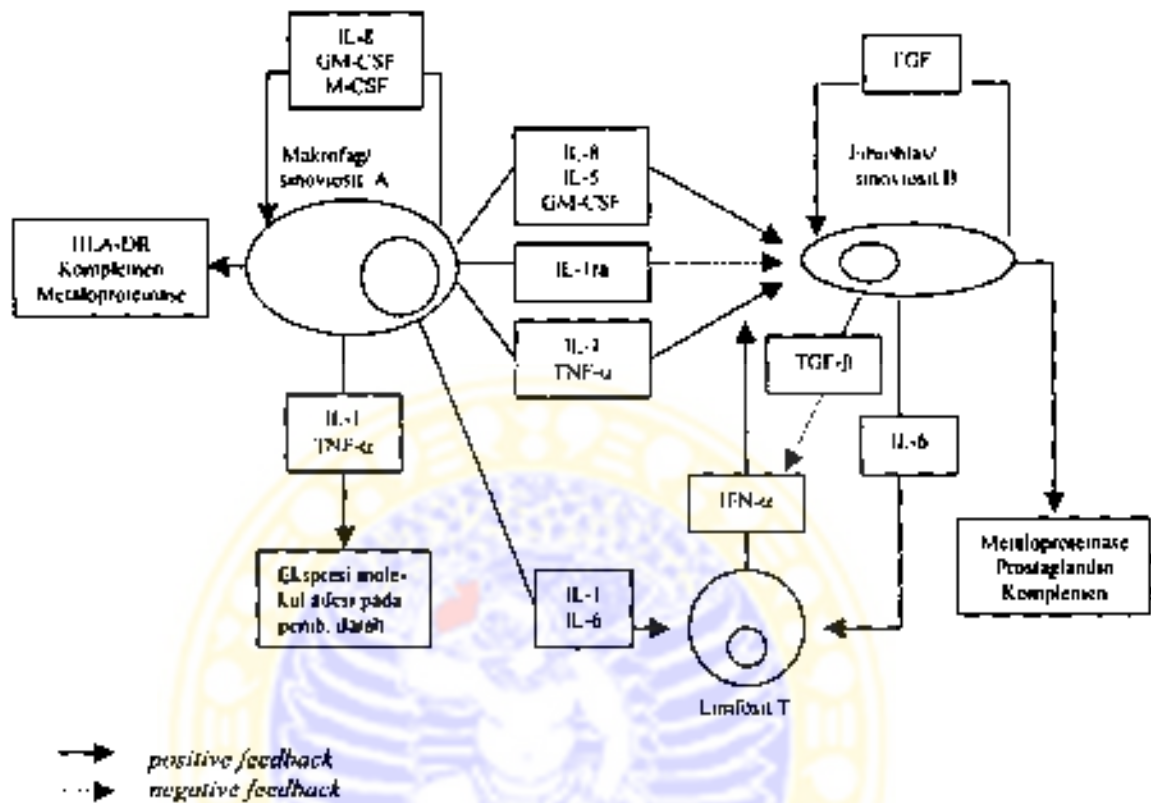
1. Sel T sebagai pengendali respon imun

Bila suatu antigen artrotropik menetap pada jaringan sinovial akan terjadi respon imun seluler terhadap antigen spesifik tersebut. Pada model patogenesis ini yang menimbulkan sinovitis terus menerus adalah limfosit T. Produk limfosit T yang menyebar ke jaringan langsung menstimulasi makrofag dan sinoviosit pada lapisan *sublining*, sehingga akan menyebabkan hiperplasia sel *synovial lining*, meningkatkan ekspresi HLA-DR dipermukaan sel. Disamping itu juga menginduksi ekspresi molekul adesi pada pembuluh HEV dan menstimulasi produksi imunoglobulin lokal melalui proliferasi dan diferensiasi limfosit B.

2. Sel T autoreaktif

Diduga bahwa suatu agen yang mengawali terjadinya arthritis reumatoid bertanggung jawab terhadap perubahan dini dan menetapnya arthritis kronik. Arthritis reumatoid kronik dapat juga terjadi sebagai respon terhadap antigen yang jauh dari proses arthritis. Sitokin yang di produksi sebagai respon terhadap antigen akan menginduksi ekspresi HLA-DR di jaringan sinovial yang akan menjadi target respon imun. Reaksi antara sel yang mengemban HLA-DR dengan limfosit T autologus dikenal sebagai AMLR (*autologus mixed leucocyte reaction*). Sedangkan untuk antigen MHC klas II, limfosit T

pada sinovitis kronis dapat langsung memberikan respon langsung terhadap antigen otologus seperti kolagen tipe II.



Gambar 2.9 : Regulasi sitokin pada patogenesis artritis reumatoid model autokrin/parakrin
 Di kutip dari : Firestein (1994)

3. Model autokrin/parakrin

Aktivasi limfosit T seperti yang di ajukan sebagai hipotesis pada model patogenesis pertama, ternyata pada studi produk aktivasi sel tidak memperlihatkan adanya peningkatan yang berarti. Sitokin yang diproduksi limfosit T seperti IL-2, IL-3, IL-4, IFN- γ dan TNF- β terdapat dengan konsentrasi sangat kecil di jaringan sinovial. Produk sel yang ditemukan dengan konsentrasi tinggi di jaringan dan cairan sinovial adalah produk dari

macrophage-like cell dan *fibroblast-like cell* dari jaringan sinovial, seperti IL-1, TNF- α , IL-6, GM-CSF (*granulocyte monocyte-colony stimulating factors*), M-CSF (*monocyte-colony stimulating factors*), TGF- β , prostaglandin, protein komplemen, TIMP, stromelisin dan kolagenase. Hal ini memperlihatkan bahwa inflamasi jaringan sinovial terjadi karena produk yang dihasilkan oleh sel makrofag dan *fibroblast synovial lining* yang berdekatan melalui model autokrin atau parakrin.

IL-1 dan TNF- α yang di produksi oleh makrofag sinovial menstimulasi fibroblas untuk berproliferasi dan meningkatkan sekresi IL-6, GM-CSF, stromelisin dan kolagenase. GM-CSF dan IL-1/TNF- α menstimulasi *fibroblast-like synoviocyte* dan menginduksi sekresi IL-1, TNF- α dan IL-8. Kombinasi GM-CSF dengan TNF- α meningkatkan ekspresi HLA-DR pada makrofag.

Fibroblas dan makrofag mempunyai lengkung autokrin yang dapat mengatur produksi selnya sendiri. Produksi sitokin lokal oleh makrofag dan fibroblas mempengaruhi aktivasi sel T (Gambar 2.5) (Firestein, 1994).

Inhibitor sitokin berperanan juga pada model autokrin/parakrin, karena lengkung *negative feedback* adalah mekanisme homeostasis normal untuk mengontrol inflamasi jaringan sinovial.

4. Hipotesis unifikasi: aksis limfosit T/ makrofag/ fibroblas

Model ini merupakan spektrum luas dari filosofi dan teori patogenesis artritis reumatoid, karena kenyataannya proses sinovitis yang terjadi terus menerus pada artritis reumatoid terlihat sebagai hasil kombinasi ketiga model

di atas, di mana limfosit T, *fibroblast-like cell*, dan *macrophage-like cell* saling mempengaruhi.

2.12 Hewan Coba Sebagai Model Patogenesis Arthritis Reumatoid

Model patogenesis arthritis reumatoid disimpulkan dari hasil penelitian baik di klinis maupun pada hewan coba. Pada arthritis reumatoid hewan coba yang secara luas dipakai sebagai model arthritis reumatoid adalah tikus atau mencit. Dipilihnya hewan ini karena secara histologis memiliki persamaan gambaran sendi dengan sendi pada manusia, dan secara patologis memiliki gambaran yang spesifik dengan arthritis reumatoid pada manusia (Kadowaki et al., 1994).

Pada penelitian tentang patogenesis arthritis reumatoid dikenal beberapa macam model hewan coba :

1. *Antigen-induced arthritis*
2. *Adjuvant-induced arthritis*
3. *Streptococcal cell wall-induced arthritis*
4. *Collagen-induced arthritis*
5. *MRL-1 arthritis*

2.12.1 Antigen-induced arthritis

Dumonde dan Glyn (1961) pertama kali memperkenalkan model ini, dimana secara eksperimental mereka mengimunisasi kelinci dengan fibrin dalam *complete Freund's adjuvant* secara intra dermal, kemudian diikuti dengan injeksi fibrin intraartikular. Perlakuan ini akan menimbulkan sinovitis kronik, dengan gambaran histopatologis meliputi hiperplasia sel lining sinovial, infiltrasi sel

plasma dan limfosit, pembentukan folikel limfoid dengan germinal senter, pembentukan panus dan erosi tulang.

2.12.2 Ajuvan-induced arthritis (AIA)

Model ini pertama kali di gunakan oleh Pearson (1956). Hewan coba adalah tikus yang diimunisasi dengan *Lyophilized Mycobacterium butyricum* yang disuspensi dengan minyak mineral (*Freund's adjuvant*) intradermal sehingga terjadi sinovitis dalam waktu 2-3 minggu. Pada eksperimen ini terjadi poliarthritis pada 100% tikus dari strain yang sama. (Halloran et al., 1996).

Sendi yang paling banyak dikenai adalah sendi tarsal diikuti oleh cakar depan, dan jari dan ekor. Arthritis akan menetap dalam beberapa minggu, sehingga menyebabkan periostitis dan pembentukan tulang baru. Gambaran histopatologis adalah sinovitis proliferasif pada sendi dan sarung tendon, infiltrasi sinovium oleh leukosit polimorfonuklear dan mononuklear dan aktifitas osteoblas yang berasal dari periosteum.

2.12.3 Streptococcal cell wall-induced arthritis

Cromartie dkk melakukan eksperimen untuk menginduksi arthritis kronik pada tikus, dengan melakukan injeksi suspensi fragmen dinding sel streptokokus dalam akuades secara intraperitoneal. Dalam dua hari terjadi arthritis akut pada hewan coba yang bersifat erosiv, kemudian di ikuti oleh arthritis kronis yang dapat terjadi remisi. Arthritis dapat menyebabkan deformitas dan ankilosis fibrosa pada hewan coba. Sinovium diinfiltrasi oleh makrofag, limfosit dan leukosit polimorfonuklear.

2.12.4 Collagen-induced arthritis (CIA)

Berdasarkan adanya respon imun humoral dan selular terhadap kolagen pada artitis reumatoid maka Trentham dkk (1977) melakukan eksperimen artitis reumatoid pada hewan coba. Eksperimen ini memperlihatkan bahwa apabila tikus diimunisasi dengan *collagen-II yang* di larutkan dalam 0.1M asam asetat dan diemulsi dengan *complete Freund's adjuvant* akan menimbulkan inflamasi poliartritis. Imunisasi dilakukan dengan memberikan injeksi suspensi kolagen tipe II dosis 200µg, secara intradermal pada ekornya. Gejala artitis rata-rata terlihat 3-4 minggu setelah imunisasi. Artitis akan menetap selama satu sampai dua bulan, kemudian menyebabkan destruksi sendi dan ankilosis (Mutafchieva et al., 2000).

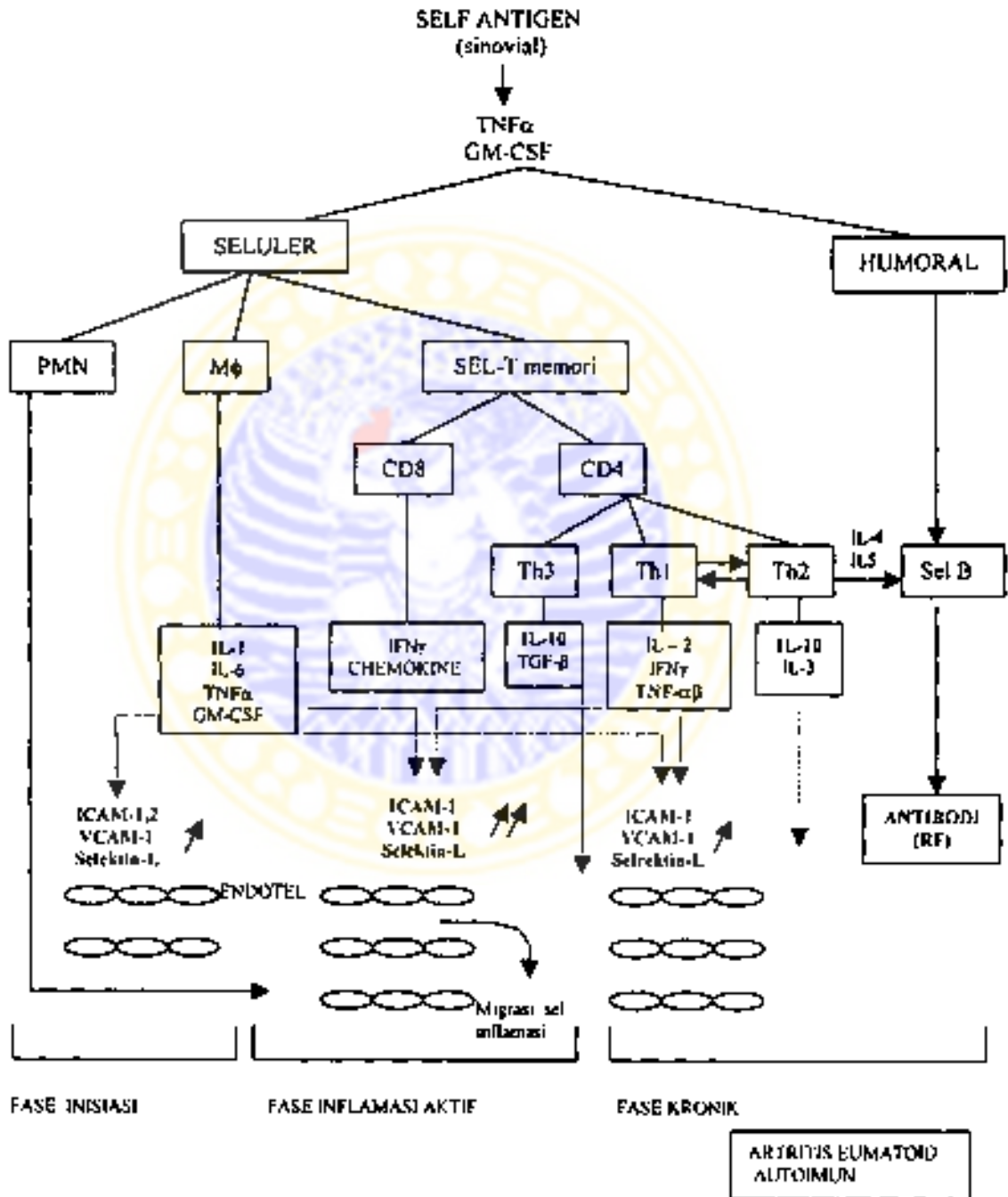
2.12.5 MRL-1 arthritis

Mencit MRL/Mp-lpr/Lpr (MRL/1) merupakan hewan coba yang biasa dipergunakan sebagai model untuk penyakit *systemic lupus erythematosus* (SLE). Pada umur tiga atau empat bulan secara spontan akan muncul gejala artitis. Sebelum hewan coba ini mati karena SLE, yaitu kira-kira pada umur lima atau enam bulan, pada 75% hewan coba terlihat gambaran histopatologi yang signifikan, meliputi proliferasi sel *synovial lining*, infiltrasi sinovium oleh limfosit dan sel plasma, efusi yang mengandung fibrin, limfosit dan leukosit polimorfonuklear, pembentukan panus dan erosi rawan sendi.

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN.

3.1 Kerangka Konseptual Penelitian



Gambar 3.1: Skema kerangka konseptual

Penjelasan Kerangka Konseptual

Dari tinjauan kepustakaan yang menguraikan tentang pada sendi, peran antigen artritogenik, peran sitokin dan peran molekul adesi terhadap terjadinya artritis reumatoid, maka di susun kerangka konseptual seperti tertera pada gambar 3.1.

Antigen *self* pada jaringan sinovial menjadi peneetus sel T autoreaktif untuk berpindah dari pembuluh darah ke jaringan sinovial. TNF- α dan GM-CSF secara non spesifik diproduksi di jaringan sinovial, yang akan mengaktifkan makrofag dan sel-sel lain yang terdapat pada lapisan lining sinovial untuk memproduksi sitokin. Sitokin yang diproduksi merupakan sitokin yang menginduksi perubahan sel T naive menjadi sel T memori dan juga menginduksi aktivasi makrofag. Limfosit T memori terdiri dari dua grup yaitu CD4 (Th) dan CD8 (Tc) (Thomas and Lipsky, 1996).

Sel Th sesuai fungsinya terdiri dari tiga subset yaitu Th1, Th2 dan Th3. Th1 mensekresi sitokin pro-inflamasi (IL-2, IFN- γ dan TNF- α,β) Sitokin tersebut menginduksi sel endotel pembuluh darah yang meningkat jumlahnya pada artritis reumatoid (neovaskularisasi) untuk mensekresikan molekul adesi ICAM-1 dan VCAM-1. Th2 mensekresi sitokin IL-4 dan IL-5 dan IL3 yang berfungsi membantu sel B memproduksi Immunoglobulin G dan M, IL-5. Di samping itu Th2 juga memproduksi IL-10. Th3 atau T regulator memproduksi IL-10 dan TGF β yang mengatur keseimbangan Th1/Th2. IL-10 bekerja menghambat aktifitas hampir semua sitokin yang di produksi oleh Th1 (Yudoh et al., 2000).

Selektin-L adalah molekul adesi yang di ekspresikan oleh sel T, yang berfungsi sebagai reseptor *homing* pada resirkulasi limfosit.

Melalui interaksi antara selektin dan integrin yang diekspresikan oleh leukosit yang sudah diaktifasi dengan molekul adesi sel endotel, terjadi adesi sel inflamasi ke sel endotel jaringan sinovial sehingga memungkinkan terjadinya migrasi sel inflamasi ke jaringan sinovial.

Pada fase inisiasi terjadinya penyakit artritis reumatoid, inflamasi terjadi karena sel T autoreaktif, berhubungan dengan sitokin TNF- α yang di produksi oleh sel sinovial. Molekul adesi yang terinduksi adalah ICAM-1 dan ICAM-2. Sehingga terjadi peningkatan ekspresi molekul adesi ICAM-1 dan ICAM-2 di jaringan sinovial. ICAM-1 menyebabkan akumulasi sel inflamasi di jaringan sehingga inflamasi menjadi aktif.

Pada fase aktif neovaskularisasi di jaringan sangat menonjol. Neovaskularisasi di ikuti oleh peningkatan ekspresi seluruh molekul adesi ICAM-1, VCAM-1, selektin dan integrin akibat stimulasi oleh sitokin pro-inflamasi (IFN- γ , TNF- α dan IL-2) yang di produksi oleh sel Th1 dan makrofag. Sehingga pada fase aktif artritis reumatoid ekspresi molekul adesi ICAM-1, VCAM-1, selektin dan integrin meningkat.

Pada fase kronik peranan sitokin yang diproduksi oleh sel Th2 dan Th3 yaitu IL-10 dan IL-6 menyebabkan perubahan keseimbangan Th1/Th2 dengan penghambatan aktifitas Th1. Sehingga yang berperan pada proses inflamasi pada fase kronik adalah TNF- α . Dalam hal ini molekul adesi yang diekspresikan merupakan molekul adesi yang di induksi oleh TNF- α saja. Pada fase kronik ini molekul adesi ICAM-1 dan VCAM-1 akan meningkat tetapi tidak lebih tinggi dari ekspresinya pada fase aktif.

3.2 Hipotesis Penelitian

Berlandaskan latar belakang masalah, tujuan penelitian dan kerangka konseptual penelitian di atas maka dirumuskan hipotesis sebagai berikut:

1. Terdapat peningkatan ekspresi molekul adesi (ICAM-1, VCAM-1 dan selektin) di jaringan sinovial pada fase inisiasi, fase aktif dan fase kronik artritis reumatoid
2. Terdapat peningkatan sitokin pro-inflamasi (TNF- α dan IL-1) di jaringan sinovial pada fase inisiasi dan fase aktif artritis reumatoid.
3. Terdapat peningkatan sitokin anti-inflamasi (IL-10) di jaringan sinovial pada fase kronik artritis reumatoid.



BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan suatu penelitian eksperimental murni, yaitu peneliti memberi suatu perlakuan terhadap tikus putih sebagai hewan coba. Dipilihnya jenis penelitian ini karena dapat menghasilkan data dengan validitas yang tinggi dan perlakuan dapat diatur secara random oleh peneliti (Tjokroprawiro dkk., 1996)

Jenis studi eksperimental ini adalah *cross sectional*. Tikus putih sebagai hewan coba di injeksi secara intradermal pada beberapa tempat di ekor tikus dengan kolagen tipe II yang di larutkan dalam 0.1M asam asetat dan diemulsi dengan *complete Freund's adjuvant*. Perubahan klinis yang terjadi pada tikus putih yang di sebut dengan *collagen induced arthritis (CIA)* berupa pembengkakan sendi. Jaringan sendi di periksa setelah periode waktu yang ditentukan sebagai fase awal, fase aktif dan fase kronik yaitu 1 minggu, 3 minggu dan 6 minggu.

4.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *complete random design*, dengan pertimbangan bahwa populasi homogen. Maka perbedaan yang timbul antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan semata-mata disebabkan oleh eksperimen yang di lakukan oleh peneliti.

Pengambilan kelompok sampel yang homogen dilakukan secara alokasi random (*random assignment*), sehingga setiap anggota sampel mempunyai kesempatan sama untuk menempati kelompok, baik kelompok artritis maupun kelompok kontrol.

Pengukuran awal tidak dilakukan oleh karena dianggap sama untuk semua kelompok yang berasal dari satu populasi, sehingga dapat dikembangkan rancangan eksperimental tanpa adanya pengukuran awal (pretest) tapi hanya pengukuran akhir (post test).

4.3 Bagan Rancangan Penelitian

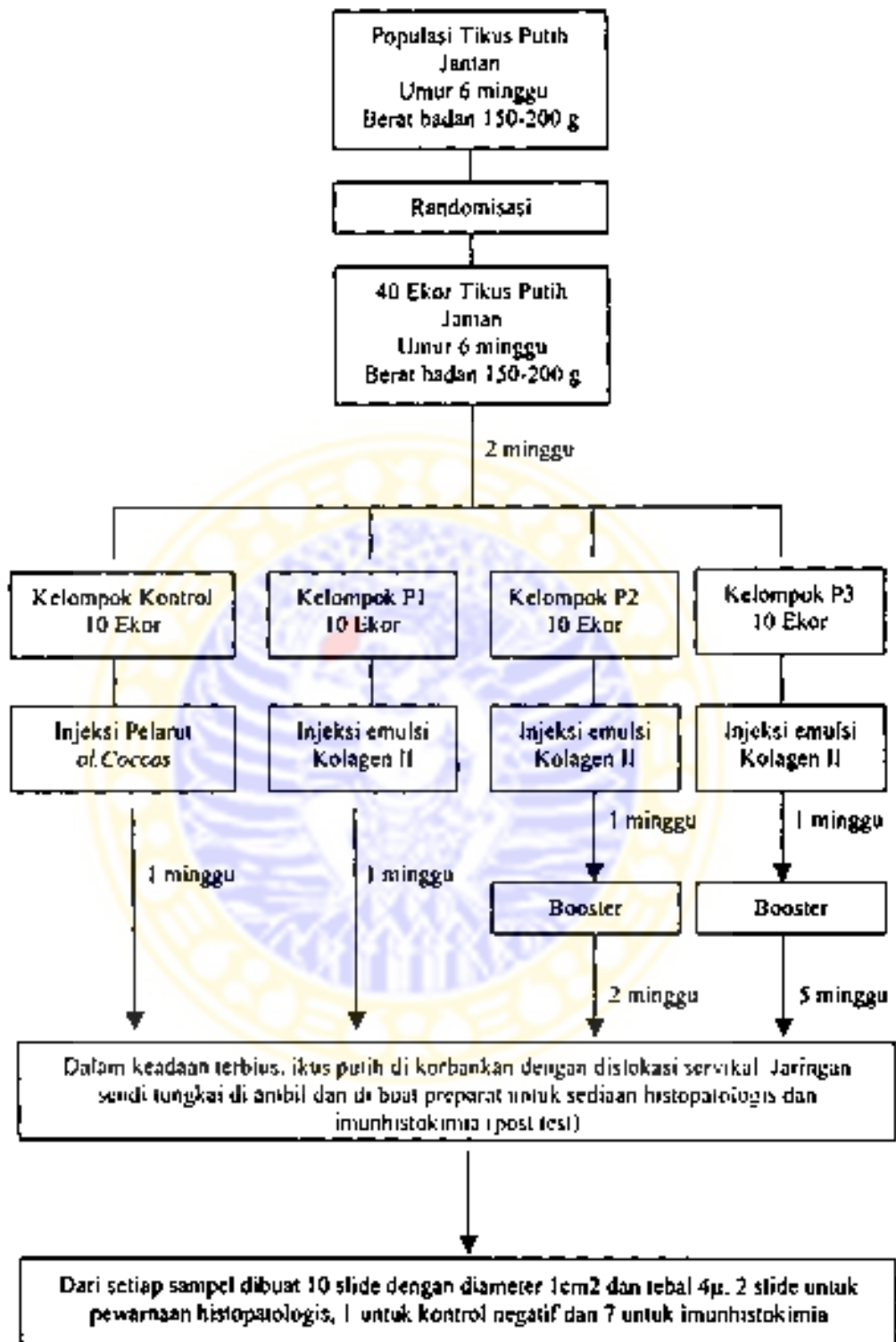


Keterangan

- Ptp : Populasi tikus putih
 S : Sampel
 R : Randomisasi tikus putih
 P1, P2, P3 : Kelompok tikus putih yang di buat artritis
 K : Kelompok kontrol
 O1 : Observasi kelompok kontrol
 O2 : Observasi kelompok pada fase awal setelah diberi perlakuan
 O3 : Observasi kelompok pada fase aktif setelah diberi perlakuan
 O4 : Observasi kelompok pada fase kronik setelah diberi perlakuan

Gambar 4.1 : Bagan rancangan penelitian

4.1 Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 4.2 : Kerangka operasional penelitian

4.5 Penjelasan Kerangka Operasional

Sebanyak 73 ekor tikus putih putih *Rattus norvegicus Strain Wistar* jantan, berumur enam minggu dengan berat badan 150-200 gram di pilih secara acak dengan *simple random sampling* mempergunakan tabel. Sebanyak 40 ekor yang terpilih di adaptasi selama dua minggu, dan di bagi dalam empat kelompok, masing-masing berjumlah 10 ekor, yaitu kelompok kontrol, kelompok perlakuan P1, P2 dan P3.

Kelompok kontrol di injeksi dengan bahan pelarut *oleum Coccus* steril 0.2 μ l intradermal dipangkal ekor. Kelompok P1, P2 dan P3 masing-masing diimunisasi dengan injeksi 0.2 μ l emulsi kolagen II intradermal pada pangkal ekor. Setelah satu minggu Kelompok K dan P1 dipreparasi post-mortem, sedangkan kelompok P2 dan P3 di lakukan booster dengan injeksi emulsi kolagen II 0.1 μ l intra dermal pada pangkal ekor. Kelompok P2 di preparasi dua minggu setelah booster, sedangkan kelompok P3 di preparasi lima minggu setelah booster.

Preparasi dilakukan setelah hewan coba dikorbankan dengan cara dislokasi servikal setelah dilakukan anestesi dengan eter. Darah tikus sebanyak 2 ml diambil untuk pemeriksaan FR. Cakar dari keempat tungkai tikus diambil dan disimpan dalam cairan *Buffer Formalin* 10% untuk persiapan pembuatan blok parafin.

