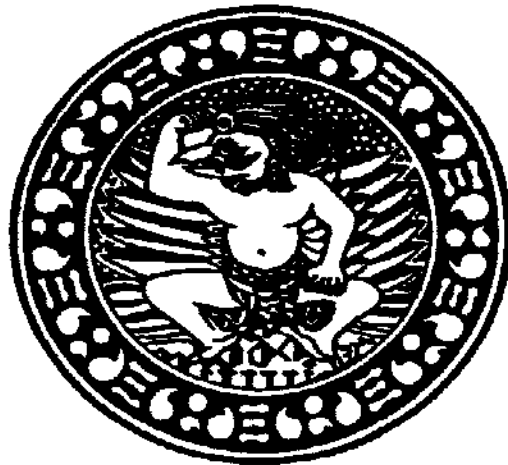


TESIS

**EKSPRESI *VASCULAR CELL ADHESION MOLECULE -1*
(VCAM-1) DAN PERUBAHAN HISTOPATOLOGI AORTA
TIKUS PUTIH JANTAN (*Ratus norvegicus*) SIROSIS YANG
DIINDUKSI DENGAN ENDOTOKSIN *E coli* O₅₅:B₄**

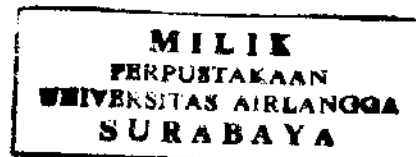


**MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

TONY HARTONO

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2005**

**EKSPRESI *VASCULAR CELL ADHESION MOLECULE -1*
(VCAM-1) DAN PERUBAHAN HISTOPATOLOGI AORTA
TIKUS PUTIH JANTAN (*Ratus norvegicus*) SIROSIS YANG
DIINDUKSI DENGAN ENDOTOKSIN *E coli* O₅₅:B₄**



TONY HARTONO
NIM. 090 214 721 M

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2005**

**EKSPRESI *VASCULAR CELL ADHESION MOLECULE -1*
(VCAM-1) dan PERUBAHAN HISTOPATOLOGI AORTA
TIKUS PUTIH JANTAN (*Ratus norvegicus*) SIROSIS YANG
DIINDUKSI DENGAN ENDOTOKSIN *E coli O55:B4***

T E S I S

Untuk memperoleh Gelar Magister
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya

Oleh:

TONY HARTONO
NIM. 090 214 721 M

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

Tanggal 21 Maret 2005

Lembar Pengesahan

**TESIS INI TELAH DISETUJUI
PADA TANGGAL, 21 MARET 2005**


OLEH

Pembimbing Ketua



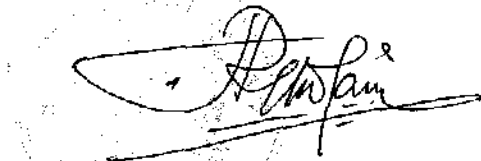
Lindawati Alimsardjono, dr., M Kes. SpMK
NIP. 131 569 375

Pembimbing



DR. Bambang Sektiari, drh., DEA
NIP. 131 837 004

Mengetahui
Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga



Prof. Retno Handajani, dr., MS., PhD
NIP. 130 541 984

**Telah Diuji dan Dinilai oleh Panitia Penguji
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga
Tanggal 21 Maret 2005**

Panitia Penguji Tesis

1. **Lindawati Alimsardjono, dr., M.Kes., Sp.M.K**
2. **Dr. Bambang Sektiari L, drh., DEA**
3. **Dr. H. Eddy Bagus Wasito, dr., M.S., Sp.M.K**
4. **Dr. Ketut Suidiana, drs., MSi**
5. **Marijam Purwanta, dra., Apt., MSc**

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kami panjatkan kehadapan Allah SWT, atas segala rahmat dan karunia-Nya, sehingga kami dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan tesis ini.

Terima kasih tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya, kami sampaikan kepada ibu Lindawati Alimsardjono dr., M.Kes., Sp.M.K selaku pembimbing ketua dan Dr. Bambang Sektiari drh., DEA selaku pembimbing yang dengan penuh perhatian telah rela menyisihkan waktunya guna memberikan bimbingan dan motivasi dalam penelitian dan penulisan tesis.

Terima kasih kepada Dr. H. Eddy Bagus Wasito dr., M.S., Sp.M.K selaku ketua minat Mikrobiologi yang dengan sabar dan penuh perhatian telah banyak meluangkan waktu dan memberikan sebagian ilmu yang dimiliki.

Kepada para dosen program studi Ilmu kedokteran Dasar khususnya program Mikrobiologi, yang telah memberikan wawasan keilmuan, kami ucapkan terima kasih yang tulus.

Ungkapan penghargaan dan rasa terima kasih kepada Dr. Ketut Suidiana, drs., M.Si.; ibu. Marijam Purwanta, dra. Apt., MSc; dan Dr. H. Eddy Bagus Wasito, dr., M.S., Sp.M.K. selaku penguji karena beliau-beliau ini telah banyak meluangkan waktunya untuk berdiskusi dan memberikan masukan dan koreksi demi sempurnanya tulisan ini.

Dengan selesainya tesis ini, perkenankan pula kami mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

- Rektor Universitas Airlangga Surabaya, Prof. Dr. Med. H. Puruhito, dr. atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada kami untuk mengikuti pendidikan program magister.
- Direktur Program Pascasarjana Prof. Dr. H. Mochamad Amin, dr. atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti pendidikan program magister.
- Kepala Laboratorium Patologi RSUD Dr Sutomo, Kepala Laboratorium Biokimia dan Kepala Laboratorium GRAMIK FK UNAIR yang telah memberikan kesempatan untuk pemeriksaan sampel.

- Kepala BBKH Tanjung Perak Kisman A. Rasyid, drh., M.M dan Penanggung Jawab Wilker Bandara Juanda Luh Darmini, drh. selaku pimpinan instansi tempat saya bekerja atas restu yang diberikan untuk menempuh studi program magister ini.
- Ibu Leni Amd, staf Laboratorium GRAMIK yang membantu pemeriksaan VCAM-1.
- Bpk. Heri dan Bpk. Choirul, staff bagian Laboratorium Biokimia yang membantu pemeliharaan hewan coba.
- Wiwik Misaco, drh., M.Kes.; Emi Kostanti, drh.; Ina Mulyani, drh.; Tyta, drh.; Suprianto, SKH; Yulia; dan Nyoman yang telah banyak membantu dalam pelaksanaan penelitian dan penyusunan tesis.
- Kepada kedua orangtua dan mertua saya, terima kasih atas doa restu dan bantuannya selama kami mengikuti program pascasarjana (S2).
- Secara khusus kepada istri tercinta atas segala doa dan pengorbanannya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini.
- Kepada semua pihak dengan keterbatasan ruang dalam tesis ini, tidak dapat saya sebutkan namanya satu per satu yang telah banyak membantu dalam penulisan tesis ini.

Mohon kiranya Allah SWT berkenan membalas kebaikan beliau-beliau tersebut diatas dengan kebaikan yang lebih besar.

Kami menyadari bahwa tulisan ini jauh dari sempurna, oleh karenanya saran dan kritikan yang sifatnya membangun dari pembaca sangat diharapkan. Akhirnya semoga tulisan ini membawa manfaat didalam menunjang perkembangan ilmu kedokteran dan perkembangan penelitian dimasa yang akan datang. Amin.

RINGKASAN

Ekspresi *Vascular Cell Adhesion Molecule-1* (VCAM-1) dan Perubahan Histopatologi Aorta Tikus Putih Jantan (*Ratus norvegicus*) Sirosis yang Diinduksi dengan Endotoksin *E coli* O₅₅:B₄

Tony Hartono

Penyakit hati yang kronis menyebabkan sirosis, ditandai dengan meluasnya jaringan fibrosis dan hilangnya morfologi hati normal. Hal ini mempengaruhi fungsi hati sebagai filter mikroorganisma dan toksin. Apabila ini berlanjut akan menyebabkan endotoksaemia.

Pelepasan endotoksin dalam sirkulasi darah menyebabkan syok septik. Tingkat mortalitas mencapai 20% hingga 30% pada pasien yang mengalami syok septik disebabkan oleh bakteri gram negatif.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ekspresi molekul adhesi VCAM-1 dan perubahan histopatologi aorta tikus putih jantan (*Ratus norvegicus*) sirosis yang diinduksi dengan endotoksin *E coli* O₅₅:B₄.

Penelitian ini merupakan eksperimental laboratorium yang menggunakan rancangan percobaan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan lima perlakuan dan lima pengulangan. Perlakuan kontrol menggunakan induksi larutan saline, selanjutnya interval pengamatan 6 jam, 12 jam, 18 jam dan 24 jam terhadap induksi endotoksin. Data dengan skala ordinal yaitu intensitas warna VCAM-1 dianalisis dengan Kruskal-Wallis dan dilanjutkan dengan Uji Z, sedangkan data dengan skala rasio dianalisis dengan Anova dan dilanjutkan dengan uji LSD.

Hasil penelitian menunjukkan ekspresi warna VCAM-1 paling tinggi pada perlakuan kontrol, pengamatan interval 6 jam dan 12 jam dengan skor rank rata-rata 18 ($P < 0,05$) dibandingkan dengan interval pengamatan 18 jam dan 24 jam. Hal ini disebabkan karena jumlah sel endotel yang mampu mengekspresikan VCAM-1 lebih banyak.

Jumlah sel endotel pada kontrol, perlakuan 6 jam dan 12 jam berbeda nyata dengan perlakuan interval 18 dan 24 jam ($P < 0,05$). Jumlah sel endotel tertinggi didapat pada perlakuan kontrol dengan jumlah rata-rata $6,6920 \pm 0,1205$

dalam interval 1 cm. Hal ini disebabkan oleh lama pemaparan endotoksin, semakin lama mengakibatkan perubahan ultra struktur endotel yang lebih parah, sehingga mengakibatkan gangguan fungsi sel endotel.

Tebal lapisan VCAM-1 pada sel endotel (dari permukaan endotel hingga lapisan elastis lamina interna) pada interval pengamatan 6 dan 12 jam berbeda dengan kontrol dan ketiganya berbeda nyata dengan perlakuan pengamatan 18 dan 24 jam ($P < 0,05$). Hasil perlakuan yang paling tebal terjadi pada perlakuan interval pengamatan 6 jam dengan tebal $(0,0705 \pm 0,0030) 10^{-3}$ cm. Hal ini disebabkan karena kemampuan masing-masing sel endotel dalam mengekspresikan molekul adhesi VCAM-1. Penurunan tebal lapisan VCAM-1 endotel pada interval pengamatan 18 jam dan 24 jam disebabkan kerusakan ultrastruktur sel endotel yang parah, sehingga kemampuan ekspresi VCAM-1 menurun.

Terjadi peningkatan diskontinuitas lapisan elastis lamina interna yang nyata dengan ($P < 0,05$) pada interval pengamatan 18 jam dan 24 jam jika dibandingkan dengan kontrol dan interval pengamatan 6 jam dan 12 jam. Hasil perlakuan yang paling tinggi mengalami diskontinuitas terjadi pada interval pengamatan 24 jam dengan panjang $(0,2312 \pm 0,0892) 10^{-3}$ cm. Hal ini menunjukkan kerusakan yang parah pada lapisan elastis lamina interna hingga terjadi diskontinuitas. Jumlah sel endotel berkurang, sehingga lapisan elastis lamina interna terparap langsung dengan endotoksin.

Penipisan lapisan elastis lamina interna yang nyata ($P < 0,05$) pada interval pengamatan 18 dan 24 jam jika dibandingkan dengan interval pengamatan kontrol, 6, dan 12 jam. Lapisan elastis lamina interna pada interval pengamatan 24 jam menunjukkan lapisan yang paling tipis dengan ketebalan $(0,0122 \pm 0,0029) 10^{-3}$ cm. Lapisan elastis lamina interna semakin menipis seiring lama kontak sel endotel dengan endotoksin. Endotoksin menyebabkan pelepasan *Nitric Oxide* (NO) yang mempunyai sifat antiproliferasi sehingga menghambat pembentukan neointima. Penurunan ekspresi VCAM-1 juga menyebabkan penurunan pembentukan neointima.

Pada penelitian ini menunjukkan ekspresi VCAM-1 dipengaruhi oleh jumlah sel endotel yang mengekspresikan VCAM-1 dan peningkatan level

ekspresi VCAM-1 pada masing-masing endotel. Pada perlakuan kontrol, interval pengamatan 6 jam dan 12 jam menunjukkan ekspresi VCAM-1 yang lebih tinggi ($P<0,05$) dibandingkan dengan kelompok interval pengamatan 18 jam dan 24 jam. Hal ini disebabkan oleh jumlah sel endotel yang lebih banyak dengan ($P<0,05$) pada kelompok kontrol, interval pengamatan 6 jam dan 12 jam jika dibandingkan dengan kelompok interval pengamatan 18 jam dan 24 jam.

Pada kelompok 18 jam dan 24 jam menunjukkan penipisan lapisan elastis lamina interna dan interval diskontinuitas yang lebih panjang dengan ($P<0,05$) dibandingkan dengan kelompok kontrol, interval pengamatan 6 dan 12 jam. Hal ini disebabkan karena waktu kontak sel endotel dengan endotoksin, semakin lama menunjukkan derajat jejas pada sel endotel semakin parah.

Saran dalam penelitian ini, perlu dilakukan kontrol pemeriksaan VCAM-1 secara *in vivo* pada penderita sirosis untuk mengetahui kondisi inflamasi sistemik pada penderita sirosis. Hal ini diharapkan dapat mengurangi resiko perdarahan yang terjadi pada penderita sirosis dengan penatalaksanaan terapi pencegahan lebih awal. Perlu dilakukan penelitian menggunakan molekul adhesi dan endotoksin dari bakteri yang lain. Perlu dilakukan dengan menggunakan dosis endotoksin yang lebih rendah dan pengamatan yang lebih lama, sehingga bisa mengamati pembentukan lapisan neointima.

SUMMARY

Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) Expression and Histopathology Change on Aorta of Cirrhosis Male Rat (*Ratus norvegicus*) induced by *E coli* O₅₅:B₄

Tony Hartono

Cirrhosis is a common end stage in a number of chronic progressive liver disease, which liver parenchymal cells are replaced with fibrous tissue. The liver functions as a blood cleansing for microorganism and toxin will be disturbed. If the process continues, it will cause endotoxaemia.

The release of endotoxin in blood circulation can trigger a septic shock. Mortality rate can reach 20% up to 30% in patients with septic shock caused by gram-negative bacteria.

The objective of this study is to know Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) expression and histopathology change on aorta of cirrhosis male rat (*Ratus norvegicus*) induced by endotoxin *E coli* O₅₅:B₄.

This study was a laboratory experimental study using Complete Randomized Design with five treatments and five repetitions. The treatment was divided into control using saline solution induction and observation interval of 6, 12, 18, and 24 hours induced by endotoxin. Data with ordinal scale were analyzed using Kruskal-Wallis and followed by Z test. Data with ratio scale were analyzed using Analysis of Variance (ANOVA) and followed by Least Significant Difference (LSD) test as needed.

The result was showing that VCAM-1 expression on control and interval observation of 6 and 12 hours have score rank mean of 18 and significant difference ($P < 0.05$), which are higher than observation interval of 18 and 24 hours. This phenomenon is because of bigger quantity of endothelial cell that expressed adhesion molecule (VCAM-1).

The quantity of endothelial cell on control and observation interval of 6 and 12 hours have significant difference ($P < 0.05$), which are bigger than interval observation of 18 and 24 hours. The control has biggest quantity with mean of

6.6920 ± 0.1205 /cm. It is caused by endothelial cell contact with endotoxin, longer contact interval can make more severe of cell dysfunction. The control treatment was using saline, which only made bigger volume, but it did not make dysfunction of the endothelial cell.

VCAM-1 layer thickness on endothelial cell in observation interval of 6 and 12 hours differ than control but all of them have significant difference ($P < 0.05$) compared with observation interval of 18 and 24 hours. The treatment with observation interval of 6 hours has thickness with mean of $(0.0705 \pm 0.0030) 10^{-3}$ cm. It is because of the ability of each endothelial cell to express VCAM-1. Thickness decrement on observation interval of 18 and 24 hours was caused by cell injury with change on ultra structure morphology till severe destruction.

There is discontinuity increment on elastic lamina internal layer with significant difference ($P < 0.05$) on observation interval 24 and 18 hours compared with control, observation 6 and 12 hours. The treatment with observation interval of 24 hours has indicated the highest discontinuity increment, which has mean $(0.2312 \pm 0.0892) 10^{-3}$ cm. This result was showing that there is severe destruction on elastic lamina internal till become discontinue, loss a lot of endothelial cell, and cause this layer express directly by endotoxin.

Real thickness decrement of elastic lamina internal layer has indicated significant difference ($P < 0.05$) within observation interval of 18 and 24 hours compared with control and observation interval of 6 and 12 hours. The result of observation interval 24 hours has mean $(0.0122 \pm 0.0029) 10^{-3}$ cm. Elastic lamina internal layer has become thinner along with contact period of endothelial cell with endotoxin. Endotoxin has caused *Nitric Oxide* (NO) release, which has antiproliferation action that can inhibit neointima formation. The decrement of VCAM-1 has caused decrement of neointima formation too.

In this study, VCAM-1 expression was influenced by quantity of endothelial cell and level increment of VCAM-1 expression on each endothelial cell. On control, observation interval of 6 and 12 hours was showing higher VCAM-1 expression than observation interval of 18 and 24 hours ($P < 0.05$). It is because of quantity of endothelial cell on control, observation interval of 6 and 12 hours bigger than of 18 and 24 hours ($P < 0.05$).

Thickness decrement and increment level discontinuity of elastic lamina internal layer on observation interval of 18 and 24 hours on significant difference ($P < 0.05$) compared with control and observation interval of 6 and 12 hours. It is caused endothelial cell become severe destruction correlation with expressed longer with endotoxin.

Suggestion in this study, it is needed for cirrhosis patients to do control VCAM-1 in vivo to know systemic inflammation condition. In order decrement bleeding risks with treatment more earlier on cirrhosis patients. It is supposed to continue study with other adhesion molecule, other endotoxin and low dose of endotoxin in order to observe new neointima layer formation.

ABSTRACT

Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) Expression and Histopathology Change on Aorta of Cirrhosis Male Rat (*Ratus norvegicus*) induced by *E coli* O₅₅:B₄

Tony Hartono

The objective of this study is to know Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) expression and histopathology change on aorta of cirrhosis male rat (*Ratus norvegicus*) induced by endotoxin *E coli* O₅₅:B₄.

This study was a laboratory experimental study using Complete Randomized Design with five treatments and five repetitions. The treatment was divided into control using induction by saline solution and induction by endotoxin in observation interval of 6, 12, 18, and 24 hours. Data were analyzed using Analysis of Variance (ANOVA) and followed by Least Significant Difference (LSD) test as needed. The other data were analyzed using Kruskal-Wallis and followed by Z test.

The result showed that VCAM-1 expression and the quantity of endothelial cell had significant difference ($P < 0.05$) on control, observation interval of 6 and 12 hours compare with observation interval of 18 and 24 hours. The thickness of expression VCAM-1 on endothelial cell had significant difference ($P < 0.05$) on observation interval of 6 and 12 hours compare with control, but they all had significant difference compare with observation interval of 18 and 24 hours. Discontinuity and thickness of Elastic Lamina Internal (ELI) had significant difference ($P < 0.05$) on control, observation interval of 6 and 12 hours compare with interval observation 18 and 24 hours. The highest discontinuity and the thinnest elastic lamina internal were obtained within observation interval of 24 hours.

Keywords: VCAM-1 Expression, Endothelial Cell, Discontinuity, Elastic Lamina Internal.

DAFTAR ISI

	Halaman
Judul.....	i
Prasyarat Gelar.....	ii
Lembar Pengesahan.....	iii
Penetapan Panitia Penguji.....	iv
Ucapan Terima Kasih.....	v
Ringkasan.....	vii
Summary	x
Abstract.....	xiii
DAFTAR ISI.....	xiv
DAFTAR TABEL.....	xvii
DAFTAR GAMBAR.....	xviii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xix
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1 Tujuan umum.....	4
1.3.2 Tujuan khusus.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Sirosis.....	6
2.2 Struktur dan Fungsi Sel Endotel.....	10
2.3 Sel Endotel dan VCAM-1.....	15
2.4 Melekatnya Lekosit pada Lokasi Infeksi.....	20
2.5 Endotoksin.....	21
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESA PENELITIAN	24
3.1 Kerangka Konseptual Penelitian.....	24

3.2	Landasan Teori Kerangka Konseptual Penelitian.....	25
3.3	Hipotesa Penelitian.....	26
BAB 4	MATERI DAN METODE PENELITIAN.....	27
4.1	Rancangan Penelitian.....	27
4.2	Kriteria dan Ukuran Sampel.....	27
4.3	Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel.....	29
4.3.1	Variabel penelitian.....	29
4.3.1.1	Variabel bebas.....	29
4.3.1.2	Variabel tergantung.....	29
4.3.1.3	Variabel kendali.....	29
4.3.2	Definisi operasional variabel.....	29
4.4	Bahan Penelitian.....	30
4.5	Instrumen Penelitian.....	30
4.6	Lokasi dan Waktu Penelitian.....	31
4.6.1	Lokasi penelitian.....	31
4.6.2	Waktu penelitian.....	31
4.7	Metode Penelitian.....	31
4.7.1	Hewan model sirosis.....	31
4.7.2	Induksi endotoksin.....	32
4.7.3	Eksisi aorta.....	32
4.7.4	Pembuatan preparat imunohistokimia VCAM-1.....	33
4.7.4.1	Pembuatan preparat histologi.....	33
4.7.4.2	Pewarnaan imunohistokimia VCAM-1.....	33
4.7.5	Hasil pengamatan.....	34
4.7.6	Analisa data.....	36
BAB 5	ANALISIS HASIL PENELITIAN.....	37
5.1	Ekspresi Warna VCAM-1.....	37
5.2	Sel Endotel.....	38
5.3	Tebal Lapisan VCAM-1 pada Endotel.....	38
5.4	Diskontinuitas dari Lapisan Elastis Lamina Interna (ELI).....	39
5.5	Tebal Lapisan Elastis Lamina Interna.....	40

BAB 6 PEMBAHASAN.....	42
6.1 Ekspresi VCAM-1.....	42
6.2 Endotel.....	44
6.3 Tebal Lapisan VCAM-1 pada Endotel.....	48
6.4 Interval Diskontinuitas Lapisan Elastis Lamina Interna.....	48
6.5 Tebal Lapisan Elastis Lamina Interna.....	49
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN.....	51
7.1 Kesimpulan.....	51
7.2 Saran.....	51
DAFTAR PUSTAKA.....	53
LAMPIRAN-LAMPIRAN.....	57

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Skor perubahan gambaran intensitas pewarnaan VCAM-1 pada sel endotel.....	35
Tabel 5.1 Hasil rata-rata rank ekspresi warna VCAM-1 pada aorta tikus putih jantan (<i>Ratus norvegicus</i>) sirosis yang diinduksi dengan endotoksin <i>E coli</i> O ₅₅ :B ₄	37
Tabel 5.2 Hasil rata-rata jumlah sel endotel pada aorta tikus putih jantan (<i>Ratus norvegicus</i>) sirosis yang diinduksi dengan endotoksin <i>E coli</i> O ₅₅ :B ₄	38
Tabel 5.3 Hasil rata-rata tebal lapisan VCAM-1 pada endotel aorta tikus putih jantan (<i>Ratus norvegicus</i>) sirosis yang diinduksi dengan endotoksin <i>E coli</i> O ₅₅ :B ₄	39
Tabel 5.4 Hasil rata-rata diskontinuitas dari ELI pada aorta tikus putih jantan (<i>Ratus norvegicus</i>) sirosis yang diinduksi dengan endotoksin <i>E coli</i> O ₅₅ :B ₄	40
Tabel 5.5 Hasil rata-rata tebal lapisan ELI pada aorta tikus putih jantan (<i>Ratus norvegicus</i>) sirosis yang diinduksi dengan endotoksin <i>E coli</i> O ₅₅ :B ₄	41

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Struktur pembuluh darah.....	9
Gambar 2.2 Histologi dari pembuluh darah pewarnaan H&E.....	9
Gambar 2.3 Histologis dari pembuluh darah pewarnaan H&E-Elastin Van Gieson.....	10
Gambar 2.4 Infiltrasi bakteri dan endotoksinnnya pada endotel.....	13
Gambar 2.5 Mekanisme endotel	14
Gambar 2.6 Migrasi leukosit dan VCAM-1 pada sel endotel.....	16
Gambar 2.7 Struktur VCAM-1, ICAM-1 dan PECAM-1.....	17

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Penentuan Peringkat (Rank).....	57
Lampiran 2 Analisis Varian	64
Lampiran 3 Foto-foto Hasil Penelitian.....	69
Lampiran 4 Pembuatan Preparat Immunohistokimia VCAM-1.....	72

BAB 1

PENDAHULUAN



1.1 Latar Belakang

Hati merupakan organ terbesar di tubuh manusia, kontribusinya kurang lebih 1/50 dari total berat badan, pada orang dewasa beratnya hingga 1,5 kg. Lobulus merupakan unit fungsional dasar dari hati, yang mempunyai bentuk silindris dan memiliki diameter 0,8 hingga 2 milimeter. Hati manusia memiliki 50.000 hingga 100.000 lobulus (Guyton, 2000).

Aliran darah yang melalui hati sangat banyak, kurang lebih 1050 mililiter darah mengalir dari vena porta ke dalam sinusoid hati tiap menitnya dan 300 mililiter mengalir dari arteri hepatica ke dalam sinusoid, sehingga total aliran darah yang mengalir berkisar 1350 ml/menit. Jumlah ini merupakan 27 % dari *resting cardiac output* (Guyton, 2000).

Menurut Guyton (2000), hati memegang peranan penting antara lain: (1) filtrasi darah; (2) metabolisme dari karbohidrat, protein, lemak, hormon, bahan kimia asing; (3) pembentukan empedu; (4) penyimpanan vitamin dan zat besi; dan (5) pembentukan faktor koagulasi.

Hati menghasilkan substansi yang penting dalam pembekuan darah. Substansi ini terdiri dari fibrinogen, prothrombin, faktor VII, dan beberapa faktor yang penting lainnya. Kemampuan hati dalam detoksifikasi racun atau mengekresikan kedalam kantong empedu beberapa obat antara lain sulfonamid, penisilin, dan eritromisin. serta beberapa hormon seperti tiroksin, estrogen, kortisol, dan aldosteron (Guyton, 2000).

Apabila hati mengalami infeksi progresif yang bersifat kronis akan menyebabkan sirosis hepatic. Pada kondisi sirosis ini sel-sel parenkim hati mengalami kerusakan, kemudian digantikan dengan jaringan fibrous. Hal ini mengakibatkan akumulasi jaringan fibrous disekeliling pembuluh darah, sehingga menahan aliran darah portal melalui hati. Hal ini bisa terjadi akibat terlalu sering meminum minuman beralkohol, juga bisa karena mencerna zat racun seperti karbon tetraklorid, infeksi virus seperti hepatitis B dan hepatitis C, autoimun hepatitis, hemochromatosis, adanya obstruksi saluran empedu, dan penyakit infeksi pada kantong empedu (Guyton, 2000).

Penderita yang mengalami fase akhir dari penyakit sirosis berkembang dengan adanya gejala koagulopati yang disebabkan peningkatan pengaturan proses prokoagulan dan fibrinolitik seperti thrombositopenia (Scherer, 1994). Hal ini menyebabkan hipertensi portal, *ascites*, *heart failure*, dan gangguan pembuluh darah.

Pada penderita sirosis, bisa terjadi tekanan darah portal melebihi tekanan darah sistemik atau lebih 12 mmHg menyebabkan hipertensi portal, vena kolateral yang menghubungkan sirkulasi sistemik dengan sirkulasi portal menjadi dilatasi dan membentuk varises yang meluas pada beberapa tempat di tubuh. Pada varises yang terjadi di esofagus dan lambung proksimal bisa menyebabkan ruptur vaskular dan terjadi perdarahan (Guyton, 2000).

Penurunan aliran darah portal mempengaruhi fungsi hati sebagai filter mikroorganisma, endotoksin, dan eksotoksin. Hal ini berakibat terjadinya endotoksaemia. Masuknya endotoksin ke dalam tubuh akan menyebabkan terjadinya pelepasan mediator-mediator inflamasi. Keadaan ini akan diikuti

dengan transmisi signal stress pada jaringan, sehingga terjadi aktivasi makrofag berupa peningkatan kecepatan metabolisme, motilitas, dan aktivitas fagosit sel makrofag. Endotoksin dapat menstimulasi lekosit untuk melepaskan sitokin seperti *Tumor Necrosis Factor* (TNF α), *Interleukin I* (IL-1) dan sintesa prostaglandin (Abbas *et al*, 2000).

Lipopolisakarida dari bakteri (LPS) atau endotoksin adalah bagian luar dinding bakteri gram negatif mempunyai kemampuan yang potensial untuk aktivasi makrofag. Endotoksin menginduksi reaksi inflamasi lokal dan sistemik. Berbagai gambaran kerusakan jaringan yang diamati pada infeksi oleh bakteri gram negatif dapat menyerupai infeksi karena pemberian LPS (endotoksin) (Abbas *et al*, 2000).

Sebagai respons terhadap sitokin seperti TNF α , sel endotel secara berurutan mengekspresikan molekul adhesi yang berbeda, mulai dari E-selektin (ELAM), *Intracellular Adhesion Molecul* (ICAM), serta *Vascular Cell Adhesion Molecul-1* (VCAM-1) untuk mengikat lekosit yang berbeda untuk masuk kedalam jaringan yang terinfeksi, pertama-tama neutrofil, kemudian monosit dan kemudian sel-sel T (Abbas *et al*, 2000). VCAM-1 meningkat secara transkripsional oleh induksi endotoksin dan sitokin inflamatori, peningkatan ini berkorelasi dengan infiltrasi monosit dan makrofag (Simoncini *et al*, 2003; Henseleit *et al*, 1994).

Endotoksin dapat menyebabkan inflamasi vaskular. Perubahan histopatologis yang terjadi pada endotel yang mengalami inflamasi terjadi infiltrasi sel-sel radang, pembentukan fibrinogen oleh sel endotel dapat menstimulasi sel myointima untuk proliferasi deposit matriks mengakibatkan

1.2 Rumusan Masalah

Apakah terjadi peningkatan ekspresi VCAM-1 pada endotel dan perubahan histopatologis pada pembuluh darah aorta tikus putih sebagai hewan model sirosis terhadap induksi endotoksin O55:B4?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengukur peningkatan ekspresi VCAM-1 pada endotel dan perubahan histopatologis pada aorta tikus putih sebagai hewan model sirosis terhadap induksi endotoksin O55:B4.

1.3.2 Tujuan Khusus

Untuk mengukur peningkatan ekspresi VCAM-1 pada endotel aorta tikus putih sebagai hewan model sirosis terhadap lama pemaparan 6 jam, 12 jam, 18 jam, dan 24 jam dengan induksi endotoksin O55:B4.

Mengamati perubahan histopatologi pada aorta tikus putih sebagai hewan model sirosis terhadap lama pemaparan 6 jam, 12 jam, 18 jam, dan 24 jam dengan induksi endotoksin O55:B4.

1.4 Manfaat Penelitian

Dari segi pengembangan ilmu pengetahuan, penelitian ini diharapkan dapat menjelaskan perubahan ekspresi VCAM-1 dan histopatologis yang terjadi pada endotel pembuluh darah aorta tikus putih sebagai hewan model sirosis yang diinduksi dengan endotoksin O55:B4.

1.4 Manfaat Penelitian

Dari segi pengembangan ilmu pengetahuan, penelitian ini diharapkan dapat menjelaskan perubahan ekspresi VCAM-1 dan histopatologis yang terjadi pada endotel pembuluh darah aorta tikus putih sebagai hewan model sirosis yang diinduksi dengan endotoksin O₅₅:B₄.

Dari segi manfaat klinik, hasil penelitian ini diharapkan sebagai dasar pertimbangan dalam usaha pencegahan dan penatalaksanaan terhadap disfungsi vaskular pada penderita sirosis yang mengalami endotoksemia.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sirosis

Sirosis merupakan stadium akhir dari beberapa penyakit inflamasi yang ditandai dengan meluasnya jaringan fibrosis dan hilangnya morfologi hati normal. Sirosis merupakan proses ireversibel dari penyakit hati kronis seperti akumulasi *copper* pada hati, penggunaan obat-obatan antikonvulsan, toksin yang menginduksi hepatitis, inflamasi kronis pada hati, kolestasis kronis pada hati dan hipoksia kronis (Guyton, 2000).

Nakanuma (2000) menyatakan sirosis pada saluran empedu primer terjadi destruksi duktus biliverus intralobuler. Sel-sel limfoid bermigrasi ke dalam lapisan epitel biliari melalui interaksi integrin (4)-fibronektin dan menyebabkan kolangitis kronis yang destruktif. Duktus biliverus memaparkan VCAM-1, ICAM-1, dan infiltrasi limfosit memaparkan LFA1 dan VLA4 untuk mempermudah interaksinya. Adanya granuloma epiteloïd yang mengandung sel-sel foam, lipid biliari, dan CD1d sebagai faktor pemicu kolangitis kronis yang destruktif. Terjadi apoptosis biliari yang direfleksikan dengan inti yang piknotis sebagai proses apoptosis.

Fase akhir dari penyakit sirosis hati seringkali terjadi koagulopati yang disebabkan karena peningkatan pengaturan proses prokoagulan dan fibrinolitik seperti trombositopenia. Hal ini mengakibatkan peningkatan resistensi vaskuler dengan beberapa akibat yang biasa ditimbulkan seperti portal hipertensi, asites, *heart failure*, dan gangguan pembuluh darah. Penurunan aliran darah portal akan

mempengaruhi fungsi hati sebagai filter mikroorganisme, endotoksin, enterotoksin, eksotoksin, zat makanan, dan bahan-bahan kimia lainnya. Bila hal ini terjadi, akhirnya akan mengakibatkan endotoksaemia. (Scherer, 1994; Guyton, 2002).

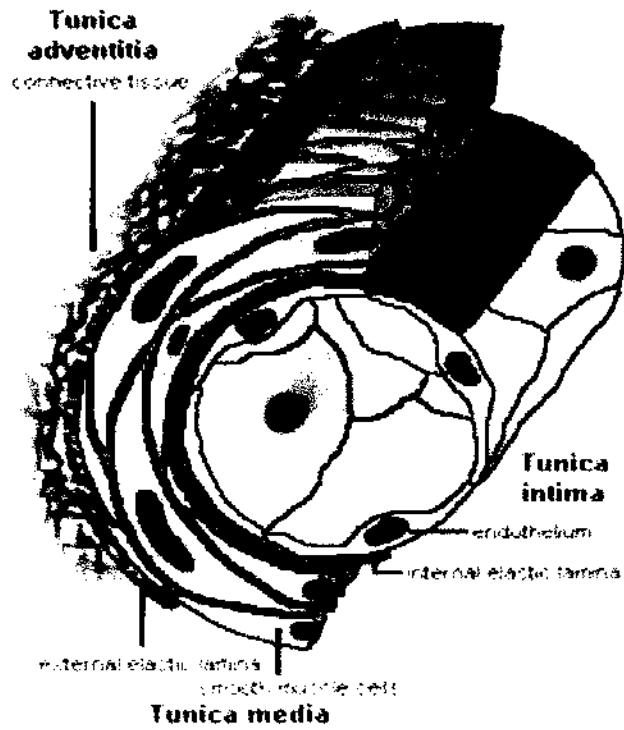
Pelepasan endotoksin merupakan penentu mortalitas yang penting pada syok septik. Mortalitas yang disebabkan sepsis oleh bakteri gram negatif cukup tinggi di Amerika Serikat, kira-kira 300.000 orang menderita septikemia setiap tahunnya dan 20% hingga 30% dari pasien ini mati karena syok septik yang disebabkan infeksi bakteri gram negatif. Pada survey yang dilakukan bulan Januari hingga April 1994 kira-kira 2 dari 100 pasien di rumah sakit memiliki gejala yang berhubungan dengan sepsis, 40% dari pasien ini mengalami infeksi gram negatif, dan 25 % dari pasien ini mengalami syok septik (Kenji *et al*, 1998).

Endotoksin adalah komponen struktural Lipopolisakarida (LPS) dari dinding sel bakteri gram negatif. Ketika LPS dilepaskan dari bakteri, lipid A dipaparkan, mengakibatkan aktivasi komplemen dan sistem koagulasi dalam darah. Pada saat yang bersamaan makrofag dan monosit diaktivasi dan sejumlah besar sitokin inflamatori seperti TNF γ dan interleukin-1 dilepaskan ke sistem sirkulasi. Perubahan ini memicu reaksi sistem inflamatori dengan sitokin yang berbeda-beda dari jaringan yang kompleks. Lebih lanjut pada sepsis yang parah, terjadi perubahan sistemik menuju ke kegagalan sirkulasi dan kegagalan multi organ (Kenji *et al*, 1998).

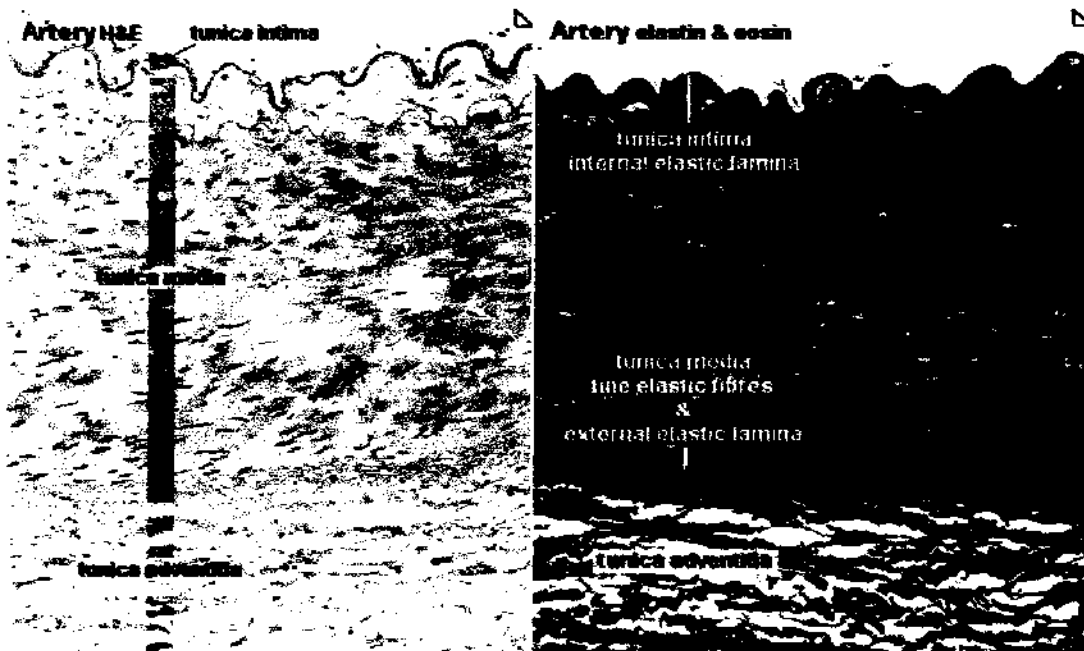
Patogenesis endotoksin dalam menginduksi jejas pada jaringan yaitu berperan penting dalam mengaktivasi sistem koagulasi. Trombomodulin adalah membran glikoprotein dari endotel yang merupakan reseptor untuk trombin.