Setiap sampel dibuat sebagai preparat histologis pada 10 slide dengan posisi memanjang cakar menurut metode standar Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Unair. Dari masing-masing sampel, 2 slide diwarnai dengan pewarnaan hematoksin eosin. Apabila gambaran histologis atau histopatologis

sesuai dengan klasifikasi yang telah di tentukan, maka jaringan yang berasal dari tikus yang sama di pergunakan untuk pewarnaan imunohistokimia.

4.5 Populasi Sampel

Populasi tikus sebagai hewan coba yang akan di pakai adalah tikus putih *Rattus norvegicus Strain Wistar* jantan berumur 6 minggu dengan berat badan tikus 150-200 gram. Tikus-tikus tersebut di peroleh dari Bagian pengembangan hewan coba di Laboratorium Farmakologi Jurusan Farmasi FMIPA Universitas Andalas Padang.

4.6 Besar Sampel

Sampel penelitian menggunakan tikus putih *Rattus norvegicus strain Wistar* jantan dengan berat antara 150-200 gram. Pemilihan tikus berumur 6 minggu dimaksud sebagai tikus pada umur dewasa muda, dan pemilihan kelamin jantan di maksud untuk menghindari pengaruh hormonal.

Untuk meyakini bahwa semua anggota kelompok berasal dari populasi yang homogen maka dilakukan randomisasi dengan metode *simple random sampling*, menggunakan tabel *random sampling*.

Penelitian eksperimental ini di lakukan pada populasi (N) tidak diketahui.

Rumus yang dipakai untuk menentukan besar sampel (n) adalah:

$$n = \frac{(Z\alpha + Z\beta)^2 \cdot Qd^2}{d^2} \quad (\text{Steel and Torrie, 1980})$$

Keterangan:

Untuk kelompok yang berpasangan $QD^2/d^2=1$, sehingga hasilnya $n=(Z\alpha+Z\beta)^2$

n = Besar sampel masing masing kelompok

$Z\alpha$ = Nilai standar normal, yang besarnya tergantung α

Bila $\alpha=0.05 \rightarrow Z\alpha=1.67=0.01 \rightarrow Z\alpha=1.96$

$Z\beta$ = Nilainya tergantung beta yang di tentukan (berdasarkan tabel)

β = *power test*

Bila $\beta=0.08 \rightarrow Z\beta=0.842$

d = Besarnya penyimpangan yang bisa ditolerir

Untuk kelompok berpasangan $QD^2/d^2 = 1$, sehingga hasilnya $n = (Z\alpha + Z\beta)^2$

Dari perhitungan di atas dimana $Z\alpha = 1.96 \rightarrow \alpha = 0.05$

$Z\beta = 0.842 \rightarrow \beta = 0.80$

maka $n = (1.96 + 0.842)^2 = 7.85 = 8$

Jadi sampel minimal untuk setiap kelompok adalah delapan. Dalam penelitian ini di gunakan 10 ekor tikus putih untuk setiap kelompok ditambah dua ekor untuk cadangan yang diperlakukan sama dengan kelompok sampel, dengan maksud untuk memantapkan signifikansi hasil penelitian. Sehingga dalam penelitian ini untuk empat kelompok sampel di gunakan 40 ekor tikus putih, ditambah dengan 8 ekor sebagai cadangan.

4.7 Kelompok Perlakuan dan Kelompok Kontrol

Sebanyak 40 ekor tikus putih sebagai sampel penelitian dibagi menjadi empat kelompok.

Keterangan:

Untuk kelompok yang berpasangan $QD^2/d^2=1$, sehingga hasilnya $n=(Z\alpha+Z\beta)^2$

n = Besar sampel masing masing kelompok

$Z\alpha$ = Nilai standar normal, yang besarnya tergantung α

Bila $\alpha=0.05 \rightarrow Z\alpha=1.67=0.01 \rightarrow Z\alpha=1.96$

$Z\beta$ = Nilainya tergantung beta yang di tentukan (berdasarkan tabel)

β = *power test*

Bila $\beta=0.08 \rightarrow Z\beta=0.842$

d = Besarnya penyimpangan yang bisa ditolerir

Untuk kelompok berpasangan $QD^2/d^2=1$, sehingga hasilnya $n=(Z\alpha+Z\beta)^2$

Dari perhitungan di atas dimana $Z\alpha=1.96 \rightarrow \alpha=0.05$

$Z\beta=0.842 \rightarrow \beta=0.80$

maka $n=(1.96+0.842)^2=7.85=8$

Jadi sampel minimal untuk setiap kelompok adalah delapan. Dalam penelitian ini di gunakan 10 ekor tikus putih untuk setiap kelompok ditambah dua ekor untuk cadangan yang diperlakukan sama dengan kelompok sampel, dengan maksud untuk memantapkan signifikansi hasil penelitian. Sehingga dalam penelitian ini untuk empat kelompok sampel di gunakan 40 ekor tikus putih, ditambah dengan 8 ekor sebagai cadangan.

4.7 Kelompok Perlakuan dan Kelompok Kontrol

Sebanyak 40 ekor tikus putih sebagai sampel penelitian dibagi menjadi empat kelompok.

- Kelompok 1** : Adalah kelompok kontrol (K), terdiri dari 10 ekor tikus putih yang diinjeksi dengan bahan pelarut *oleum coecos* steril, jaringan di preparasi 1 minggu setelah injeksi bahan pelarut.
- Kelompok 2** : Adalah kelompok perlakuan 1 (P1), terdiri dari 10 ekor tikus putih yang distimulasi dengan injeksi emulsi Kolagen tipe II dalam *complete Freund's adjuvant* sehingga menderita artritis yang disebut *collagen-induced arthritis* (CIA). Jaringan sendi dipreparasi 1 minggu setelah imunisasi. Tidak dilakukan booster pada kelompok ini. Tikus pada kelompok ini merupakan kelompok tikus dengan artritis reumatoid fase awal atau fase inisiasi.
- Kelompok 3** : Adalah kelompok Perlakuan 2 (P2), terdiri dari 10 ekor tikus putih yang distimulasi dengan injeksi emulsi Kolagen tipe II dalam *complete Freund's adjuvant* sehingga menderita artritis yang di sebut *collagen-induced arthritis* (CIA). Booster dilakukan 1 minggu setelah imunisasi pertama dan jaringan sendi di preparasi 3 minggu setelah imunisasi pertama. Tikus pada kelompok ini merupakan kelompok tikus dengan artritis reumatoid fase aktif.
- Kelompok 4** : Adalah kelompok perlakuan 3 (P3), terdiri dari 10 ekor ikus putih yang di stimulasi dengan injeksi emulsi Kolagen tipe II dalam *complete Freund's adjuvant* sehingga menderita artritis yang disebut *collagen-induced arthritis* (CIA). Booster dilakukan 1 minggu setelah imunisasi pertama dan jaringan sendi di preparasi

6 minggu setelah imunisasi pertama. Tikus pada kelompok ini merupakan kelompok tikus dengan artritis reumatoid fase kronik.

4.8 Variabel Penelitian

4.8.1 Variabel Bebas

Stimulasi tikus putih sehingga menderita artritis, yaitu dengan cara memberikan imunisasi pada tikus putih dengan injeksi Kolagen tipe II yang di emulsi dengan *complete Freund's adjuvant*. Tikus yang memberikan respon terhadap emulsi kolagen tipe II tersebut dikenal sebagai *collagen induced arthritis* (CIA). Tergantung pada waktu setelah imunisasi, artritis reumatoid pada tikus putih di kelompokkan menjadi tikus artritis reumatoid fase inisiasi, fase aktif dan fase kronik.

4.8.2 Variabel kendali

- 4.8.2.1 Hewan coba: Jenis tikus putih, umur dan jenis kelamin
- 4.8.2.2 Pemeliharaan dan bahan makanan
- 4.8.2.3 Imunisasi: Teknik injeksi intra dermal di beberapa tempat pada ekor tikus putih
- 4.8.2.4 Pengambilan jaringan sendi: Teknik pengambilan jaringan, fiksasi dan pemotongan jaringan sendi untuk preparat
- 4.8.2.5 Pewarnaan preparat: Teknik pewarnaan histologipatologis dan imunhistokimia.

4.8.3 Variabel tergantung

Variabel tergantung adalah variabel yang akan di teliti, yaitu perubahan respon imun yang terjadi di jaringan sinovial dari sendi cakar tikus putih yang distimulasi menjadi artritis reumatoid (tikus CIA) pada fase inisiasi, fase aktif dan fase kronik. Variabel tersebut adalah:

4.8.3.1 Ekspresi molekul ICAM-1

4.8.3.2 Ekspresi molekul VCAM-1

4.8.3.3 Ekspresi molekul selektin-1.

4.8.3.4 Ekspresi molekul sel yang menghasilkan TNF- α

4.8.3.5 Ekspresi molekul sel yang menghasilkan IL-1

4.8.3.6 Ekspresi molekul sel yang menghasilkan IL-10

4.9 Definisi Operasional Variabel

4.9.1. Tikus *collagen induced arthritis* (CIA)

Adalah tikus putih *Rattus norvegicus Strain Wistar* jantan yang diimunisasi dengan injeksi emulsi kolagen tipe II. Emulsi kolagen tipe II di peroleh dengan cara: melarutkan *Collagen type II* (berasal dari rawan sendi *Bovin*) (Sigma, St Louis) dengan 0.1M asam asetat, kemudian diemulsi dengan *complete Freund's adjuvant* (mengandung 1 mg *Mycobacterium Tuberculosis heat killed and dried*, 0.85 ml *mineral oil*, 0.15 ml *Mannide Monooleate*) (sigma, St Louis) dalam jumlah yang sama. Injeksi di lakukan intradermal di beberapa tempat pada ekor tikus, dengan dosis pemberian: 200 μ l. Booster di lakukan pada kelompok P2 dan P3, satu minggu setelah imunisasi pertama, dengan dosis 100 μ l intradermal di beberapa tempat pada ekor tikus.

4.9.2 Fase inisiasi artritis reumatoid

Fase ini merupakan fase awal atau permulaan terjadinya penyakit artritis reumatoid, yaitu saat mulai terjadinya respon terhadap imunisasi. Pada fase inisiasi atau fase awal belum terlihat adanya gejala klinis artritis reumatoid, yang ditandai dengan peradangan pada sendi cakar tungkai tikus CIA. Fase ini telah ditentukan, yaitu selama satu minggu sesudah imunisasi pertama. Secara histopatologis terlihat adanya hiperplasia ringan dari sel lining, infiltrasi sel limfosit dan makrofag serta gambaran vasodilatasi pembuluh darah pada jaringan sinovial sendi cakar tikus.

4.9.3 Fase aktif artritis reumatoid

Fase ini merupakan fase dimana terlihat adanya gejala klinis artritis reumatoid, dimana telah terlihat tanda-tanda inflamasi pada sendi cakar tikus CIA berupa pembengkakan dan warna kemerahan. Fase ini telah ditentukan, yaitu tiga minggu setelah imunisasi pertama yang dilanjutkan dengan booster satu minggu setelah imunisasi pertama. Secara histopatologis terlihat adanya infiltrasi sel-sel limfosit, makrofag dan sel plasma. Gambaran neovaskularisasi dan vasodilatasi dan pembuluh darah terlihat sangat menonjol pada jaringan sinovial. Infiltrasi sel radang akut pada penyakit artritis reumatoid terdiri dari sel bulat yang mendominasi sel di jaringan sinovial. Fase ini merupakan fase inflamasi akut, yang secara klinis dikenal dengan *flare-up*.

4.9.4 Fase kronis artritis reumatoid

Fase ini merupakan saat dimana penyakit artritis reumatoid berlanjut menjadi kronis. Fase ini telah ditentukan, yaitu enam minggu setelah imunisasi

pertama yang dilanjutkan dengan booster satu minggu setelah imunisasi pertama. Secara histopatologis terlihat gambaran proliferasi fibroblas, infiltrasi sel-sel radang kronik yaitu sel mononuklear, limfosit, sel plasma dan *giant cells* atau sel datia mendominasi sel di jaringan sinovial. Sel radang berkelompok membentuk nodul yang dapat berkembang sehingga mengandung *germinal center*. Pada fase ini terjadi erosi pada tulang rawan sendi.

4.9.5 Sitokin pro-inflamasi

Adalah sitokin yang merangsang terjadinya respon imun. Sitokin pro-inflamasi berperan pada timbulnya inflamasi. Yang termasuk dalam sitokin pro-inflamasi adalah IL-1 dan TNF- α .

4.9.6 Sitokin anti inflamasi

Adalah sitokin yang menghambat terjadinya respon imun. Sitokin anti inflamasi bekerja menghambat aktifitas Th1 dalam memproduksi sitokin pro-inflamasi. Yang termasuk dalam sitokin anti-inflamasi adalah IL-10.

4.9.7 Perubahan respon imun

Adalah terjadinya perubahan pada sejumlah komponen sel imunokompeten akibat perlakuan. Perubahan yang terjadi dilihat pada jaringan sinovial sendi cakar tikus CIA, dimana sel imunokompeten akan mengekspresikan molekul yang menandakan aktivasinya. Ekspresi molekul tersebut di ekspresikan oleh sel di jaringan sinovial yang di deteksi dengan menggunakan teknik

pewarnaan imunohistokimia, dengan monoklonal antibodi langsung terhadap molekul dari permukaan sel yang akan dideteksi, yaitu:

ICAM-1

VCAM-1

Selektin-L

Molekul dari sel penghasil TNF- α

Molekul dari sel penghasil IL-1

Molekul dari sel penghasil IL-10

4.10 Prosedur Pelaksanaan Penelitian.

4.10.1 Teknik Pembuatan Preparat Histologis

1. Proses fiksasi: Jaringan yang di ambil dari tikus putih yang telah dikorbankan dengan teknik dislokasi servikal setelah di anastesi dengan eter, difiksasi dengan *buffer formalin* 10% selama 15-24 jam
2. Proses dekalsifikasi: Jaringan dimasukkan kedalam cairan alklorid yang mengandung asam formiat, HCL dan aquadestilata selama 24 jam.
3. Proses dehidrasi dilakukan untuk menarik air dari jaringan dengan memasukkan jaringan kedalam etanol secara bertahap agar tidak terjadi perubahan morfologi jaringan.

Alkohol dapat di pergunakan sebagai media antara dari fase air ke fase minyak. Tahap dehidrasi mulai dari konsentrasi 80% selama 2 jam, etanol 90% selama 2 jam, etanol 95% selama 1 jam dan etanol absolut tiga kali masing-masing selama 1 jam.

4. Proses penjernihan (*clearing*) di lakukan untuk mengganti dari fase air ke fase minyak. Bahan untuk penjernihan adalah xylol. Jaringan di masukkan kedalam xylol dua kali selama masing-masing 1 jam, diikuti dengan yang ketiga selama 2 jam.
5. Proses penanaman (*impregnation*) adalah dengan memasukkan jaringan kedalam *histosec* cair sebanyak tiga kali masing-masing selama 2 jam.
6. Proses pengeblokan (*embedding*) yaitu pembuatan balok parafin
7. Balok parafin disayat setebal 5-7 μ m dengan mikrotom. Sayatan jaringan ditempelkan pada gelas objek yang telah dilapisi polilisin, dan di keringkan dalam oven.
8. Jaringan dilakukan deparafinisasi dengan xylol, hidrasi dengan alkohol dari konsentrasi tinggi ke rendah secara bertahap, kemudian dimasukkan ke dalam air.
9. Proses pengecatan di lakukan dengan Hematoksilin-Eosin, jaringan yang telah diwarnai dibersihkan dari sisa pewarnaan dan dilakukan dehidrasi dengan alkohol.
10. Jaringan ditutup dengan gelas penutup yang direkatkan dengan entelan. (Cormack, 1987; Tania,2000).

4.10.2 Teknik Pewarnaan Imunohistokimia

Teknik pewarnaan imunohistokimia adalah pewarnaan imunoperoksidase indirek dengan tahapan sebagai berikut:

1. Di lakukan deparafinisasi sayatan jaringan untuk menghilangkan parafin dari jaringan. Deparafinisasi dilakukan dengan cara standar baku laboratorium,

yaitu dengan cara bertahap preparat dimasukan kedalam cairan aseton, kemudian xylol 3x masing-masing selama 5 menit, alkohol 100% 3x masing-masing selama 5 menit, alkohol 96% 3x masing-masing selama 5 menit, alkohol 80% 3x masing-masing selama 5 menit, alkohol 70% 3x masing-masing selama 5 menit dan kemudian dicuci dengan air.

2. Jaringan dicuci dengan PBS pH 7,4
3. Jaringan ditandai dengan pena penanda jaringan
4. Jaringan diinkubasi dengan tripsin 3% pada temperatur 37°C selama 5-10 menit, untuk membuka *masking antigen*.
5. Jaringan di inkubasi dengan H₂O₂ 3% (Dako Kit) selama 5 menit untuk menghilangkan *background staining*, di ikuti dengan pengeringan pada temperatur ruangan.
6. Jaringan dicuci dengan air mengalir selama 1 menit, diikuti pencucian dengan aquadestilata.
7. Jaringan diinkubasi dengan monoklonal antibodi primer yaitu *murine monoclonal antibody* terhadap molekul adesi (ICAM-1, VCAM-1 dan Selektin-I) dari *rat* (Santa Cruz, US). Dan *murine monoclonal antibody* terhadap sel penghasil sitokin pro-inflamasi (TNF- α dan IL-1) serta sel penghasil sitokin anti-inflamasi (IL-10) dari *rat* (Santa Cruz, US). Monoklonal antibodi di larutkan dengan TRIS-PBS 1:200. Untuk jaringan seluas 1 cm² di perlukan 100 μ l monoklonal antibodi. Inkubasi di lakukan selama 30 menit dalam ruang lembab pada suhu kamar.
8. Jaringan di cuci dengan PBS pH 7,4 dua kali masing-masing selama 5 menit

9. Jaringan diinkubasi dengan antibodi sekunder yaitu *labelled polymer horseradish peroxidase (HRP)* (Dako Kit), selama 30 menit dalam ruang lembab pada suhu kamar.
10. Jaringan dicuci dengan PBS pH 7,4 dua kali masing-masing selama 3 menit
11. Jaringan dicuci dengan PBS dua kali masing-masing selama 5 menit
12. Jaringan diinkubasi dengan substrat, yaitu DAB yang dilarutkan dengan *substrat –chromogen solution* (Dako Kit) selama 5-10 menit
13. Apabila timbul warna merah kecoklatan, substrat dibuang dari jaringan.
14. Jaringan dicuci dengan PBS pH 7,4 dua kali selama masing-masing 5 menit
15. Jaringan dicuci dengan akuadestilata
16. Jaringan diwarnai dengan Hematoksin
17. Jaringan dicuci jaringan dengan air mengalir.
18. Tutup jaringan dengan kaca penutup (*deck glass*) dan dilem dengan entelan
19. Ekspresi molekul yang positif dengan monoklonal antibodi primer akan terlihat berwarna coklat di bawah mikroskop cahaya.
20. Sel yang positif dihitung dari 100 sel dalam lapangan pandangan dengan menggeser slide seperti pada pelaksanaan hitung jenis leukosit.
21. Dari setiap pelaksanaan pewarnaan dibuat kontrol positif dan kontrol negatif (Branztaeg, 1982; Bourne, 1983; Tania, 2000)

4.11 Tempat dan Waktu Penelitian

4.11.1 Tempat penelitian

Penelitian dilaksanakan di:

1. Laboratorium Farmakologi Jurusan Farmasi FMIPA Unand untuk pemeliharaan dan pembuatan tikus CIA, sampai hewan coba di korbakan untuk pengambilan sendi sebagai sampel jaringan sinovial.
2. Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga untuk pembuatan preparat histologis jaringan sinovial.
3. Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas untuk melakukan pewarnaan dengan teknik imunohistokimia.
4. Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas untuk penilaian gambaran histopatologis jaringan sinovial dan imunohistokimia.

4.11.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan selama 12 bulan. Mulai dari Bulan Oktober 2002 sampai dengan bulan Oktober 2003

4.12 Persyaratan Etik

Implikasi etik pada tikus putih sebagai hewan coba mengikuti *Animals Ethic*. Hal yang perlu dilaksanakan sesuai dengan etik antara lain perawatan tikus putih dalam kandang, pemberian makan dan minum, aliran udara dalam ruang kandang, perlakuan saat penelitian, cara pengambilan unit analisis penelitian dan pemusnahannya.

.....

Untuk menguji hipotesis 1,2 dan 3 digunakan Manova, Anova dan LSD (*Least Significant Different*) Hasil pengujian bermakna bila harga p maksimal 0.05 (Steel and Torrie, 1980).



BAR 5

ANALISIS DAN HASIL PENELITIAN

5.1 Hasil Perlakuan Pada Hewan Coba

Dari 73 ekor tikus yang menjadi hewan coba, telah dilakukan randomisasi sehingga terpilih 40 ekor sebagai sampel pada penelitian ini. Ke 40 ekor tikus tersebut dikelompokkan menjadi empat dengan $n = 10$, yaitu kelompok kontrol (K), kelompok tikus artritis reumatoid fase awal (P1), kelompok tikus artritis reumatoid fase akut (P2) dan kelompok tikus artritis reumatoid kronik (P3).

Semua tikus ditimbang berat badannya sebelum diberi perlakuan dan sesudah diberi perlakuan. Selama kurun waktu penelitian, tikus diamati untuk mengetahui terjadinya pembengkakan sendi-sendi pada cakar tungkai belakang dan tungkai depan. Tidak ada tikus yang mati selama kurun waktu penelitian.

Data dasar hasil penimbangan berat badan yang dilakukan terhadap masing-masing kelompok tikus tersebut terlihat pada lampiran 1, sedangkan data dasar pembengkakan sendi cakar tikus terlihat pada lampiran 17.

Pembengkakan yang terjadi pada sendi-sendi cakar tungkai tikus sebagai hewan coba yang mengalami perlakuan, terjadi sesuai dengan waktu yang telah diperkirakan sebelumnya. Satu minggu setelah imunisasi dengan emulsi kolagen tipe II dalam *complete Freund's adjuvant* pada tikus kelompok P1, P2 dan P3 tidak terlihat adanya pembengkakan pada sendi. Pada tikus kelompok P1 yang di preparasi satu minggu setelah imunisasi, secara klinis tidak terlihat adanya pembengkakan sendi. Tikus ini merupakan kelompok tikus dengan artritis reumatoid fase inisiasi,

Pada kelompok P2, satu minggu setelah imunisasi diikuti dengan booster preparasi dilakukan tiga minggu setelah imunisasi pertama. Pembengkakan sendi cakar tungkai tikus, mulai terlihat nyata pada minggu ketiga setelah imunisasi pertama. Setelah akhir minggu ketiga saat akan dilakukan preparasi, pada semua tikus dalam kelompok ini terlihat pembengkakan sendi cakar pada kedua tungkai belakang. Pembengkakan yang nyata dari sendi-sendi ini, diikuti dengan warna kemerahan, yang merupakan tanda-tanda inflamasi akut atau *flare-up*. Kelompok P2 merupakan kelompok tikus artritis reumatoid fase aktif.

Tikus pada kelompok P3 mendapat perlakuan yang sama dengan kelompok P2, yaitu satu minggu setelah imunisasi diikuti dengan booster. Preparasi dilakukan enam minggu setelah imunisasi pertama. Pada semua tikus dalam kelompok ini masih terlihat pembengkakan sendi cakar pada kedua tungkai belakang. Pembengkakannya berkurang dibanding pembengkakan saat tiga minggu setelah imunisasi pertama. Warna kemerahan pada sendi cakar yang membengkak menghilang. Di samping itu terlihat pembengkakan pada cakar tungkai depan. Pembengkakan pada sendi cakar tungkai depan ini tidak memperlihatkan warna kemerahan. Pada fase ini sudah terlihat adanya deformitas dari cakar tungkai belakang. Kelompok P3 merupakan kelompok tikus dengan artritis reumatoid kronis.