Ketika trombin terikat dengan trombomodulin, kemampuan prokoagulannya menjadi hilang, mengakibatkan penurunan pembekuan darah. Terikatnya trombin pada trombomodulin mengaktifasi jalur *endogenous* antikoagulan melalui protein C (Hasegawa *et al*, 1996).

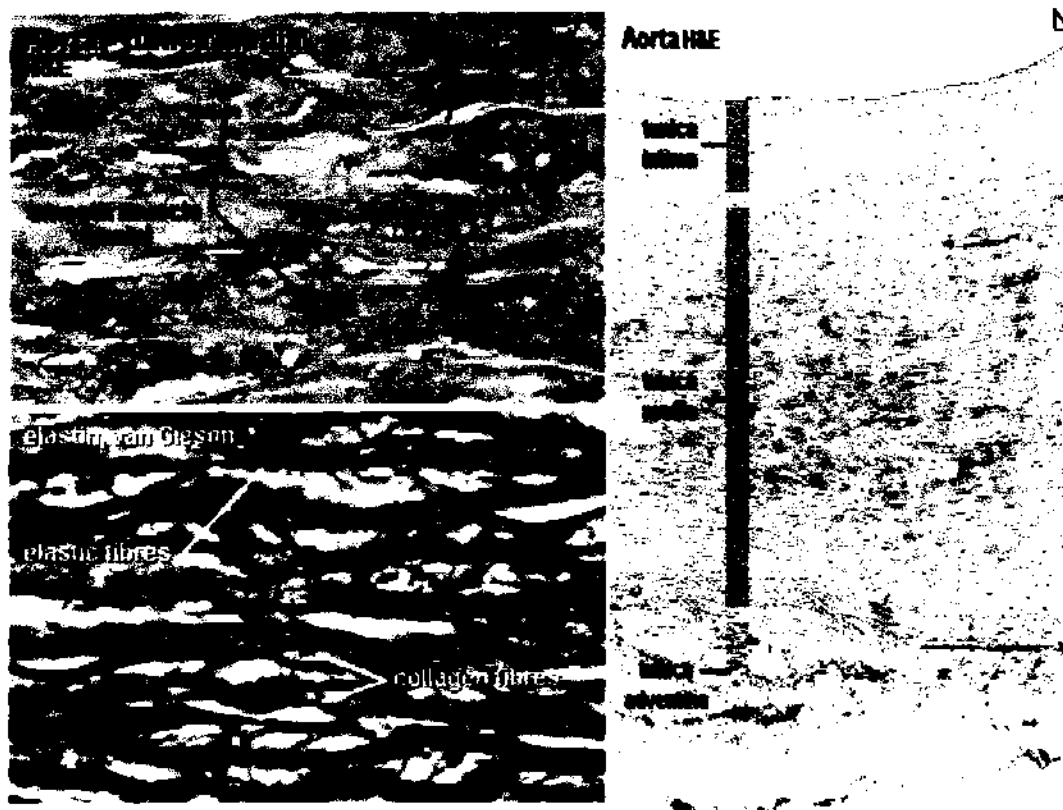
Struktur pembuluh darah, pada dasarnya tersusun atas tiga lapisan yaitu: (1) tunika intima; (2) tunika media; dan (3) tunika adventisia (Slomianka, 2003). Tunika intima tersusun atas: (1) selapis tipis sel epitel skuamosa yaitu sel endotel; (2) membran basalis; (3) jaringan ikat sub endotel; dan (4) lamina elastis internal-elastis fiber. Lapisan ini berkembang dengan baik pada arteri pada musculus, tetapi mungkin tidak terdapat pada pembuluh darah kecil. Tunika media terdiri dari lapisan: (1) lapisan yang mengandung banyak sel seperti sel-sel otot polos, serabut elastis, serabut kolagen dan proteoglikan; dan (2) arteri pada musculus yang besar memiliki lapisan lamina elastis eksternal yang membatasi dengan lapisan tunika media dengan tunika adventisia. Kapiler dan postkapiler tidak memiliki tunika media. Tunika adventisia terdiri dari lapisan: (1) jaringan ikat; dan (2) sel fibroblas, serabut kolagen dan serabut elastis (*thin layers*).



Gambar 2.1 Struktur pembuluh darah (Slomianka, 2003)



Gambar 2.2 Histologi dari pembuluh darah pewarnaan H&E (Slomianka, 2003)



Gambar 2.3 Histologis dari pembuluh darah pewarnaan H & E – Elastin Van Gicson (Slomianka, 2003)

2.2. Struktur dan Fungsi Sel Endotel

Saat ini diketahui bahwa endotel pada manusia adalah organ dengan luas 700 m², berat 1,5 kg dan menghasilkan beberapa faktor yang menyebabkan vasodilatasi lokal. Endotel adalah selapis sel dengan bentuk memanjang yang melapisi seluruh pembuluh darah. Dahulu fungsi endotel diketahui sebagai membran semipermeabel yang mencegah difusi berbagai makromolekul. Sebagai respons terhadap rangsangan fisik dan humoral, endotel akan mensekresikan beberapa zat yang mengendalikan tonus serta pertumbuhan vaskular. Fungsi pengendalian meliputi tonus pembuluh baik yang bersifat penghantar maupun

tahanan, aktivasi trombosit, adhesi monosit, trombogenesis dan pertumbuhan pembuluh darah (Julwan, 2002).

Endotel merupakan pembatas antara darah dan rongga ekstravaskuler. Pada keadaan normal, endotel merupakan permukaan yang tidak lengket sehingga mencegah koagulasi, adhesi scl, dan kebocoran cairan rongga intravaskuler (Julwan, 2002).

Prinsip dasar dari fungsi pembuluh darah adalah menjamin pertukaran molekul-molekul antara darah dan jaringan atau organ secara kontinyu. Fungsi ini terutama terjadi karena adanya endotelium (endotel dan sub endotel). Endotel berfungsi sebagai barier selektif yang tidak hanya mengatur transfer zat dengan berat molekul bervariasi, namun juga mensintesis, mengekspresikan, dan mensekresikan zat-zat yang diperlukan untuk keseimbangan dan kesinambungan proses tersebut (Thomas and Matthias, 1997).

Karakteristik morfologi utama endotel adalah adanya "Weibel-Palade body". Adanya bentukan ini sering digunakan untuk melakukan identifikasi spesifik endotel, berfungsi sebagai tempat penyimpanan faktor "Von-Willbrand" (VWF). Karakterisasi endotel dapat juga dilakukan dengan identifikasi terhadap adanya *filamen intermediet-vimentin* (Thomas and Matthias, 1997).

Menurut Thomas and Matthias (1997), endotel terpolarisasi pada dua sisi, sisi luminal yang mempunyai kontak dengan darah yang bersirkulasi dan sisi sub endotel yang kontak dengan sub endotel. Polarisasi ini bersifat fungsional karena zat-zat yang menyusun matriks ekstraseluler pada lamina basal dihasilkan oleh sisi sub endotel. Endotel selalu tersusun oleh monolayer yang tidak pernah

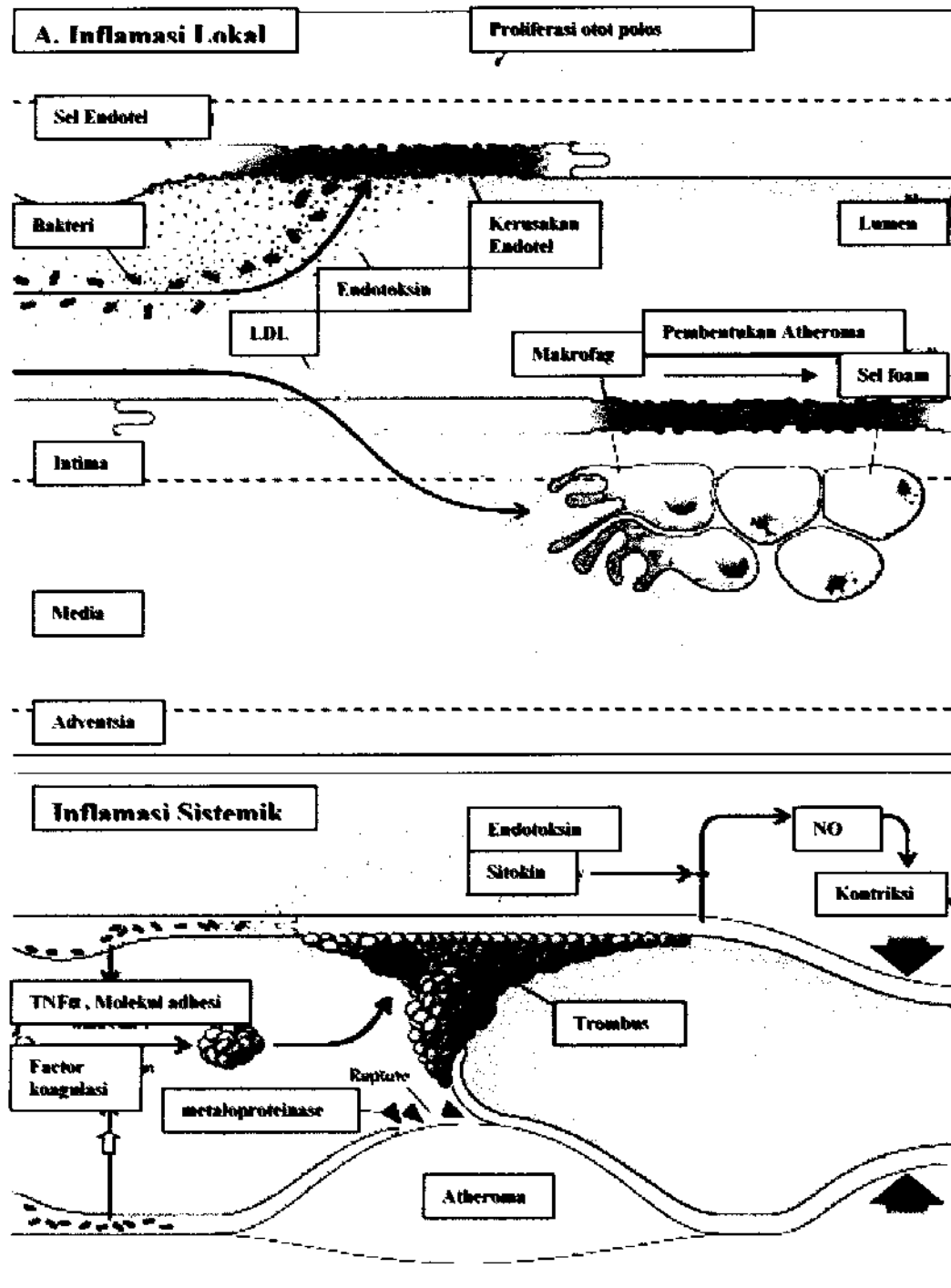
didapatkan dalam kondisi multilayer karena adanya “contact inhibition” yang mengontrapolarisasi endotel.

Interceluler junction (tight junction, gap junction) berfungsi untuk melakukan kontrol terhadap pertukaran trans-endotel dan menjaga keseimbangan fisiologis antara darah dan jaringan. Hal ini penting terutama untuk terjadinya pertukaran cairan dan gas (Thomas and Matthias, 1997).

Endotel dapat berfungsi dengan stabil pada intra luminal pembuluh darah karena interaksi antara endotel dan sub endotel yang tersusun oleh matriks yang terdiri dari: kolagen, elastin, fibrinectin, laminin, glycosaminoglycane, thrombospondin, dan faktor Von Willbrand (Thomas and Matthias, 1997).

Endotel juga berperan dalam pengaturan tonus vaskuler dan perfusi jaringan melalui pelepasan komponen vasodilatori (prostaglandin/PG12, adenosin dan *Endothelial cell-Derived Relaxing Factor* (EDRF), dan komponen vasokonstriksi (endotelin)) (Thomas and Matthias, 1997).

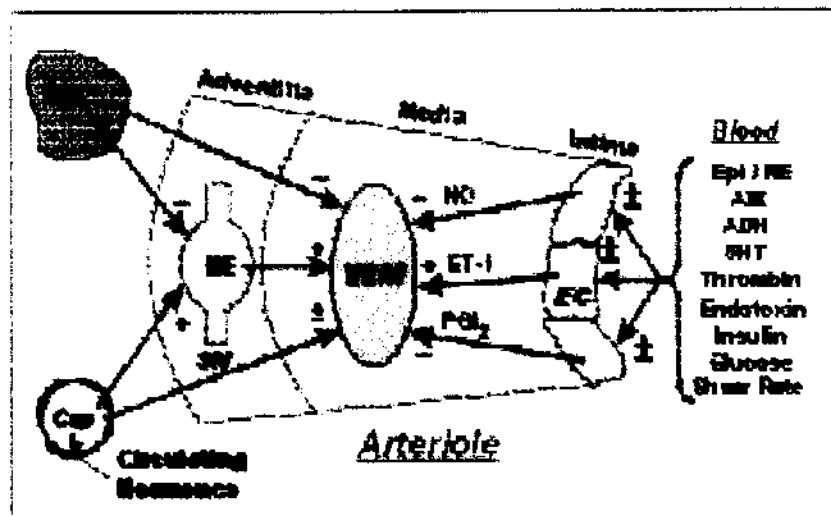
Pada keadaan normal endotel akan mempertahankan tonus vaskular untuk dominan vasodilatasi, mempertahankan permukaan yang licin yang tidak merangsang trombosis atau perlekatan sel-sel inflamasi, serta tidak mencetuskan pertumbuhan sel otot polos vaskuler (Julwan, 2002).



Gambar 2.4 Infiltrasi bakteri dan endotoksinya pada endotel (Benites, 1999)

Sebagai respons terhadap berbagai rangsang, endotel akan mengeluarkan zat-zat relaksasi atau konstriksi. Faktor relaksasi yang utama ialah *nitric oxide* (NO) yang dikenal juga sebagai *Endotelial cell-Derived Relaxing Factor* atau

EDRF, prostasiklin dan faktor hiperpolarisasi dari endotel (*Endothelial cell-Derived Hyperpolarizing Factor* atau EDHF). NO dibentuk dari asam amino L-arginin melalui kerja *nitric oxide synthase* (NOS). NOS terdapat dalam beberapa isoform pada sel endotel, trombosit, makrofag, sel otot polos vaskular, saraf dan otak. Ekspresi gen NOS diaktifkan secara terus-menerus, tergantung kalsium dan dapat di *upregulated* oleh tekanan geser dan estrogen. NOS ada dalam bentuk *inducible* pada sel otot polos vaskular dan makrofag. Bentuk yang tak tergantung kalsium ini dapat diinduksi oleh sitokin seperti endotoksin, TNF α dan interleukin-1b (IL-1b) (Julwan, 2002).



Gambar 2.5 Mekanisme endotel (Klaubunde, 2004)

Endotel memiliki peranan penting dalam regulasi fungsi otot polos dan modulasi lekosit dan perlekatan platelet. Gambar diatas menunjukkan beberapa agen yang berhubungan dengan sel endotel vaskular menyebabkan produksi dan pelepasan faktor endotel untuk reaksi relaksasi (-) dan kontraksi (+) otot polos vaskular (VSM). Faktor endotel menguatkan efek norepineprin (NE) yang dilepaskan syaraf simpatik (SN) dan efek metabolit jaringan dan faktor humoral.

Tiga substansi paling penting yang berasal dari sel endotel adalah *nitic oxide* (NO), endotelin (ET-1) dan prostacyclin (PGI₂). NO dan PGI₂ bertindak sebagai vasodilator dan ET-1 bertindak sebagai vasokonstriktor (Klaubunde, 2004).

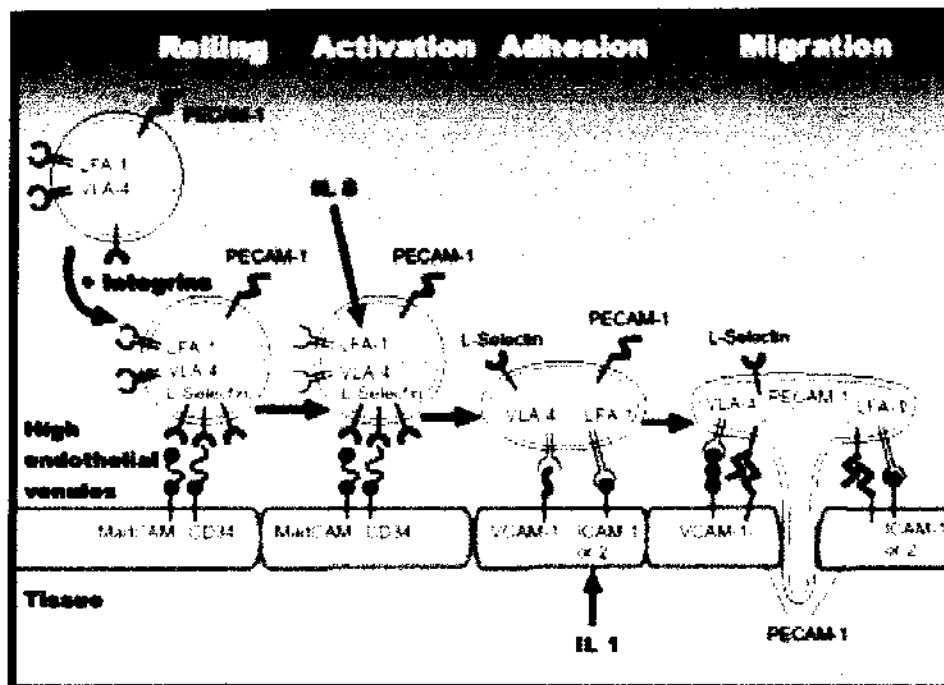
Secara laboratoris, ada beberapa senyawa *soluble* yang dapat diukur yang menjadi pertanda disfungsi endotel atau perbaikan fungsi endotel seperti sVCAM-1 untuk inflamasi, vWF untuk agregasi trombosit, PAI-1 untuk gangguan fibrinolisis dan mikroalbuminuria untuk peningkatan permeabilitas endotel (Julwan, 2002).

Menurut Maria (2003), sel endotel adalah komponen seluler yang paling dinamis dan secara biologis aktif dari pembuluh darah. Memiliki peranan penting dalam patogenesis dari vaskulitis sistemik. Peranan sel endotel dalam patogenesis inflamasi vaskuler adalah kompleks. Di satu sisi endotelium vaskuler sebagai target utama untuk jejas. Sebaliknya di sisi yang lain sel endotel secara aktif memperkuat dan mempertahankan proses inflamasi. Peranan sel endotel sebagai target jejas lebih sering pada vaskulitis pembuluh darah yang kecil, sering disebut vaskulitis hipersensitivitas. Pada vaskulitis pembuluh darah yang besar, sel endotel memperkuat respons inflamasi, perbaikan, dan *remodelling* pembuluh darah. Sel endotel dapat menguatkan respons inflamasi melalui tiga mekanisme, yakni: ekspresi molekul adhesi, produksi sitokin, dan angiogenesis.