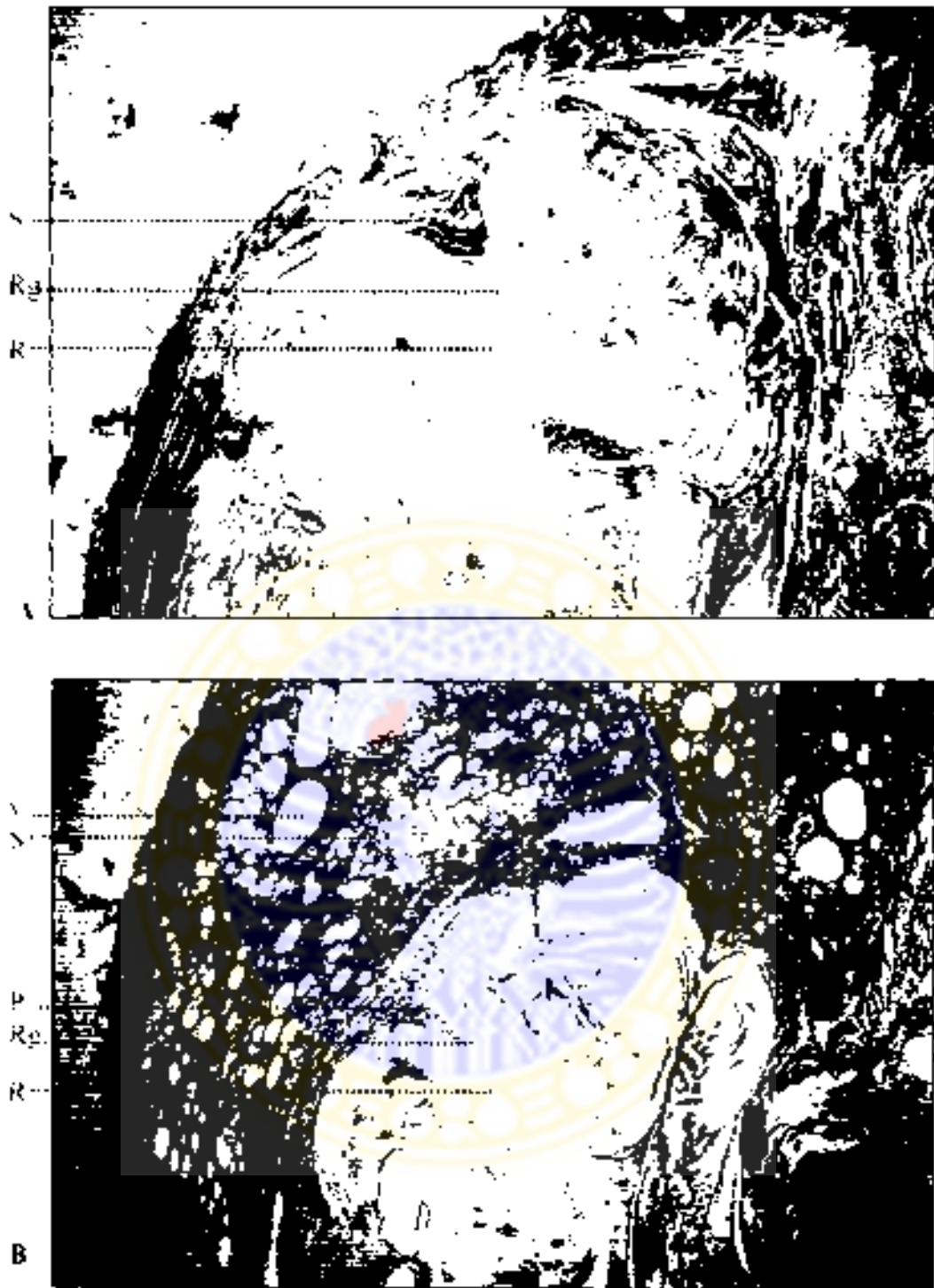
5.2 Gambaran Histopatologis

Gambar-gambar berikut memperlihatkan gambaran histologis sendi cakar tungkai belakang tikus normal dibandingkan dengan gambaran histopatologis

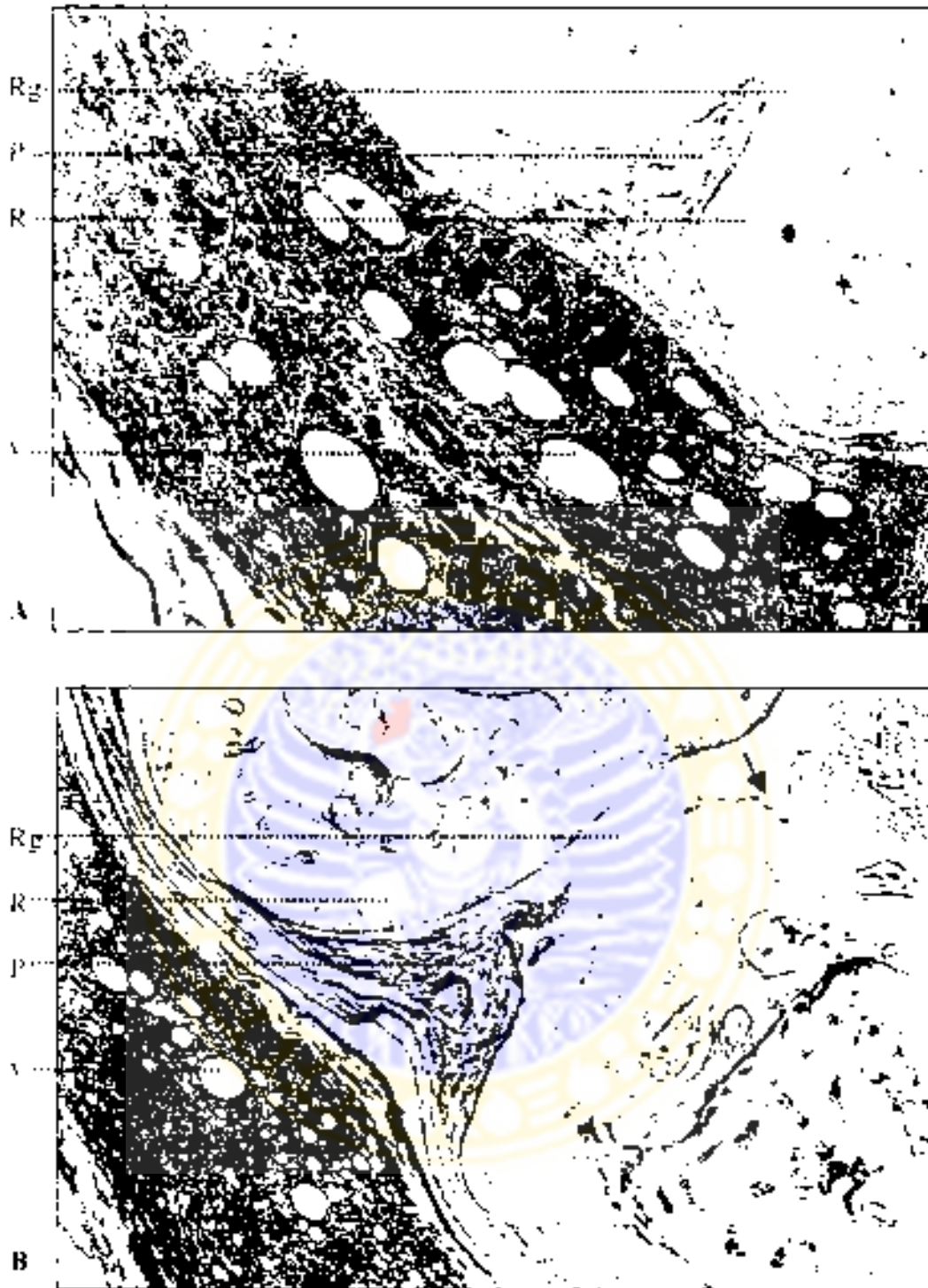
sendi cakar tungkai belakang tikus artritis reumatoid fase inisiasi, fase aktif dan fase kronis.

Pada tikus normal, gambaran histologis sendi cakar tungkai belakang terlihat pada gambar 5.1 A. Di bawah jaringan kulit terdapat jaringan kolagen dan jaringan fibrosa. Lapisan khusus dari kolagen membentuk sinovium. Rongga sinovial terlihat lebar. Pada artritis reumatoid fase awal atau fase inisiasi, jaringan panus terlihat pada rongga sinovial diantara tulang rawan sendi. Jaringan sinovial terlihat sedikit menebal, dengan pembuluh darah kecil, terutama venula. Panus dilapisi oleh fibroblas, di jaringan panus terdapat sedikit pembuluh darah dengan infiltrasi sel radang, sel fibroblas dan fibrosit.

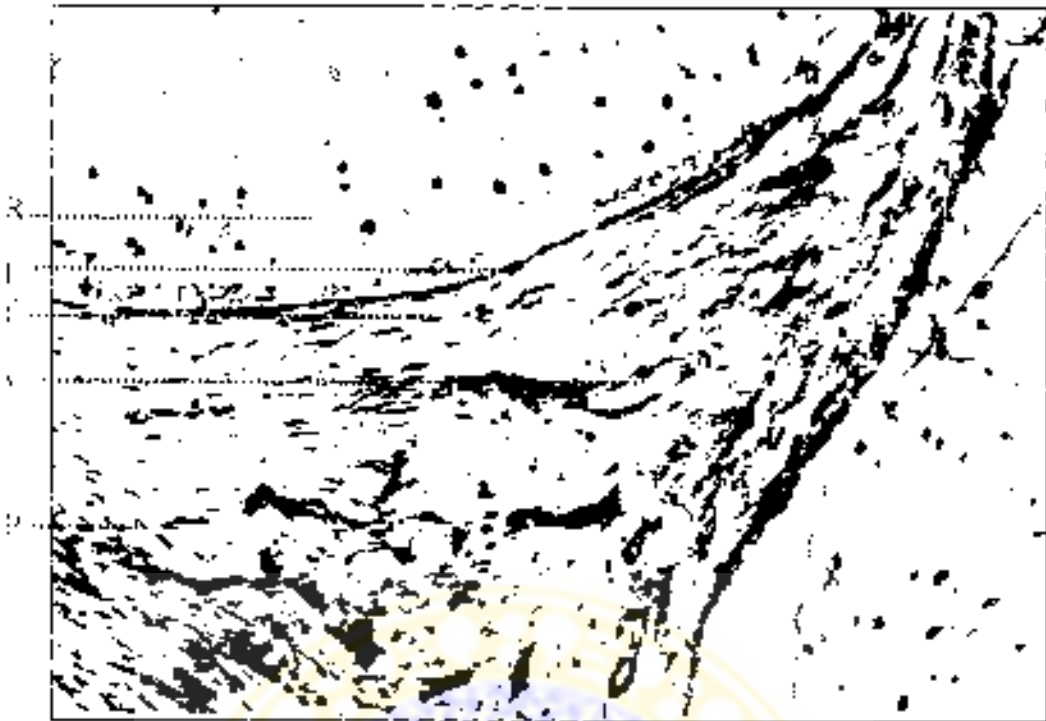
Pada artritis reumatoid fase aktif (gambar 5.1 B), panus lebih menonjol ke dalam rongga sinovial bila dibandingkan dengan panus pada tikus normal. Jaringan sinovial terlihat sangat tebal, dan rongga sinovial tampak menyempit. Jaringan sinovial yang tebal tersebut mengandung banyak pembuluh darah, terutama venule. Jaringan sinovial tampak diinfiltrasi oleh sel-sel limfosit, makrofag, sel plasma. Infiltrasi sel limfosit terlihat difus, dan ada yang membentuk folikel.



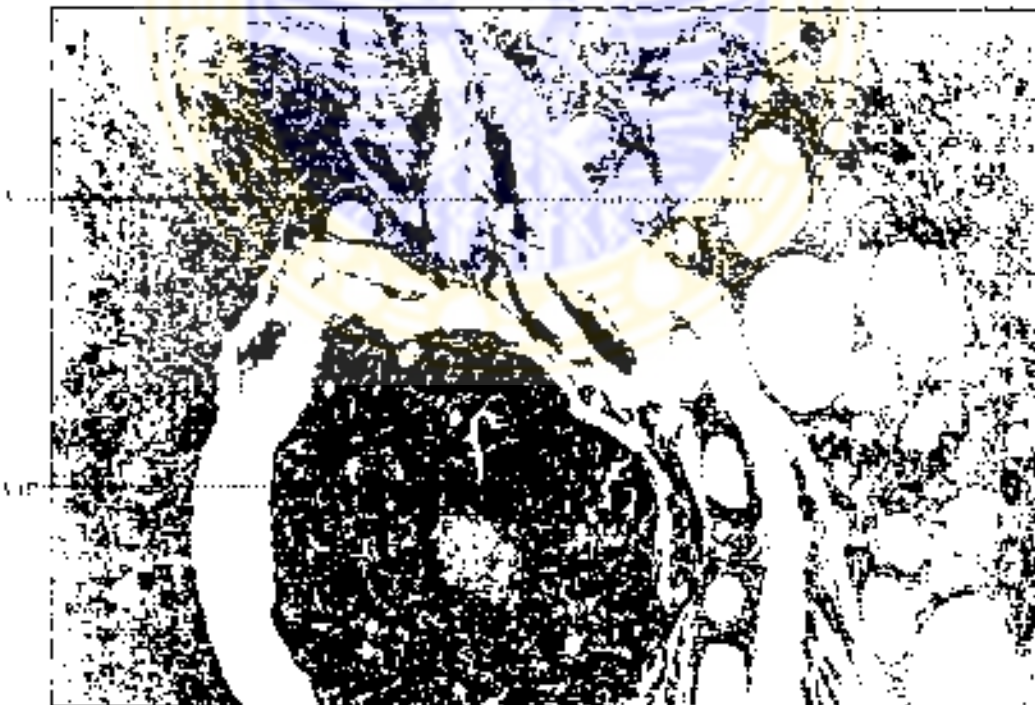
Gambar 5.1. Gambaran histologis sendi tikus normal (A), di bandingkan dengan gambaran histopatologis sendi tikus arthritis reumatoid fase aktif (B) (H&E; x40).
 S-Jaringan sinovial, P Pannus, R-Tulang rawan sendi, Rg Rongga sendi, V Venule



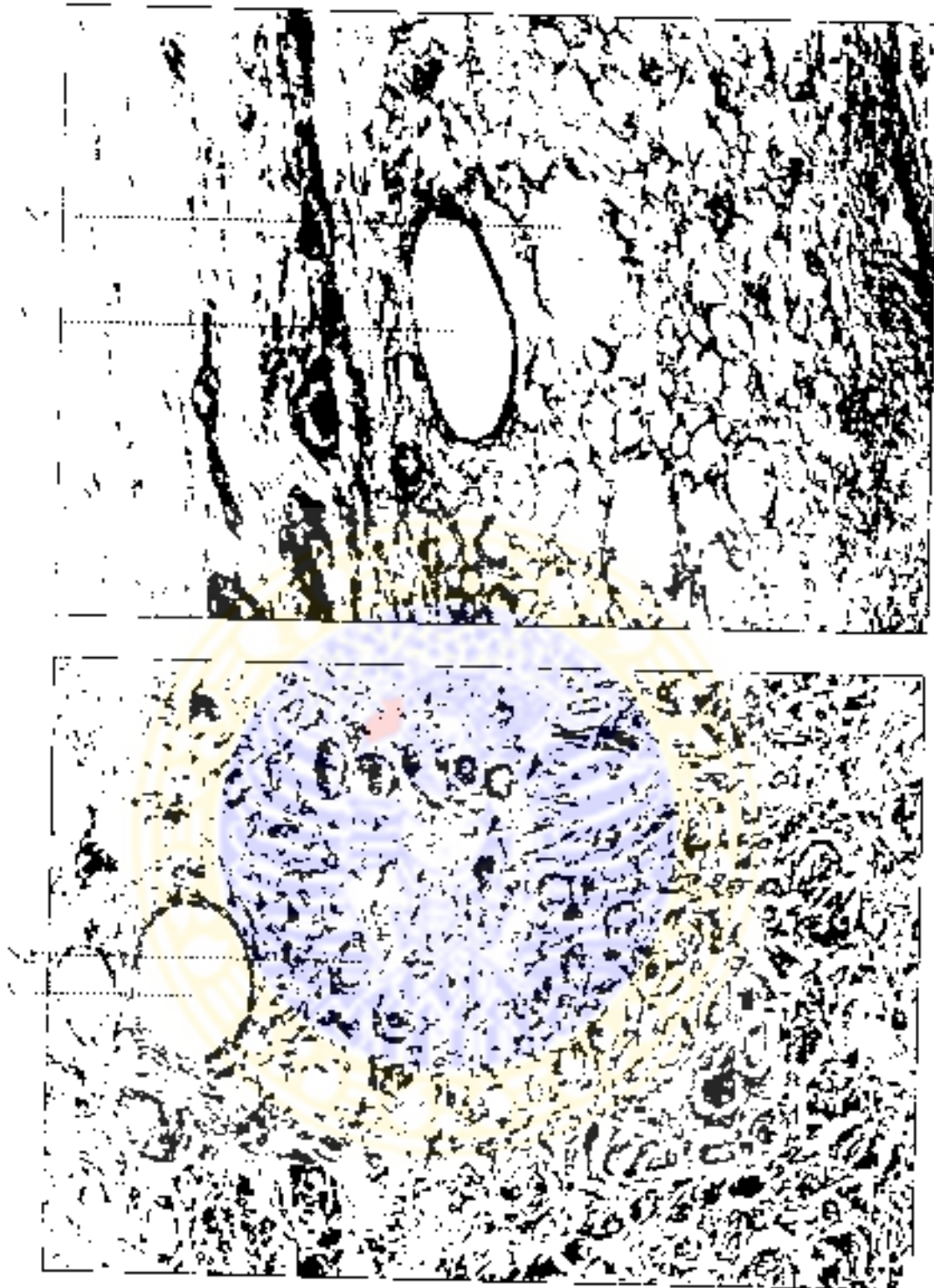
Gambar 5.2 Perbandingan gambaran histopatologis panus dan jaringan sinovial dari sendi kaki tungkai belakang tikus arthritis reumatoid fase aktif (A) dan fase kronik (B) (HE X100).
 S Jaringan sinovial, P Panus, R Tulang rawan sendi, Rg Rongga sendi, V Venule
 Tanda panah kerusakan sendi



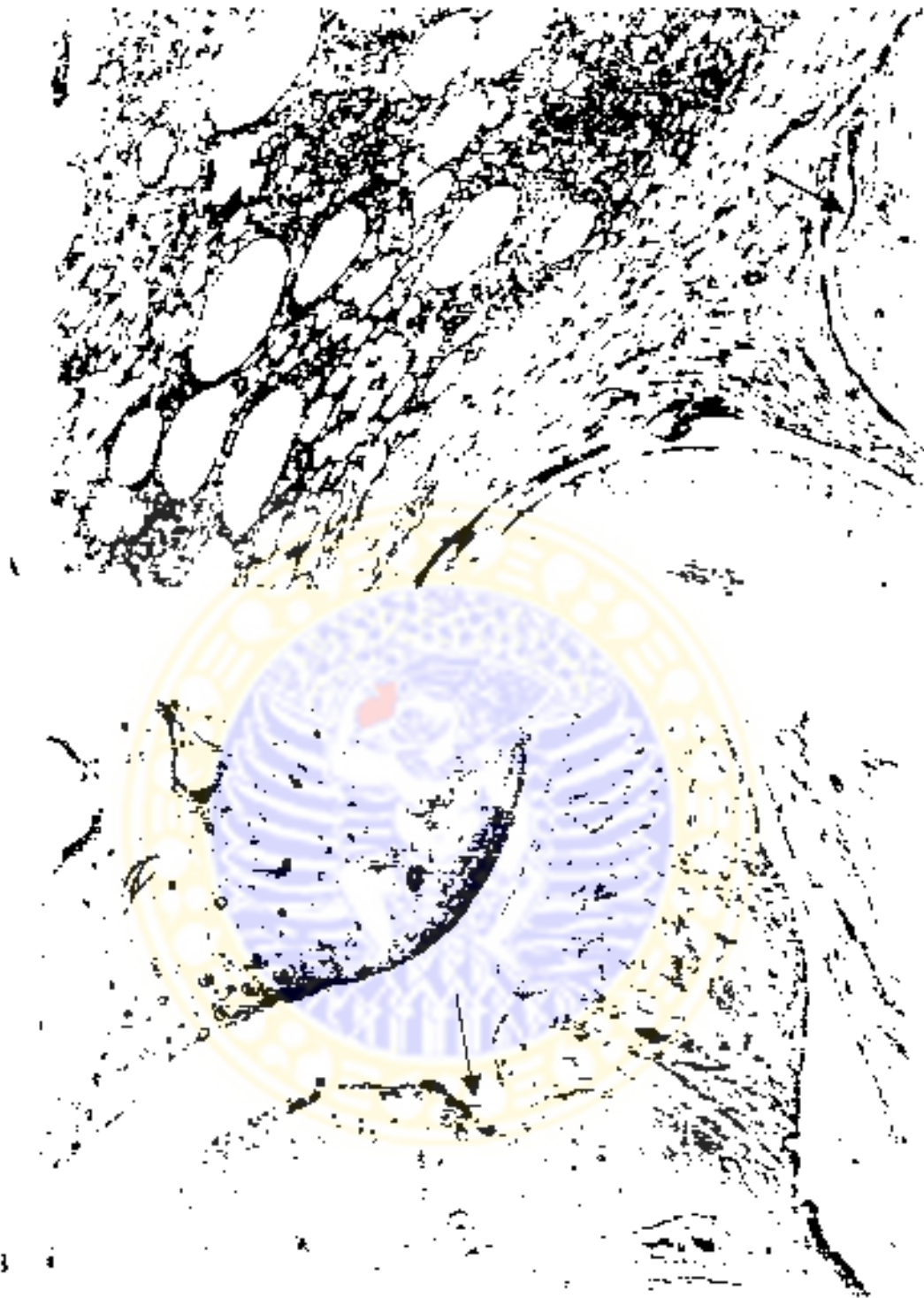
Gambar 5.3 Gambaran histopatologis panus pada sendi tikus arthritis reumatoid fase aktif (HE, X200).
 S Jaringan sinovial, R Tulang rawan sendi, V Venula, P Panus, F Fibrosis, T Fibroblas



Gambar 5.4 Gambaran histopatologis lapisan sinovial pada sendi tikus arthritis reumatoid fase aktif (HE, X400).
 V Venula, Gr Jaringan granuloma



Gambar 5. Gambaran histopatologis jaringan sinovial pada sendi tikus artitis reumatoid fase kronis (H&E x200).
A. Verula. B. Jaringan nekrotik. C. Sel darah



B **A**

Gambar 5.6. Gambaran histopatologis kerusakan tulang rawan sendi pada tikus arthritis reumatoid fase aktif (A) dan fase kronis (B) (34). X100.
Tanda panah = kerusakan tulang rawan sendi

Pada gambaran histopatologis artritis reumatoid fase aktif (gambar 5.2 A) yang dibandingkan dengan artritis reumatoid fase kronik (5.2 B), terlihat bahwa pada fase aktif ruang antar sendi yang menyempit. Panus jauh masuk kedalam rongga sinovial. Pada panus terlihat kapiler, venule, limfosit, fibroblas, fibrosit dan lemak. Di dalam rongga sendi terlihat beberapa sel radang dan sel lemak. Jaringan sinovial sangat tebal dengan peningkatan jumlah pembuluh darah yang sangat banyak jumlahnya terutama venula. Lumen pembuluh darah terlihat lebih lebar, karena adanya vasodilatasi dari pembuluh darah. Terlihat infiltrat sel-sel radang yang difus, granulomatous dan peradangan perivaskuler. Sel-sel radang terdiri dari sel-sel sel bulat (limfosit dan sel plasma), makrofag. Diantara sel-sel terdapat serat kolagen tipis. Sel-sel yang terlihat pada jaringan sinovial adalah sel limfosit, monosit, sel plasma, fibroblas, fibrosit dan sel lemak.

Bila di bandingkan dengan gambaran histopatologis artritis reumatoid fase kronik (gambar 5.2 B) panus terlihat lebih lebar dan lebih jauh menjorok masuk kedalam rongga sinovial. Terlihat penebalan jaringan sinovial, dengan ketebalan yang kurang daripada ketebalan jaringan sinovial pada fase aktif. Seperti juga pada fase aktif, terlihat peningkatan jumlah pembuluh darah terutama venula pada jaringan sinovial. Pada sisi lain dari sendi terlihat adanya kerusakan pada rawan

Gambar 5.3 memperlihatkan gambaran histopatologi panus dari sendi cakar tikus artritis reumatoid fase aktif. Pada panus terlihat kapiter, pembuluh darah kecil, lemak, sel fibroblas, fibrosit dan sel-sel radang

Gambar 5.4 memperlihatkan terbentuknya granuloma dengan jaringan fibrosis dibagian tengahnya. Di sekitarnya terlihat infiltrasi difus dari sel radang.

Pada artritis reumatoid fase kronik terlihat invasi panus yang bercabang menjorok kedalam ruang antar sendi. Panus di lapiasi oleh fibrosit, di dalam panus terlihat pembuluh darah kecil terutama venula, sel lemak, fibroblas, fibrosit dan sel radang. Sel radang terlihat sampai pada daerah ujung panus. Jaringan sinovial pada artritis reumatoid kronik tidak begitu tebal, mengandung pembuluh darah kecil terutama venula. Pada jaringan sinovial terlihat adanya jaringan nekrotik (gambar 5.5 A) . Sel-sel radang yang difus terdiri dari sel plasma, limfosit dan sel datia (*giant cell*) (gambar 5.5 B)

Kerusakan tulang rawan sendi terlihat pada artritis reumatoid fase aktif (gambar 5.6 A). Permukaan tulang rawan sendi tampak tidak rata. Sedangkan kerusakan tulang rawan sendi pada fase kronik terlihat pada gambar 5.6 B. Permukaan tulang rawan sendi tidak rata dan terlihat fibrosis pada kaput tulang rawan sendi.

5.3 Hasil Pemeriksaan faktor reumatoid (FR)

Pemeriksaan FR dari serum darah hewan coba memperlihatkan titer yang negatif baik pada kelompok kontrol maupun pada kelompok tikus artritis fase awal, akut dan kronis.

5.4 Hasil Uji Statistik Sampel

5.4.1 Uji homogenitas sampel

Uji statistik Anova di lakukan untuk meyakinkan bahwa sampel berasal dari populasi yang sama.

5.4.2 Uji normalitas

Uji normalitas yang dilakukan pada penelitian ini untuk menunjukkan bahwa semua variabel, yaitu berat badan sebelum imunisasi, berat badan sesudah imunisasi, persentase ekspresi molekul adesi (ICAM-1, VCAM-1 dan selektin-L), persentase sel penghasil sitokin pro-inflamasi (IL-1 dan TNF α) serta sel penghasil sitokin anti-inflamasi (IL-10) mempunyai distribusi normal (Lampiran 10)

5.4.3 Hasil Penelitian Imunohistokimia

Dengan mempergunakan metode pewarnaan imunoperoksidase tidak langsung, mempergunakan monoklonal antibodi terhadap ICAM-1, VCAM-1 dan Selektin – 1, ekspresi molekul adesi ICAM-1, VCAM-1 dan Selektin –1, di jaringan sinovial dari sendi tikus kelompok kontrol, kelompok artritis reumatoid fase inisiasi, fase aktif dan fase kronik terlihat pada data hasil analisis statistik pada tabel 5.1.

Molekul sel penghasil sitokin pro-inflamasi (TNF- α , IL-1) dan anti-inflamasi (IL-10) yang ekspresinya dideteksi dengan mempergunakan monoklonal anti-bodi terhadap TNF- α , IL-1 dan IL-10 di jaringan sinovial sendi tikus kelompok kontrol dan kelompok artritis reumatoid terlihat pada data hasil analisis statistik pada tabel 5.2.

Gambaran ekspresi molekul adesi di jaringan sendi tikus artritis reumatoid pada fase inisiasi, fase aktif dan fase kronik terlihat pada gambar 5.7, 5.8, 5.9, 5.9, 5.10, 5.11, 5.12, 5.13 dan 5.14.

Tabel 5.1 : Persentase ekspresi molekul adesi ICAM-1, VCAM-1 dan Selektin-L di jaringan sinovial sendu tikus kelompok kontrol (K), kelompok artritis reumatoid fase inisiasi (P1), fase aktif (P2) dan fase kronis (P3).

Kelompok (n=10)	ICAM-1	VCAM-1	Selektin-L
K	0.10±0.316 ^a	0.30±0.675 ^a	0.20±0.632 ^a
P1	21.00±6.272 ^b	13.00±3.944 ^b	15.60±5.854 ^b
P2	46.00±8.498 ^d	29.10±6.454 ^d	31.10±9.620 ^c
P3	29.30±6.019 ^c	19.60±5.700 ^c	25.80±5.884 ^c

Nilai rata-rata pada kolom sama yang diikuti dengan superskrip berbeda, berbeda nyata ($p < 0.05$)

Tabel 5.2 : Persentase ekspresi molekul sel penghasil TNF- α , IL-1 dan IL-10 di jaringan sinovial tikus kelompok kontrol (K), kelompok artritis reumatoid fase inisiasi (P1), fase aktif (P2) dan fase kronis (P3).

Kelompok (n=10)	TNF- α	IL-1	IL-10
K	0.00±0.00 ^a	0.40±0.516 ^a	0.00±0.00 ^a
P1	26.50±4.905 ^b	29.20±5.160 ^b	7.50±2.799 ^b
P2	34.20±4.492 ^c	39.10±8.724 ^c	7.50±2.635 ^b
P3	34.70±8.512 ^c	25.40±6.328 ^b	18.50±6.433 ^c

Nilai rata-rata pada kolom sama yang diikuti dengan superskrip berbeda, berbeda nyata ($p < 0.05$)

5.4.3.1 Persentase ekspresi ICAM-1

Tabel 5.1 memperlihatkan perbedaan persentase ekspresi ICAM-1 di jaringan sinovial sendi tikus kelompok kontrol, kelompok artritis reumatoid fase inisiasi, fase aktif dan fase kronik .

Dengan uji multivariat terlihat persentase ekspresi ICAM-1 di jaringan sinovial sendi tikus kelompok artritis reumatoid fase inisiasi (21.00 ± 6.272), fase aktif (46.00 ± 8.498) dan fase kronik (29.30 ± 6.019) lebih tinggi dari pada tikus kelompok kontrol (0.10 ± 0.316) dengan perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$).

Dengan uji Anova dan LSD persentase ekspresi ICAM-1 yang paling tinggi terlihat pada jaringan sinovial sendi tikus kelompok artritis reumatoid fase aktif bila dibandingkan dengan tikus kelompok artritis reumatoid fase kronik fase inisiasi kelompok kontrol dengan perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$).

5.4.3.2 Persentase ekspresi VCAM-1

Pada tabel 5.1 memperlihatkan persentase ekspresi VCAM-1 di jaringan sinovial sendi tikus kelompok kontrol, kelompok artritis reumatoid fase inisiasi, fase aktif dan fase kronik.

Dengan uji multivariat terlihat bahwa persentase ekspresi VCAM-1 di jaringan sinovial tikus kelompok artritis reumatoid fase inisiasi (13.00 ± 3.944), fase aktif (29.10 ± 6.454) dan fase kronik (19.60 ± 5.700) lebih tinggi dibandingkan dengan tikus kelompok kontrol (0.30 ± 0.675) dengan perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$).