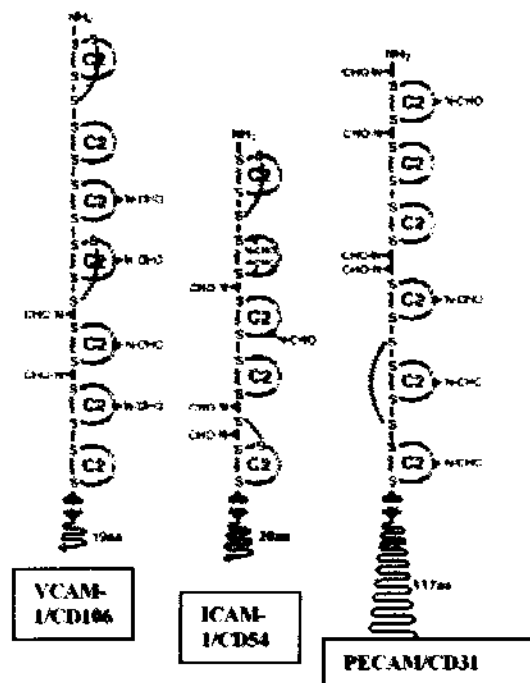
2.3 Sel Endotel dan VCAM-1

Menurut Abe *et al* (1996), selama proses inflamasi endotelium vaskular menjadi lebih permeabel tidak hanya terhadap protein plasma, juga pada molekul adhesi sebagai permulaan migrasi lokal dari leukosit. Infiltrasi leukosit dalam

pembuluh darah membutuhkan interaksi dalam pengaturan antara leukosit, sel endotel dan molekul adhesi. Mekanisme imunopatogenik memegang peranan yang penting dalam patogenesis inflamasi pembuluh darah, seperti pada vaskulitis menunjukkan pengaruh ekspresi molekul adhesi (Maria, 2003). C1q menginduksi E-selektin, ICAM-1, VCAM-1, dan C5a menunjukkan regulasi lebih lanjut ekspresi P-selektin. Ekspresi molekul adhesi dibutuhkan untuk reaksi kompleks-immun dan komplemen dalam kerusakan pembuluh darah secara *in vitro*.



Gambar 2.6 Migrasi leukosit dan VCAM-1 pada sel endotel (Kliche, 2004)



Gambar 2.7 Struktur VCAM-1, ICAM-1 dan PECAM-1 (Anonymous, 1997)

Pada kejadian vaskulitis, limfosit teraktivasi dan makrofag secara aktif menghasilkan IL-1, TNF α , dan interferon γ , untuk menginduksi molekul adhesi endotelial. Studi *in vitro* menunjukkan produk komplemen yang teraktivasi menginduksi ekspresi molekul adhesi di dalam kultur sel endotel (Maria, 2003).

Bila sel endotel rusak, sifat antikoagulasi akan hilang dan membran basal terparap, sehingga menimbulkan agregasi trombosit dan leukosit. Endotel dipengaruhi TNF, IL-1 dan endotoksin sehingga sel endotel berpartisipasi aktif dalam respons inflamasi terutama dalam ekspresi molekul adhesi. Dalam fungsinya, baik leukosit maupun sel-sel lainnya memerlukan kontak dengan sel lain atau matriks ekstraseluler melalui molekul yang disebut molekul adhesi (Abbas *et al*, 2000)

Dewasa ini sudah diketahui molekul adhesi diperlukan dalam berbagai kejadian seperti: (1) maturasi leukosit dalam jaringan limfoid; (2) resirkulasi darah

perifer melalui organ limfoid; (3) adhesi lekosit dengan matriks subendotel atau komponen matriks ekstraseluler; dan (4) interaksi sel terutama antara sel T, sel B monosit atau dengan yang lain dan sasaran yang mengandung antigen.

Molekul adhesi terdiri dari: (1) integrin; (2) golongan immunoglobulin (ICAM-1 dan VCAM-1); serta (3) selektin. Pada keadaan normal, lekosit hanya sedikit melekat pada sel endotel tetapi oleh rangsangan inflamasi adhesi antara lekosit dan sel endotel sangat meningkat. Interaksi adhesi ini diatur oleh ekspresi permukaan sel yaitu molekul adhesi beserta resptor-reseptornya. Ikatan lekosit dan sel endotel mula-mula terjadi oleh ekspresi L-selektin pada permukaan lekosit, P-selektin pada permukaan sel endotel. Interaksi ini menyebabkan marginasi lekosit sepanjang dinding vaskuler tempat inflamasi (Abbas *et al*, 2000). Inflamasi akut disertai dengan pelepasan mediator yang meningkatkan molekul adhesi baik pada sel inflamasi (neutrofil, monosit) maupun pada endotel. Hal ini meningkatkan adhesi dan sedikit perubahan dalam arus darah dan marginasi. Dari sinilah sel-sel neutrofil, monosit, dan eosinofil bermigrasi ke pusat inflamasi (Abbas *et al*, 2000).

VCAM-1 adalah ekspresi gen lekosit-endotelial molekul adhesi yang meningkat secara transkripsional oleh endotoksin bakteri dan sitokin inflamatoris (Simoncini *et al* 2003). Weiner (1991) menyatakan adanya peningkatan 10 kali lipat dari lekosit, terutama neutrofil pada pemberian endotoksin *E coli* pada endotel alveolar domba.

VCAM-1 yang diinduksi oleh sitokin untuk memudahkan sel mononuklear melekat pada sel endotel secara *in vitro* melalui perlekatan pada integrin *Very Late Antigen 4* (VLA 4). Pengamatan yang dilakukan terhadap murin sebagai

model inflamasi terdiri dari inflamasi dermatitis, inflamasi granulomatous kronis, dan inflamasi akut menunjukkan ekspresi VCAM-1 pada ketiga model inflamasi tersebut pada endotel vaskularnya. VCAM-1 juga didapat setelah injeksi LPS dan TNF γ secara subkutan. Peningkatan ekspresi VCAM-1 pada model inflamasi tersebut diatas berkorelasi dengan infiltrasi monosit atau makrofag (Hensleit *et al*, 1994).

Abe *et al* (1996) melakukan pengamatan pada penyuntikan vaksin BCG intradermal pada kelinci dan memeriksa peningkatan ICAM dan VCAM pada endotel, terjadi peningkatan pada hari ke 9 dan tetap meningkat hingga mencapai level puncak pada hari ke 23. Hal ini menunjukkan VCAM dan ICAM memiliki peranan yang penting dalam inflamasi kronis, dibandingkan dengan E-selektin (ELAM) yang lebih berperan dalam proses inflamasi yang akut, hanya meningkat konsentrasinya hingga hari ke 6.

TNF α dapat meningkatkan ekspresi molekul adhesi, dengan peningkatan awal terjadi 2 hingga 5 jam, level peningkatan tertinggi dicapai 5 hingga 9 jam dan masih sedikit meningkat hingga 24 jam. TNF α menginduksi peningkatan baik ICAM-1 dan VCAM-1 tergantung dosis TNF α dengan peningkatan yang nyata pada dosis 5 μ g/kg dan maksimal peningkatan terjadi pada dosis 10 hingga 25 μ g/kg (Henninger *et al*, 1997).

VCAM-1 adalah reseptor yang mendukung melekatnya leukosit pada dinding vaskular. Studi secara *in vivo* menunjukkan ekspresi VCAM-1 pada sel endotel meningkat disebabkan: (1) endotoksin; (2) makanan berkolesterol; (3) proses regenerasi setelah jejas pada vascular; dan (4) induksi alokson pada diabetes mellitus. Penelitian yang dilakukan dengan kelinci yang diinfeksi secara

eksperimental terjadi peningkatan yang signifikan ekspresi VCAM-1 pada endotel aorta, perubahan morfologi yang terjadi pada endotel yang diamati dengan mikroskop elektron: (1) sel menjadi lebih bervakuol dan mengandung proporsi yang tinggi retikulum endoplasma kasar yang mengalami dilatasi; (2) sel memiliki persentase lekosit yang tinggi menempel pada sel endotel (Anonymous, 1997).

VCAM-1 dari marmut dan tikus putih telah berhasil dikloning. Kedua VCAM-1 tikus putih dan marmut sangat homolog pada level protein VCAM-1 manusia (77% dan 76%) (Gearing and Newman, 1993).

2.4 Melekatnya Lekosit pada Lokasi Infeksi

Proses migrasi lekosit ke lokasi infeksi distimulasi oleh sitokin, reseptor lekosit dan ligan endotelial terhadap reseptor tersebut. Sitokin yang paling penting pada reaksi ini adalah TNF α dan kemokin, yang dihasilkan oleh makrofag, sel endotel dan tipe sel yang lain sebagai respons terhadap infeksi. TNF α yang disekresikan makrofag merangsang sel endotel secara berurutan mengekspresikan molekul yang berbeda untuk memudahkan melekatnya tipe lekosit yang berbeda pula. Dalam 1 hingga 2 jam setelah TNF α terpapar, sel endotel mengekspresikan E-selektin (ELAM). ELAM pertama-tama yang mempermudah perlekatan neutrofil dan lekosit lain pada lokasi infeksi. Sel lekosit melalui permukaan sel endotel dengan berputar. Ligan VCAM-1 untuk VLA-4 integrin dan ligan ICAM-1 (CD54) untuk LFA-1 dan Mac-1 integrin tampak pada sel endotel setelah 6 hingga 12 jam terpapar dengan TNF α . Integrin menstabilkan adhesi lekosit terhadap endotel. Adhesi yang stabil diikuti dengan migrasi lekosit melalui celah interendotel ke dalam jaringan ekstrasvaskular (Abbas *et al*, 2000).

Kemakin juga terlibat dalam menarik lekosit ke dalam lokasi infeksi, dengan mengaktivasi lekosit untuk kemotaksis ke dalam jaringan sehingga terjadi akumulasi lekosit ekstraseluler pada lokasi infeksi. Kemakin dihasilkan oleh makrofag yang memberikan respons terhadap bakteri. Sel endotel mengalami aktivasi oleh TNF dan IL-1 sehingga menstimuli sel T (Abbas *et al*, 2000).

2.5 Endotoksin

Lipopolisakarida merupakan kompleks dengan berat molekul yang cukup besar yang tersusun oleh kompleks polisakarida yang bersifat hidrofilik yang berikatan dengan toksophore hidrofobik yang disebut lipid A. Secara struktural LPS terdiri dari 3 bagian yaitu lipid A, polisakarida yang terdapat dibagian tengah (core) yang dapat memiliki susunan serupa dalam satu genus dan polisakarida spesifik yang disebut rantai O spesifik (Joklik *et al*, 1992).

Endotoksin memiliki sifat stabil terhadap pemanasan, tidak dapat dirusak oleh enzim proteolitik, toksisitasnya rendah tetapi hanya sebagian kecil saja yang dapat dinetralisasi oleh antiserum dan tidak dapat dikonversikan menjadi toksoid (Joklik *et al*, 1992).

Endotoksin menyebabkan gejala klinis inflamasi (demam, pusing, peningkatan denyut jantung, dan penurunan tekanan diastolik darah) setelah periode 4 hingga 6 jam. Endotoksin secara *in vivo* dapat mengaktivasi platelet, lekosit dan sel endotel, memudahkan pembentukan agregat lekosit-platelet, dan thrombin (Soop, 2003). Weiner (1991) menyatakan adanya peningkatan 10 kali lipat dari lekosit, terutama neutrofil pada pemberian endotoksin *E coli* pada endotel alveolar domba.

Masuknya endotoksin akan menyebabkan pelepasan mediator-mediator inflamasi. Mediator tersebut antara lain TNF, IL-1, IL6, IL-12, dan interferon. Mediator-mediator ini dapat secara langsung mempengaruhi organ melalui aktivitasnya untuk merangsang pelepasan mediator-mediator sekunder. Mediator sekunder tersebut antara lain NO, *thromboxane*, *leukotrien*, *prostaglandin*, dan komplemen (Abbas *et al*, 2000; Roitt, 2001).

Menurut Bennerman *et al* (2002) sel endotel sebagai target kunci dari endotoksin (LPS) mengakibatkan respons endotelial yaitu regulasi sitokin dan molekul adhesi. Telah dibuktikan secara *in vivo* maupun *in vitro* endotoksin dapat menginduksi apoptosis pada endotel. Pemberian endotoksin secara signifikan dapat meningkatkan konsentrasi molekul adhesi ELAM, ICAM-1, dan VCAM-1 pada tikus (Gill, 2001).

Bila endotel mengalami denudasi atau kematian, maka endotel akan kehilangan kontak sub endotel, sel endotel yang berada di sekitarnya akan bermigrasi ke daerah lesi. Proses ini berlangsung terus menerus hingga endotel benar-benar terlepas dari dinding pembuluh darah. Sel endotel normal yang bermigrasi merupakan suatu mekanisme untuk mendorong endotel yang mengalami denudasi ke arah lumen pembuluh darah (Clowes *et al*, 1999).

Meyric *et al* (1986) menyatakan pengaruh endotoksin *E coli* terhadap struktur, metabolisme, dan fisiologis pada sel mono layer endotel dari paru-paru hewan sapi, diamati dengan memaparkan endotelial monolayer terhadap endotoksin *E coli* yang menunjukkan adanya peningkatan permeabilitas, dilatasi pada lapisan intima endotel pada *intracellular junctions* dan perubahan meningkatnya kontraksi filamen sitoplasmik, inti yang piknotis dan pelepasan

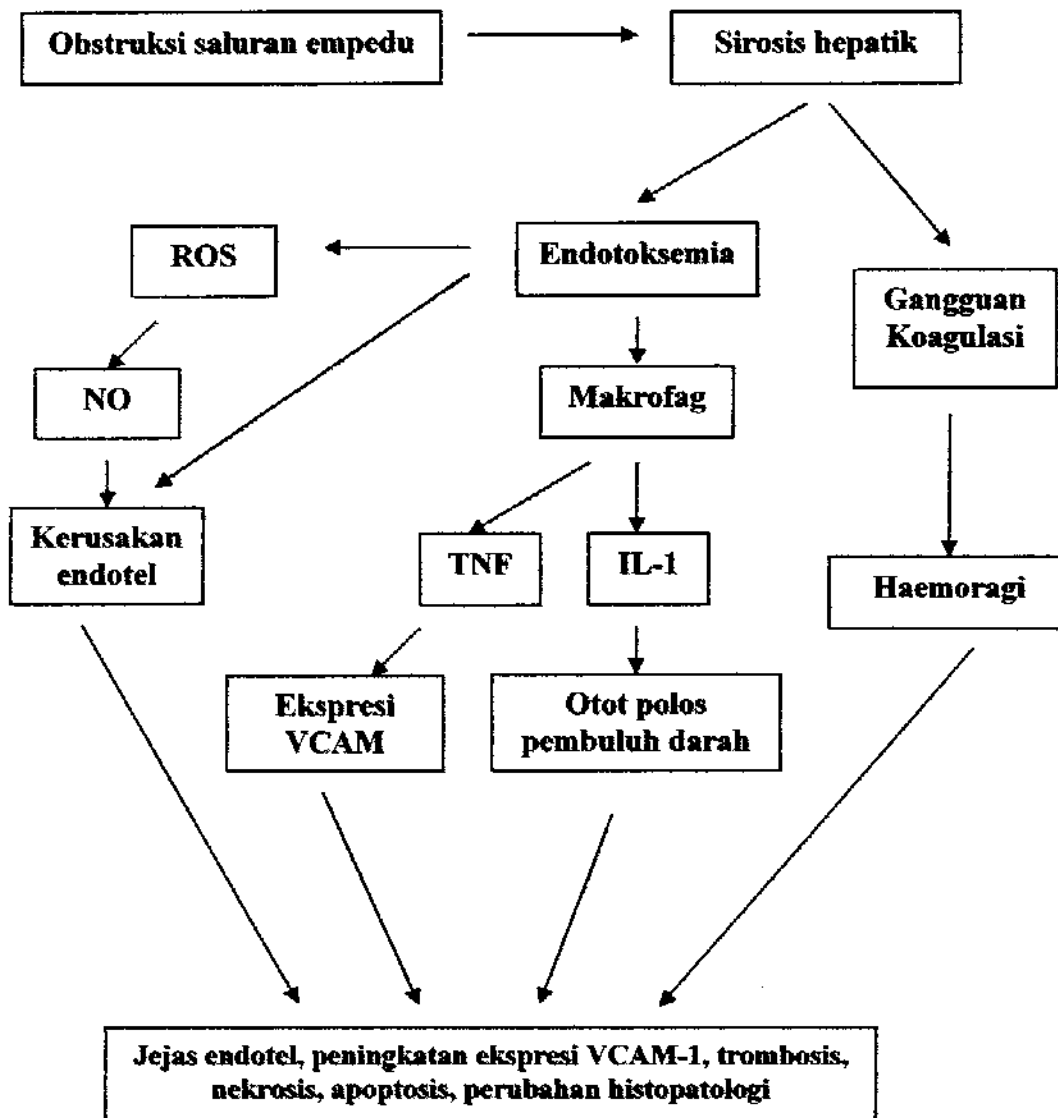
lactate dehydrogenase, peningkatan produksi *protacyclin*, dan penonjolan sitoplasmik. Setelah 2 jam ditemukan adanya sel yang mati.



BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESA PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual Penelitian



3.2 Landasan Teori Kerangka Konseptual Penelitian

Penyakit sirosis bisa mengakibatkan koagulopati yang disebabkan karena peningkatan pengaturan proses prokoagulan dan fibrinolitik seperti trombositopenia (Scherer, 1994). Hal ini menyebabkan peningkatan resistensi vaskuler dengan beberapa akibat yang biasa ditimbulkan seperti portal hypertension, ascites, dan gangguan pembuluh darah. Penurunan aliran darah akan mempengaruhi fungsi hepar sebagai filter organisme, endotoksin, enterotoksin, eksotoksin, zat makanan, dan bahan kimia lainnya. Bila hal ini terjadi akan menyebabkan endotoksemia.

Masuknya Endotoksin akan mengakibatkan pelepasan mediator-mediator inflamasi. Mediator tersebut antara lain TNF, Il-1, IL6, IL-12 dan interferon. Mediator-mediator ini dapat secara langsung mempengaruhi organ melalui aktivitasnya untuk merangsang pelepasan mediator-mediator sekunder. Mediator sekunder tersebut antara lain NO, thromboxane, leukotrien, prostaglandin dan komplemen (Abas *et al*, 2000; Roitt, 2001).

Menurut Bennerman *et al* (2002), pembuluh darah endotel sebagai target kunci dari endotoksin (LPS) mengakibatkan respons endotelial yaitu regulasi sitokin dan molekul adhesi. Telah dibuktikan secara *in vivo* maupun *in vitro*, endotoksin dapat menginduksi apoptosis pada sel endotel. Pemberian endotoksin secara signifikan dapat meningkatkan konsentrasi adhesi molekul E LAM, ICAM-1, dan VCAM-1 pada tikus (Gill, 2001).

Induksi endotoksin menyebabkan peradangan yang menyebabkan perubahan histopatologis pada lapisan endotel dengan adanya infiltrasi sel-sel

radang, proliferasi tunika intima dan myointima, serta adanya denudasi sel endotel (Maria, 2003).

3.3 Hipotesa Penelitian

Induksi endotoksin $O_{55}:B_4$ dapat meningkatkan ekspresi VCAM-1 pada endotel aorta tikus putih sebagai hewan model sirosis dengan lama pemaparan 6 jam, 12 jam, 18 jam, dan 24 jam.

Induksi endotoksin $O_{55}:B_4$ menyebabkan perubahan histopatologi pembuluh darah aorta tikus putih sebagai hewan model sirosis yang berbeda dengan lama pemaparan 6 jam, 12 jam, 18 jam, dan 24 jam.

BAB 4

MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini termasuk penelitian eksperimental laboratoris yang pelaksanaannya (observasi dan pengamatan hasil) dilakukan di laboratorium. Untuk mengetahui ekspresi VCAM-1 dan perubahan histopatologi aorta dilakukan penelitian dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan lima perlakuan dan lima ulangan.

4.2 Kriteria dan Ukuran Sampel

Sampel yang dipergunakan sebagai bahan penelitian berasal dari populasi tikus putih jantan strain wistar dengan umur 4 bulan yang memiliki berat rata-rata 150-200 gram. Tikus putih jantan sebagai hewan model sirosis dengan teknik ligasi saluran empedu (*Bile Duct Ligation* atau BDL). Persiapan hewan model sirosis membutuhkan waktu 3 minggu setelah BDL dilaksanakan. Selanjutnya seluruh tikus putih mendapatkan perlakuan berupa induksi endotoksin O₅₅:B₄ (3 mg/kg BB yang dilarutkan dengan 1 ml) secara intra vena, kecuali tikus putih yang menjadi kelompok kontrol. Kelompok kontrol akan mendapatkan induksi larutan salin secara intravena dengan volume yang sama dengan volume endotoksin yang digunakan sebagai kontrol negatif. Endotoksin yang digunakan lipopolisakarida L-2880, (*Sigma Chemical Company*). Pembagian kelompok berdasarkan pada interval pemaparan toksin dengan waktu pengamatan yaitu setiap 6 jam selama 24 jam.

Jumlah ulangan ditentukan dengan rumus (Sutjihno, 1986):

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

$$(5-1)(u-1) \geq 15$$

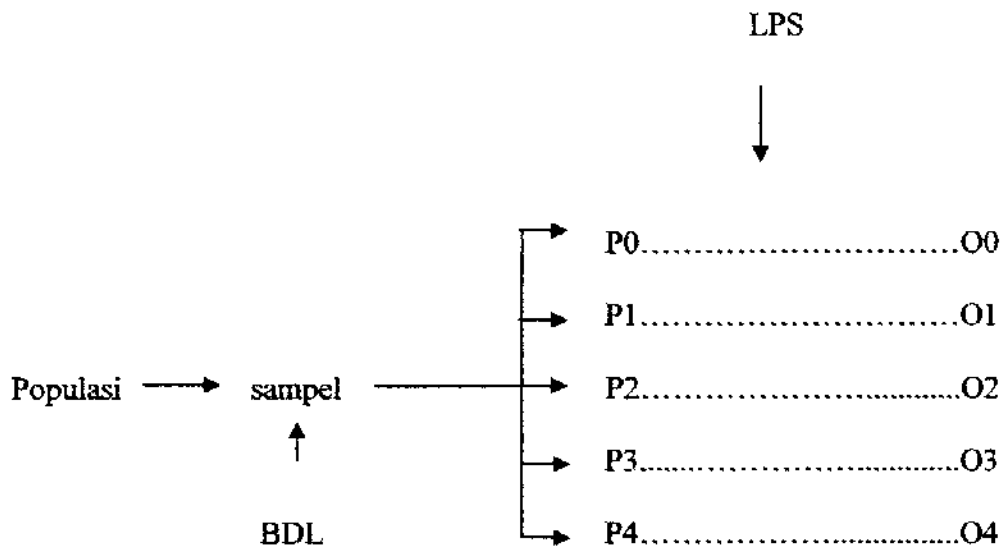
$$4(u-1) \geq 15$$

$$4u-4 \geq 15$$

$$4u \geq 15+4$$

$$u \geq 19/4$$

$$u \geq 4,75 \text{ dibulatkan } 5$$



Keterangan :

P0 : BDL + Saline + Aorta diambil 6 jam setelah induksi salin intravena

P1 : BDL + LPS + Aorta diambil 6 jam setelah induksi LPS intravena

P2 : BDL + LPS + Aorta diambil 12 jam setelah induksi LPS intravena

P3 : BDL + LPS + Aorta diambil 18 jam setelah induksi LPS intravena

P4 : BDL + LPS + Aorta diambil 24 jam setelah induksi LPS intravena.

4.3 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel

4.3.1 Variabel penelitian

4.3.1.1 Variabel bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah dosis endotoksin $O_{55}:B_4$ sebesar 3 mg/Kg BB dalam saline sebanyak 0,5 ml yang diberikan secara intra vena. Dosis ini dipakai karena dapat menimbulkan jejas pada pembuluh darah tanpa menimbulkan kematian. Kelompok kontrol diberikan induksi saline dengan volume yang sama dengan volume endotoksin yang digunakan.

4.3.1.2 Variabel tergantung

Variabel tergantung dari penelitian ini adalah ekspresi VCAM-1 dan perubahan histopatologi pada endotel pembuluh darah aorta tikus putih sebagai hewan model sirosis yang diinduksi dengan endotoksin $O_{55}:B_4$.

4.3.1.3 Variabel kendali

Variabel kendali adalah keragaman umur, jenis kelamin, dan berat badan sampel yang digunakan serta keseragaman tatalaksana pemeliharaan hewan model selama penelitian. Selain itu juga keseragaman perlakuan BDL untuk mendapatkan hewan model sirosis.

4.3.2 Definisi operasional variabel

Variabel yang dilibatkan dalam penelitian ini beserta definisi operasionalnya adalah:

- a. Hewan model sirosis adalah tikus putih yang mendapat perlakuan BDL untuk menginduksi terjadinya sirosis 3 minggu setelah BDL.

- b. Endotoksin yang digunakan adalah endotoksin *E coli* yang termasuk dalam golongan Enteropatogenik *E coli* O₅₅:B₄ yang telah diekstraksi dengan fenol dan bersifat larut dalam air.
- c. Perubahan ekspresi VCAM-1 dari endotel adalah perubahan warna yang terjadi pada endotel dengan pemeriksaan imunohistokimia.
- d. Perubahan histopatologi dari aorta adalah perubahan jumlah sel endotel, tebal lapisan VCAM-1 pada endotel, tebal tunika intima, dan diskontinuitas lapisan elastis intima.
- e. Pada penelitian ini dianggap selama 24 jam tidak ada faktor lain yang menyebabkan inflamasi (*confounding factor*).

4.4 Bahan Penelitian

Bahan yang dipakai dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan strain Wistar sebagai hewan model sirosis dengan tehnik BDL dan endotoksin *E coli* O₅₅:B₄, serta bahan lain yang digunakan untuk membuat preparat imunohistokimia VCAM-1 dari pembuluh darah aorta tikus putih sebagai hewan model sirosis yang telah diinduksi dengan endotoksin *E coli* O₅₅:B₄.

4.5 Instrumen Penelitian

Instrumen penelitian dalam penelitian ini adalah instrumen yang digunakan untuk pembedahan dalam rangka menyiapkan hewan model sirosis dengan tehnik BDL, Instrumen untuk induksi endotoksin *E coli* O₅₅:B₄, instrumen untuk pembuatan preparat imunohistokimia VCAM-1 dari aorta pembuluh darah tikus putih dan mikroskop untuk mengamati hasil ekspresi

VCAM-1 yang terjadi pada endotel dan perubahan histopatologis pembuluh darah aorta.

4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.6.1 Lokasi penelitian

Penelitian dilakukan di bagian hewan percobaan Laboratorium Biokimia FK UNAIR, Unit laboratorium GRAMIK FK UNAIR dan Laboratorium Patologi RSUD Dr Sutomo.

4.6.2 Waktu penelitian

Penelitian dilakukan selama empat bulan, yaitu pada bulan Juli sampai dengan November 2004.

4.7 Metode Penelitian

4.7.1 Hewan model sirosis

Tikus putih yang telah dianestesi dengan kombinasi Ketamin dan Xylazine dengan perbandingan 100mg : 50mg, dosis 0,9ml/Kg BB intra muskular diletakkan rebah dorsal. Insisi dengan blade dilakukan pada midline abdomen sepanjang kurang lebih setengah dari jarak antara bagian abdomen posterior dengan cartilago xyphoideus.

Gulungan kasa steril diletakkan pada bagian bawah thoraks untuk menopang tulang belakang, sehingga letak saluran empedu lebih jelas terlihat. Duodenum dan sebagian kecil intestin dikluarkan dari rongga abdomen,

menggunakan pinset saluran empedu akan terlihat jelas dan dapat dibedakan dengan jaringan sekitarnya.

Bagian saluran empedu terletak 0,5 – 1 cm dari dinding duodenum merupakan bagian yang bebas dari pankreas. Pada bagian ini dibuat 2 ligasi dengan jarak kurang lebih 0,3 cm menggunakan benang prolon 5/0. Bagian medial diantara dua ligasi dipotong untuk mendapatkan obstruksi total pada saluran empedu.

Kembalikan duodenum dan saluran empedu yang telah terikat dan terpotong ke dalam rongga abdomen. Muskulus dan kulit abdominal yang telah diinsisi ditutup kembali dengan jahitan terputus menggunakan benang cut gut dan silk 4/0.

4.7.2 Induksi endotoksin

Induksi endotoksin diberikan 3 minggu setelah pelaksanaan BDL dengan dosis 3mg/kg BB secara intravena. Untuk menghindari perubahan tekanan darah selama proses induksi saline maupun endotoksin, setiap hewan model diinduksi dengan 1 ml larutan endotoksin dalam saline dalam waktu lima menit.

4.7.3 Eksisi aorta

Melalui thoracotomy, pembuluh darah aorta hewan model sepanjang 1 cm dieksisi kurang lebih 0,5 dari caudal arcus aorticus, aorta yang diperoleh selanjutnya dilakukan pemeriksaan imunohistokimia untuk mengetahui ekspresi VCAM-1 dan perubahan histopatologi yang terjadi.

4.7.4 Pembuatan preparat imunohistokimia VCAM-1

4.7.4.1 Pembuatan preparat histologi

Pembuatan preparat histologi terdiri dari beberapa tahapan: fiksasi sampel, dehidrasi dan clearing, infiltrasi, pembuatan blok parafin dan dilanjutkan pemotongan dengan mikrotom. Selanjutnya dilanjutkan dengan pewarnaan imunohistokimia.

4.7.4.2 Pewarnaan imunohistokimia VCAM-1

Untuk menghilangkan paraffin pada sampel dilakukan deparafinisasi seperti berikut dengan dimasukan ke dalam larutan dengan urutan sebagai berikut xylol sebanyak tiga kali masing-masing 5 menit, dilanjutkan larutan alkohol absolut sebanyak dua kali masing-masing 3 menit, alkohol 96% sebanyak dua kali masing-masing 3 menit, alkohol 80% satu kali selama 3 menit, dan alkohol 70% selama 3 menit. Selanjutnya mencuci dengan air mengalir selama 1 menit.

Selanjutnya siap untuk pewarnaan VCAM-1, adapun urutannya adalah sebagai berikut :

1. Trypsin 0,025% ± selama 15 – 30 menit, pada suhu 37°C, cuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit dan diulang sekali.
2. Tambahkan H₂O₂ 3% (1 bagian H₂O₂ 30%+9 bagian aqua) selama 10 menit.
3. Cuci PBS selama 5 menit dan diulang sekali lagi.
4. Primer Antibodi primer VCAM-1 selama 45 menit hingga 1 jam.
5. Cuci dengan PBS selama 5 menit dan diulang sekali lagi.
6. Antibodi sekunder selama 30 menit (Ig G yang berlabel).
7. Cuci dengan PBS selama 5 menit dan diulang sekali lagi.

8. Streptavidin selama 30 menit.
9. Cuci dengan PBS selama 5 menit dan diulang sekali lagi.
10. DAB – chromogen selama 6 hingga 10 menit.
11. Cuci dengan PBS, Aqua dan air mengalir masing-masing 5 menit.
12. Pewarnaan counter: Meycr's Haemotoxylin selama 10 hingga 15 menit.
13. Cuci dengan air mengalir.
14. Dikeringkan di udara.
15. Mounting.

4.7.5 Hasil pengamatan

Pengamatan intensitas pewarnaan VCAM-1

Pengamatan secara mikroskopis untuk pewarnaan VCAM-1 menggunakan mikroskop cahaya, mula-mula digunakan pembesaran 100x kemudian dilanjutkan dengan pembesaran 400X dan 1000X. Setiap preparat pewarnaan VCAM-1 diamati menggunakan mikro retikuler yang memiliki diameter 1 cm x 1cm, didalamnya terdapat kotak kecil 20 x 20. Apabila kita menggunakan pembesaran 1000x maka diameter masing-masing kotak kecil adalah $0,05 \times 10^{-3}$ cm. Pengamatan dilakukan pada 20 kotak kecil atau 1 cm dan jeda interval 10 kotak atau 0,5 cm antar pengamatan. Pengamatan dilakukan pada 9 lokasi. Apabila pada satu lokasi menunjukkan ekspresi warna coklat 50% atau lebih banyak dibandingkan warna lain (coklat muda atau coklat tua) maka lokasi tersebut diwakili oleh warna itu..

Selanjutnya dilakukan pemberian skor terhadap data perubahan intensitas pewarnaan VCAM-1. Adapun skor yang diberikan untuk masing-masing tingkat perubahan dapat dilihat pada tabel 4.1 berikut.

Tabel 4.1 Skor perubahan gambaran intensitas pewarnaan VCAM-1 pada sel endotel

Intensitas pewarnaan VCAM-1	Skor
Tidak mengekspresikan	0
Coklat muda	1
Coklat	2
Coklat tua	3

Pengamatan histopatologi

Pengamatan secara mikroskopis untuk histopatologi aorta menggunakan mikroskop cahaya, mula-mula digunakan pembesaran 100x kemudian dilanjutkan dengan pembesaran 400X dan 1000X. Setiap preparat diamati menggunakan mikro retikuler yang memiliki diameter 1 cm x 1 cm, didalamnya terdapat kotak kecil 20 x 20. Apabila kita menggunakan pembesaran 1000x, maka diameter masing-masing kotak kecil adalah $0,05 \times 10^{-3}$ cm. Pengamatan dilakukan pada 20 kotak kecil atau 1 cm dan jeda interval 10 kotak atau 0,5 cm antar pengamatan. Pengamatan dilakukan pada 9 lokasi.

Pengamatan histopatologi meliputi penghitungan jumlah sel endotel, tebal ekspresi VCAM-1 pada endotel, diskontinuitas lapisan elastis lamina interna, dan tebal lapisan elastis lamina interna pada masing-masing perlakuan.

Jumlah sel endotel dihitung pada 9 lokasi, masing-masing lokasi memiliki interval pengamatan 20 kotak atau 1 cm. Selanjutnya dihitung rata-ratanya.

Tebal ekspresi VCAM-1 pada sel endotel diukur pada 9 lokasi. Pengukuran dimulai dari bagian basal sel endotel hingga bagian endotel terluar yang mengekspresikan warna VCAM-1. Selanjutnya dihitung rata-ratanya

Panjang arca yang mengalami diskontinuitas diamati pada 9 lokasi. Masing-masing lokasi, apabila ada yang mengalami diskontinuitas ditambahkan dan dihitung jumlah totalnya, misalkan terdapat diskontinuitas pada 3 tempat dalam satu lokasi masing-masing diameternya 0,05 cm, 0,02 cm dan 0,03 cm maka panjang diskontinuitas pada lokasi tersebut 0,1 cm.

Tebal lapisan ELI diukur pada 9 lokasi. Pengukuran dilakukan dari basal lapisan ELI hingga bagian terluar dari lapisan ELI. Selanjutnya dihitung rata-ratanya.

4.7.6 Analisa data

Data perubahan intensitas pewarnaan VCAM-1 diolah dengan penilaian peringkat (rank) lalu dianalisis dengan uji statistik non parametrik dengan menggunakan Uji Kruskal – Wallis (Daniel, 1989). Apabila terdapat perbedaan yang nyata diantara kelompok perlakuan, dilanjutkan dengan uji Pembandingan berganda (Uji Z) 5% (Daniel, 1989).

Data hasil pengamatan histopatologi dihitung jumlah rata-ratanya dan Selanjutnya dilakukan analisa dengan menggunakan Anova dan apabila terjadi perbedaan yang nyata dilanjutkan dengan uji LSD.

BAB 5

ANALISIS HASIL PENELITIAN

5.1 Ekspresi Warna VCAM-1

Perbedaan rata-rata dari seluruh kelompok perlakuan terhadap ekspresi warna VCAM-1 dengan uji Z5% adalah sebagai berikut:

Tabel 5.1 Hasil rata-rata rank ekspresi warna VCAM-1 pada aorta tikus putih jantan (*Ratus norvegicus*) sirosis yang diinduksi dengan endotoksin *E coli* O₅₅:B₄

Perlakuan	Rank warna VCAM-1 (R)
P0	18 ^a
P1	18 ^a
P2	18 ^a
P3	8 ^b
P4	3 ^b

Dari hasil analisis uji statistik non parametrik dengan menggunakan Uji Kruskal-Wallis, menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata karena $H_{tabel} (0,05) < H_{hitung}$ maka dapat disimpulkan terdapat perbedaan yang nyata diantara kelompok perlakuan. Apabila terdapat perbedaan yang nyata dilanjutkan dengan Uji perbandingan berganda Uji Z 5%. Hasil Uji Z menunjukkan P0, P1, dan P2 menunjukkan ekspresi intensitas warna yang lebih kuat ($P < 0,05$) dibandingkan dengan perlakuan P3 dan P4. Sedangkan diantara P0, P1, dan P3 tidak berbeda nyata. Perlakuan P3 dan P4 tidak menunjukkan perbedaan yang nyata. Hasil tertinggi dengan skor rank 18 didapat pada perlakuan P0, P1, dan P2. Adapun perhitungan statistik ekspresi warna VCAM-1 tertera pada lampiran 1.

5.2 Sel Endotel

Hasil rata-rata penghitungan jumlah sel endotel dari masing-masing perlakuan dapat dilihat pada tabel di bawah ini.

Tabel 5.2 Hasil rata-rata jumlah sel endotel pada aorta tikus putih jantan (*Ratus norvegicus*) sirosis yang diinduksi dengan endotoksin *E coli* O₅₅:B₄

Perlakuan	Jumlah Sel endotel /(1cm) ± SD
P0	6,6920 ^a ± 0,1205
P1	6,2640 ^a ± 0,2281
P2	6,2900 ^a ± 0,4600
P3	2,5980 ^b ± 1,4777
P4	1,0020 ^c ± 0,3932

Keterangan : Superskrip a, b, dan c menunjukkan perbedaan yang sangat nyata (P<0,05).

Analisis statistik dengan sidik ragam menunjukkan perbedaan yang nyata diantara perlakuan. Dilanjutkan dengan LSD menunjukkan P0, P1 dan P2 menunjukkan jumlah sel endotel lebih banyak (P<0,05) dibandingkan dengan P3 dan P4. Perlakuan P3 dan P4 juga menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05). Jumlah sel endotel paling banyak terdapat pada perlakuan kontrol dengan jumlah sel endotel 6,69 dalam interval 1 cm.

Perhitungan statistik jumlah sel endotel masing-masing perlakuan tertera pada lampiran 2.

5.3 Tebal Lapisan VCAM-1 pada Endotel

Hasil pemeriksaan tebal lapisan VCAM-1 masing-masing perlakuan dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 5.3 Hasil rata-rata tebal lapisan VCAM-1 pada endotel aorta tikus putih jantan (*Ratus norvegicus*) sirosis yang diinduksi dengan endotoksin *E coli* O₅₅:B₄

Perlakuan	Tebal VCAM-1(10 ⁻³ cm) ± SD
P0	0,0544 ^b ± 0,01174
P1	0,0705 ^a ± 0,0030
P2	0,0675 ^a ± 0,0038
P3	0,0495 ^b ± 0,0138
P4	0,0039 ^c ± 0,0054

Keterangan : Superskrip a, b, dan c menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05).

Analisis statistik dengan sidik ragam menunjukkan perbedaan tebal VCAM-1 pada endotel yang nyata diantara perlakuan. Perbandingan dengan LSD menunjukkan P1 dan P2 tidak berbeda nyata tetapi keduanya lebih tebal VCAM-1nya (P<0,05) dengan P0 dan P3 serta P4. Diantara P0 dan P3 tidak berbeda nyata tebal VCAM-1nya ditandai dengan superskrip yang sama. Kelompok perlakuan P1 menunjukkan tebal VCAM-1 0,0705 x 10⁻³ cm paling tinggi dibandingkan dengan yang lain.

Perhitungan statistik jumlah sel endotel masing-masing perlakuan tertera pada lampiran 2.

5.4 Diskontinuitas dari Lapisan Elastis Lamina Interna (ELI)

Hasil pemeriksaan diskontinuitas lapisan lamina interna dari masing-masing perlakuan dapat dilihat dalam tabel 5.4.

Tabel 5.4 Hasil rata-rata diskontinuitas dari ELI pada aorta tikus putih jantan (*Ratus norvegicus*) sirosis yang diinduksi dengan endotoksin *E coli* O₅₅:B₄

Perlakuan	Panjang diskontinuitas (10 ⁻³ cm) ± SD
P0	0.0000 ^b ± 0.0000
P1	0.0000 ^b ± 0.0000
P2	0.0000 ^b ± 0.0000
P3	0,0667 ^b ± 0,0147
P4	0,2312 ^a ± 0,0892

Keterangan : Superskrip a, b menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05).