Dengan uji Anova dan LSD terlihat bahwa persentase ekspresi VCAM-1 yang paling tinggi terlihat pada tikus kelompok artritis reumatoid fase aktif dari

pada tikus kelompok artritis reumatoid fase kronik, fase inisiasi dan kelompok tikus kontrol, dengan perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$).

5.4.3.3 Persentase ekspresi selektin-L

Pada tabel 5.1 terlihat persentase ekspresi selektin-L di jaringan sinovial sendi tikus kelompok artritis reumatoid fase inisiasi, fase akut dan fase kronik dibandingkan dengan kelompok tikus kontrol.

Dengan uji multivariat terlihat persentase ekspresi selektin-L lebih tinggi di jaringan sinovial sendi tikus kelompok artritis reumatoid fase inisiasi (15.60 ± 5.854), fase aktif (31.10 ± 9.620) dan fase kronik (25.80 ± 5.884) dibandingkan dengan kelompok kontrol (0.20 ± 0.632) dengan perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$).

Dengan tes Anova dan LSD terlihat bahwa persentase ekspresi selektin-L yang paling tinggi terlihat pada tikus kelompok artritis reumatoid fase aktif dari pada tikus kelompok artritis reumatoid fase kronik, fase inisiasi dan kelompok kontrol dengan perbedaan yang signifikan ($p < 0.05$). Ekspresi selektin-L pada tikus kelompok artritis reumatoid fase inisiasi tidak berbeda bermakna dengan fase kronik ($p > 0.05$).

5.4.3.4 Persentase Ekspresi Molekul Sel Penghasil Sitokin Pro-inflamasi

TNF- α (*tumor necrotizing factor- α*)

Tabel 5.2 memperlihatkan perbedaan persentase ekspresi molekul sel penghasil sitokin pro-inflamasi TNF- α di jaringan sinovial sendi tikus kelompok kontrol, kelompok artritis reumatoid fase inisiasi, fase akut dan fase kronik.

Dengan uji multivariat terlihat persentase ekspresi molekul sel penghasil TNF- α di jaringan sinovial sendi tikus kelompok artritis reumatoid fase inisiasi ($26,50 \pm 4,905$), fase aktif ($34,20 \pm 4,492$) dan fase kronik ($34,70 \pm 8,512$) lebih tinggi dari pada kelompok tikus kontrol ($0,00 \pm 0,00$) dengan perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$).

Dengan uji Anova terlihat bahwa ekspresi molekul sel penghasil TNF- α pada tikus kelompok artritis reumatoid fase aktif dan fase kronik lebih tinggi dari pada tikus kelompok artritis reumatoid fase inisiasi dan kelompok kontrol dengan perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$). Sedangkan antara kelompok artritis reumatoid fase aktif dan fase kronik tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$).

5.4.3.5 Persentase Ekspresi Molekul Sel Penghasil Sitokin Pro-inflamasi IL-1 (interleukin-1)

Tabel 5.2 memperlihatkan persentase ekspresi molekul sel penghasil interleukin-1 di jaringan sinovial sendi tikus kelompok artritis reumatoid fase inisiasi fase inisiasi, fase aktif dan fase kronik, dibandingkan dengan tikus kelompok kontrol.

Dengan uji multivariat terlihat bahwa persentase ekspresi sel penghasil IL-1 pada jaringan sinovial sendi tikus kelompok artritis reumatoid fase inisiasi ($29,30 \pm 5,160$), fase aktif ($39,10 \pm 8,724$), fase kronis ($25,40 \pm 6,328$) lebih tinggi daripada tikus kelompok kontrol ($0,40 \pm 0,516$) dengan perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$).

Dengan uji Anova terlihat bahwa ekspresi sel penghasil IL-1 paling tinggi pada tikus kelompok artritis reumatoid fase aktif bila dibandingkan dengan fase inisiasi fase kronik dan tikus kelompok tikus kontrol dengan perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$). Sedangkan ekspresi sel penghasil IL-1 antara tikus kelompok artritis reumatoid fase tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan fase kronik ($p > 0.05$).

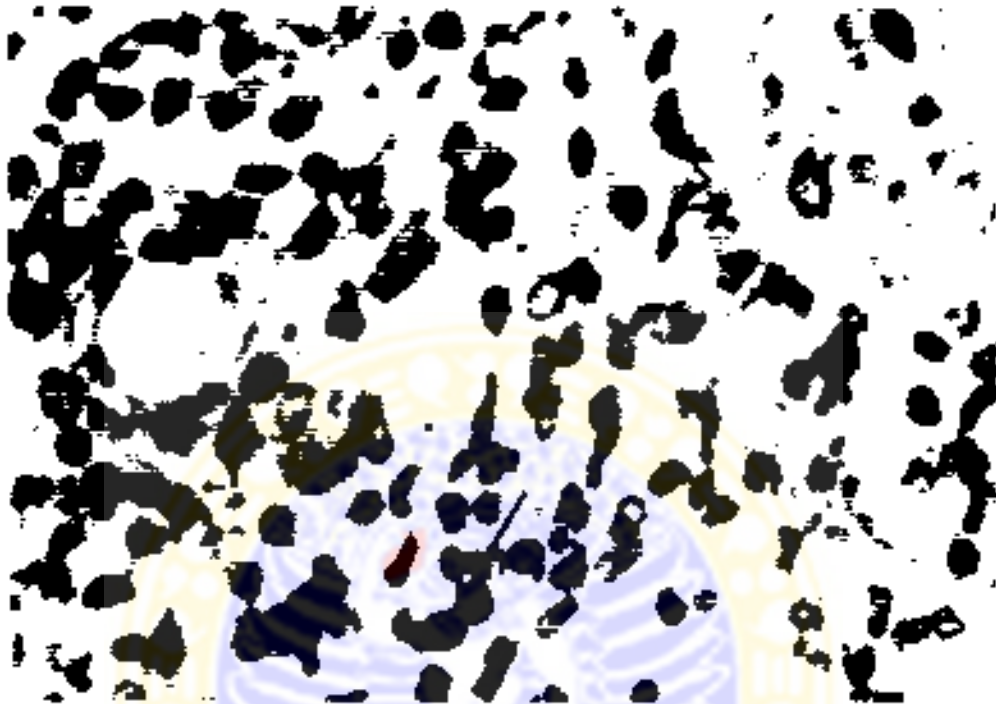
5.4.3.6 Persentase Ekspresi Molekul Sel Penghasil Sitokin IL-10 (interleukin-10)

Pada tabel 5.2 terlihat ekspresi sel penghasil IL-10 di jaringan sinovial sendi tikus kelompok artritis reumatoid fase inisiasi, fase aktif, fase kronik dan kelompok kontrol.

Dengan uji multivariat terlihat bahwa ekspresi sel penghasil IL-10 di jaringan sinovial sendi tikus kelompok artritis reumatoid fase inisiasi (7.50 ± 2.799), fase aktif (7.50 ± 2.635) dan fase kronik (18.50 ± 6.433) lebih tinggi dari pada tikus kelompok kontrol (0.00 ± 0.00) dengan perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$).

Dengan uji Anova, variabel IL-10 yang diukur persentase ekspresi sel penghasilnya, menunjukkan ekspresi yang paling tinggi terdapat pada tikus kelompok artritis reumatoid fase kronik bila dibandingkan dengan fase aktif dan fase inisiasi dan kelompok kontrol dengan ($p < 0.05$). Sedangkan antara kelompok artritis reumatoid fase inisiasi dan fase aktif tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p > 0.05$).

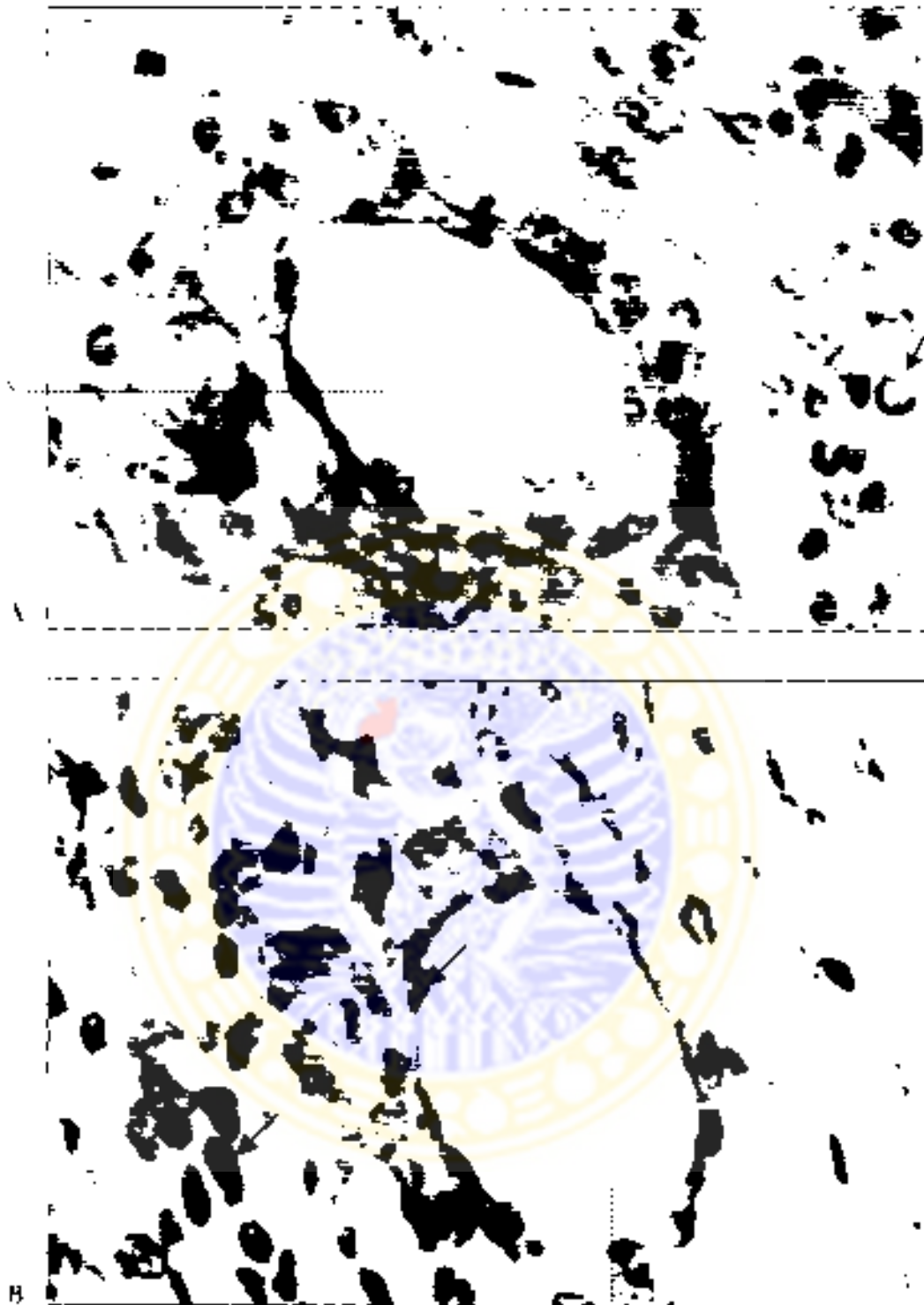
5.4.3.7 Gambaran jaringan sinovial sendi dengan pewarnaan imunohistokimia.



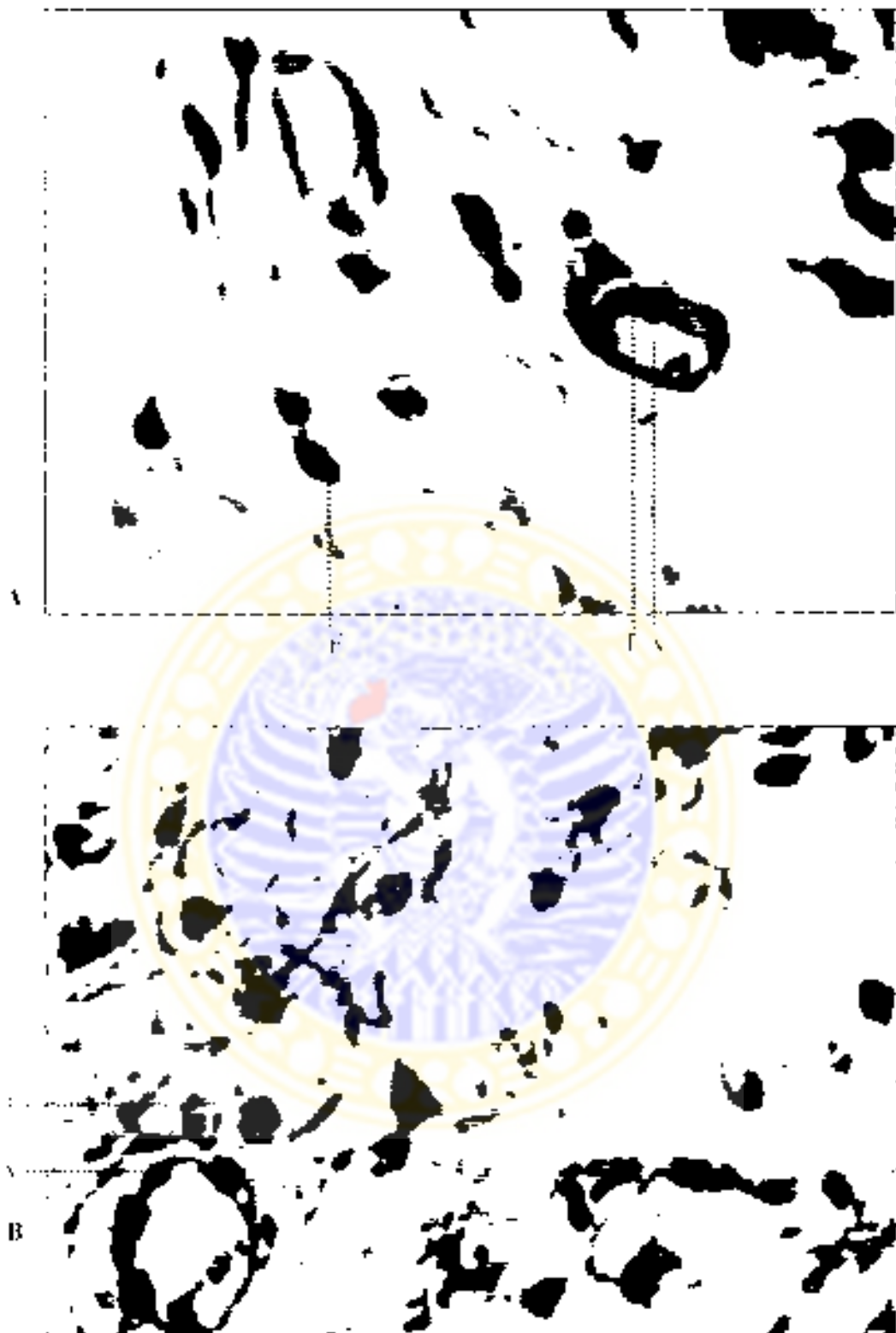
Gambar 5.7 Gambaran pewarnaan imunohistokimia dengan monoklonal antibodi terhadap selektin-L, untuk mendeteksi ekspresi selektin-L di jaringan sinovial sendi tikus arthritis reumatoid fase aktif (x400). Sel yang positif terlihat berwarna coklat (tanda panah)



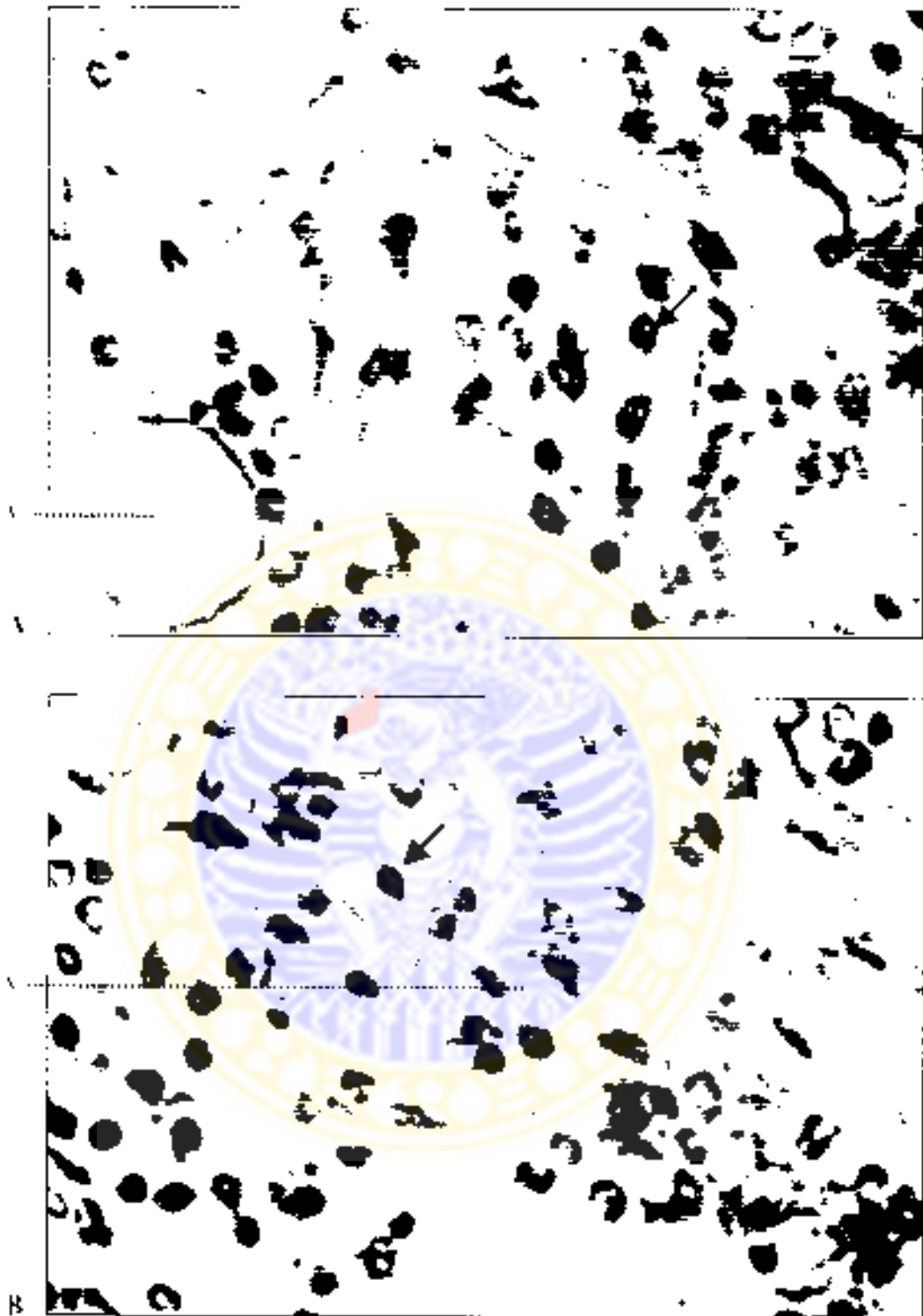
Gambar 5.8 Ekspresi VCAM-1 dengan pewarnaan imunohistokimia di panus sendi artritis reumatoid fase akut (A) x40 (B) dan x400 (C). Tanda panah adalah area pembesaran. Sel yang positif adalah sel yang berwarna coklat.



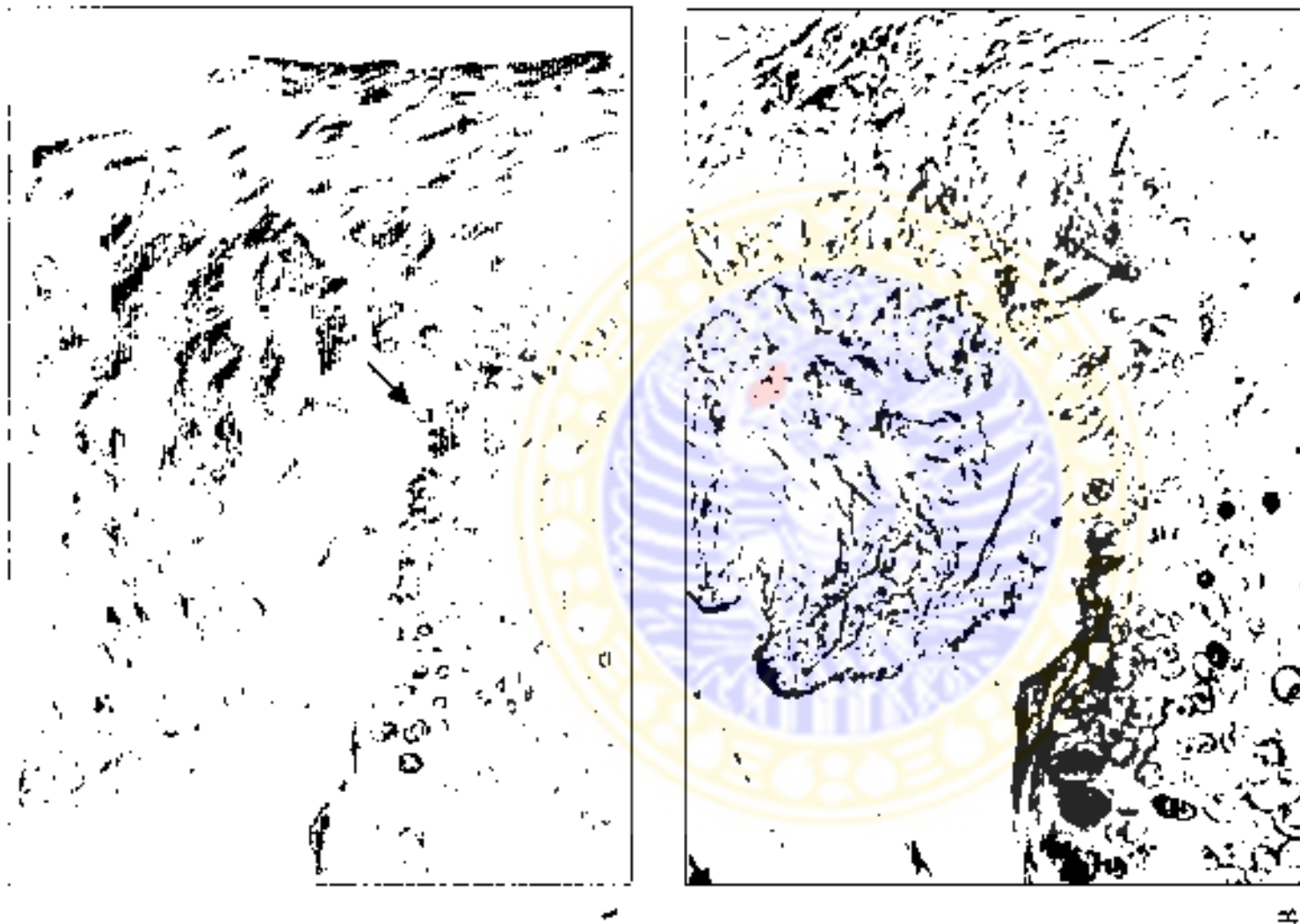
Gambar 5.9 Ekspresi VCAM¹ dengan pewarnaan imunohistokimia di jaringan sinovial sendi tikus arthritis reumatoid fase insersi (A) dan fase aktif (B) (x400).
Sel yang positif berwarna coklat (tanda panah).
V: Venule



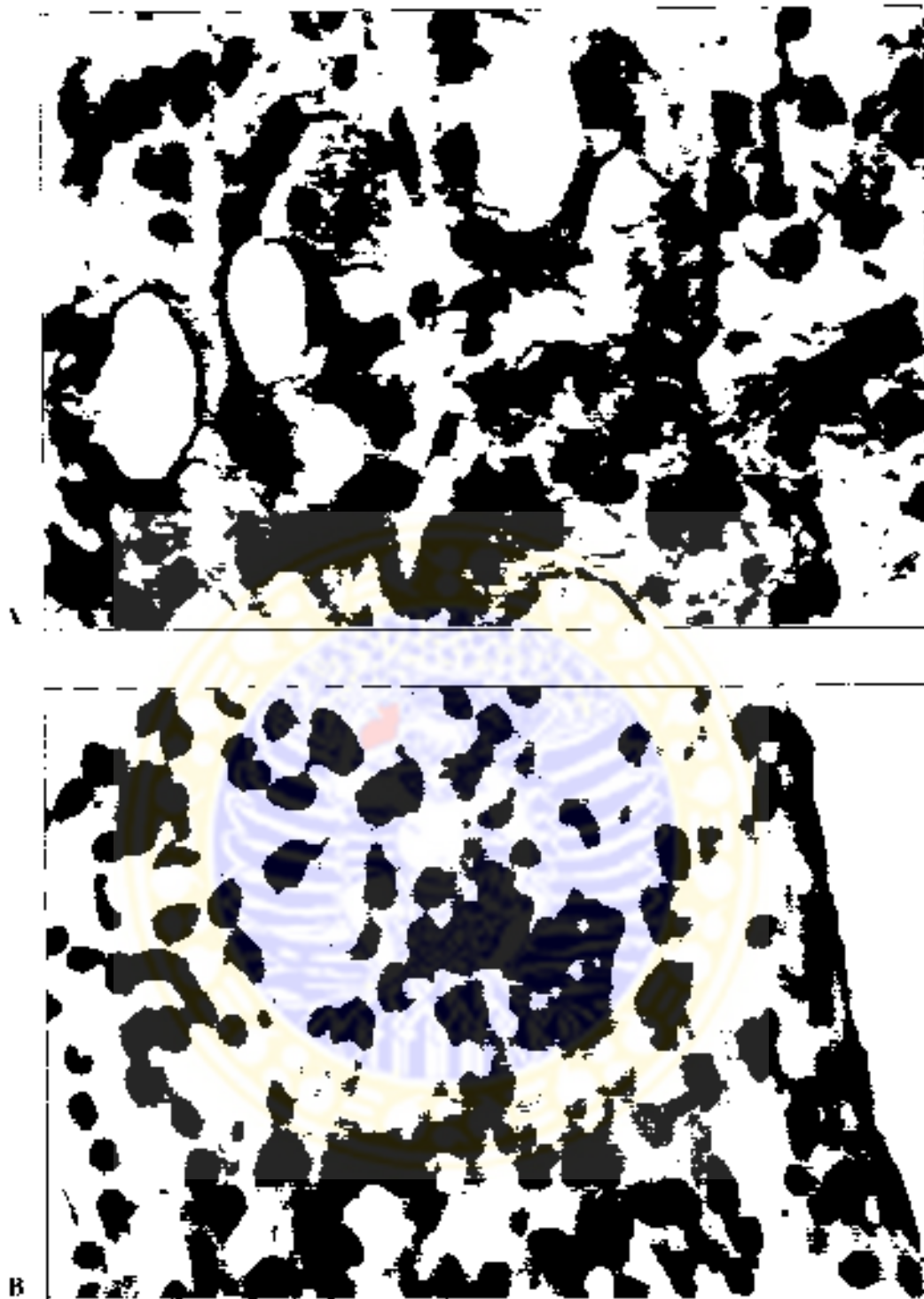
Gambar 5.10 Ekspresi VCAM-1 dengan pewarnaan imunohistokimia pada persendian tikus arthritis reamanon: fase inisiasi (A), dan fase aktif (B) ($\times 100$)
V: Venule; F: Sel endotel; * Sel fibroblas



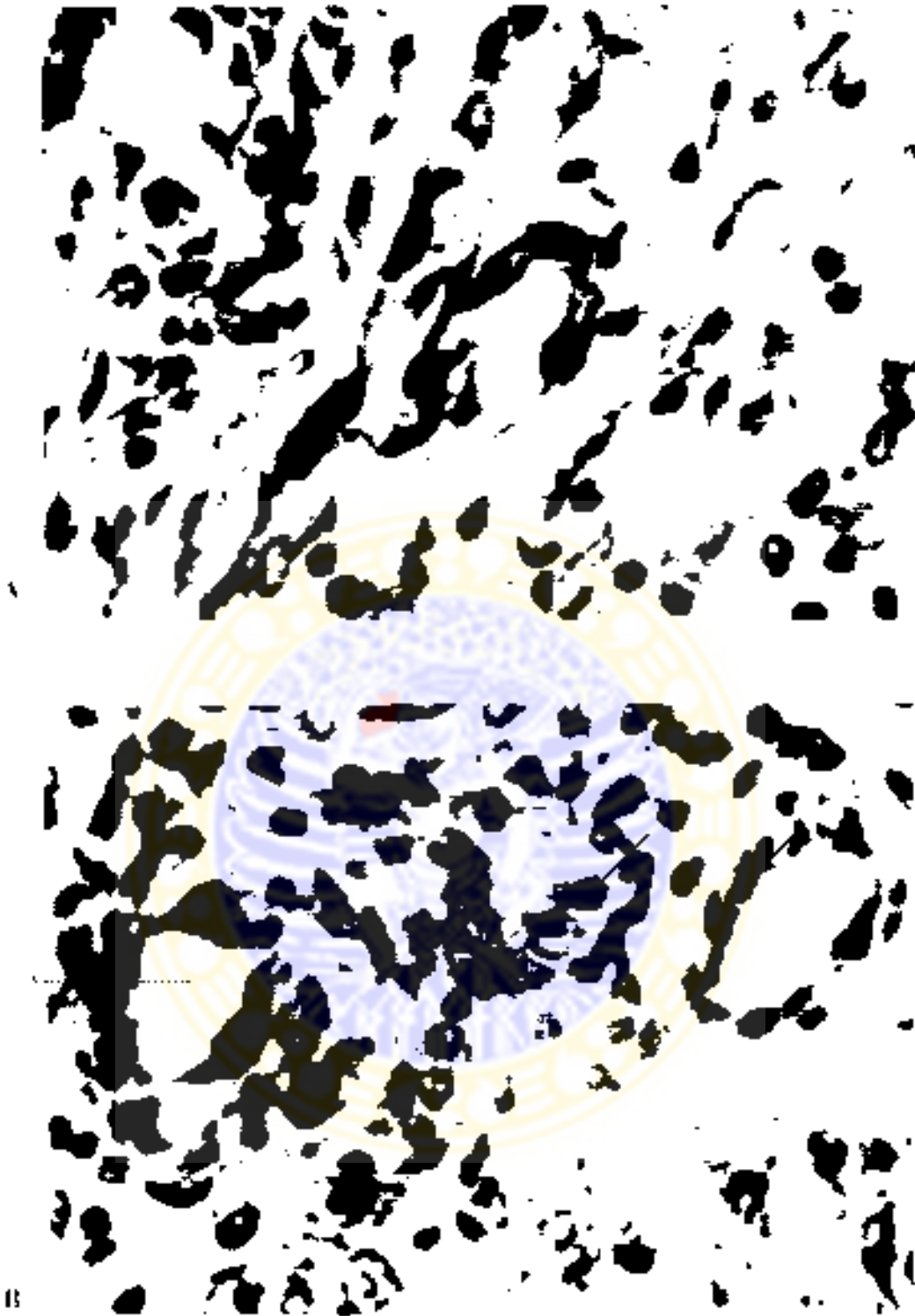
Gambar 5.11. Ekspresi selektin-I pada dengan pewarnaan imunohistokimia diaringan sinovial sendi tikus arthritis reumatoid fase inisiasi (A) dan fase aktif (B) (x400).
A. Venule. Tanda panah= sel yang positif



Gambar 5.11. Perbandingan gambaran histopatologis jaringan sinovial sendi tikus arthritis reumatoid fase kronik dengan pewarnaan HE (A) dengan pewarnaan imunohistokimia (B) (x400). Tanda panah adalah sel penghasil TNF- α positif.