Analisis statistik dengan sidik ragam menunjukkan perbedaan yang nyata diantara perlakuan. Perbandingan dengan LSD menunjukkan, P4 mengalami diskontinuitas lapisan elastis lamina interna lebih panjang dibandingkan dengan kelompok perlakuan P0, P1, P2 dan P3 (P<0,05). Panjang area yang mengalami diskontinuitas pada P4 adalah 0,2312 x 10⁻³ cm.

Perhitungan statistik diskontinuitas lapisan ELI masing-masing perlakuan tertera pada lampiran 2.

5.5 Tebal Lapisan Elastis Lamina Interna

Hasil pemeriksaan tebal lapisan ELI masing-masing perlakuan dapat dilihat tabel berikut.

Tabel 5.5 Hasil rata-rata tebal lapisan ELI pada aorta tikus putih jantan (*Ratus norvegicus*) sirosis yang diinduksi dengan endotoksin *E coli* O₅₅:B₄

Perlakuan	Tebal ELI (10 ⁻³ cm) ± SD
P0	0,0381 ^a ± 0,0047
P1	0,0397 ^a ± 0,0062
P2	0,0365 ^a ± 0,0048
P3	0,0174 ^b ± 0,0063
P4	0,0122 ^b ± 0,0029

Keterangan : Superskrip a, b menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$).

Analisis statistik dengan sidik ragam menunjukkan perbedaan yang sangat nyata diantara perlakuan. Perbandingan dengan LSD menunjukkan P3 dan P4 berbeda nyata ($P < 0,05$) lebih mengalami penipisan lapisan elastis lamina interna dibandingkan dengan perlakuan P0, P1, dan P2. Diantara perlakuan P0, P1, dan P2 tidak berbeda nyata. Tebal lapisan ELI pada P4 adalah $0,0122 \times 10^{-3}$ cm paling tipis dibandingkan dengan perlakuan lain.

Perhitungan statistik tebal lapisan ELI masing-masing perlakuan tertera pada lampiran 2.

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Ekspresi VCAM-1

Pada penelitian ini, hewan model sirosis mengalami endotoksaemia dan menunjukkan ekspresi VCAM-1 yang kuat pada perlakuan dengan interval waktu pengamatan 6 jam, 12 jam dan kontrol. Hal ini disebabkan salah satu respons sel endotel terhadap mediator inflamasi pada kondisi sepsis dengan meningkatkan ekspresi molekul adhesi pada permukaan selnya.

Endotoksin mengaktifkan reseptor (*toll-like receptors*) pada leukosit, monosit, makrofag jaringan, dan sel endotel untuk melepaskan mediator inflamasi (William, 2003). Endotoksin menyebabkan makrofag untuk mensekresikan sitokin antara lain TNF, IL-1, dan IL-12. Sitokin ini dapat ditemukan dalam serum pada individu yang diinfeksi dengan endotoksin dalam beberapa jam setelah diinduksi (Abbas *et al*, 2000).

Menurut Laudes *et al* (2004), berdasarkan studi klinik peningkatan konsentrasi VCAM-1 dan ICAM-1 dalam plasma memprediksikan perkembangan dari sindrom disfungsi multiorgan, kematian neonatal dan kondisi sepsis.

TNF α dan IL-1 menginduksi ekspresi molekul adhesi, sehingga neutrofil dan monosit dapat melekat dengan stabil pada sel endotel pada lokasi terjadinya infeksi. Makrofag dan sel endotel menghasilkan kemokin. Kemokin menstimulasi ekstravasasi leukosit ke lokasi infeksi (Abbas *et al*, 2000).

Michihisa *et al* (2001) menyatakan pentingnya protein GATA (faktor transkripsi sebagai *zinc finger proteins*, mempunyai peranan penting dalam

pertumbuhan dan differensiasi sel, memiliki urutan basa A/TGATA(A/G), sehingga disebut protein GATA) dalam induksi VCAM-1 oleh TNF α . Stimulasi TNF α meningkatkan ekspresi mRNA dari GATA-6. Uji pergeseran mobilitas elektroporetik menunjukkan stimulasi TNF α meningkatkan pengikatan DNA pada GATA-6. Dimana GATA-6 bertindak sebagai regulasi transkripsi gen VCAM-1.

Ekpresi VCAM-1 pada perlakuan kontrol dengan pengamatan 6 jam dan 12 tidak menunjukkan perbedaan yang nyata, hal ini disebabkan jumlah sel endotel yang diantara kelompok tersebut yang mengalami denudasi tidak berbeda nyata, sedangkan VCAM-1 diekspresikan oleh sel endotel itu sendiri.

Pada perlakuan kontrol, hewan mengalami sepsis ditandai dengan adanya peritonitis, dan infeksi di seluruh tubuh. Hal ini mungkin juga disebabkan oleh hambatan pelepasan empedu ke dalam saluran pencernaan yang berfungsi sebagai faktor penghambat pertumbuhan flora normal usus, sehingga pertumbuhan flora normal menjadi berlebihan mengakibatkan sepsis. Hal ini menyebabkan pelepasan mediator inflamasi. Mediator inflamasi seperti TNF, IL-1 akan mengaktifasi peningkatan ekspresi VCAM-1 pada sel endotel. Hal ini sesuai dengan pernyataan Henninger *et al* (1997), TNF α dapat meningkatkan ekspresi molekul adhesi, dengan peningkatan awal terjadi 2 jam hingga 5 jam, level peningkatan tertinggi dicapai 5 hingga 9 jam dan masih meningkat dengan rendah hingga 24 jam.

Pada pengamatan 18 jam dan 24 menunjukkan perbedaan yang nyata dengan kelompok kontrol, 6 jam dan 12 jam dalam mengekspresikan VCAM-1. Hal ini disebabkan karena jumlah sel endotel yang mengalami denudasi meningkat dan berbeda sangat nyata dengan kelompok kontrol, interval

pengamatan 6 jam dan 12 jam. Hal ini sesuai pernyataan Raeburn (2002), pengamatan luas area dan intensitas ekspresi VCAM-1 pada induksi LPS disebabkan oleh peningkatan jumlah sel endotel yang terekspresi dan peningkatan level ekspresi VCAM-1 pada masing-masing endotel.

Berdasarkan penelitian yang sama, menggunakan mikroskop elektron, terjadi perubahan ultrastruktur sel endotel, dengan semakin lama interval waktu pengamatan, perubahan yang mengarah pada kerusakan ultrastruktur seluler semakin jelas dan semakin parah (Misaco, 2005). Kerusakan membran sel dan membran inti dari sel endotel mengakibatkan ekspresi molekul adhesi pada permukaan sel endotel menjadi berkurang.

Hewan coba yang digunakan mengalami sirosis dan mengalami endotoksaemia, sehingga fungsi liver sebagai tempat metabolisme asam lemak (*fatty acid*) menjadi terganggu. Menurut Raffaele *et al* (2000), *fatty acid* dapat menurunkan ekspresi VCAM-1 endotel. *Fatty acid* dapat menurunkan aktivasi sistem NF- κ B terhadap respon sitokin sehingga menurunkan transkripsi gen yang mengkode molekul adhesi. Sitokin akan mengaktifasi NADH atau NADPH oksidase yang menghasilkan oksigen reaktif yang dapat mengaktifkan NF- κ B. Oksigen reaktif dapat ditangkap oleh *fatty acid* yang tidak jenuh sehingga terjadi hambatan aktivasi NF- κ B oleh oksigen reaktif.

6.2 Endotel

Jumlah sel endotel pada pengamatan kelompok kontrol 6 jam dan 12 jam dibandingkan dengan kelompok 18 jam dan 24 jam menunjukkan hasil yang sangat berbeda nyata. Dalam penelitian yang sama, terlihat bahwa waktu kontak

antara sel endotel dan endotoksin menyebabkan perbedaan respon dan derajat jejas pada sel endotel. Pada kelompok kontrol, pemeriksaan dengan elektron mikroskop, tidak menunjukkan perubahan ultrastruktur sel. Hal ini disebabkan saline sebagai larutan isotonis tidak menyebabkan perubahan osmolalitas cairan ekstraseluler apabila diberikan intravaskuler, sehingga tidak terjadi perubahan morfologi sel endotel secara umum (Misaco, 2005).

Perubahan yang terjadi pada perlakuan dengan interval 6 jam, 12 jam, dan 18 jam menunjukkan kerusakan sel endotel, meliputi pembengkakan sel endotel, kerusakan membran sel dan membran inti, perubahan gambaran kromatin inti dan mitokondria serta pembentukan vakuol dengan jumlah dan ukuran yang bervariasi didalam sitoplasma. (Misaco, 2005).

Gambaran ultra struktur sel endotel pada waktu pengamatan 24 jam menunjukkan ciri-ciri sel yang mengalami apoptosis. Ukuran sel menjadi lebih kecil, berbentuk bulat atau oval, terjadi kondensasi kromatin inti, pembentukan *cytoplasmic bleb* dan *apoptotic bodies* terjadi perubahan permeabilitas membran plasma. Inti sel mengalami kerusakan irreversibel ditandai dengan adanya gambaran kariolisis, karioreksis dan piknosis dari inti (Misaco, 2005). Hal tersebut sesuai dengan Meyric (1986) yang menyatakan induksi endotoksin pada sel endotel selama 24 jam, menunjukkan peningkatan sel piknotis dan pelepasan *lactate dehydrogenase* serta *prostacyclin*. Terjadi dilatasi pada *intercellular junctions* dan perubahan seluler menunjukkan peningkatan kontraksi filament sitoplasmik, *nuclear crenation*, penonjolan sitoplasma setelah 30 menit.

Berdasarkan penelitian Bennerman *et al* (2002), endotoksin dapat menginduksi apoptosis pada sel endotel secara *in vivo* maupun *in vitro*. Efek

utama endotoksin pada dinding pembuluh darah adalah sifat sitotoksik terhadap sel endotel (Hanson *et al*, 1985). Sifat sitotoksik ini dapat disebabkan degranulasi leukosit menghasilkan protease (elastase dan *matrix metalloproteinases* yang dapat merusak struktur protein) dan produksi *reactive oxygen species* (ROS). Aktivasi neutrofil menghasilkan ROS dari ikatan membran *NADPH oxidase* yang menghasilkan radikal bebas (*oxygen free radical superoxide and hydroxyl radical*) (Paterson and Webster, 2000). Radikal bebas yang terbentuk akan merusak molekul yang elektronnya ditarik, sehingga menyebabkan gangguan fungsi sel, kerusakan sel bahkan kematian sel. VCAM-1 menyebabkan sel endotel untuk mengaktivasi *NADPH oxidase*, hal ini dibutuhkan untuk migrasi limfosit (Heather *et al*, 2000).

Apoptosis pada sel merupakan regulasi yang normal, kurang dari 0,1% sel endotel mengalami apoptosis. Patogen tertentu dapat menginduksi terjadinya apoptosis. Endotoksin dapat menginduksi apoptosis. Endotoksin dapat meregulasi lebih lanjut *Bcl-2 homologue*, A1 dan *Zinc finger protein*, A20 pada kultur sel endotel. Pada kondisi sepsis melibatkan beberapa mediator yang dapat menyebabkan apoptosis sel endotel antara lain; TNF α , IL-1, interferon, oksigen radikal bebas, dan hipoksia. Interaksi antara sel dalam sirkulasi dan endotel menguatkan signal proapoptosis. Endotoksin mengaktifkan monosit untuk merangsang program kematian sel pada sel endotel dengan kombinasi TNF α . Sel endotel yang mengalami apoptosis menyebabkan peningkatan respon proinflamasi. Sel endotel yang mengalami apoptosis menyebabkan pelepasan IL-1 yang menginduksi pelepasan molekul adhesi ICAM-1 dan VCAM-1, meningkatkan produksi oksigen reaktif (ROS), meningkatkan aktivitas

prokoagulan, menurunkan produksi prostasiklin dan mengaktivasi komplemen. Sel endotel yang sedang mengalami apoptosis menunjukkan peningkatan perlekatan dengan platelet. Pada hewan model tikus yang diinjeksikan secara peritoneal dengan endotoksin menunjukkan sel endotel yang mengalami apoptosis secara meluas (William, 2003).

Salah satu Fungsi liver adalah sintesis fosfolipid yang dibutuhkan dalam pembentukan membran sel (Guyton, 2000), pada penelitian ini hewan model mengalami sirosis dan endotoksaemia menyebabkan terjadinya gangguan sintesis fosfolipid sehingga proses reendotelisasi menjadi terganggu.

Hewan yang mengalami endotoksaemia mengalami penurunan uptake asam amino di usus. Asam amino arginin juga mengalami penurunan dalam plasma pada hewan yang mengalami endotoksaemia. Arginin mempunyai kemampuan untuk memproteksi morfologi sel endotel pada kondisi sepsis. Hal ini karena Arginin dapat membantu sintesa protein dan fibrinogen yang dibutuhkan oleh sel endotel (Eric *et al*, 2000).

Secara normal apabila sel endotel mengalami denudasi atau kematian, maka endotel akan kehilangan kontak sub endotel, sel endotel yang berada di sekitar area akan bermigrasi ke daerah lesi. Proses ini berlangsung terus menerus hingga endotel benar-benar terlepas dari dinding pembuluh darah. Sel endotel normal yang bermigrasi merupakan suatu mekanisme untuk mendorong endotel yang mengalami denudasi ke arah lumen pembuluh darah (Clowes *et al*, 1999). Apabila jejas yang bersifat ireversibel dan sel endotel semakin lama terpapar dengan endotoksin mengakibatkan jumlah sel endotel yang mengalami jejas semakin banyak sehingga meningkatkan sel endotel yang mengalami kematian.

Studi *in vitro* inkubasi sel endotel dengan endotoksin menunjukkan induksi apoptosis dengan regulasi lebih lanjut *Bcl-2 homolog* (William, 2003).

6.3 Tebal Lapisan VCAM-1 pada Endotel

Pada perlakuan interval pengamatan 6 jam dan 12 jam, berbeda nyata dengan interval pengamatan kontrol dan interval pengamatan 18 jam. Hal ini menunjukkan pada perlakuan ini kemampuan sel endotel untuk mengekspresikan molekul adhesi semakin kuat dengan adanya induksi endotoksin jika dibandingkan dengan kontrol. Ekspresi VCAM menurun ditandai dengan semakin menurunnya tebal molekul adhesi, karena sel endotel mulai mengalami perubahan ultrastruktur yang semakin parah dengan lama pemaparan dengan endotoksin. Hal ini seperti terlihat pada perlakuan pengamatan interval 18 jam dan paling rendah mengalami ekspresi VCAM-1 pada perlakuan pengamatan 24 jam, dimana kondisi sel endotel sudah mengalami kerusakan ultrastruktur sehingga mengalami apoptosis.

6.4 Interval Diskontinuitas Lapisan Elastis Lamina Interna

Perlakuan pengamatan interval 24 jam berbeda sangat nyata dengan pengamatan interval 18 jam. Dan kedua interval tersebut sangat berbeda nyata dibandingkan kontrol, pengamatan interval 6 jam dan 12 jam. Pada perlakuan interval 24 jam menunjukkan jumlah bagian yang mengalami diskontinuitas dari lapisan elastis lamina interna meningkat, hal ini karena lapisan ini sel endotelnya sudah mengalami denudasi sehingga terpapar dengan endotoksin. Menurut Meyric *et al* (1986), apoptosis ditemukan 2 jam setelah induksi dengan endotoksin.

Mekanisme normal jejas pada lapisan ini akan menebal menuju pembentukan lapisan elastis lamina yang baru, pada penelitian ini hal ini tidak terlalu tampak, karena inti sel myosit juga mengalami apoptosis, adanya penipisan serabut kolagen dan elastis karena pemaparan dengan endotoksin, sehingga pembentukan lapisan elastis lamina tidak terjadi. Hal ini bisa juga karena pengamatan hanya sampai 24 jam, proses pembentukan lapisan ini membutuhkan waktu yang lebih lama. Hal ini juga tergantung jenis dan lamanya jejas.

6.5 Tebal Lapisan Elastis Lamina Interna

Pada perlakuan ini menunjukkan perbedaan yang nyata diantara perlakuan. Pengamatan interval 6 jam, 12 jam, dan kontrol berbeda nyata dengan perlakuan pengamatan 18 jam dan 24 jam. Semakin lama pemaparan dengan endotoksin menunjukkan jumlah sel endotel yang mengalami denudasi menjadi meningkat sehingga kontak antara lapisan elastis lamina dengan endotoksin meningkat, yang menyebabkan penipisan lapisan ini.

Stoclet *et al* (1997), menyatakan pada kondisi inflamasi sistemik seperti sepsis dan reaksi lokal yang dihasilkan denudasi endotel menghasilkan pelepasan sejumlah besar *nitric oxide* (NO). Hal ini karena induksi ekspresi iNOS (*inducible form of NO-synthase*) oleh rangsangan inflamasi. Produksi yang berlebihan NO dalam darah menyebabkan gangguan sirkulasi dan bersifat sitotoksik pada jaringan sekitar. Menurut Kuang *et al* (1997), pengeluaran NO dapat menurunkan pembentukan lapisan neointima. NO memiliki kemampuan antiproliferasi secara *in vitro*. NO dapat merangsang proliferasi pada konsentrasi rendah pada *Vascular*

Smooth Muscle Cell (VSMCs) tetapi memiliki efek antiproliferasi pada konsentrasi yang tinggi.

Kuang *et al* (1997) menyatakan penurunan pembentukan lapisan neointima pada jejas arterial dikarenakan penurunan proliferasi VSMCs medial dan penurunan ekspresi VCAM-1.

Penelitian pada tikus sebagai model untuk jejas perivaskuler dengan induksi menggunakan *periadventitial collar* pada sekeliling arteri karotis menunjukkan pembentukan lapisan neointima yang tipis setelah hari ke-21 (Kuang *et al*, 1997). Apabila dihubungkan dengan penelitian ini yang pengamatan hanya 24 jam, mungkin terlalu singkat waktunya untuk pembentukan lapisan neointima.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

1. Endotoksin yang diberikan parenteral dapat mengekspresikan molekul adhesi VCAM-1 pada sel endotel pembuluh darah aorta hewan model yang mengalami sirosis. Semakin banyak sel endotel yang mengekspresikan semakin kuat identifikasi VCAM-1 nya. Tebal ekspresi VCAM-1 pada sel endotel dipengaruhi oleh lama interval pengamatan dan perubahan ultrastruktur dari sel endotel itu sendiri
2. Jumlah sel endotel berkurang karena mengalami jejas oleh endotoksin, semakin lama pemaparan sel endotel dengan endotoksin semakin banyak sel yang mengalami gangguan fungsi selnya..
3. Diskontinuitas lapisan elastis lamina interna meningkat sesuai dengan lama pemaparan dengan endotoksin.
4. Lapisan elastis lamina interna semakin menipis sesuai lama pengamatan karena lama kontak dengan endotoksin menyebabkan kerusakan sel yang semakin parah, dan pembentukan lapisan neointima membutuhkan waktu pengamatan yang lebih lama.

7.2 Saran

1. Perlu dilakukan kontrol pemeriksaan VCAM-1 secara *in vivo* pada penderita sirosis untuk mengetahui kondisi inflamasi sistemik pada penderita sirosis.

Hal ini diharapkan dapat mengurangi resiko perdarahan yang sering terjadi pada penderita sirosis. Dengan penatalaksanaan terapi pencegahan lebih awal.