Gambar 5.13 Ekspresi sel penghasil IL-1 dengan pewarnaan imunohistokimia pada jaringan sinovial sendi tikus arthritis reumatoid fase insidius (A) dan fase kronis (B) x400
Tanda panah sel yang positif



Gambar 5.4 : Ekspresi ICAM-1 dengan pewarnaan imunohistokimia pada jaringan sinovial sendi muskularis reumatoid fase instasi (AI) dan fase aktif (B) x40
Tanda panah : sel yang positif

BAB 6**PEMBAHASAN****6.1 Hasil Perlakuan Pada Hewan Coba**

Pembengkakan yang terjadi pada sendi-sendi tikus sebagai hewan coba yang mengalami perlakuan terjadi sesuai dengan lamanya waktu yang telah ditetapkan. Fase inisiasi artritis reumatoid pada penelitian ini yang terjadi dalam satu minggu setelah imunisasi merupakan fase mulai terjadinya respon imun terhadap imunisasi. Pada fase inisiasi belum terlihat adanya pembengkakan.

Kejadian yang paling awal pada sinovitis sulit untuk ditentukan. Akan tetapi bukti-bukti yang ada memperlihatkan bahwa kerusakan mikrovaskular dan proliferasi ringan dari sel sinovial merupakan lesi pertama. Biopsi yang dilakukan pada penderita artritis reumatoid pada minggu inisiasi dari artritis memperlihatkan adanya proliferasi ringan dari sel *synovial lining* dan limfosit perivaskular (Ziffeler, 1985).

Artritis reumatoid fase aktif pada penelitian ini memperlihatkan tanda khas dari suatu inflamasi akut, yaitu adanya pembengkakan yang nyata disertai dengan warna kemerahan pada sendi yang di kenai. Pada fase kronis, pembengkakan sendi berkurang dibandingkan dengan fase aktif, warna kemerahan menghilang. Dan terlihat adanya deformitas. Pembengkakan terjadi pada semua sendi. Pada fase kronis artritis reumatoid biasanya sudah terjadi erosi pada rawan sendi sehingga menyebabkan deformitas. Pada penelitian ini walaupun pembengkakan terjadi pada beberapa sendi, namun jaringan yang diperiksa hanya pada satu sendi. Pada penelitian yang dilakukan oleh Kraan et al., 2002 memperlihatkan bahwa

gambaran imunohistologis inflamasi pada jaringan sendi lutut tidak berbeda dengan gambaran inflamasi pada sendi-sendi kecil, sehingga gambaran inflamasi pada satu sendi representatif untuk sendi-sendi lain.

Insiden dan beratnya gejala artritis reumatoid pada tikus yang diinduksi seperti CIA tergantung pada genotipe dari pada tikus tersebut. Pada mencit perkembangan artritis dimulai dua minggu setelah imunisasi pertama dan mencapai puncaknya pada minggu keempat, dengan insiden 100% (Yamaguchi, 2003).

Tikus sebagai hewan coba dari jenis *rat* atau *murine* merupakan model CIA untuk penyakit artritis reumatoid yang di pergunakan secara luas. Munculnya artritis pada hewan coba ini adalah berdasarkan pada adanya autoreaktivitas terhadap kolagen tipe II dari tulang rawan sendi. Imunisasi tikus dengan kolagen tipe II asing (berasal dari bovin) dalam *complete Freund's adjuvant* menimbulkan reaksi silang terhadap pada respon sel T dan reaksi imun yang di perantarai oleh antibodi terhadap kolagen tipe II yang homolog. Pada percobaan eksperimental artritis reumatoid yang mempergunakan model ini, artritis berlanjut menjadi kronis setelah 4 minggu, yang ditandai dengan erosi tulang rawan sendi dan tulang. Progresifitas penyakit berhubungan dengan tingginya level imunitas seluler dan imunitas humoral terhadap kolagen tipe II (Ducoroy et al, 2003; Vossenaar et al., 2003).

6.2 Gambaran Histopatologis

Pewarnaan histopatologis jaringan sinovial dengan hematoksilin eosin dilakukan pada pemeriksaan awal. Pemeriksaan ini bertujuan untuk memastikan

bahwa masing-masing kelompok tikus yang fasenya ditetapkan berdasarkan dengan lamanya waktu sesudah imunisasi, sesuai dengan gambaran histopatologisnya.

Gambaran histopatologis artritis reumatoid memperlihatkan adanya hiperplasia sel sinovial, infiltrasi oleh sel plasma, limfosit, makrofag dan sel mast. Di samping itu terjadi pertumbuhan yang berlebihan dari jaringan granulasi fibrovaskuler, yang dikenal sebagai panus. Panus secara progresif akan melapisi dan menyebabkan erosi tulang rawan sendi yang akan mengakibatkan kerusakan sendi yang ireversibel. Komponen utama pada panus adalah pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis). Folkman dkk menduga bahwa pembentukan panus dan destruksi sendi tidak akan terjadi bila tidak ada angiogenesis (Schreiber, 1994).

Pada penelitian ini gambaran histopatologis jaringan sinovial pada sendi tikus artritis reumatoid fase inisiasi memperlihatkan adanya perubahan struktur normal dari sendi, dimana terlihat penebalan jaringan sinovial dan terlihat peningkatan jumlah dan ukuran pembuluh darah. Pada jaringan sinovial terlihat infiltrasi sel-sel radang. Pada fase inisiasi tidak terlihat adanya penyempitan rongga sinovial dan tanda erosi. Fase inisiasi pada penelitian ini sesuai dengan stadium 1 (penyakit dini) artritis reumatoid menurut metode *Steinbracker*, yaitu metode untuk menentukan derajat kerusakan sendi secara radiologis.

Gambaran histopatologis artritis reumatoid fase aktif pada penelitian ini memperlihatkan gambaran adanya inflamasi akut yang hebat, dimana terlihat penebalan yang ekstrem dari jaringan sinovial disertai dengan peningkatan jumlah pembuluh darah yang ekstrem. Jaringan sinovial di infiltrasi oleh sel limfosit.

monosit dan sel plasma. Infiltrasi terlihat difus, membentuk folikel dan granuloma. Gambaran ini sesuai dengan gambaran histopatologis inflamasi sendi artritis reumatoid akut dalam keadaan *flare up*. Pada fase aktif dari penelitian ini terlihat penyempitan rongga sinovial. Fase aktif pada penelitian ini sesuai dengan stadium 2 yaitu penyakit moderat artritis reumatoid menurut metode *Steinbrocker*

Inflamasi akut merupakan respon yang terjadi segera terhadap adanya agen asing. Perubahan atau fenomena pembunuh darah berperan penting pada terjadinya inflamasi akut. Tanda yang khas dari inflamasi akut adalah adanya eksudasi cairan dan plasma sehingga menyebabkan edema dan migrasi dari leukosit terutama netrofil (Cotran et al., 1999).

Gambaran artritis reumatoid fase kronik pada penelitian ini memperlihatkan berkurangnya ketebalan jaringan sinovial bila di bandingkan dengan artritis reumatoid fase aktif. Invasi panus kedalam rongga sinovial terlihat lebih menonjol di bandingkan dengan fase aktif. Di samping itu dengan tanda-tanda erosi tulang rawan sendi yang terlihat sesuai dengan adanya gejala deformitas pada sendi.

Sinovitis pada artritis reumatoid memperlihatkan gambaran yang heterogen dan gambaran patologisnya tidak selalu bermanfaat untuk membedakan maknanya pada artritis reumatoid dengan inflamasi artropati yang lainnya. Hanya pembentukan agregat limfosit B dan limfosit T yang kadang-kadang disertai terbentuknya *germinal center*, yang dapat merupakan tipikal dari artritis reumatoid. Gambaran jaringan sinovial pada artritis reumatoid dikategorikan dalam tiga pola, yaitu:

1. Sinovitis difus, ditandai oleh adanya infiltrat yang difus dari limfosit dan makrofag.
2. Sinovitis folikular, di tandai oleh adanya akumulasi limfosit B yang dikelilingi oleh limfosit T membentuk agregat limfosit yang berbatas tegas dengan germinal senter.
3. Granuloma nekrotik, ditandai dengan adanya pusat nekrosis fibrinoid yang dikelilingi oleh sel histiosit, epiteloid dan sel giant.

(Klimiuk et al., 2000).

Pada AR yang merupakan penyakit autoimun, autoantigen membangkitkan respon imun yang menetap terhadap jaringan sendiri, sehingga menyebabkan proses inflamasi berlanjut menjadi kronik. Gambaran histologis dari inflamasi kronik adalah :

1. Adanya infiltrasi sel mononuklear seperti makrofag, limfosit dan sel plasma yang merupakan refleksi adanya reaksi yang persisten terhadap antigen.
2. Adanya destruksi jaringan yang diinduksi oleh sel inflamasi
3. Pada proses selanjutnya jaringan yang rusak digantikan oleh jaringan ikat atau fibrosis (Cotran et al., 1999).

Erosi sendi yang terlibat dari gambaran histopatologis pada penelitian ini terdapat pada fase aktif dan fase kronik. Erosi sendi pada artritis reumatoid merupakan akibat dari abnormalitas imunologis primer, atau abnormalitas seluler dari sel fibroblas sinovial, osteoklas dan sel-sel lain. Terjadinya erosi sendi yang dini pada artritis reumatoid berhubungan dengan struktur anatomi dan faktor biomekanik dari sendi. Dari penelitian yang di lakukan pada pasien artritis reumatoid dini dengan sinovitis dan erosi sendi, 47,3% erosi dan sinovitis terjadi

pada sisi radial dari sendi MCP (*metacarpophalangeal*) kedua dan ketiga. Hal ini terjadi karena ligamen kolateral sendi MCP kedua dan ketiga pada sisi radial mengalami tegangan yang lebih besar dari pada sisi ulnar pada waktu gerakan ekstensi dan fleksi. (Tan et al., 2003).

6.3 Hasil Pemeriksaan Faktor Reumatoid (FR)

Pada penelitian ini pemeriksaan titer faktor reumatoid dalam serum memberikan hasil negatif pada tikus dari semua kelompok penelitian. Seropositif FR berhubungan dengan HLA-DR. Pada tikus yang biasanya dipakai sebagai hewan coba untuk model arthritis reumatoid, seperti *adjuvant arthritis*, *Streptococcal cell wall model of arthritis*, *antigen-induced arthritis*, dan *collagen-induced arthritis* tidak di temukan titer FR positif dalam serumnya. Seropositif FR hanya ditemukan pada strain MRL/lpr dan CIA dengan transgenik HLA-DQ8 (Silver and Zveifler, 1985; Vossenaar et al., 2003).

Penelitian retrospektif yang dilakukan pada donor darah sukarela yang mendonorkan darahnya 2-4 kali dalam setahun sejak tahun 1984, yang dikemudian hari menderita arthritis reumatoid, ternyata pada 49,4% dari penderita ditemukan faktor reumatoid positif beberapa tahun sebelum gejala arthritis reumatoidnya muncul (Nielen et al., 2004)



6.4 Hasil Penelitian Imunohistokimia

6.4.1 Persentase ekspresi molekul adesi ICAM-1, VCAM-1 dan Selektin-L.

Pada penelitian ini persentase ekspresi molekul adesi ICAM-1 (CD54) di jaringan sinovial pada kelompok tikus yang diinduksi menjadi tikus artritis reumatoid memperlihatkan persentase yang lebih tinggi dari pada tikus normal sebagai kontrol. Dari analisis statistik terdapat adanya peningkatan ekspresi molekul adesi ICAM-1 pada artritis reumatoid fase inisiasi, fase aktif dan fase kronik. Persentase peningkatan ekspresi molekul adesi ICAM-1 lebih tinggi pada artritis reumatoid fase aktif.

Persentase ekspresi molekul adesi VCAM-1 di jaringan sinovial artritis reumatoid fase inisiasi, fase akut dan fase kronik meningkat dibandingkan dengan ekspresinya pada jaringan sinovial tikus normal, dengan persentase peningkatan yang lebih tinggi yaitu pada artritis reumatoid fase aktif.

Demikian juga dengan persentase ekspresi selektin-L, dimana persentase ekspresi selektin-L pada artritis reumatoid fase inisiasi, aktif dan kronik meningkat, dan peningkatan yang paling tinggi adalah pada artritis reumatoid fase aktif.

Artritis reumatoid pada manusia dan hewan coba sebagai model berhubungan dengan reaksi inflamasi yang mengenai cairan sinovial, membrana sinovial, tulang rawan sendi dan jaringan periartikuler. Reaksi ini secara histologi ditandai oleh adanya akumulasi masif dari leukosit polimorfonuklear didalam cairan sinovial dan pada permukaan rawan sendi, sedangkan jaringan sinovial difiltrasi oleh sel mononuklear meliputi limfosit T. Sel-sel imun dan sel inflamasi ini diyakini memberikan kontribusi pada tahap awal, dan menetapnya

respon imun dan inflamasi di dalam sendi, yang akhirnya menyebabkan erosi rawan sendi dan kerusakan sendi. Pada artritis reumatoid akut limfosit T dan PMN dengan cepat dan kontinyu ditarik dari pembuluh darah ke jaringan sendi (Jessekutz et al., 1994).

Tahap awal terjadinya respon inflamasi dimulai dari meningkatnya molekul adesi pada endotel oleh suatu stimulus, meliputi TNF- α , IL-1, oksigen radikal dan lain-lain. Apabila molekul adesi di ekspresikan oleh endotelium, maka leukosit akan dapat melekat pada endotelium sehingga memungkinkan leukosit bermigrasi ke dalam jaringan. Yang menarik adalah bahwa perlekatan ini harus berulang-ulang sampai terjadinya proses migrasi leukosit ke dalam jaringan. Perbedaan ekspresi dari berbagai molekul adesi dapat membantu untuk menentukan tipe leukosit yang akan melekat dan bermigrasi menembus batas sel. Sebagai contoh, netrofil mempergunakan lebih banyak ekspresi ICAM-1 untuk bermigrasi melalui endotel, sedangkan eosinofil lebih membutuhkan adanya ekspresi VCAM-1 (Lukaes et al., 1997).

ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) merupakan molekul adesi yang di ekspresikan oleh sel endotel dan limfosit. Ekspresi ICAM-1 berperan untuk adesi dari sel T pada sel endotel dan APC LFA-1. ICAM-1 dan VCAM-1 tidak diekspresikan di jaringan normal. Tapi pada tingkat yang rendah, endotel pembuluh darah mengekspresikan ICAM-1 dan VCAM-1. Ekspresi ICAM-1 meningkat dengan adanya stimulasi sitokin pro-inflamasi TNF- α , IL-1. Varani et al., 1994 melaporkan hasil penelitian yang dilakukan pada manusia, dimana puncak ekspresi ICAM-1 terjadi 24-48 jam setelah induksi sitokin TNF- α , IL-1, dan ekspresi ini tetap tinggi selama sitokin berada dalam konsentrasi yang sama.

Seperti juga dengan ekspresi ICAM-1, VCAM-1 juga meningkat dengan induksi sitokin pro-inflamasi. Molekul adesi ICAM-1 selain diekspresikan oleh sel endotel, juga di ekspresikan oleh limfosit yang sudah di aktifasi, sedangkan VCAM-1 selain di ekspresikan oleh endotel juga di ekspresikan oleh sinoviosit.

Pada penelitian ini di jaringan sendi tikus normal persentase ekspresi ICAM-1 hanya terlihat pada 1% pada 1 sampel, sedangkan VCAM-1 terlihat dengan persentase 1% pada 2 sampel. Dengan persentase ekspresi rata-rata kurang dari 1%, memperlihatkan bahwa pada tikus normal sebagai kontrol dapat terdeteksi adanya molekul adesi ini pada tingkat yang rendah.

Peningkatan ekspresi molekul adesi ICAM-1 pada fase awal, merupakan respon terhadap imunisasi, dimana komponen *complete Freund's adjuvant* akan memicu respon imun secara sistemik, sedangkan komponen kolagen II akan melokalisasi respon imun pada sendi.

Peningkatan persentase ekspresi ICAM-1 yang lebih tinggi pada fase aktif adalah sebagai respon terhadap imunisasi yang di ikuti dengan booster. Respon imun yang terjadi pada fase aktif memperlihatkan kesamaan dengan respon imun pada inflamasi aktif (*flare up*). Pada fase ini siktokin pro-inflamasi yang meningkat akibat imunisasi akan merangsang endotel dan sel limfosit yang sudah diaktifasi untuk mengekspresikan ICAM-1. Tingginya molekul adesi ICAM-1 diduga berhubungan dengan angiogenesis yang sangat menonjol, yang terlihat pada artritis reumatoid fase aktif. Angiogenesis diketahui merupakan kunci dari terjadinya beberapa proses biologi. Adanya stimulus yang adekuat di jaringan sinovial akan meningkatkan afinitas leukosit untuk berlekatan dengan ICAM-1.

Persentase ekspresi ICAM-1 pada fase aktif lebih tinggi dari pada persentase ekspresi VCAM-1 adalah karena pada keadaan adanya stimulus, selain pada endotel pembuluh darah, ICAM-1 juga dihasilkan oleh sel limfosit yang sudah diaktifasi. Seperti diketahui bahwa ICAM-1 di ekspresikan dengan reaksi temah oleh *resting lymphocyte*. Pada artritis reumatoid, dengan adanya stimulasi mitogen terhadap sel T maka ekspresi ICAM-1 akan meningkat pada sel limfosit. Limfosit yang sudah diaktivasi merupakan sel yang dominan menginfiltrasi jaringan sinovial pada fase aktif artritis reumatoid. Hal ini berbeda dengan VCAM-1, dimana pada jaringan sinovial yang terstimulasi, VCAM-1 diekspresikan oleh endotel dan sel sinoviosit, yang tidak dominan pada artritis reumatoid fase aktif.

Penelitian molekul adesi yang di lakukan oleh Halloran et al.,1996 pada hewan coba AIA (*antigen-induced arthritis*) memperlihatkan bahwa ICAM-1 di jaringan sinovial di ekspresikan oleh makrofag, sel *synovial lining* dan sel endotel. Ekspresi ICAM-1 meningkat pada AIA bila dibandingkan dengan tikus normal. ICAM-1. Pada penelitian ini di simpulkan bahwa ICAM-1 dilibatkan dalam induksi dan progresifitas adjuvant artritis.

Kawanaka et al., 2002 meneliti ekspresi ICAM-1 pada monosit darah penderita artritis reumatoid, dimana terlihat bahwa ekspresi ICAM-1 pada monosit darah (CD16+) meningkat pada artritis reumatoid aktif. Peningkatan ini berhubungan dengan sitokin yang dilepas dari sendi yang mengalami inflamasi.

Hessan et al., 2003 meneliti ekspresi ICAM-1, VCAM-1 dan selektin-E pada jaringan sinovial penderita artritis reumatoid. VCAM-1 di ekspresikan oleh sel lining dan endotel pembuluh darah, sedangkan ICAM-1 dan selektin-E

diekspresikan terutama oleh pembuluh darah. Pada penelitian ini 79% sampel memperlihatkan reaksi yang positif dengan monoklonal antibodi terhadap ICAM-1, 62% sampel positif dengan VCAM-1 dan 28% sampel positif dengan selektin-E.

Selektin-L merupakan molekul adesi yang di ekspresikan oleh sel *T naive*. Pada proses ekstravasasi leukosit, selektin-L menyebabkan perlekatan yang lemah dengan reseptor selektin-L di endotel, sehingga sel limfosit yang mengekspresikan selektin-L hanya dapat menggelinding sepanjang endotel. Pada artritis reumatoid fase aktif, sel T diaktivasi oleh adanya stimulus dari sitokin pro-inflamasi sehingga sel mengekspresikan molekul LFA-1 yang mempunyai afinitas tinggi untuk berikatan dengan ICAM-1. Ikatan ini menimbulkan adesi yang kuat sehingga proses menggelindingnya limfosit terhenti dan dapat ekstravasasi keluar pembuluh.

Hal tersebut diatas berhubungan dengan peningkatan persentase ekspresi selektin-L pada penelitian ini. Pada jaringan sendi tikus normal sebagai kontrol, tidak terlihat reaksi positif dari selektin-L dengan pewarnaan imunohistokimia, kecuali pada 1 sampel dengan persentase ekspresi hanya 2%. Tidak terlihatnya ekspresi selektin-L adalah karena pada keadaan normal pada jaringan sendi tidak di infiltrasi oleh sel limfosit. Pada artritis reumatoid fase aktif, infiltrasi jaringan oleh limfosit berhubungan dengan tingginya ekspresi molekul adesi selektin-L.

Rekrutmen neutrofil berperan pada terjadinya respon inflamasi. Proses rekrutmen terjadi melalui 3 tahap, yaitu interaksi awal leukosit dengan endotelium yang sudah di aktivasi, perlekatan dengan endotel dan ekstravasasi. Pada proses ini beberapa famili molekul adesi mempunyai peran yang berbeda pada setiap tahap. Selektin yang diekspresikan oleh endotel yaitu selektin-E dan

selektin-P merupakan molekul adesi yang paling berperan pada awal pertekatan neutrofil dengan endotel yang sudah diaktifasi. Ekstravasasi neutrofil dalam jumlah besar ke jaringan sinovial serta berpindah ke dalam cairan sinovial, dimana dilepaskan beberapa proteinase dan oksigen radikal bebas (Humbria et al., 1994).

Dari uraian diatas maka dapat di mengerti bahwa pada jaringan sinovial artritis reumatoid fase aktif maupun kronis tidak terlihat adanya infiltrasi sel neutrofil. sehingga dengan pewarnaan imunohistokimia persentase sel memperlihatkan jumlah sel yang positif dari sel mononuklear di jaringan sinovial.

Dari penelitian yang di lakukan oleh Issekutz and Issekutz pada jaringan sinovial AIA, memperlihatkan bahwa migrasi sel leukosit yang mengekspresikan LFA-1 ke jaringan sinovial, puncaknya terjadi pada 20 hari setelah imunisasi dengan adjuvant. LFA-1 di ekspresikan oleh limfosit, makrofag dan sel lining (Halloran et al., 1996)

Pada penelitian yang di lakukan oleh peneliti, ekspresi selektin-L paling tinggi adalah pada jaringan sinovial sendi artritis reumatoid fase aktif yaitu pada hari ke 22, di mana bisa di bandingkan dengan penelitian di atas migrasi leukosit ke jaringan kemungkinan mencapai puncaknya pada fase aktif artritis reumatoid.

6.4.2 Ekspresi sel penghasil sitokin pro-inflamasi (TNF- α - dan IL-1)

Pada penelitian ini tidak terlihat adanya reaksi yang positif sebagai sel penghasil TNF- α pada jaringan normal. sedangkan ekspresi sel penghasil IL-1 terlihat positif pada 1 sampel. Bila di bandingkan dengan persentase ekspresi sel penghasil TNF- α - dan IL-1 pada jaringan sinovial artritis reumatoid terlihat

bahwa ada peningkatan persentase ekspresi sel penghasil sitokin pro-inflamasi. Persentase ekspresi sitokin pro-inflamasi tertinggi adalah pada fase aktif.

Paradigma tradisional untuk artritis reumatoid yang masih diyakini sampai saat ini adalah adanya peranan bermacam-macam mekanisme yang memberikan kontribusi pada terjadinya inisiasi dan menetapnya inflamasi jaringan sinovial. Mekanisme ini meliputi aktivasi sel T, regulasi sitokin yang persisten produksi sitokin pro-inflamasi. Produksi sitokin pro-inflamasi seperti IFN- γ , TNF- α dan IL-1 mempunyai peran penting dari patogenesis terjadinya poliartritis pada artritis reumatoid. Tapi TNF- α yang di produksi oleh makrofag diduga sebagai mediator yang dominan terjadinya sinovitis pada artritis reumatoid (Firestein,1999).