2. Perlu dilakukan penelitian menggunakan molekul adhesi yang lain berkaitan dengan endotoksaemia seperti solubel ICAM-1 dan VCAM-1.
3. Perlu dilakukan penelitian dengan menggunakan dosis endotoksin yang lebih rendah dan pengamatan yang lebih lama sehingga bisa mengamati pembentukan lapisan neointima.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas K. Abul, Lichtman H. Andrew, Pober S. Jordan, 2000. Cellular and Molecular Immunology. 4th Ed. W.B. Saunders Company, California, USA.
- Abe Y, K. Sugisaki, A.M. Dannenberg, 1996. Rabbit Vascular Endothelial Adhesion Molecules: ELAM-1 is most elevated in acute inflammation, whereas VCAM-1 and ICAM-1 predominate in chronic inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, Vol. 60, Issue 6 692-703, Department of Environmental Health Sciences, School of Hygiene and Public Health, The Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland 21205, USA.
- Anonymous, 1997. Increased Expression of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 by Aortic Endothelium of Rabbits with *Pasteurella multocida* Pneumonia. *Laboratory Animal Science* 47 (1): 027.
- Anonymous, 1997. VCAM-1 / CD106. First Printed and R&D Systems.
- Benites R. Michael, 1999. Atherosclerosis: An infectious Disease? Hospital Practise. University of Maryland, Baltimore, USA.
- Daniel W, 1989. Statistik Non Parametrik Terapan. Terjemahan Alex Tri Kantjono W. Penerbit PT Gramedia. Jakarta. Hal. 258-264, 272-276.
- Eric Wiel, Qian Pu, Delphine Corseaux, Emmanuel Robin, Regis Bordet, Niels Lund, Brigitte Jude, Benoit Vallet, 2000. Effect of L-Arginine on Endothelial Injury and Hemostasis in Rabbit Endotoxin Shock., *J Appl Physiol* Vol. 89: 1811-1818.
- Gearing AJH, W. Newman, 1993. Circulating Adhesion Molecules in Disease. *Immunol. Today* 14, 506.
- Gill, 2001. Modulation of Soluble Phases of Endothelial/Leucocyte Adhesion Molecule-1 and Vascular Adhesion Molecule-1, within Interleukin-1 β after Experimental Endotoxic Challenge. *Crit Care Med*. Apr; 29 (4): 776-781.
- Guyton AC, Hall JE, 2000. Textbook of Medical Physiology. 10th Ed. W.B. Saunders Co., Philadelphia, USA.
- Hasegawa N, T.G. Kandra, A.W. Husari, S. Veiss, W.T. Hart, J. Hedgpeth, R. Wydro, T.A. Raffin, 1996. The Effects of Recombinant Human Thrombomodulin on Endotoxin-induced Multiple-system Organ Failure in Rats. Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Stanford University Medical Center, Stanford, California, USA.

- Henseleit U, Steinbrink K, Sunderkotter C, Goebeler M, Roth J, Sorg C, 1995. Expression of Murine VCAM-1 *in Vitro* and in Different Models of Inflammation *in Vivo*: Correlation with Immigration of Monocytes: *Exp Dermatol.* Oct; 4 (5): 249-256. Institute of Experimental Dermatology, University of Munster, Germany.
- Heninger DD, Panes J, Eppihimer M, Russell J, Gerritsen M, Anderson DC, Granger DN, 1997. Cytokine-Induced VCAM-1 and ICAM-1 Expression in Different Organs of the Mouse. Department of Physiology and Biophysics, Louisiana State University Medical Center, Shreveport 71130, USA.
- Hansson GK, S. Chao, S.M. Schwartz, M.A., 1985. Aortic Endothelial Cell Death and Replication in Normal and Lipopolysaccharide-Treated Rats. *American Journal of Pathology*, Vol. 121, 123-127.
- Heather E. Matheny, Tracy L. Deem, Joan M. Cook-Mills, 2000. Lymphocyte Migration Through Monolayer of Endothelial Cell Lines Involves VCAM-1 Signaling via Endothelial Cell NADPH Oxidized. *The Journal of Immunology*, 164: 6550-6559.
- Julwan, 2002. Disfungsi Endotel dan Aterosklerosis Koroner.
- Kenji Kishi, Kazuhiro Hirai, Kazufumi Hiramatsu, Tohru Yamasaki, Masaru, 1999. Clindamycin Suppresses Endotoxin by Cefotaxime-Treated *Escherichia coli* O55:B5 and Subsequent Production of Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin-1 β . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, March 1999, pp. 616-622, Vol. 43, No.3. Oita Medical University, Hasama, Japan.
- Kuang-Yuh Chyu, Paul Dimayuga, Jenny Zhu, Jan Nilsson, Sanjay Kaul, Prediman K.Shah, Bojan Cercek, 1999. Decreased Neointimal Thickening After Arterial Wall Injury in Inducible Nitric Oxide Synthase Knockout Mice. *Circulation Research* 1999; 85: 1192. American Heart Association, Inc.
- Kliche Stefanie, 2004. Adhesion and Migration of T Cells, Adapter Protein, SKAP-55, SLP-130. University of Magdeburg.
- Laudes Ines J, Ren-Feng Guo, Niels C. Riedemann, Cecilia Speyer, Ron Craig, J. Vidya Sarma, Peter A. Ward, 2004. Disturbed Homeostasis of Lung Intercellular Adhesion Molecule-1 and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 During Sepsis *American Journal of Pathology*. 164: 1435-1445.
- Maria, 2003. Endothelial Cell Biology, Perivascular Inflammation and Vasculitis. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*. Volume 69.
- Meyrick BO, U.S. Ryan, K.L. Brigham, 1986. Direct Effects of *E coli* Endotoxin on Structure and Permeability of Pulmonary Endothelial Monolayers and the

Endotelial Layer of Intimal Explants. *American Journal of Pathology*, Vol. 122, 140-151.

- Michihisa Umetani, Chikage Mataka, Naoko Minegishi, Masayuki Yamamoto, Takao Hamakubo, Tatsuhiko Kodama, 2001. Function of GATA Transcription Factors in Induction of Endothelial Vascular Cell Adhesion Molecule-1 by Tumor Necrosis Factor- α . *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 21: 917.
- Misaco Wiwik, 2005. Gambaran Ultrastruktur Endotel Pembuluh Darah Aorta Tikus Putih (*Ratus Norvegicus*) sebagai Hewan Model Sirosis yang Diinduksi dengan Endotoksin *E coli O55:B4*. Tesis, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Nakanuma Y, Tsuneyama K, Sasaki M, Harada K, 2000. Destruction of Bile Ducts in Primary Biliary Cirrhosis. Department of Pathology, Kanazawa University School of Medicine, Kanazawa, 920-8640, Japan: *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2000 Aug; 14 (4): 549-570.
- Paterson RL, Webster NR, 2000. Sepsis and the Systemic Inflammatory Response Syndrome. University of Aberdeen, UK.
- Roitt, Brostoff, D. Male, 2001. *Immunology* 6th Edition, Harcourt Publisher Ltd., London, UK.
- Raeburn D. Christopher, Casey M. Calkin, Michael A. Zimmerman, Yong Song, Lihua Ao, Anirban Banerjee, Alden H. Harken, Xianzhong Meng, 2002. ICAM-1 and VCAM-1 Mediate Endotoxemic Myocardial Dysfunction Independent of Neutrophil Accumulation. *Am J Physiol regul Integr Comp Physiol* 283: R477-R486. Vol. 283.
- Raffaele De Caetrina, James K. Liao, Peter Libby, 2000. Fatty Acid Modulation of Endothelial Activation. *American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 71, No. 1, pp. 213-223.
- Scherer, 1994. The Effect of Substitution with AT III and PPSB Concentrates in patient with Terminal Liver Insufficiency. *Anaesthesist Mar*; 43 (3): 178-182.
- Sutjihno, 1986. Rancangan Percobaan. Bogor.
- Simoncini Tommaso, Silvia Maffei, Giuseppina Basta, Giuseppina Barsacchi, Andrea R. Genazzani, James K. Liao, Raffaele De Caterina, 2003. Effects of Sex Steroid Hormon on Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) Gene Expression in Activated Endotelial Cells. University of Pisa, Italy.
- Slomianka Luiz, 2003. *Blue Histology – Vascular System*. University of Western, Australia.

- Soop, Anne, 2003. Experimental Studies on Endotoxin Infusion in Human: Evaluation of Pharmacological Immunomodulation by Adenosine and Nicotinamide, Karolinska Institutet.
- Stoclet JC, B. Muller, R. Andrantsitohaina, A. Kleschyov, 1997. Overproduction of Nitric Oxide in Pathophysiology of Blood Vessels. Laboratoire de Pharmacologie et Physiopathologie Cellulaires, URA CNRS 600, Université Louis Pasteur de Strasbourg, 74, route du Rhin, BP 24, 67401 Illkirch, France.
- Thomas F. Luscher, Matthias Barton, 1997. Biology of Endothelium. Clin. Cardiol. Vol. 20 (Suppl. II), II-3-II-10.
- Weiner Wiener-Kronish JP, Albertine KH, Matthay MA, 1991. Differential responses of the endothelial and epithelial barriers of the lung in sheep to Escherichia coli endotoxin. J Clin Invest. 1991 Sep; 88 (3): 864-875 Cardiovascular Research Institute, University of California, San Francisco 94143-0130, USA.
- William C. Aird, 2003. The Role of Endothelium in Severe Sepsis and Multiple Organ Dysfunction Syndrome. Blood. Vol. 101. No. 10, pp. 3765-3777.

Lampiran 1

Penentuan Peringkat (Rank)

Angka-angka yang menunjukkan nilai skor perubahan gambaran ekspresi VCAM-1, baik dari satu kelompok perlakuan maupun dalam kelompok perlakuan yang lain, akan diberikan peringkat (rank) yang sama. Penentuan peringkat (rank) dicari dengan cara menjumlahkan nilai skor perubahan ekspresi warna VCAM-1 terkecil dibagi dengan banyaknya nilai skor perubahan ekspresi warna VCAM-1 tersebut, maka diperoleh hasil sebagai berikut :

Nilai skor perubahan ekspresi warna VCAM-1 = 0 mempunyai rank:

$$\frac{1+2+3+4+5}{5} = 3$$

Nilai skor perubahan ekspresi warna VCAM-1 = 1 mempunyai rank:

$$\frac{6+7+8+9+10}{5} = 8$$

Nilai skor perubahan ekspresi warna VCAM-1 = 2 mempunyai rank: 0

Nilai skor perubahan ekspresi warna VCAM-1 = 3 mempunyai rank:

$$\frac{11+12+13+14+\dots+25}{1} = 18$$

Uji Kruskal – Wallis

Setelah menentukan peringkat (rank) dari nilai skor ekspresi warna VCAM-1 yang sama kemudian dilanjutkan dengan mencari nilai H hitung dengan menggunakan rumus:

$$H_{hitung} = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{j=1}^k \frac{R_j^2}{n_j} - 3(N+1)$$

Keterangan :

N = Jumlah seluruh preparat pewarnaan VCAM-1

R_j^2 = Jumlah rank kuadrat pada kelompok perlakuan ke j

n_j = Jumlah ulangan pada kelompok perlakuan ke j

Maka :

$$H_{hitung} = \frac{12}{25(25+1)} \left[\frac{90^2+90^2+90^2+40^2+15^2}{5} \right] - 3(25+1)$$

$$= 18,46$$

Karena dalam data terdapat angka kembar, maka harus dilakukan koreksi terhadap hasil H_{hitung} agar diperoleh hasil yang lebih signifikan. Rumus yang digunakan adalah:

$$\text{Hhit terkoreksi} = \frac{\text{Hhit}}{1 - \frac{\sum T}{N^3 - N}}$$

Keterangan:

$\sum T$ = Total seluruh nilai pengamatan dari seluruh kelompok skor yang berangka sama

N = Jumlah seluruh preparat pewarnaan VCAM-1

Sebelum mencari nilai Hhitung terkoreksi terlebih dahulu mencari nilai $\sum T$ dengan rumus

$$T_i = t^3 - t$$

Maka diperoleh :

$$T_0 = 5^3 - 5 = 120$$

$$T_1 = 5^3 - 5 = 120$$

$$T_3 = 15^3 - 15 = 3375 - 15 = 3360$$

$$\sum T = \sum(t^3 - t) = 3600$$

Karena nilai Hhitung dan $\sum T$ sudah diketahui, maka nilai Hhitung terkoreksi dapat ditentukan sehingga diperoleh :

$$\text{Hhitung terkoreksi} = \frac{18,46}{1 - \frac{3600}{25^3 - 25}}$$

Hhitung terkoreksi = 23,998

Selanjutnya menentukan nilai derajat bebasnya dengan rumus:

$$Db = t - 1$$

Keterangan:

Db = derajat bebas

t = Banyaknya perlakuan

Maka diperoleh :

$$Db = 5 - 1 = 4$$

Setelah diketahui nilai Hhitung terkoreksi = 23,998 dan derajat bebas = 4, maka dapat ditentukan nilai H table

$$H_{tabel} (0,05) = 9,49$$

$$H_{tabel} (0,01) = 13,3$$

Karena $H_{tabel} (0,05) < H_{hitung} > H_{tabel} (0,01)$, maka dapat disimpulkan terdapat perbedaan yang sangat nyata diantara kelompok perlakuan. Jadi, hipotesis yang diajukan pada penelitian ini ditolak.

Uji Perbandingan Berganda

Karena terdapat perbedaan yang sangat nyata diantara kelompok perlakuan, maka dilanjutkan dengan Uji Perbandingan Berganda (Uji Z) 5%.

Dari hasil analisis data dengan Uji Z%, akan dapat diketahui urutan tingkat perubahan ekspresi VCAM-1 diantara kelima kelompok perlakuan.

Rumus

$$\left| \bar{R}_i - \bar{R}_j \leq Z \sqrt{\frac{k[N(N^2-1) - \sum(t^3-t)]}{6N(N-1)}} \right|$$

Keterangan :

R_i = Rata-rata pada kelompok perlakuan ke i

R_j = Rata-rata rank pada kelompok perlakuan ke j

Z = Nilai Z table

K = Banyaknya perlakuan

N = Jumlah seluruh preparat pewarnaan VCAM-1

T = Banyaknya nilai pengamatan yang sama dalam sekelompok skor yang berangka sama

Untuk menentukan nilai Ztabel dengan taraf nyata 0,05 dan k = 5 maka dapat dihitung dengan rumus :

$$Z = \frac{\alpha}{k(k-1)}$$

Keterangan :

α : Taraf nyata

k : Banyaknya perlakuan

Sehingga akan diperoleh:

$$Z = \frac{0,05}{5(5-1)} = 0,0025$$

Maka Z table (0,05,5) = 2,81

Selanjutnya dilakukan perhitungan Uji Z 5%

Perhitungan uji Z%

$$2,81 \sqrt{\frac{5\{25(25^2-1) - 3600\}}{(6 \times 25)(25-1)}}$$

= 11,47

Perbedaan rata-rata dari seluruh kelompok perlakuan terhadap ekspresi warna VCAM-1 dengan uji Z5%

Perlakuan	Rata-rata Rank (R)	Beda selisih					Uji Z 5%
		R-P0	R-P1	R-P2	R-P3	R-P4	
P0	18 ^a	15	10				11,47
P1	18 ^a	15	10				
P2	18 ^a	15	10				
P3	8 ^b	5					
P4	3 ^b						

Penentuan Notasi

$P0^a$	$P1^a$	$P2^a$	$P3^b$	$P4^b$
18	18	18	8	3

a

b

Lampiran 2 Analisa Varian

Tabel hasil penelitian

n	Perlakuan	Endotel/cm	VCAM-1 (10^{-3} cm)	Diskontinuitas (10^{-3} cm)	ELI (10^{-3} cm)
1	P0	6.67	0.053	0	0.036
2	P0	6.67	0.047	0	0.0335
3	P0	6.89	0.0485	0	0.0375
4	P0	6.56	0.0485	0	0.0375
5	P0	6.67	0.075	0	0.046
6	P1	6.22	0.075	0	0.0375
7	P1	6.44	0.072	0	0.0405
8	P1	5.89	0.068	0	0.036
9	P1	6.44	0.068	0	0.05
10	P1	6.33	0.0695	0	0.0345
11	P2	6.56	0.0695	0	0.0445
12	P2	6.89	0.068	0	0.0335
13	P2	6.33	0.068	0	0.0375
14	P2	5.89	0.071	0	0.0335
15	P2	5.78	0.061	0	0.0335
16	P3	5.11	0.025	0.189	0.025
17	P3	2	0.053	0.0445	0.0125
18	P3	2.22	0.0585	0	0.0235
19	P3	1.22	0.0555	0.028	0.0125
20	P3	2.44	0.0555	0.072	0.0135
21	P4	1	0	0.1555	0.011
22	P4	0.89	0	0.1945	0.012
23	P4	1.67	0.0085	0.178	0.013
24	P4	0.78	0.011	0.25	0.0085
25	P4	0.67	0	0.378	0.0165

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		ENDOTEL	VCAM	DISKONTIN	ELI
N		25	25	25	25
Normal Parameter s	Mean	4.5692	.049160	.059580	.028780
	Std. Deviation	2.45989	.0257126	.1028760	.0127083
Most Extreme Differenc es	Absolute	.289	.227	.359	.245
	Positive	.173	.157	.359	.165
	Negative	-.289	-.227	-.281	-.245
Kolmogor ov- Smirnov Z		1.444	1.133	1.794	1.224
Asymp. Sig. (2- tailed)		.031	.154	.003	.100

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

Oneway

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ENDOTEL	Between Groups	134.752	4	33.688	64.329	.000
	Within Groups	10.474	20	.524		
	Total	145.225	24			
VCAM	Between Groups	.014	4	.004	46.908	.000
	Within Groups	.002	20	.000		
	Total	.016	24			
DISKONTI	Between Groups	.201	4	.050	18.856	.000
	Within	.053	20	.003		

	Within Groups	.053	20	.003		
	Total	.254	24			
ELI	Between Groups	.003	4	.001	31.880	.000
	Within Groups	.001	20	.000		
	Total	.004	24			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) WAKTU	(J) WAKTU	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
ENDOTEL	6 jam	6 jam	.4280	.45768	.361	-.5267	1.3827
		12 jam	.4020	.45768	.390	-.5527	1.3567
		18 jam	4.0940	.45768	.000	3.1393	5.0487
		24 jam	5.6900	.45768	.000	4.7353	6.6447
	12 jam	6 jam	-.4280	.45768	.361	-1.3827	.5267
		12 jam	-.0260	.45768	.955	-.9807	.9287
		18 jam	3.6660	.45768	.000	2.7113	4.6207
		24 jam	5.2620	.45768	.000	4.3073	6.2167
	18 jam	6 jam	-.4020	.45768	.390	-1.3567	.5527
		12 jam	.0260	.45768	.955	-.9287	.9807
		18 jam	3.6920	.45768	.000	2.7373	4.6467
		24 jam	5.2880	.45768	.000	4.3333	6.2427
	24 jam	6 jam	-4.0940	.45768	.000	-5.0487	-3.1393
		12 jam	-3.6660	.45768	.000	-4.6207	-2.7113
		18 jam	-3.6920	.45768	.000	-4.6467	-2.7373
		24 jam	1.5960	.45768	.002	.6413	2.5507
VCAM	6 jam	6 jam	-5.6900	.45768	.000	-6.6447	-4.7353
		12 jam	-5.2620	.45768	.000	-6.2167	-4.3073
		18 jam	-5.2880	.45768	.000	-6.2427	-4.3333
		24 jam	-1.5960	.45768	.002	-2.5507	-.6413
	12 jam	6 jam	-.016100	.0055288	.009	-.027633	-.004567
		12 jam	-.013100	.0055288	.028	-.024633	-.001567
		18 jam	.004900	.0055288	.386	-.006633	.016433
		24 jam	.050500	.0055288	.000	.038967	.062033