Makrofag secara signifikan memberi kontribusi terhadap proses erosi rawan sendi dan kerusakan sendi dengan memproduksi sitokin pro-inflamasi (TNF- α dan IL-1) dan enzim proteolitik seperti *collagenase(matrix metalloproteinase-1, MMP1)*, stromelisin (MMP3), elastase dan gelatinase B (MMP9). Dari pemeriksaan radiologi, erosi mempunyai korelasi yang signifikan dengan intensitas infiltrasi makrogag pada membrana sinovial (Yousef et al.,1999).

Peningkatan persentase ekspresi sel penghasil sitokin pro-inflamasi TNF- α pada artritis reumatoid fase aktif dalam penelitian ini memperlihatkan peranan sitokin TNF untuk meningkatkan ekspresi molekul adesi ICAM-1 dan VCAM-1 di jaringan sinovial pada fase aktif. Peningkatan persentase ekspresi TNF- α pada artritis reumatoid fase aktif ini bila dibandingkan dengan fase kronik, tidak terdapat perbedaan yang bermakna. Dari uraian di atas tampaknya pada fase

kronik ekspresi TNF- α meningkat, sehingga turut berperan pada terjadinya erosi bersama-sama dengan enzim lainnya.

Pada artritis reumatoid IL-1 dan TNF- α secara sinergis merupakan *arthritogenic* pada hewan coba dan merupakan stimulator yang poten menstimulasi sinoviosit untuk memproduksi MMP, prostaglandin dan mensekresi GM-CSF. IL-1 dan TNF- α meningkatkan ekspresi molekul adesi ICAM-1 yang menyebabkan peningkatan rekrutman sel mononuklear di jaringan sinovial. IL-1 menginduksi fase respon akut, disamping itu juga dapat sebagai *autocrin growth factor* untuk sinoviosit.

Dari uraian tersebut di atas, peningkatan persentase ekspresi sel penghasil IL-1 yang paling tinggi pada fase aktif mengindikasikan perannya dalam meningkatkan ekspresi molekul adesi ICAM-1 pada fase akut artritis reumatoid.

6.4.3 Ekspresi sel penghasil sitokin anti-inflamasi (IL-10)

Jaringan normal pada penelitian ini tidak memperlihatkan adanya reaksi yang positif dengan monoklonal antibodi terhadap sel penghasil IL-10. Pada artritis reumatoid terlihat adanya peningkatan persentase ekspresi sel penghasil IL-10. Persentase ekspresi sel penghasil IL-10 terlihat paling tinggi pada fase kronik.

IL-10 merupakan molekul imuperegulator yang berperanan sebagai anti inflamasi. Level yang signifikan terlihat pada artritis reumatoid, psoriasis dan osteo artrosis, tetapi tidak terlihat pada jaringan sinovial normal.

IL-10 berfungsi menghambat proses inflamasi melalui beberapa mekanisme. Pertama, IL-10 mensupresi produksi sitokin pro-inflamasi yang

diproduksi Th1 (IFN- γ dan IL-2) dan monosit (IL-1, IL-6 dan TNF- α). Kedua, IL-10 mengurangi proliferasi sel T yang diinduksi oleh antigen dengan menurunkan ekspresi HLA-DR yang diekspresikan oleh monosit. Ketiga, IL-10 menginduksi reseptor antagonis IL-1 dan reseptor TNF solubel (TNFs). Keempat, IL-10 dapat membatasi resorpsi tulang dengan menghambat MMP dan meningkatkan produksi *tissue inhibitor of metalloproteinases* (TIMP) (Ritchlin and Haas-Smith, 2001).

Lard et al., 2003 melakukan eksperimen dengan menginjeksikan IL-10 pada pasien artritis reumatoid, memperlihatkan terjadi penurunan sitokin pro-inflamasi (TNF- α dan IL-1) dan penurunan level MMP yang diproduksi oleh makrofag dan *fibrocyte like cell* (FLS).

Bila dilihat dari hasil penelitian peneliti, dimana pada fase kronis artritis reumatoid terlihat peningkatan persentase ekspresi sel penghasil IL-10 yang paling tinggi, mengindikasikan adanya peranan IL-10 dalam menginhibisi sitokin pro-inflamasi untuk menstimulasi ekspresi molekul adesi pada fase kronis.

BAB 7**KESIMPULAN DAN SARAN****7.1 Kesimpulan**

Berdasarkan hasil-hasil penelitian yang dilakukan, maka diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Terdapat peningkatan ekspresi molekul adesi ICAM-1, VCAM-1 dan Selektin-L di jaringan sinovial artritis fase inisiasi, fase aktif dan fase kronik. Peningkatan ekspresi molekul adesi ICAM-1, VCAM-1 dan selektin-L paling tinggi terdapat pada artritis reumatoid fase aktif
2. Terdapat peningkatan ekspresi sel penghasil sitokin pro-inflamasi TNF- α dan IL-1 di jaringan sinovial artritis reumatoid fase inisiasi, fase aktif dan fase kronik. Peningkatan ekspresi molekul sel penghasil sitokin pro-inflamasi TNF- α paling tinggi terdapat pada artritis reumatoid fase aktif dan menetap dengan persentasi tinggi pada fase kronik. Peningkatan ekspresi molekul sel penghasil IL-1 paling tinggi terdapat pada artritis reumatoid fase aktif.
3. Peningkatan ekspresi sel penghasil sitokin anti-inflamasi IL-10 terdapat di jaringan sinovial artritis reumatoid fase inisiasi, fase aktif dan fase kronik. Peningkatan ekspresi molekul sel penghasil sitokin anti-inflamasi paling tinggi terdapat pada artritis reumatoid fase kronik.

7.2 **Saran**

Berdasarkan hasil penelitian tersebut diatas maka ada beberapa saran, yaitu:

1. Untuk mengetahui lebih dalam mengenai peranan molekul adesi terhadap inflamasi arthritis reumatoid, di sarankan untuk meneliti kelas molekul adesi yang lain dan faktor-faktor lain.
2. Untuk pemeriksaan sitokin, selain dengan pewarnaan imunohistokimia disarankan dilakukan juga pemeriksaan sitokin dalam darah dengan metode ELISA.
3. Pemberian imunoterapi disarankan untuk mengacu kepada hasil penelitian ini, yaitu berdasarkan fase penyakitnya.



DAFTAR PUSTAKA

- Austyn JM and KJ Wood. 1994. Principles of cellular and molecular immunology. 1st edition, Oxford New York Tokyo: Oxford University Press.
- Bourne JA. 1983. Handbuch der Immunoperoxidase Färbemethoden. Hamburg. Dako Corporation
- Bradley LM and SR Watson. 1996. Lymphocyte migration into tissue: the paradigm derived from CD4 subsets. *Current Opinion in* 8 (3): 312-319.
- Branztaug P. 1982. Tissue preparation methods for immunocytochemistry. In: Bullock GR and P Petrusz) *Technics in immunocytochemistry*, Vol 1. London, Academic Press Inc. LTD.
- Breedveld FC. 1998. New insight in the pathogenesis of RA. *J of Rheumatol*, 25. suppl 53 : 3-7
- Buckley CD, 1997. Science, medicine, and future: Treatment of rheumatoid arthritis. *Brit Med J* 315: 236-238.
- Burkit HG, B Young and JW Heath, 1995. Wheather' Functional histology; A Text Book and Colour Atlas. Jan Tambayong, penerjemah. Buku Ajar dan Atlas Weather, Histologi fungsional. Ed 3. Penerbit Buku Kedokteran EGC
- Collahan JF. 1998. The burden of RA: Facts and figures. *J of Rheumatol*, 25 suppl. 53 : 8-12.
- Chapel H and M Haeney, 1988. *essential of Clinical Immunology* 2nd ed. Oxford, Blackwell Scientific Publications.
- Charlton B and KJ Lafferty. 1995. The Th/Th2 balance in autoimmunity. *Curr opin in Immunol* 7 : 793-798
- Choy EHS, ECC Rankin, D Kassinos D, O Veterlein , A Garyfallos , CT Ravirajan , R Aestel , G Kingsley , K Isenberg and GS Papani. 1999. The engineered human anti-tumor necrosis factor- α antibody CDP571 inhibits inflammatory pathwas but not T cell activation in patients with rheumatoids arthritis. *J of Rheumatol* 26(11): 2310-2317.
- Collins TL, PD Kassner , BE Bieter and SJ Burakoff. 1994. Adhesion receptor in Lymphocyte activation. *Curr Opin in Immunol* 6: 385-393

- Cormack DH, 1987. Joints. In: *Han's Histology* 9th ed. Philadelphia, J.B.Lipincot Company
- Cotran RS, V Kumar and SL Robbins. 1999. *Robbins Pathologic Basis Disease*.5th ed. Philadelphia. WB Saunders Company
- Crohn M. A pathologic mechanism is shared in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheum Dis* 57:573-577.
- Dalbeth N and MFC Callan. 2002. A subset of natural killer cells is greatly expanded within inflamed joints. *Arthritis Rheum* 46(7):1763-1772.
- Ducrocy P, D de Fornel, L Dubrez-Daloz, E Solary and P Dutartre, 2003. Longterm protection of mice against collagen-induced arthritis after short term LE 15-0195 treatment: Modulation of B and T lymphocyte activation. *J Rheumatol* 30: 918-925.
- Edwards J,1994 Synovium. Rheumatoid Arthritis. In: (Klippel JH and Dieppe PH eds) *Rheumatology*. Baltimore. Mosby Year Book.
- Enzer LG, Dunn, I, Jacobsson, PH Bennett, WC Knowler and A Silman, 2002. epidemiologic study of trends in prevalence of rheumatoid factor seropositivity in Pima Indians. Evidence of decline due to both secular and birth-cohort influences. *Arthritis & Rheum*. 46 (7): 1729-1734.
- Firestein GS, 1994. Rheumatoid arthritis. Rheumatoid synovitis and panus. In: (Klippel JH and Dieppe PH eds) *Rheumatology*. Baltimore. Mosby Year Book.
- Firestein GS. 1999. Starving the synovium: angiogenesis in inflammation in rheumatoid arthritis. *J of Clin Investigation*, 103(1): 3-4.
- Furuzawa CJ and VJ Alcocer, 1999. 11-8, 11-10, ICAM-1 and VCAM-1 expression levels are higher in synovial tissue from patient with RA than OA. *Scand J of Rheumatol* 50 (2) : 215 - 222.
- Gabriel HW and W Kindermann. 1998. Adhesion molecules during immune respon to exercise. *Can J Physiol.Pharmacol* 76: 512-523
- Goodson NJ, NJ Wiles, M Junt, EM Barret, AJ Silman and DPM Symmons, 2002. Mortality in early inflammatory polyarthritis. *Arthritis Rheum* 46 (8): 2001-2019.
- Gorman JD, FL Raymond, JJ Chen, ME Suarez-Almazor, G Thomson and LA Criswel. 2004. Impact on shared epitop genotype and ethnicity on erosive disease. A meta-analysis of 3240 rheumatoid arthritis patients. *Arthritis & Rheum* 50 (2):400-412.

- Halloran M, Z Szekanecz, N Barquin, GK Hainas and AE Koch, 1996. Cellular adhesion molecules in rat adjuvant arthritis. *Arthritis Rheum* 39 (5): 810-819
- Hessian PA, J Highton, a Kean, CK Sun and M Chin, 2003. Cytokine profile of the rheumatoid nodule suggest that it is a Th1 granuloma. *Arthritis Rheum* 48 (2): 334-338.
- Humbria A, F Diaz-Gonzales, MR campanero, AG Arroyo, A Laffon, R Gonzales-Amaro and f Sanchez-Madrid, 1994. Expression of L-selectin, Cd43, and Cd44 in synovial fluid neutrophils from patients with inflammatory joint diseases. *Arthritis & Rheum* 3 : 342-348.
- Issekutz AC, A Meager, I Otenness and TB Issekutz, 1994. The role of tumor necrosis factor α and IL-1 in polymorphonuclear leukocyte and T lymphocyte recruitment to joint inflammation in adjuvant arthritis. *Clin Exp Immunol* 97 : 26-32.
- Janeway CA and P Travers, 1994. *Immunobiology. The immune system in health and disease*. London: Current Biology Limited, Oxford: Blackwell Scientific Publication
- Kalim H dan K Handono, 2000. Masalah penyakit reumatik di Indonesia serta upaya-upaya penanggulangannya. Dalam: (Setyohadi B, Kasjmir YI dan Mahfudzoh eds). *Naskah lengkap Temu Ilmiah Reumatologi 2000*. Jakarta: 1-11.
- Kasjmir YI, 2000. Terapi agresif pada artritis reumatoid. Dalam: *Kumpulan makalah Simposium Reumatologi 2000 "Penatalaksanaan Reumatik Pada Milenium III"*, Padang: 1-4
- Kavanaugh AF, HS Koops, LS Davies, and PE Lipsky, 1997. Repeat treatment of rheumatoid arthritis patients with a murine anti-intercellular adhesion molecule 1 monoclonal antibody. *Arthritis Rheum* 40(5): 849-853.
- Kawanaka N, M Yamamura, T Aita, Y Morita, A Okamoto, M Kawashima, M Iwahashi, A Ueno, Y Ohmotor and H Makino, 2002. CD14+, CD16+ Blood monocytes and joints inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 46 (10): 2578-2586.
- Kim JM and Weisman MH, 2000. When does rheumatoid arthritis begin and why do we need to know?. *Arthritis Rheum* 43 (3): 437-484
- Kirkham B, 1996. The Synovium. Modulators of synovitis. In: *Proceeding The eight APLAR Congress of Rheumatology*, Melbourne: 162-164

- Klingelhöfer S, B Obertreis, S Quast and B Behnke. 1999. Antirheumatic effect of IDS 23, a stinging nettle leaf extract, on in vitro expression of T helper cytokines. *J of Rheumatol* 26 (12) : 2517-2522.
- Klimuik PA, S Sierakowski, R Jatosewicz, B Cylwik, J Skowronski and J Chwiecko, 2001. *J Rheumatol* 28 (6): 1211-1216.
- Klippel JH., 2001. *Primer on the Rheumatic Diseases 12thed.* Atlanta Georgia. Arthritis Foundation.
- Kraan MC, RJ reece, TJM Smeets, DJ Veale, P Emery and PP Tak, 2002. Comparison of synovial tissues from the knee joints and the small joints of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis & Rheum* 46 (8): 2034-2038.
- Kuiper S, AM van Gestel, HL Swinkels, TM de Boo, JAP da Silva and PLCM van Riel, 2001. Influence of sex, age, and menopausal state on the course of early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 28 (8):1809-1816.
- Lard LR, FA van Gaalen, JIM Schonkeren, EJ Pieterman, G Stoeken, K Vos, RGHH Nielsen, RGJ Westendorp, RC Hoeben, FC Breedveld, REM Toes and TWJ Huizinga, 2003. Association of the-2849 Interleukin-10 promoter polymorphism with autoantibody production and joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48 (7):1841-1848
- Lipsky PE 1997. Adhesion molecule and lymphocyte trafficking. In: *Proceeding the XIX ILAR Congress of Rheumatology*. Singapore: 4-5
- Lukacs NW, RM Strieter and Kunkel SL, 1997. Endothelium in vascular inflammation. In *Proceeding the XIX ILAR Congress of Rheumatology*. Singapore: 122-123
- MacGregor AJ, H Sneider, AS Rigby, M Koskenvuo, J Kaprio, K Aho and AJ Silman, 2000. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data fro twins. *Arthritis Rheum* 43 (1): 30-37.
- Mann CL and Cidlowski JA, 1999. Signaling cascades of apoptosis. in: (Winkler JD ed.) *Apoptosis and inflammation*. Basel, Boston, Berlin. Birkhäuser Verlag.
- Mikuls T, K Saag, L Criswell, L Merlino and JR Cerhan, 2003. Health related quality of life in oman with elderly onset rheumatoid arthritis. *J of Rheumatol* 30(5) : 952-957.
- Mintz G, 1985. The acute-phase respon and the erythrocyte sedimentation rate. in: (Utsinger PD, NJ Zvaifler and SB Weiner eds.) *Rheumatoid arthritis. Etiologi, diagnosis, management*. Philadelphia. JB Lipincot Company

- Mutafchieva LM, RO Williams, C Mauri, LJ Mason, MJ Walmsley, PC Taylor, M Feldmann and RN Maini. 2000. A comparative study into the mechanisms of action of anti-tumor necrosis factor α , anti-CD4, and combined anti-tumor necrosis factor α /anti-CD4 treatment in early collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 43(3) : 638-644.
- Nasution AR dan B Setyohadi. 1999. Perkembangan terbaru dibidang reumatologi. Dalam: *Proceeding Reumatologi menyongsong milenium ke-3*. Koeker VI JRA Malang: 1-7.
- Navarro-Cano G, I del Rincon, S Pogosan, JF Roldan and A Escalante, 2003. Association of mortality with disease severity in rheumatoid arthritis, independent of comorbidity. *Arthritis Rheum* 48 (9) : 2425-2433.
- Nielen MMJ, D van Schaardenburg, HE Reesink, RJ van de Stadt, IE van der Horst-Bruinsma, MIMT de Koning, MR Habibow, JP vandenbroucke and BAC Dijkmans, 2004. Specific autoantibody precede the symptoms of rheumatoid arthritis. A study of serial measurements in blood donors. *Arthritis & Rheum* 50 (2): 380-386.
- O'Garra A and K Murphy, 1994. Role of cytokines in determining T-lymphocyte function. *Current Opinion in Immunol* 6 : 458-466.
- Rasch EK, R Hirsch, R Paulose-Ram and MC Hochberg, 2003. Prevalence of rheumatoid arthritis in person 60 years of age and older in the United States. Effect of different methods of case classification. *Arthritis & Rheum* 48 (4): 917-926.
- Ritchlin C and S A Haas-Smith, 2001. Expression of interleukin 10 mRNA and protein by synovial fibroblastic cells. *J Rheumatol* 28 (4): 698-704.
- Saraux A, C Guedes, J Allain, V Devauchelle, I Valls, A Lamour, F Guillemin, P Youinou and P Le Goff. 1999. Prevalence of rheumatoid arthritis and spondyloarthritis in Brittany, France. *J of Rheumatol* 26(12) : 2622-2627
- Schreiber L.1994. Rheumatoid arthritis. The endothelium in rheumatoid arthritis. In: (Klippel JH and Dieppe PH eds) *Rheumatology*. Baltimore. Mosby Year Book
- Setyohadi B, 2000. Perkembangan terbaru dalam penatalaksanaan artritis reumatoid. Dalam: (Setyohadi B, Kasjmir YI dan Mahfudzoh eds). *Naskah Lengkap Temu Ilmiah reumatologi 2000*. Jakarta:93-97
- Sieper J, 2000. Role of cytokine in the pathogenesis of different forms of arthritides. In: *Proceeding 9th Asia Pacific League of Association for Rheumatology Congress 2000*. Beijing: 105

- Silver RM and NJ Zvaifler, 1985. Pathogenesis. Immunologic consideration in: (Utsinger PD, NJ Zvaifler and SB Weiner eds.) Rheumatoid arthritis. Etiologi, diagnosis, management. Philadelphia. JB Lipincot Company
- Smolen JS. 1997. Concepts for early therapeutic intervention in rheumatoid arthritis. Rheumatoid Arthritis : Current challenges Future Solutions. In Symposium at the XIX ILAR Congress of Rheumatology : 16-24.
- Smolen JS, 2000. Pathogenesis of RA:Targets for the therapeutic intervention. In:Proceeding 9th Asia Pacific League of association for Rheumatology Congress 2000. Beijing:153
- Soenarto. 1999. Manifestasi klinik dan komplikasi penyakit-penyakit autoimun. Dalam:Proceeding Reumatologi menyongsong millenium ke-3, Konker VI IRA Malang: 17-26
- Soeroto J, 2003. Aspek genetik arthritis reumatoid. Dalam: (Setiyohadi B da Kasjmis YI eds.) Naskah lengkap Temu Ilmiah Reumatologi, Ascan Meeting on Gout and Hyperuricemia. Jakarta: 11-21.
- Steel RGD ang JH Torrie, 1980. Prinsipal and procedures of statistics. Biometrical Approach. 2nd ed. Sao Paolo Singapore Sydney Tokyo McGraw-Hill Book Company: 68-120
- Sumariyono, 2000. Prediktor kerusakan sendi pada arthritis reumatoid. Dalam: (Setiyohadi B, YI Kasjmir dan S Mahfudzoh eds) Naskah Lengkap Temu Ilmiah Reumatologi 2000. Jakarta: 86-92.
- Sumariyono, 2002. Aspek selular dan molekular kerusakan sendi arthritis reumatoid. Dalam: (Setiyohadi B dan YI Kasjmir eds) Naskah Lengkap temu Ilmiah Reumatologi 2002. Jakarta: 35-38.
- Tak PP and Firestein GS, 1999. Apoptosis in rheumatoid arthritis. in (Winkler JD ed.) Apoptosis and inflammation. Basel, Boston, Berlin. Birkhäuser Verlag.
- Tan AI, SF Tanner, PG Conaghan, A Radjenovic, P O'Connor, AK Brown, P Timery and d McGonagle. 2003. role of metacarpophalangeal joint anatomic factors in the distribution of synovitis and bone erosion in early rheumatoid arthritis. Arthritis & Rheum 48 (5): 1214-1222.
- Tania H. 2000. Prosedur pembuatan preparat histologi dan pewarnaan imunohistokimia. Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Jangga.
- Tjokroprawiro A,WI Pudjarahardjo dan ST Putra.1996. Pedoman Penelitian Kedokteran. Surabaya. Airlangga University Press

- Taylor PC, AM Peters, E Paleolog, PT Chapman, MJ Elliott, R McCloskey R, M Feldmann and RN Maini. 1999. Reduction of chemokine levels and leukocyte traffic to joints by tumor necrosis factor α blockade in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 43(1) : 38-47
- Tessier PA, P Cattaruzi and SR McColl. 1996. Inhibition of lymphocyte adhesion to cytokine activated synovial fibroblast by glucocorticoid involves the attenuation of vascular cell adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1 gene expression. *Arthritis Rheum* 9(2) : 226-234.
- Thomas R and PE Lipsky. 1997. Presentation of self peptides by dendritic cells. Possible implication for pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 39 (2) : 183-190.
- Tomita T, T Nakasane, M Kaneko, K Shi, K Takahi T Ochi and H Yoshikawa. 2002. Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer and enhancement of the production of matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis: 373-378
- Utsinger PD, NJ Zvaifler and SBWeiner, 1985. Etiology in (Utsinger PD, NJ Zvaifler and SB Weiner eds.) *Rheumatoid arthritis. Etiology, diagnosis, management.* Philadelphia. JB Lipincot Company
- van der Pouw Kraan, FA van Gaalen, PV Kasperkovitz, NL Verbeet, TJM Smeets, MC Kraan, M Fero, PT Tak, TWJ Huizinga, E Pieterman, FC Breedveld, AA Alizadeh and CJ Verweij. 2003. Rheumatoid arthritis is a heterogenous disease. *Arthritis Rheum* 48 (8) : 2132-2145
- Varani J, MS Mulligan and PA Ward, 1994. Rheumatoid Arthritis. The vascular endothelium and acut inflammation. In (Klippel HJ and AP Diepe eds.). *Rheumatology.* London, Mosby Year Book.
- Vossenaar ER, S Nijenhuis, MMA Helsen, A van der Heijden, Senshu T, WB van den Berg, WJ van Venrooij and LAB Joosten, 2003. Citrullination in synovial proteins in murine models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48 (9): 2489-2500
- Waynforth HB. 1980. *Experimental and surgical technique in the rat.* London. Academic Press.
- Williams DG. 1994. Autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Rheumatoid arthritis.* In: (Klippel JH and Dieppe PH eds) *Rheumatology.* Baltimore, Mosby Year Book
- Winkler JD. 1999. Introduction. Apoptosis in inflammatory cells and diseases. In (Winkler JD ed.) : *Apoptosis and inflammation.* Basel, Boston, Berlin, Birkhäuser Verlag.

- Wordsworth P and Pile K. 1994. Etiology. Rheumatoid Arthritis. . In: (Klippel JH and Dieppe PH eds) Rheumatology. Baltimore. Mosby Year Book
- Yamaguchi N, S Onshima, M Umeshita-Sashai, K Nishioka, H Kobayashi, T Mima, T Kishimoto and Y Saeki, 2003. Synergistic effect on the attenuation of collagen induce arthritis in tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1) and interleukin 6 double knock out mice. *J of Rheumatol* 30(1) : 22-27
- Youssef P, J Roth, M Frosch, P Costello, O Fitzgerald, C Sorg and B Breshniban, 1999. Expression of myeloid related proteins (MRP) 8 and 14 and the MRP 8/14 heterodimer in rheumatoid arthritis synovial membrane. *J of Rheumatol* 26(11) : 2523-2527.
- Yudoh K, H Matsuno, F Nakazawa, T Yonezawa and T Kimura, 2000. Reduced expression of the regulatory CD4+ Tcell subset is related to Th1/Th2 balance and disease severity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 43 (3) : 617-627.



Lampiran 1

Tabel perbandingan berat badan tikus kelompok kontrol (K), artitis reumatoid artritis fase awal (P1), fase aktif (P2) dan fase kronik (P3) sebelum (awal) dan sesudah imunisasi

No	K(gr)		P1(gr)		P2 (gr)		P3 (gr)	
	awal	1 minggu	awal	1 minggu	awal	3 minggu	awal	6 minggu
1	180	200	200	170	187	200	227	252
2	180	210	155	120	198	200	190	292
3	160	186	183	150	186	220	182	281
4	180	202	186	170	197	200	232	297
5	220	238	182	160	175	190	165	306
6	180	206	160	155	225	210	224	300
7	200	198	180	160	222	210	202	264
8	165	200	195	175	229	220	224	265
9	190	212	155	120	182	190	214	232
10	200	210	170	145	203	220	215	218
Mean	185.50	206.20	176.60	152.50	200.40	206.00	207.50	269.30
SD	17.71	13.51	16.02	19.47	19.10	11.74	22.15	32.18

Lampiran 2

Tabel persentase ekspresi ICAM-1 di jaringan sinovial sendi tikus kelompok kontrol(K), artritis reumatoid fase awal (P1), fase aktif (P2) dan fase kronik (P3) (n=10)

No	K	P1	P2	P3
1	0	21	49	33
2	0	18	38	21
3	0	27	52	28
4	1	19	61	35
5	0	28	37	26
6	0	23	48	41
7	0	11	45	22
8	0	31	39	29
9	0	15	55	27
10	0	17	36	31
Mean	0.10	21.00	46.00	29.30
SD	0.32	6.27	8.50	6.02

Lampiran 3

Tabel persentase ekspresi VCAM-1 di jaringan sinovial sendi tikus kelompok kontrol (K), artritis reumatoid fase awal (P1), fase aktif (P2) dan fase kronik (P3)

No	K	P1	P2	P3
1	0	13	26	16
2	1	8	39	23
3	0	11	32	28
4	0	17	28	13
5	0	9	35	21
6	2	10	30	27
7	0	12	24	19
8	0	21	21	21
9	0	14	20	18
10	0	15	36	10
Mean	0.30	13.00	29.10	19.60
SD	0.67	3.94	6.45	5.70

Lampiran 4

Tabel persentase ekspresi Selektin L di jaringan sinovial sendi tikus kelompok kontrol (K), artritis reumatoid fase awal (P1), fase aktif (P2) dan fase kronik (P3)

No	K	P1	P2	P3
1	0	11	51	25
2	0	17	26	34
3	0	9	21	22
4	0	21	30	26
5	2	12	24	37
6	0	25	35	18
7	0	14	32	27
8	0	10	43	20
9	0	13	27	23
10	0	24	22	26
Mean	0.20	15.60	31.10	25.80
SD	0.63	5.85	9.62	5.88

Lampiran 5 :

Tabel persentase ekspresi sel penghasil IL-1 di jaringan sinovial sendi tikus kelompok kontrol (K), artritis reumatoid fase awal (P1), fase aktif (P2) dan fase kronik (P3)

No	K	P1	P2	P3
1	1	27	45	30
2	0	37	40	21
3	0	36	38	26
4	0	29	29	33
5	1	25	36	29
6	0	30	25	36
7	0	21	32	19
8	1	34	49	20
9	1	28	51	18
10	0	25	46	22
Mean	0.30	29.20	39.10	25.40
SD	0.48	5.16	8.72	9.33

Lampiran 6 :

Tabel persentase ekspresi sel penghasil TNF α di jaringan sinovial sendi tikus kelompok kontrol(K), artritis reumatoid fase awal (P1), fase aktif (P2) dan fase kronik (P3)

No	K	P1	P2	P3
1	0	20	29	43
2	0	22	35	35
3	0	31	38	29
4	0	27	33	32
5	0	21	28	40
6	0	34	39	22
7	0	25	30	41
8	0	33	41	23
9	0	27	32	34
10	0	25	37	48
Mean	0.00	26.50	34.70	34.20
SD	0.00	4.90	8.51	4.49

Lampiran 7

Tabel persentase ekspresi sel penghasil IL-10 di jaringan sinovial sendi tikus kelompok kontrol(K), artritis reumatoid fase awal (P1), fase aktif (P2) dan fase kronik (P3)

No	K	P1	P2	P3
1	0	8	11	13
2	0	12	12	21
3	0	6	7	9
4	0	3	5	18
5	0	5	5	17
6	0	6	9	15
7	0	10	8	22
8	0	7	8	31
9	0	11	4	25
10	0	7	6	14
Mean	0.00	7.50	7.50	18.50
SD	0.00	2.80	2.64	6.43

Lampiran 8

Uji Homogenitas Sampel

Oneway

Descriptives

bb sbl imunisasi

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
K (klp kontrol)	10	185.50	17.709	5.800	172.83	198.17
P1 (fase awal)	10	176.60	16.015	5.084	165.14	188.06
P2 (fase aktif)	10	200.40	19.103	6.041	186.73	214.07
P3 (fase kronik)	10	207.50	22.152	7.005	191.65	223.35
Total	40	192.50	21.911	3.464	185.49	199.51

Descriptives

bb sbl imunisasi

	Minimum	Maximum
K (klp kontrol)	180	220
P1 (fase awal)	155	200
P2 (fase aktif)	175	229
P3 (fase kronik)	165	232
Total	155	232

Test of Homogeneity of Variances

bb sbl imunisasi

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.523	3	36	.669

ANOVA

bb sbl imunisasi

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5892.200	3	1964.067	5.510	.003
Within Groups	12831.800	36	356.439		
Total	18724.000	39			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: bb sbl imunisasi
LSO

(I) kip perlakuan	(J) kip perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K (kip kontrol)	P1 (fase awal)	8.90	8.443	.299	-8.22	26.02
	P2 (fase aktif)	-14.90	8.443	.086	-32.02	2.22
	P3 (fase kronik)	-22.00*	8.443	.013	-39.12	-4.88
P1 (fase awal)	K (kip kontrol)	-8.90	8.443	.299	-26.02	8.22
	P2 (fase aktif)	-23.80*	8.443	.008	-40.92	-6.68
	P3 (fase kronik)	-30.90*	8.443	.001	-48.02	-13.78
P2 (fase aktif)	K (kip kontrol)	14.90	8.443	.086	-2.22	32.02
	P1 (fase awal)	23.80*	8.443	.008	6.68	40.92
	P3 (fase kronik)	-7.10	8.443	.406	-24.22	10.02
P3 (fase kronik)	K (kip kontrol)	22.00*	8.443	.013	4.88	39.12
	P1 (fase awal)	30.90*	8.443	.001	13.78	48.02
	P2 (fase aktif)	7.10	8.443	.406	-10.02	24.22

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

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		ekspresi sel penghasil IL-10 (%)	perubahan bb sb' ssc Imunisasi
N		40	40
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	8,38	16,35
	Std. Deviation	7,591	39,271
Most Extreme Differences	Absolute	.135	.153
	Positive	.120	.153
	Negative	-.135	-.096
Kolmogorov-Smirnov Z		.854	.967
Asymp. Sig. (2-tailed)		.460	.307

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.



Lampiran 9

Uji Distribusi Variabel

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		bb sbi imunisasi	bb ssd imunisasi	ekspresi ICAM-1 (%)	ekspresi VCAM-1 (%)
N		40	40	40	40
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	192.50	208.85	24.10	15.50
	Std. Deviation	21.911	46.551	17.728	11.549
Most Extreme Differences	Absolute	.099	.155	.154	.129
	Positive	.099	.155	.154	.129
	Negative	-.095	-.083	-.087	-.090
Kolmogorov-Smirnov Z		.627	.983	.972	.814
Asymp. Sig. (2-tailed)		.827	.289	.301	.521

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		ekspresi selektin L (%)	ekspresi sel penghasil IL-1 (%)	ekspresi sel penghasil TNF- α (%)
N		40	40	40
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	18.18	23.53	23.85
	Std. Deviation	13.403	15.540	15.239
Most Extreme Differences	Absolute	.137	.176	.191
	Positive	.137	.176	.191
	Negative	-.108	-.138	-.157
Kolmogorov-Smirnov Z		.869	1.116	1.209
Asymp. Sig. (2-tailed)		.436	.166	.107

Lampiran 10

Uji Anova dan LSD perubahan berat badan tikus kelompok kontrol dan kelompok perlakuan sebelum dan sesudah imunisasi

Oneway

Descriptives

perubahan bb sbl-sd imunisasi

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
K (kjp kontrol)	10	20.70	10.478	3.313	13.20	28.20
P1 (fase awal)	10	-24.10	9.550	3.020	-30.93	-17.27
P2 (fase aktif)	10	5.80	15.101	4.775	-5.20	16.40
P3 (fase kronik)	10	63.20	42.983	13.592	32.45	93.95
Total	40	18.35	39.271	6.209	3.79	28.91

Descriptives

perubahan bb sbl-sd imunisasi

	Minimum	Maximum
K (kjp kontrol)	-2	35
P1 (fase awal)	-35	-5
P2 (fase aktif)	-15	34
P3 (fase kronik)	3	141
Total	-35	141

Test of Homogeneity of Variances

perubahan bb sbl-sd imunisasi

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
8.134	3	36	.000

ANOVA

perubahan bb sbl-sd imunisasi

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	39658.100	3	13218.700	23.228	.000
Within Groups	20489.000	36	569.139		
Total	60145.100	39			

Post Hoc Tests

Disertasi

Kajian Molekul Adesi (ICAM-1, VCAM-1 dan ...

Eryati Darwin

Multiple Comparisons

Dependent Variable: perubahan bb sbl-ssd imunisasi
LSD

(I) kip perlakuan	(J) kip perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K (kip kontrol)	P1 (fase awal)	44.80*	10.669	.000	23.16	66.44
	P2 (fase aktif)	15.10	10.669	.166	-6.54	36.74
	P3 (fase kronik)	-42.50*	10.669	.000	-64.14	-20.86
P1 (fase awal)	K (kip kontrol)	-44.80*	10.669	.000	-66.44	-23.16
	P2 (fase aktif)	-29.70*	10.669	.009	-51.34	-8.06
	P3 (fase kronik)	-87.30*	10.669	.000	-108.94	-65.66
P2 (fase aktif)	K (kip kontrol)	-15.10	10.669	.166	-36.74	6.54
	P1 (fase awal)	29.70*	10.669	.009	8.06	51.34
	P3 (fase kronik)	-57.60*	10.669	.000	-79.24	-35.96
P3 (fase kronik)	K (kip kontrol)	42.50*	10.669	.000	20.86	64.14
	P1 (fase awal)	87.30*	10.669	.000	65.66	108.94
	P2 (fase aktif)	57.60*	10.669	.000	35.96	79.24

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

Lampiran II

Uji Anova dan LSD Ekspresi molekul adesi (ICAM-1, VCAM-1 dan selektin-L) pada tikus kelompok kontrol dan kelompok perlakuan

Oneway

Descriptives

ekspresi ICAM-1 (%)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
K (klp kontrol)	10	.10	.316	.100	-.13	.33
P1 (fase awal)	10	21.00	6.272	1.983	16.51	25.49
P2 (fase aktif)	10	46.00	8.498	2.687	39.92	52.08
P3 (fase kronik)	10	29.30	6.019	1.904	24.99	33.61
Total	40	24.10	17.726	2.803	18.43	29.77

Descriptives

ekspresi ICAM-1 (%)

	Minimum	Maximum
K (klp kontrol)	0	1
P1 (fase awal)	11	31
P2 (fase aktif)	36	61
P3 (fase kronik)	21	41
Total	0	61

Test of Homogeneity of Variances

ekspresi ICAM-1 (%)

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
7.766	3	36	.000

ANOVA

ekspresi ICAM-1 (%)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10922.600	3	3640.867	98.476	.000
Within Groups	1331.000	36	36.972		
Total	12253.600	39			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: ekspresi ICAM-1 (%)
LSD

(I) klp perlakuan	(J) klp perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K (klp kontrol)	P1 (fase awal)	-20.90*	2.719	.000	-26.41	-15.39
	P2 (fase aktif)	-45.90*	2.719	.000	-51.41	-40.39
	P3 (fase kronik)	-29.20*	2.719	.000	-34.71	-23.69
P1 (fase awal)	K (klp kontrol)	20.90*	2.719	.000	15.39	26.41
	P2 (fase aktif)	-25.00*	2.719	.000	-30.51	-19.49
	P3 (fase kronik)	-8.30*	2.719	.004	-13.81	-2.79
P2 (fase aktif)	K (klp kontrol)	45.90*	2.719	.000	40.39	51.41
	P1 (fase awal)	25.00*	2.719	.000	19.49	30.51
	P3 (fase kronik)	16.70*	2.719	.000	11.19	22.21
P3 (fase kronik)	K (klp kontrol)	29.20*	2.719	.000	23.69	34.71
	P1 (fase awal)	8.30*	2.719	.004	2.79	13.81
	P2 (fase aktif)	-16.70*	2.719	.000	-22.21	-11.19

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

Oneway

Descriptives

ekspresi VCAM-1 (%)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
K (klp kontrol)	10	13.30	3.675	1.213	10.18	16.42
P1 (fase awal)	10	13.00	3.944	1.247	10.18	15.82
P2 (fase aktif)	10	29.10	6.454	2.041	24.48	33.72
P3 (fase kronik)	10	19.60	5.700	1.802	15.52	23.68
Total	40	15.50	11.549	1.826	11.81	19.19

Descriptives

ekspresi VCAM-1 (%)

	Minimum	Maximum
K (klp kontrol)	0	2
P1 (fase awal)	8	21
P2 (fase aktif)	20	39
P3 (fase kronik)	10	28
Total	0	39

Test of Homogeneity of Variances

ekspresi VCAM-1 (%)

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
8.502	3	36	.001

ANOVA

ekspresi VCAM-1 (%)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4390.600	3	1463.533	64.934	.000
Within Groups	811.400	36	22.539		
Total	5202.000	39			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: ekspresi VCAM-1 (%)

LSO

(I) klp perlakuan	(J) klp perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K (klp kontrol)	P1 (fase awal)	-12.70*	2.123	.000	-17.01	-8.39
	P2 (fase aktif)	-28.80*	2.123	.000	-33.11	-24.49
	P3 (fase kronik)	-19.30*	2.123	.000	-23.61	-14.99
P1 (fase awal)	K (klp kontrol)	12.70*	2.123	.000	8.39	17.01
	P2 (fase aktif)	-16.10*	2.123	.000	-20.41	-11.79
	P3 (fase kronik)	-6.60*	2.123	.004	-10.91	-2.29
P2 (fase aktif)	K (klp kontrol)	28.80*	2.123	.000	24.49	33.11
	P1 (fase awal)	16.10*	2.123	.000	11.79	20.41
	P3 (fase kronik)	9.50*	2.123	.000	5.19	13.81
P3 (fase kronik)	K (klp kontrol)	19.30*	2.123	.000	14.99	23.61
	P1 (fase awal)	6.80*	2.123	.004	2.29	10.91
	P2 (fase aktif)	-9.50*	2.123	.000	-13.81	-5.19

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

Oneway

Descriptives

ekspresi selektin L (%)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
K (kip kontrol)	10	.20	.632	.200	-.25	.65
P1 (fase awal)	10	15.80	5.854	1.851	11.41	19.79
P2 (fase aktif)	10	31.10	9.620	3.042	24.22	37.98
P3 (fase kronik)	10	25.80	5.884	1.861	21.59	30.01
Total	40	18.18	13.403	2.119	13.88	22.46

Descriptives

ekspresi selektin L (%)

	Minimum	Maximum
K (kip kontrol)	0	2
P1 (fase awal)	9	25
P2 (fase aktif)	21	51
P3 (fase kronik)	18	37
Total	0	51

Test of Homogeneity of Variances

ekspresi selektin L (%)

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5.989	3	36	.002

ANOVA

ekspresi selektin L (%)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5549.275	3	1849.758	45.720	.000
Within Groups	1456.500	36	40.458		
Total	7005.775	39			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: ekspresi selektin L (%)

LSD

{I} klp perlakuan	{J} klp perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K (klp kontrol)	P1 (fase awal)	-15.40*	2.845	.000	-21.17	-9.63
	P2 (fase aktif)	-30.90*	2.845	.000	-36.67	-25.13
	P3 (fase kronik)	-25.60*	2.845	.000	-31.37	-19.83
P1 (fase awal)	K (klp kontrol)	15.40*	2.845	.000	9.63	21.17
	P2 (fase aktif)	-15.50*	2.845	.000	-21.27	-9.73
	P3 (fase kronik)	-10.20*	2.845	.001	-15.97	-4.43
P2 (fase aktif)	K (klp kontrol)	30.90*	2.845	.000	25.13	36.67
	P1 (fase awal)	15.50*	2.845	.000	9.73	21.27
	P3 (fase kronik)	5.30	2.845	.071	-.47	11.07
P3 (fase kronik)	K (klp kontrol)	25.60*	2.845	.000	19.83	31.37
	P1 (fase awal)	10.20*	2.845	.001	4.43	15.97
	P2 (fase aktif)	-5.30	2.845	.071	-11.07	.47

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

ANOVA

ekspresi sel penghasil TNF- α (%)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8006.800	3	2668.967	91.480	.000
Within Groups	1050.200	36	28.172		
Total	9057.100	39			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: ekspresi sel penghasil TNF- α (%)

LSD

(I) klp perlakuan	(J) klp perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K (klp kontrol)	P1 (fase awal)	-26.50*	2.415	.000	-31.40	-21.60
	P2 (fase aktif)	-34.20*	2.415	.000	-39.10	-29.30
	P3 (fase kronik)	-34.70*	2.415	.000	-39.60	-29.80
P1 (fase awal)	K (klp kontrol)	26.50*	2.415	.000	21.60	31.40
	P2 (fase aktif)	-7.70*	2.415	.003	-12.60	-2.80
	P3 (fase kronik)	-8.20*	2.415	.002	-13.10	-3.30
P2 (fase aktif)	K (klp kontrol)	34.20*	2.415	.000	29.30	39.10
	P1 (fase awal)	7.70*	2.415	.003	2.80	12.60
	P3 (fase kronik)	-.50	2.415	.837	-5.40	4.40
P3 (fase kronik)	K (klp kontrol)	34.70*	2.415	.000	29.80	39.60
	P1 (fase awal)	8.20*	2.415	.002	3.30	13.10
	P2 (fase aktif)	.50	2.415	.837	-4.40	5.40

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

Lampiran 12

Uji Anova dan LSD ekspresi sel penghasil sitokin pro-inflamasi (TNF- α dan IL-1) dan sitokin anti-inflamasi (IL-10) pada tikus kelompok kontrol dan kelompok perlakuan

Oneway

Descriptives

ekspresi sel penghasil TNF- α (%)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
K (kip kontrol)	10	.00	.000	.000	.00	.00
P1 (fase awal)	10	26.50	4.905	1.551	22.59	30.61
P2 (fase aktif)	10	34.20	4.452	1.420	30.90	37.41
P3 (fase kronik)	10	34.70	8.512	2.692	28.61	40.79
Total	40	23.85	15.239	2.410	18.96	28.72

Descriptives

ekspresi sel penghasil TNF- α (%)

	Minimum	Maximum
K (kip kontrol)	0	0
P1 (fase awal)	20	34
P2 (fase aktif)	28	41
P3 (fase kronik)	22	48
Total	0	48

Test of Homogeneity of Variances

ekspresi sel penghasil TNF- α (%)

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
8.937	3	36	.000

Oneway

Descriptives

ekspresi sel penghasil IL-1 (%)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
K (knp kontrol)	10	.40	.518	.163	.03	.77
P1 (fase awal)	10	29.20	5.160	1.632	25.51	32.89
P2 (fase aktif)	10	39.10	8.724	2.759	32.86	45.34
P3 (fase kronik)	10	25.40	6.328	2.001	20.87	29.93
Total	40	23.53	15.540	2.457	18.58	28.49

Descriptives

ekspresi sel penghasil IL-1 (%)

	Minimum	Maximum
K (knp kontrol)	0	1
P1 (fase awal)	21	37
P2 (fase aktif)	25	51
P3 (fase kronik)	18	36
Total	0	51

Test of Homogeneity of Variances

ekspresi sel penghasil IL-1 (%)

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
6.722	3	36	.000

ANOVA

ekspresi sel penghasil IL-1 (%)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8130.675	3	2710.225	75.793	.000
Within Groups	1287.300	36	35.758		
Total	9417.975	39			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: ekspresi sel penghasil IL-1 (%)

LSD

(I) klp perlakuan	(J) klp perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K (klp kontrol)	P1 (fase awal)	-28.80*	2.674	.000	-34.22	-23.38
	P2 (fase aktif)	-38.70*	2.674	.000	-44.12	-33.28
	P3 (fase kronik)	-25.00*	2.674	.000	-30.42	-19.58
P1 (fase awal)	K (klp kontrol)	28.80*	2.674	.000	23.38	34.22
	P2 (fase aktif)	-9.90*	2.674	.001	-15.32	-4.48
	P3 (fase kronik)	3.80	2.674	.164	-1.62	9.22
P2 (fase aktif)	K (klp kontrol)	38.70*	2.674	.000	33.28	44.12
	P1 (fase awal)	9.90*	2.674	.001	4.48	15.32
	P3 (fase kronik)	13.70*	2.674	.000	8.28	19.12
P3 (fase kronik)	K (klp kontrol)	25.00*	2.674	.000	19.58	30.42
	P1 (fase awal)	-3.80	2.674	.164	-9.22	1.62
	P2 (fase aktif)	-13.70*	2.674	.000	-19.12	-8.28

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

Oneway

Descriptives

ekspresi sel penghasil IL-10 (%)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
K (klp kontrol)	10	.00	.000	.000	.00	.00
P1 (fase awal)	10	7.50	2.799	.885	5.50	9.50
P2 (fase aktif)	10	7.50	2.635	.833	5.61	9.39
P3 (fase kronik)	10	18.50	6.433	2.034	13.90	23.10
Total	40	8.38	7.591	1.200	5.95	10.80

Descriptives

ekspresi sel penghasil IL-10 (%)

	Minimum	Maximum
K (klp kontrol)	0	0
P1 (fase awal)	3	12
P2 (fase aktif)	4	12
P3 (fase kronik)	9	31
Total	0	31

Test of Homogeneity of Variances

ekspresi sel penghasil IL-10 (%)

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
9.296	3	36	.000

ANOVA

ekspresi sel penghasil IL-10 (%)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1741.875	3	580.625	41.350	.000
Within Groups	505.500	36	14.042		
Total	2247.375	39			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: ekspresi sel penghasil IL-10 (%)

LSD

(I) klp perlakuan	(J) klp perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K (klp kontrol)	P1 (fase awal)	-7.50*	1.676	.000	-10.90	-4.10
	P2 (fase aktif)	-7.50*	1.676	.000	-10.90	-4.10
	P3 (fase kronik)	-18.50*	1.676	.000	-21.90	-15.10
P1 (fase awal)	K (klp kontrol)	7.50*	1.676	.000	4.10	10.90
	P2 (fase aktif)	.00	1.676	1.000	-3.40	3.40
	P3 (fase kronik)	-11.00*	1.676	.000	-14.40	-7.60
P2 (fase aktif)	K (klp kontrol)	7.50*	1.676	.000	4.10	10.90
	P1 (fase awal)	.00	1.676	1.000	-3.40	3.40
	P3 (fase kronik)	-11.00*	1.676	.000	-14.40	-7.60
P3 (fase kronik)	K (klp kontrol)	18.50*	1.676	.000	15.10	21.90
	P1 (fase awal)	11.00*	1.676	.000	7.60	14.40
	P2 (fase aktif)	11.00*	1.676	.000	7.60	14.40

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

Lampiran 13

... pada
 tikus kelompok kontrol dan kelompok perlakuan

General Linear Model

Between-Subjects Factors

	Value Label	N
klp perlakuan	1 K (klp kontrol)	10
	2 P1 (fase awal)	10
	3 P2 (fase aktif)	10
	4 P3 (fase kronik)	10

Descriptive Statistics

	klp perlakuan	Mean	Std. Deviation	N
ekspresi ICAM-1 (%)	K (klp kontrol)	.10	.316	10
	P1 (fase awal)	21.00	6.272	10
	P2 (fase aktif)	46.00	8.498	10
	P3 (fase kronik)	29.30	6.019	10
	Total	24.10	17.726	40
ekspresi VCAM-1 (%)	K (klp kontrol)	.30	.675	10
	P1 (fase awal)	13.00	3.944	10
	P2 (fase aktif)	29.10	6.454	10
	P3 (fase kronik)	19.60	5.700	10
	Total	15.50	11.549	40
ekspresi selektin L (%)	K (klp kontrol)	.20	.632	10
	P1 (fase awal)	15.60	5.854	10
	P2 (fase aktif)	31.10	9.620	10
	P3 (fase kronik)	25.80	5.884	10
	Total	18.18	13.403	40

Box's Test of Equality of Covariance Matrices^a

Box's M	117.503
F	5.520
df1	18
df2	4579.730
Sig.	.000

Tests the null hypothesis that the observed covariance matrices of the dependent variables are equal across groups.

a. Design: Intercept+KLP

Multivariate Tests^c

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	.986	822.403 ^a	3.000	34.000	.000
	Wilks' Lambda	.014	822.403 ^a	3.000	34.000	.000
	Hotelling's Trace	72.565	822.403 ^a	3.000	34.000	.000
	Roy's Largest Root	72.565	822.403 ^a	3.000	34.000	.000
KLP	Pillai's Trace	1.058	6.542	9.000	108.000	.000
	Wilks' Lambda	.027	31.305	9.000	82.898	.000
	Hotelling's Trace	32.842	118.479	9.000	98.000	.000
	Roy's Largest Root	32.546	390.547 ^b	3.000	36.000	.000

a. Exact statistic

b. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

c. Design: Intercept+KLP

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

	F	df1	df2	Sig.
ekspresi ICAM-1 (%)	7.766	3	36	.000
ekspresi VCAM-1 (%)	6.502	3	36	.001
ekspresi selektin L (%)	5.989	3	36	.002

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept+KLP

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	ekspresi ICAM-1 (%)	10922.600 ^a	3	3640.867	98.476	.000
	ekspresi VCAM-1 (%)	4390.600 ^b	3	1463.533	64.934	.000
	ekspresi selektin L (%)	5549.275 ^c	3	1849.758	45.720	.000
Intercept	ekspresi ICAM-1 (%)	23232.400	1	23232.400	628.374	.000
	ekspresi VCAM-1 (%)	9610.000	1	9610.000	426.374	.000
	ekspresi selektin L (%)	13213.225	1	13213.225	326.588	.000
KLP	ekspresi ICAM-1 (%)	10922.600	3	3640.867	98.476	.000
	ekspresi VCAM-1 (%)	4390.600	3	1463.533	64.934	.000
	ekspresi selektin L (%)	5549.275	3	1849.758	45.720	.000
Error	ekspresi ICAM-1 (%)	1331.000	36	36.972		
	ekspresi VCAM-1 (%)	611.400	36	22.538		
	ekspresi selektin L (%)	1456.500	36	40.458		
Total	ekspresi ICAM-1 (%)	35488.000	40			
	ekspresi VCAM-1 (%)	14812.000	40			
	ekspresi selektin L (%)	20219.000	40			
Corrected Total	ekspresi ICAM-1 (%)	12253.600	39			
	ekspresi VCAM-1 (%)	5202.000	39			
	ekspresi selektin L (%)	7005.775	39			

a. R Squared = .891 (Adjusted R Squared = .882)

b. R Squared = .844 (Adjusted R Squared = .831)

c. R Squared = .792 (Adjusted R Squared = .775)

Post Hoc Tests

k/p perlakuan

Multiple Comparisons

LSO

Dependent Variable	(I) k/p perlakuan	(J) k/p perlakuan	Mean Difference (I-J)	Sig. Error	Sig.
ekspresi ICAM-1 (%)	K (k/p kontrol)	P1 (fase awal)	-20.90*	2.719	.000
		P2 (fase aktif)	-45.90*	2.719	.000
		P3 (fase kronik)	-29.20*	2.719	.000
	P1 (fase awal)	K (k/p kontrol)	20.90*	2.719	.000
		P2 (fase aktif)	-25.00*	2.719	.000
		P3 (fase kronik)	-8.30*	2.719	.004
	P2 (fase aktif)	K (k/p kontrol)	45.90*	2.719	.000
		P1 (fase awal)	25.00*	2.719	.000
		P3 (fase kronik)	16.70*	2.719	.000
	P3 (fase kronik)	K (k/p kontrol)	25.20*	2.719	.000
		P1 (fase awal)	8.30*	2.719	.004
		P2 (fase aktif)	-16.70*	2.719	.000
ekspresi VCAM-1 (%)	K (k/p kontrol)	P1 (fase awal)	-12.70*	2.123	.000
		P2 (fase aktif)	-28.80*	2.123	.000
		P3 (fase kronik)	-19.30*	2.123	.000
	P1 (fase awal)	K (k/p kontrol)	12.70*	2.123	.000
		P2 (fase aktif)	-16.10*	2.123	.000
		P3 (fase kronik)	-6.60*	2.123	.004
	P2 (fase aktif)	K (k/p kontrol)	28.80*	2.123	.000
		P1 (fase awal)	16.10*	2.123	.000
		P3 (fase kronik)	9.50*	2.123	.000
	P3 (fase kronik)	K (k/p kontrol)	19.30*	2.123	.000
		P1 (fase awal)	6.60*	2.123	.004
		P2 (fase aktif)	-9.50*	2.123	.000
ekspresi selektin L (%)	K (k/p kontrol)	P1 (fase awal)	-15.40*	2.845	.000
		P2 (fase aktif)	-30.50*	2.845	.000
		P3 (fase kronik)	-25.60*	2.845	.000
	P1 (fase awal)	K (k/p kontrol)	15.40*	2.845	.000
		P2 (fase aktif)	-15.50*	2.845	.000
		P3 (fase kronik)	-10.20*	2.845	.001
	P2 (fase aktif)	K (k/p kontrol)	30.90*	2.845	.000
		P1 (fase awal)	15.50*	2.845	.000
		P3 (fase kronik)	5.30	2.845	.071
	P3 (fase kronik)	K (k/p kontrol)	25.60*	2.845	.000
		P1 (fase awal)	10.20*	2.845	.001
		P2 (fase aktif)	-5.30	2.845	.071

Based on observed means.