6 jam	6 jam	.016100	.0055288	.009	.004567	.027633
12 jam	12 jam	.003000	.0055288	.593	-.008533	.014533
18 jam	18 jam	.021000	.0055288	.001	.009467	.032533
24 jam	24 jam	.066600	.0055288	.000	.055067	.078133
6 jam	6 jam	.013100	.0055288	.028	.001567	.024633
12 jam	12 jam	-.003000	.0055288	.593	-.014533	.008533
18 jam	18 jam	.018000	.0055288	.004	.006467	.029533
24 jam	24 jam	.063600	.0055288	.000	.052067	.075133
6 jam	18 jam	-.004900	.0055288	.386	-.016433	.006633
6 jam	6 jam	-.021000	.0055288	.001	-.032533	-.009467
12 jam	12 jam	-.018000	.0055288	.004	-.029533	-.006467
24 jam	24 jam	.045600	.0055288	.000	.034067	.057133
6 jam	24 jam	-.050500	.0055288	.000	-.062033	-.038967
6 jam	6 jam	-.066600	.0055288	.000	-.078133	-.055067
12 jam	12 jam	-.063600	.0055288	.000	-.075133	-.052067
18 jam	18 jam	-.045600	.0055288	.000	-.057133	-.034067
6 jam	6 jam	.000000	.0326301	1.000	-.068065	.068065
12 jam	12 jam	.000000	.0326301	1.000	-.068065	.068065
18 jam	18 jam	-.066700	.0326301	.054	-.134765	.001365
24 jam	24 jam	-.231200	.0326301	.000	-.299265	-.163135
6 jam	6 jam	.000000	.0326301	1.000	-.068065	.068065
12 jam	12 jam	.000000	.0326301	1.000	-.068065	.068065
18 jam	18 jam	-.066700	.0326301	.054	-.134765	.001365
24 jam	24 jam	-.231200	.0326301	.000	-.299265	-.163135
6 jam	6 jam	.000000	.0326301	1.000	-.068065	.068065
12 jam	12 jam	.000000	.0326301	1.000	-.068065	.068065
18 jam	18 jam	-.066700	.0326301	.054	-.134765	.001365
24 jam	24 jam	-.231200	.0326301	.000	-.299265	-.163135
6 jam	6 jam	.000000	.0326301	1.000	-.068065	.068065
12 jam	12 jam	.000000	.0326301	1.000	-.068065	.068065
18 jam	18 jam	-.066700	.0326301	.054	-.134765	.001365
24 jam	24 jam	-.231200	.0326301	.000	-.299265	-.163135
6 jam	6 jam	.000000	.0326301	1.000	-.068065	.068065
12 jam	12 jam	.000000	.0326301	1.000	-.068065	.068065
18 jam	18 jam	-.066700	.0326301	.054	-.134765	.001365
24 jam	24 jam	-.231200	.0326301	.000	-.299265	-.163135
6 jam	6 jam	.000000	.0326301	1.000	-.068065	.068065
12 jam	12 jam	.000000	.0326301	1.000	-.068065	.068065
18 jam	18 jam	-.066700	.0326301	.054	-.134765	.001365
24 jam	24 jam	-.231200	.0326301	.000	-.299265	-.163135
6 jam	6 jam	.164500	.0326301	.000	.096435	.232565
12 jam	12 jam	.231200	.0326301	.000	.163135	.299265
18 jam	18 jam	.231200	.0326301	.000	.163135	.299265
24 jam	24 jam	-.164500	.0326301	.000	-.232565	-.096435
6 jam	6 jam	.066700	.0326301	.054	-.001365	.134765
12 jam	12 jam	.066700	.0326301	.054	-.001365	.134765
18 jam	18 jam	-.231200	.0326301	.000	-.299265	-.163135
24 jam	24 jam	-.066700	.0326301	.054	-.134765	.001365
6 jam	6 jam	.000000	.0326301	1.000	-.068065	.068065
12 jam	12 jam	.000000	.0326301	1.000	-.068065	.068065
18 jam	18 jam	-.066700	.0326301	.054	-.134765	.001365
24 jam	24 jam	-.231200	.0326301	.000	-.299265	-.163135
6 jam	6 jam	.001600	.0032419	.627	-.005163	.008363
12 jam	12 jam	.020700	.0032419	.000	.013937	.027463
18 jam	18 jam	.020700	.0032419	.000	.013937	.027463
24 jam	24 jam	.025900	.0032419	.000	.019137	.032663
6 jam	6 jam	.001600	.0032419	.627	-.005163	.008363
12 jam	12 jam	.003200	.0032419	.335	-.003563	.009963
18 jam	18 jam	.022300	.0032419	.000	.015537	.029063
24 jam	24 jam	.027500	.0032419	.000	.020737	.034263
6 jam	6 jam	-.001600	.0032419	.627	-.008363	.005163
12 jam	12 jam	-.001600	.0032419	.627	-.008363	.005163
18 jam	18 jam	.001600	.0032419	.627	-.008363	.005163
24 jam	24 jam	-.001600	.0032419	.627	-.008363	.005163
6 jam	6 jam	.003200	.0032419	.335	-.003563	.009963

		18 jam	.019100	.0032419	.000	.012337	.025863
		24 jam	.024300	.0032419	.000	.017537	.031063
	18 jam	6 jam	-.020700	.0032419	.000	-.027463	-.013937
		6 jam	-.022300	.0032419	.000	-.029063	-.015537
		12 jam	-.019100	.0032419	.000	-.025863	-.012337
		24 jam	.005200	.0032419	.124	-.001563	.011963
	24 jam	6 jam	-.025900	.0032419	.000	-.032663	-.019137
		6 jam	-.027500	.0032419	.000	-.034263	-.020737
		12 jam	-.024300	.0032419	.000	-.031063	-.017537
		18 jam	-.005200	.0032419	.124	-.011963	.001563

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

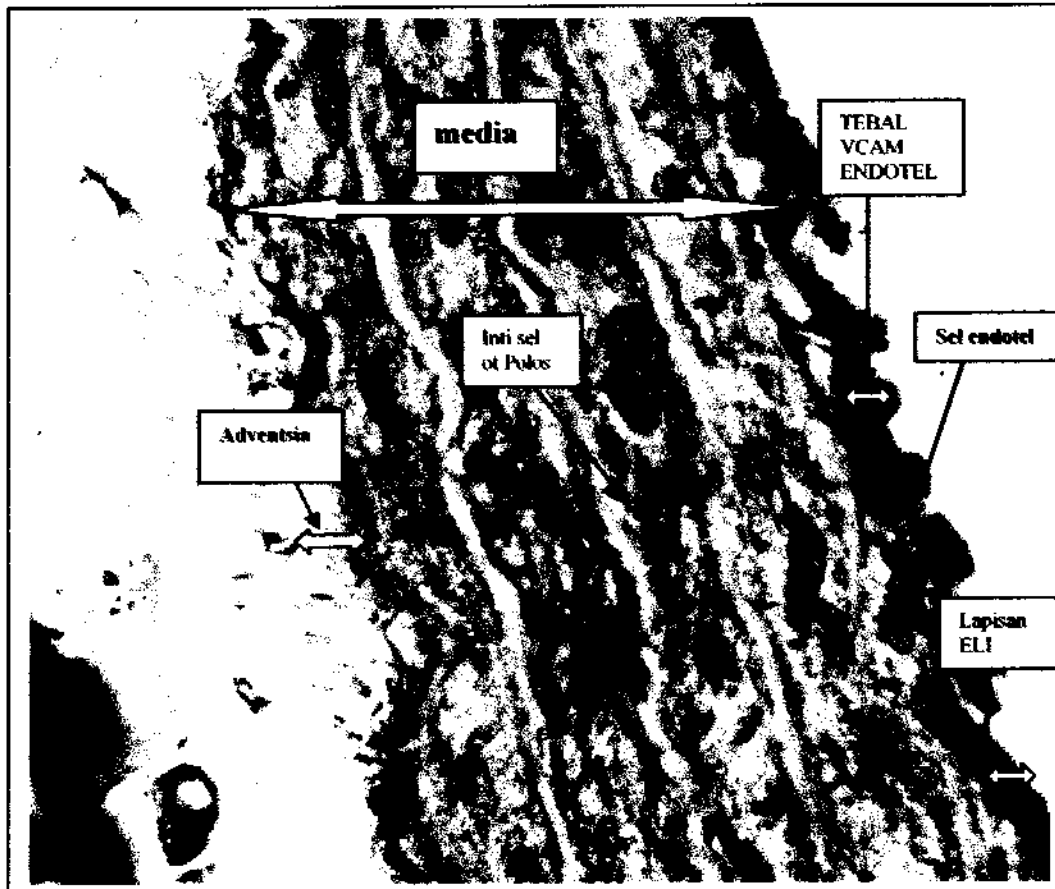
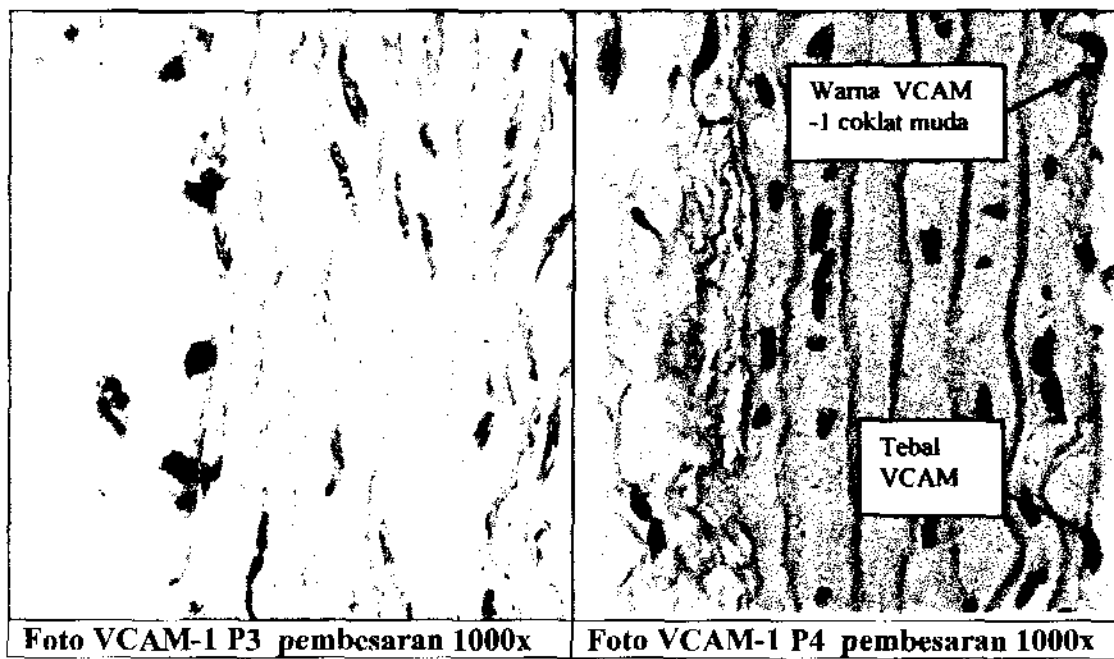
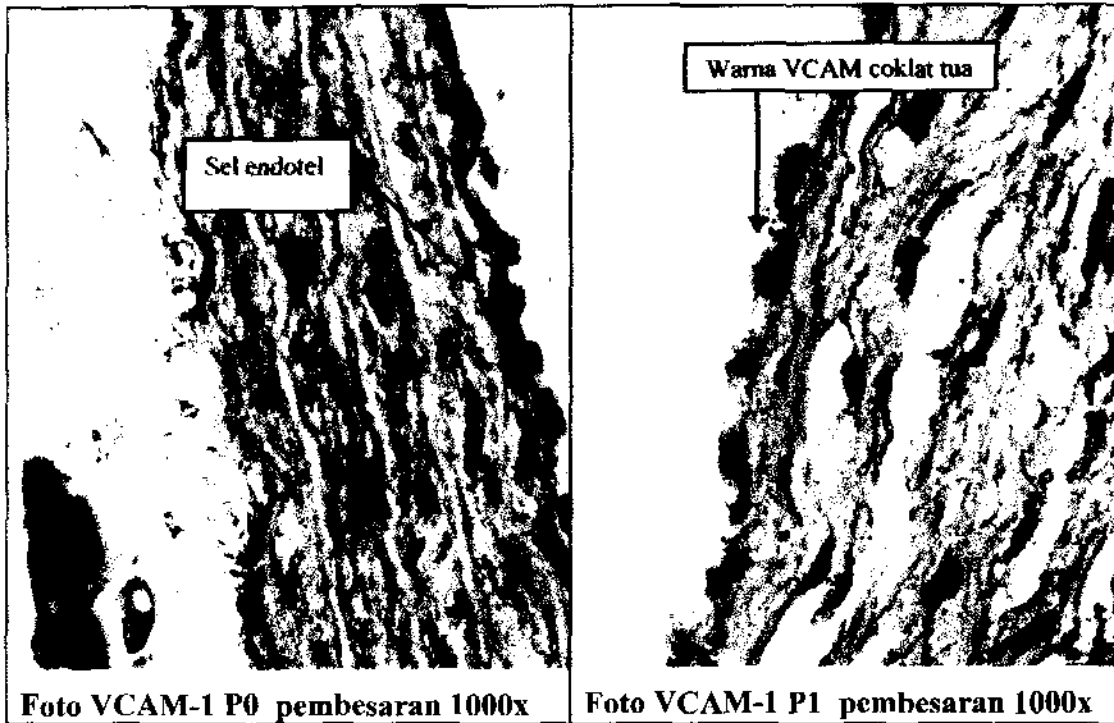
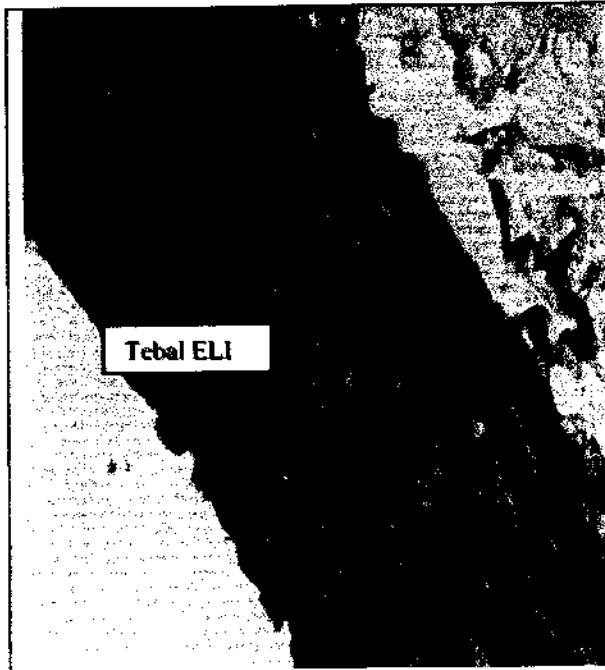
Lampiran 3. Foto-foto Hasil penelitian**Gambar Pewarnaan VCAM-1 P0, dengan pembesaran 1000x**

Foto-foto Hasil Penelitian

Pewarnaan VCAM-1



Pewarnaan HE



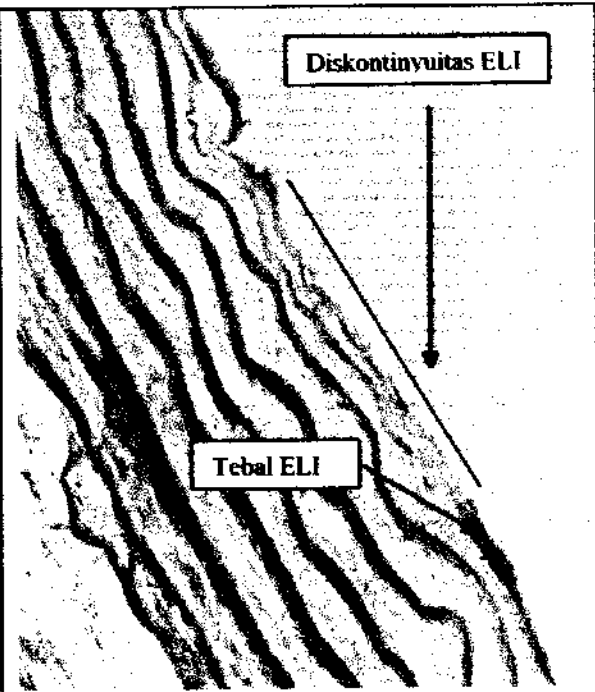
Pewarnaan HE P0, pembesaran 1000x



Pewarnaan HE P1, pembesaran 1000x



Pewarnaan HE P3, pembesaran 1000x



Pewarnaan HE P4, pembesaran 1000x

Lampiran 4

Pembuatan Preparat Immunohistokimia VCAM-1

Fiksasi

Bertujuan untuk menghentikan proses metabolisme jaringan, mencegah terjadinya degenerasi pasca mati, mematikan kuman atau bakteri, menjadikan jaringan lebih keras sehingga lebih mudah dipotong dan meningkatkan afinitas jaringan terhadap bermacam-macam zat warna.

Cara kerja : Hasil eksisi pembuluh darah aorta difiksasi dengan dimasukkan pot plastik yang berisi buffer formalin 10%.

Cuci dengan air mengalir ± 20 menit

Dehidrasi dan Clearing

Bertujuan untuk menarik air dari jaringan, membersihkan, dan menjernihkan jaringan.

Tahapan dehidrasi:

Bahan	Ulangan	Lama
Alkohol 70 %	2 X	1 jam
Alkohol 80%	2 X	1 jam
Alkohol 96%	2 X	1 jam
Alkohol Absolut	2 X	1 jam

Tahapan clearing: xylol/xylene

Bahan	Ulangan	Lama
Xylol/xylene	3 X	1 jam

Infiltrasi

Untuk menginfiltrasi jaringan dengan parafin. Parafin ini akan menembus ruangan antar sel dan dalam sel sehingga jaringan menjadi lebih tahan terhadap pemotongan.

Impregnasi parafin (1 bagian parafin murni: 1 bagian xylene)

Bahan	Ulangan	Lama
Impregnasi parafin	1 X	15 – 30 menit
Impregnasi parafin	3 X	2 jam

Pembuatan Balok Parafin

Bertujuan supaya jaringan mudah dipotong. Menggunakan reagen paraffin cair.

Cara kerja : Disiapkan beberapa cetakan besi yang sebelumnya telah diolesi gliserin dengan maksud mencegah melekatnya parafin pada cetakan besi tersebut. Kemudian cetakan besi tersebut diisi dengan parafin cair dan panas. Selanjutnya organ endotel dimasukkan dengan pinset ke dalam cetakan besi.

Pemotongan

Untuk memotong jaringan setipis mungkin agar dapat dilihat di bawah mikroskop menggunakan alat mikrotom.

Cara kerja : Pemotongan diambil secara random, tiap 10 kali pemotongan yang dilakukan seri, diambil satu dengan ketebalan 2-6 μ m. Dibiarkan kering di udara.

Deparafinisasi

Bahan	Ulangan	Lama
Xylol	3 X	5 menit
Alkohol absolut	2 X	3 menit
Alkohol 96%	2 X	3 menit
Alkohol 80%	1 X	3 menit
Alkohol 70%	1 X	3 menit

Cuci dengan air mengalir \pm 1 menit

Tahapan Pewarnaan VCAM-1

1. Trypsin 0,025% ± selama 15 – 30 menit, pada suhu 37°C, cuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit dan diulang sekali.
2. Tambahkan H₂O₂ 3% (1 bagian H₂O₂ 30%+9 bagian aqua) selama 10 menit.
3. Cuci PBS selama 5 menit dan diulang sekali lagi.
4. Primer Antibodi primer VCAM-1 selama 45 menit hingga 1 jam.
5. Cuci dengan PBS selama 5 menit dan diulang sekali lagi.
6. Antibodi sekunder selama 30 menit.
7. Cuci dengan PBS selama 5 menit dan diulang sekali lagi.
8. Streptavidin selama 30 menit.
9. Cuci dengan PBS selama 5 menit dan diulang sekali lagi.
10. DAB – chromogen selama 6 hingga 10 menit.
11. Cuci dengan PBS, Aqua dan air mengalir masing-masing 5 menit.
12. Pewarnaan counter: Meyer's Haemotoxylin selama 10 hingga 15 menit.
13. Cuci dengan air mengalir.
14. Dikeringkan diudara.
15. Mounting.