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) klp perlakuan	(J) klp perlakuan	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
ekspresi ICAM-1 (%)	K (klp kontrol)	P1 (fase awal)	-26.41	-15.39
		P2 (fase aktif)	-51.41	-40.39
		P3 (fase kronik)	-34.71	-23.69
	P1 (fase awal)	K (klp kontrol)	15.39	26.41
		P2 (fase aktif)	-30.51	-19.49
		P3 (fase kronik)	-13.81	-2.79
	P2 (fase aktif)	K (klp kontrol)	40.39	51.41
		P1 (fase awal)	19.49	30.51
		P3 (fase kronik)	11.19	22.21
	P3 (fase kronik)	K (klp kontrol)	23.69	34.71
		P1 (fase awal)	2.79	13.81
		P2 (fase aktif)	-22.21	-11.19
ekspresi VCAM-1 (%)	K (klp kontrol)	P1 (fase awal)	-17.01	-8.39
		P2 (fase aktif)	-33.11	-24.49
		P3 (fase kronik)	-23.61	-14.99
	P1 (fase awal)	K (klp kontrol)	8.39	17.01
		P2 (fase aktif)	-20.41	-11.79
		P3 (fase kronik)	-10.91	-2.29
	P2 (fase aktif)	K (klp kontrol)	24.49	33.11
		P1 (fase awal)	11.79	20.41
		P3 (fase kronik)	5.19	13.81
	P3 (fase kronik)	K (klp kontrol)	14.99	23.61
		P1 (fase awal)	2.29	10.91
		P2 (fase aktif)	-13.81	-5.19
ekspresi selektin L (%)	K (klp kontrol)	P1 (fase awal)	-21.17	-9.63
		P2 (fase aktif)	-36.67	-25.13
		P3 (fase kronik)	-31.37	-19.83
	P1 (fase awal)	K (klp kontrol)	9.63	21.17
		P2 (fase aktif)	-21.27	-9.73
		P3 (fase kronik)	-15.97	-4.43
	P2 (fase aktif)	K (klp kontrol)	25.13	36.67
		P1 (fase awal)	9.73	21.27
		P3 (fase kronik)	-4.7	11.07
	P3 (fase kronik)	K (klp kontrol)	19.83	31.37
		P1 (fase awal)	4.43	15.97
		P2 (fase aktif)	-11.07	-4.7

Based on observed means.

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

Lampiran 14

Uji multivariat ekspresi sel penghasil sitokin pro-inflamasi (TNF- α dan IL-1) dan sitokin anti-inflamasi (IL-10) pada tikus kelompok kontrol dan kelompok perlakuan

General Linear Model

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
kip perlakuan	1	K (kip kontrol)	10
	2	P1 (fase awal)	10
	3	P2 (fase aktif)	10
	4	P3 (fase kronik)	10

Descriptive Statistics

	kip perlakuan	Mean	Std. Deviation	N
ekspresi sel penghasil IL-1 (%)	K (kip kontrol)	.40	.516	10
	P1 (fase awal)	29.20	5.160	10
	P2 (fase aktif)	39.10	8.724	10
	P3 (fase kronik)	25.40	6.328	10
	Total	23.53	15.540	40
ekspresi sel penghasil TNF- α (%)	K (kip kontrol)	.00	.000	10
	P1 (fase awal)	26.50	4.905	10
	P2 (fase aktif)	34.20	4.492	10
	P3 (fase kronik)	34.70	8.512	10
	Total	23.85	15.239	40

Box's Test of Equality of Covariance Matrices^a

Box's M	9.237
F	1.374
df1	6
df2	16168.92
Sig.	.221

Tests the null hypothesis that the observed covariance matrices of the dependent variables are equal across groups.

a. Design: Intercept+KLP

Multivariate Tests^c

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	.975	687.127 ^a	2.000	35.000	.000
	Wilks' Lambda	.025	687.127 ^a	2.000	35.000	.000
	Hotelling's Trace	39.264	687.127 ^a	2.000	35.000	.000
	Roy's Largest Root	39.264	687.127 ^a	2.000	35.000	.000
KLP	Pillai's Trace	1.264	20.595	6.000	72.000	.000
	Wilks' Lambda	.046	42.845 ^a	6.000	70.000	.000
	Hotelling's Trace	14.075	79.756	6.000	68.000	.000
	Roy's Largest Root	13.577	162.922 ^b	3.000	36.000	.000

a. Exact statistic

b. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

c. Design: Intercept*KLP

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

	F	df1	df2	Sig.
ekspresi sel penghasil IL-1 (%)	8.722	3	36	.000
ekspresi sel penghasil TNF- α (%)	8.937	3	36	.000

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept*KLP

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	ekspresi sel penghasil IL-1 (%)	8130.675 ^a	3	2710.225	75.793	.000
	ekspresi sel penghasil TNF-a (%)	8006.900 ^b	3	2668.967	91.490	.000
Intercept	ekspresi sel penghasil IL-1 (%)	22137.025	1	22137.025	619.073	.000
	ekspresi sel penghasil TNF-a (%)	22752.900	1	22752.900	779.951	.000
KLP	ekspresi sel penghasil IL-1 (%)	8130.675	3	2710.225	75.793	.000
	ekspresi sel penghasil TNF-a (%)	8006.900	3	2668.967	91.490	.000
Error	ekspresi sel penghasil IL-1 (%)	1287.300	36	35.758		
	ekspresi sel penghasil TNF-a (%)	1050.200	36	29.172		
Total	ekspresi sel penghasil IL-1 (%)	31555.000	40			
	ekspresi sel penghasil TNF-a (%)	31810.000	40			
Corrected Total	ekspresi sel penghasil IL-1 (%)	9417.975	39			
	ekspresi sel penghasil TNF-a (%)	9057.100	39			

a. R Squared = .863 (Adjusted R Squared = .852)

b. R Squared = .884 (Adjusted R Squared = .874)

Post Hoc Tests

LSD perlakuan

Multiple Comparisons

LSO

Dependent Variable	(I) kip perlakuan	(J) kip perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
ekspresi sel penghasil IL-1 (%)	K (kip kontrol)	P1 (fase awal)	-28.80*	2.674	.000
		P2 (fase aktif)	-38.70*	2.674	.000
		P3 (fase kronik)	-25.00*	2.674	.000
	P1 (fase awal)	K (kip kontrol)	28.80*	2.674	.000
		P2 (fase aktif)	-9.90*	2.674	.001
		P3 (fase kronik)	3.80	2.674	.164
	P2 (fase aktif)	K (kip kontrol)	38.70*	2.674	.000
		P1 (fase awal)	9.90*	2.674	.001
		P3 (fase kronik)	13.70*	2.674	.000
	P3 (fase kronik)	K (kip kontrol)	25.00*	2.674	.000
		P1 (fase awal)	-3.80	2.674	.164
		P2 (fase aktif)	-13.70*	2.674	.000
ekspresi sel penghasil TNF- α (%)	K (kip kontrol)	P1 (fase awal)	-26.50*	2.415	.000
		P2 (fase aktif)	-34.20*	2.415	.000
		P3 (fase kronik)	-34.70*	2.415	.000
	P1 (fase awal)	K (kip kontrol)	26.50*	2.415	.000
		P2 (fase aktif)	-7.70*	2.415	.003
		P3 (fase kronik)	-8.20*	2.415	.002
	P2 (fase aktif)	K (kip kontrol)	34.20*	2.415	.000
		P1 (fase awal)	7.70*	2.415	.003
		P3 (fase kronik)	-.50	2.415	.837
	P3 (fase kronik)	K (kip kontrol)	34.70*	2.415	.000
		P1 (fase awal)	8.20*	2.415	.002
		P2 (fase aktif)	.50	2.415	.837

Based on observed means.

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) klp perlakuan	(J) klp perlakuan	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
ekspresi sel penghasil IL-1 (%)	K (klp kontrol)	P1 (fase awal)	-34.22	-23.38
		P2 (fase aktif)	-44.12	-33.28
		P3 (fase kronik)	-30.42	-19.58
	P1 (fase awal)	K (klp kontrol)	23.38	34.22
		P2 (fase aktif)	-15.32	-4.48
		P3 (fase kronik)	-1.62	9.22
	P2 (fase aktif)	K (klp kontrol)	33.28	44.12
		P1 (fase awal)	4.48	15.32
		P3 (fase kronik)	8.28	19.12
	P3 (fase kronik)	K (klp kontrol)	19.58	30.42
		P1 (fase awal)	-9.22	1.62
		P2 (fase aktif)	-19.12	-8.28
ekspresi sel penghasil TNF- α (%)	K (klp kontrol)	P1 (fase awal)	-31.40	-21.60
		P2 (fase aktif)	-39.10	-29.30
		P3 (fase kronik)	-39.60	-29.80
	P1 (fase awal)	K (klp kontrol)	21.60	31.40
		P2 (fase aktif)	-12.60	-2.80
		P3 (fase kronik)	-13.10	-3.30
	P2 (fase aktif)	K (klp kontrol)	29.30	39.10
		P1 (fase awal)	2.80	12.60
		P3 (fase kronik)	-5.40	4.40
	P3 (fase kronik)	K (klp kontrol)	29.80	39.60
		P1 (fase awal)	3.30	13.10
		P2 (fase aktif)	-4.40	5.40

Based on observed means.

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

Lampiran 15

T test untuk perbedaan ekspresi molekul adesi (ICAM-1, VCAM-1 dan selektin-L) pada tikus kelompok kontrol dan kelompok perlakuan

T-Test

Group Statistics

k/p perlakuan		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ekspresi ICAM-1 (%)	K (k/p kontrol)	10	.10	.316	.100
	P1 (fase awal)	10	21.00	5.272	1.983

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
ekspresi ICAM-1 (%)	Equal variances assumed	19.994	.000
	Equal variances not assumed		

Group Statistics

k/p perlakuan		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ekspresi ICAM-1 (%)	K (k/p kontrol)	10	.10	.316	.100
	P2 (fase aktif)	10	45.00	8.496	2.687

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
ekspresi ICAM-1 (%)	Equal variances assumed	26.069	.000
	Equal variances not assumed		

Group Statistics

	ktp perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ekspresi ICAM-1 (%)	K (ktp kontrol)	10	.10	.316	.100
	P3 (fase kronik)	10	29.30	6.019	1.904

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
ekspresi ICAM-1 (%)	Equal variances assumed	14.545	.001
	Equal variances not assumed		

Group Statistics

	ktp perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ekspresi ICAM-1 (%)	P1 (fase awal)	10	21.00	6.272	1.983
	P2 (fase aktif)	10	46.00	8.498	2.687

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
ekspresi ICAM-1 (%)	Equal variances assumed	1.364	.258
	Equal variances not assumed		

Group Statistics

	ktp perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ekspresi ICAM-1 (%)	P2 (fase aktif)	10	46.00	8.498	2.687
	P3 (fase kronik)	10	29.30	6.019	1.904

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
ekspresi ICAM-1 (%)	Equal variances assumed	1,928	.182
	Equal variances not assumed		

Group Statistics

klp perlakuan		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ekspresi ICAM-1 (%)	P1 (fase awal)	10	21,00	6,272	1,983
	P3 (fase kronik)	10	29,30	6,019	1,904

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
ekspresi ICAM-1 (%)	Equal variances assumed	,078	,783
	Equal variances not assumed		

Group Statistics

klp perlakuan		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ekspresi VCAM-1 (%)	K (klp kontrol)	10	,30	,675	,213
	P1 (fase awal)	10	13,00	3,944	1,247

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
ekspresi VCAM-1 (%)	Equal variances assumed	11,034	,004
	Equal variances not assumed		

Group Statistics

klp perlakuan		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ekspresi VCAM-1 (%)	K (klp kontrol)	10	.30	.675	.213
	P2 (fase aktif)	10	29.10	6.454	2.041

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
ekspresi VCAM-1 (%)	Equal variances assumed	21.627	.000
	Equal variances not assumed		

Group Statistics

klp perlakuan		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ekspresi VCAM-1 (%)	K (klp kontrol)	10	.30	.675	.213
	P3 (fase kronik)	10	19.60	5.700	1.802

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
ekspresi VCAM-1 (%)	Equal variances assumed	13.748	.002
	Equal variances not assumed		

Group Statistics

klp perlakuan		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ekspresi VCAM-1 (%)	P1 (fase awal)	10	13.00	3.944	1.247
	P2 (fase aktif)	10	29.10	6.454	2.041

Group Statistics

k/p perlakuan		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ekspresi selektin L (%)	P2 (fase aktif)	10	31.10	9.620	3.042
	P3 (fase kronik)	10	25.80	5.884	1.861

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
ekspresi selektin L (%)	Equal variances assumed	2.027	.172
	Equal variances not assumed		

Group Statistics

k/p perlakuan		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ekspresi selektin L (%)	P1 (fase awal)	10	15.60	5.854	1.851
	P3 (fase kronik)	10	25.80	5.884	1.861

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
ekspresi selektin L (%)	Equal variances assumed	.232	.635
	Equal variances not assumed		

Group Statistics

k/p perlakuan		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ekspresi selektin L (%)	P1 (fase awal)	10	15.60	5.854	1.851
	P2 (fase aktif)	10	31.10	9.620	3.042

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
ekspresi VCAM-1 (%)	Equal variances assumed	3.308	.086
	Equal variances not assumed		

Group Statistics

klp perikuan		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ekspresi VCAM-1 (%)	P1 (fase awal)	10	13.00	3.944	1.247
	P3 (fase kronik)	10	19.60	5.700	1.802

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
ekspresi VCAM-1 (%)	Equal variances assumed	1.185	.291
	Equal variances not assumed		

Group Statistics

klp perikuan		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ekspresi VCAM-1 (%)	P2 (fase aktif)	10	29.10	5.454	2.041
	P3 (fase kronik)	10	19.60	5.700	1.802

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
ekspresi VCAM-1 (%)	Equal variances assumed	.378	.540
	Equal variances not assumed		

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
ekspresi selektin L (%)	Equal variances assumed	1.426	.248
	Equal variances not assumed		

Group Statistics

kip perlakuan		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ekspresi selektin L (%)	K (kip kontrol)	10	.20	.632	.200
	P3 (fase kronik)	10	25.80	5.884	1.861

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
ekspresi selektin L (%)	Equal variances assumed	9.651	.006
	Equal variances not assumed		

Group Statistics

kip perlakuan		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ekspresi selektin L (%)	K (kip kontrol)	10	.20	.632	.200
	P2 (fase aktif)	10	31.10	9.620	3.042

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
ekspresi selektin L (%)	Equal variances assumed	14.563	.001
	Equal variances not assumed		

Lampiran 16

T test untuk perbedaan ekspresi sel penghasil sitokin pro-inflamasi (TNF- α dan IL-1) dan sitokin anti-inflamasi (IL-10) pada tikus kelompok kontrol dan kelompok perlakuan

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
ekspresi sel penghasil TNF- α (%)	Equal variances assumed	19.882	.000
	Equal variances not assumed		

Group Statistics

	kip perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ekspresi sel penghasil TNF- α (%)	P1 (fase awal)	10	25.50	4.905	1.551
	P2 (fase aktif)	10	34.70	4.492	1.420

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
ekspresi sel penghasil TNF- α (%)	Equal variances assumed	.009	.926
	Equal variances not assumed		

Group Statistics

	kip perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ekspresi sel	P2 (fase aktif)	10	34.20	4.492	1.420
penghasil TNF- α (%)	P3 (fase kronik)	10	34.70	8.512	2.692

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
ekspresi sel penghasil TNF- α (%)	Equal variances assumed	3.149	.093
	Equal variances not assumed		

Group Statistics

klp perlakuan		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ekspresi sel	K (klp kontrol)	10	.00	.000	.000
penghasil TNF- α (%)	P1 (fase awal)	10	26.50	4.005	1.551

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
ekspresi sel	Equal variances assumed	21.256	.000
penghasil TNF- α (%)	Equal variances not assumed		

Group Statistics

klp perlakuan		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ekspresi sel	K (klp kontrol)	10	.00	.000	.000
penghasil TNF- α (%)	P2 (fase aktif)	10	34.20	4.482	1.420

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
ekspresi sel	Equal variances assumed	34.935	.000
penghasil TNF- α (%)	Equal variances not assumed		

Group Statistics

klp perlakuan		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ekspresi sel	K (klp kontrol)	10	.00	.000	.000
penghasil TNF- α (%)	P3 (fase kronik)	10	34.70	8.512	2.692

Group Statistics

	ktp perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ekspresi sel	P1 (fase awal)	10	26.50	4.905	1.551
penghasil TNF- α (%)	P3 (fase kronik)	10	34.70	8.512	2.692

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
ekspresi sel penghasil TNF- α (%)	Equal variances assumed	2.637	.122
	Equal variances not assumed		

Group Statistics

	ktp perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ekspresi sel	K (ktp kontrol)	10	.40	.516	.163
penghasil IL-1 (%)	P2 (fase aktif)	10	39.10	8.724	2.759

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
ekspresi sel penghasil IL-1 (%)	Equal variances assumed	21.804	.000
	Equal variances not assumed		

Group Statistics

	ktp perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ekspresi sel	K (ktp kontrol)	10	.40	.516	.163
penghasil IL-1 (%)	P3 (fase kronik)	10	25.40	6.328	2.001

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
ekspresi sel penghasil IL-1 (%)	Equal variances assumed	31.621	.000
	Equal variances not assumed		

Group Statistics

	klp perfakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ekspresi sel penghasil IL-1 (%)	P1 (fase awal)	10	29.20	5.160	1.632
	P2 (fase aktif)	10	39.10	8.724	2.759

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
ekspresi sel penghasil IL-1 (%)	Equal variances assumed	3.277	.087
	Equal variances not assumed		

Group Statistics

	klp perfakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ekspresi sel penghasil IL-1 (%)	P1 (fase awal)	10	29.20	5.160	1.632
	P3 (fase kronik)	10	25.40	5.328	2.001

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
ekspresi sel penghasil IL-1 (%)	Equal variances assumed	1.147	.298
	Equal variances not assumed		

Group Statistics

	kip perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ekspresi sel	P2 (fase aktif)	10	39.10	8.724	2.759
perghasil IL-1 (%)	P3 (fase kronik)	10	25.40	5.328	2.001

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
ekspresi sel perghasil IL-1 (%)	Equal variances assumed	1.042	.321
	Equal variances not assumed		



T-Test

Group Statistics

		ktp perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ekspresi sel penghasil IL-10 (%)	K (ktp kontrol)		10	.00	.000	.000
	P1 (fase awal)		10	7.50	2.799	.885

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
ekspresi sel penghasil IL-10 (%)	Equal variances assumed	19,710	.000
	Equal variances not assumed		

Group Statistics

		ktp perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ekspresi sel penghasil IL-10 (%)	K (ktp kontrol)		10	.00	.000	.000
	P2 (fase aktif)		10	7.50	2.635	.833

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
ekspresi sel penghasil IL-10 (%)	Equal variances assumed	21,571	.000
	Equal variances not assumed		

Group Statistics

		ktp perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ekspresi sel penghasil IL-10 (%)	K (ktp kontrol)		10	.00	.000	.000
	P3 (fase kronik)		10	18.50	6.433	2.034

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
ekspresi sel penghasil IL-10 (%)	Equal variances assumed	18.367	.000
	Equal variances not assumed		

Group Statistics

	kip perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ekspresi sel penghasil IL-10 (%)	P1 (fase awal)	10	7.50	2.799	.885
	P2 (fase aktif)	10	7.50	2.635	.833

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
ekspresi sel penghasil IL-10 (%)	Equal variances assumed	.022	.883
	Equal variances not assumed		

Group Statistics

	kip perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ekspresi sel penghasil IL-10 (%)	P1 (fase awal)	10	7.50	2.799	.885
	P3 (fase kronik)	10	18.50	6.433	2.034

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
ekspresi sel penghasil IL-10 (%)	Equal variances assumed	4.880	.040
	Equal variances not assumed		

Group Statistics

	ktp perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ekspresi sel penghasil IL-10 (%)	P2 (fase aktif)	10	7.50	2.635	.833
	P3 (fase kronik)	10	18.50	6.433	2.034

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
ekspresi sel penghasil IL-10 (%)	Equal variances assumed	5.372	.032
	Equal variances not assumed		



Lampiran 17



DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
UNIVERSITAS ANDALAS
PAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
JURUSAN FARMASI

Kampus Unand Limau Manis, PADANG - 25163

Telp. (0751) 71682, Fax. 73118, 71682

SURAT KETERANGAN

No. 295/J.16.3. Far/PP/2004

Kerua Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
 Universitas Andalas menerangkan bahwa :

Nama : **Dr. Eryati Darwin**
 Pekerjaan : **Staf Pengajar Fakultas Kedokteran Univ. Andalas
 Mahasiswa Prog. Pendidikan Doktor Universitas
 Airlangga Surabaya**

telah menyelesaikan penelitian dengan judul "Kajian Molekul Adesi
 (ICAM, VCAM dan Selektin) pada Kejadian Arthritis Reumatoid Fase Awal,
 Akut dan Kronis. Percobaan Eksperimental pada Tikus Putih
Rattus Norvegicus", pada Lab. Farmakologi Jurusan Farmasi FMIPA Unand.

Demikianlah Surat Keterangan ini diberikan untuk dapat digunakan dimana
 perlu.

Padang, 19 April 2004

Dr. Akmal Djamean, MS, Apt
 NIP. 131 810 800

Laporan hasil perlakuan pada hewan coba di Laboratorium Farmakologi jurusan Farmasi FMIPA Unand

Judul Disertasi : Kajian molekul adesi (ICAM, VCAM dan Selektin) pada kejadian artritis reumatoid fase awal, aktif dan kronik (Penelitian eksperimental pada tikus putih *Rattus norvegicus*)

Objek penelitian : 40 ekor Tikus putih *Rattus Norvegicus* strain Wistar jantan
Umur 6- 8 minggu
Berat Badan 150-200 gram

Target Penelitian : Tikus CIA (*Collagen Induced Arthritis*)

Kelompok I/P1 (10 ekor) : Kelompok tikus dengan artritis reumatoid fase awal

Kelompok II/P2 (10 ekor) : Kelompok tikus dengan artritis reumatoid fase aktif

Kelompok III/P3 (10 ekor) : Kelompok tikus dengan artritis reumatoid fase kronik

Kelompok IV/K (10 ekor) : Kelompok tikus kontrol

Bahan Immunisasi : *Type II- Collagen* (Sigma) dilarutkan dengan asam asetat (0,1 M) 2mg/ml dan diemulsi dengan *Complete Freund's Adjuvant* (Sigma) dalam jumlah sama

Dosis Pemberian : Immunisasi pertama : 0,2 µl emulsi Kollagen tipe II
Booster : 0,1µl emulsi Kollagen tipe II
Kontrol : 0,2 µl *Oleum cocus* steril

Cara Pemberian : Injeksi intra dermal pada pada 4 tempat di pangkal ekor tikus

Jadwal pelaksanaan : Pemeliharaan: s/d preparasi : 5 Oktober 2002-13 Desember 2002

Imunisasi I : 23 Oktober 2002

Booster : 1 November 2002

Jaringan yang diteliti: Sendi
Darah
Testis

HASIL PENELITIAN

Kelompok I

1 minggu setelah imunisasi tanpa booster, tidak terlihat adanya pembengkakan pada sendi-sendi tungkai tikus.

Preparasi : tgl 2 November 2002

Kelompok II:

3 minggu sesudah imunisasi 1 atau 2 minggu sesudah booster pada seluruh tikus kelompok ini terlihat tanda-tanda inflamasi akut pada kedua tungkai belakang berupa pembengkakan yang nyata dan warna kemerahan.

Preparasi : tgl 9 November 2002

Kelompok III:

6 minggu sesudah imunisasi I atau 5 minggu sesudah booster pada seluruh tikus kelompok ini terlihat pembengkakan sendi pada tungkai depan dan belakang. Pembengkakan sendi pada tungkai belakang berkurang bila dibanding dengan pembengkakan pada fase aktif dan terlihat deformitas sendi. Disamping itu pada seluruh tikus ini terjadi pembesaran testis.

Preparasi : tgl 13 Desember 2002

Kelompok IV:

1 minggu sesudah injeksi dengan bahan pelarut (oleum cocos) tidak terlihat perubahan pada sendi tungkai tikus

Preparasi : tgl 3 November 2002

Tabel: Pembengkakan sendi dan hasil laboratorium faktor reumatoid (FR) pada tikus kelanipak kontrol (K), artritis reumatoid fase inisiasi (P1), fase aktif (P2) dan fase kronik (P3)

No	K		P1		P2		P3	
	Edema	FR	Edema	FR	Edema	Fr	Edema	FR
1	-	-	-	-	++	-	+d	-
2	-	-	-	-	++	-	+d	-
3	-	-	-	-	+	-	+d	-
4	-	-	-	-	++	-	+d	-
5	-	-	-	-	++	-	±d	-
6	-	-	-	-	++	-	+d	-
7	-	-	-	-	++	-	+d	-
8	-	-	-	-	++	-	±d	-
9	-	-	-	-	++	-	+	-
10	-	-	-	-	++	-	+d	-

- : Tidak terlihat adanya edema pada sendi
- ± : Terlihat adanya edema ringan pada sendi
- + : Terlihat edema pada sendi
- ++ : Terlihat edema yang nyata pada sendi dengan warna kemerahan
- +d : Terlihat ada edema pada sendi diikuti dengan deformitas jari-jari
- : Faktor reumatoid negatif (seronegatif)

Lampiran 18



Gambar 18. Gambaran sendi arthritis rematoid fase kronik pada sendi cakar tungkai belakang tikus. Tampak sedikit pembengkakan dan deformitas pada tungkai belakang tikus pada jari-jari

Lampiran 19.



**DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
UNIVERSITAS ANDALAS
LEMBAGA PENELITIAN**

Gedung Rektorat Lantai II Kampus Universitas Andalas, Limau Manis, PADANG - 26163
Telp. (0751) 72645. Fax. (0751) 72645, 71086, E-mail : lpus@padang.unsriand.ac.id

Surat Keterangan

No 091/J.16/PL/2004

Kena Lembaga Penelitian Universitas Andalas dengan ini menerangkan bahwa

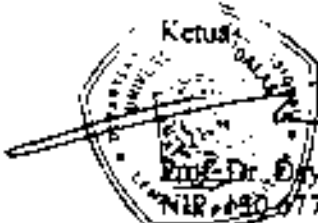
Nama : Dr. Eryati Darwin
NIP : 131 129 836
Pekerjaan : Staf Pengajar Fakultas Kedokteran Univ. Andalas/ Mahasiswa Program Pendidikan Doktor Universitas Airlangga Surabaya.

Telah melakukan penelitian " *Kajian Molekul Adesi (ICAM, VCAM dan Selektin) pada kejadian Arthritis Reumatoid Fase Awal, Akut dan Kronis Percobaan eksperim,ental pada Tikus Putih Rattus norvegicus*", di Laboratorium Farmakologi Jurusan Farmasi FMIPA Unand.

Yang bersangkutan selama melaksanakan penelitian di Laboratorium Farmakologi tersebut diatas telah meneliti sesuai dengan prosedur standar bekerja dengan binatang percobaan (Animal Ethics), karena memang setiap penelitian yang dilakukan disana harus mengikuti etika tersebut.

Demikianlah surat keterangan ini kami buat untuk dapat digunakan dimana perlu.

Padang, 27 Mei 2004


Ketua
Prof. Dr. Daryar Arbain, Apt.
NIP. 190 677 654